

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Saniye ŞEN

**DENEYSEL DİYABETİK NEFROPATİDE  
İRBESARTAN, ANTIOKSİDAN VE KOMBİNASYON  
TEDAVİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Hande PEYNİRCİ**

EDİRNE-2010

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalıőmam sırasında değerli fikirleriyle bana yol gösteren, destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Saniye ŞEN'e, eğitim sürecime bilgi ve tecrubeleriyle katkıda bulunan İç Hastalıkları A.D.'daki tüm hocalarıma, tezimin her aőamasında tecrbe ve bilgisiyle desteğini gördüğüm sayın Yrd. Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĐ'a, deney aőamasında yardımcı olan Histoloji A.D.'dan Prof. Dr. Mehmet KANTER ve Uzm. Dr. Cevat AKTAŐ'a, laboratuvar çalışmalarında destek veren Yük. Kimyager Őentürk ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Hakan ERBAŐ, Yrd. Doç. Dr. Hakan KUNDURACILAR'a, tüm asistan, uzman arkadaşlarıma ve hastane çalıőanlarına saygılarımla teőekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>DİABETES MELLİTUS</b> .....	3
<b>DİYABETİK NEFROPATİ</b> .....	5
<b>DİYABETİK NEFROPATİDE HİSTOPATOLOJİ</b> .....	16
<b>RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ</b> .....	18
<b>RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ VE</b> <b>DİYABETİK NEFROPATİ</b> .....	23
<b>ANJİOTENSİN II TİP 1 RESEPTÖR BLOKERLERİ</b> .....	26
<b>NİGELLA SATİVA VE DİYABET</b> .....	28
<b>N-ASETİL SİSTEİN VE DİYABET</b> .....	30
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	32
<b>BULGULAR</b> .....	41
<b>TARTIŞMA</b> .....	88
<b>SONUÇLAR</b> .....	102
<b>ÖZET</b> .....	104
<b>SUMMARY</b> .....	106
<b>KAYNAKLAR</b> .....	108
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ACE</b>	: Angiotensin converting enzyme (Anjiotensin dönüştürücü enzim)
<b>ACEi</b>	: Angiotensin converting enzyme inhibitor (Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü)
<b>ADA</b>	: American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Cemiyeti)
<b>AGEs</b>	: Advanced glycation end products (İleri glikozilasyon son ürünleri)
<b>AGT</b>	: Anjiotensinojen
<b>Ang I</b>	: Anjiotensin I
<b>Ang II</b>	: Anjiotensin II
<b>ARB</b>	: Anjiotensin II tip 1 reseptör blokerleri
<b>AT1</b>	: Anjiotensin II tip 1 reseptörü
<b>AT2</b>	: Anjiotensin II tip 2 reseptörü
<b>ATP</b>	: Adenosine triphosphate (Adenozin trifosfat)
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNP</b>	: Diyabetik nefropati
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ECM</b>	: Extracellular matrix (Hücre dışı matriks)
<b>FENa</b>	: Fractional Excretion of Sodium (Fraksiyonel Na atılımı )
<b>GBM</b>	: Glomerular basement membrane (Glomerüler bazal membran)
<b>GFR</b>	: Glomerular filtration rate (Glomerüler filtrasyon hızı)
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>HbA1c</b>	: Hemogloblin A1c

<b>HT</b>	: Hipertansiyon
<b>iNOS</b>	: inducible Nitric Oxide Synthase
<b>İR</b>	: İrbesartan
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>KB</b>	: Kan basıncı
<b>KBH</b>	: Kronik böbrek hastalığı
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktive eden protein kinaz
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>NAC</b>	: N-acetylcysteine (N-asetil sistein)
<b>NADP</b>	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NADPH</b>	: reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NAG</b>	: N-acetyl- beta- D-glucosaminidase (N-Asetil-beta-D- Glukozaminidaz)
<b>NF-kB</b>	: Nükleer faktör kappa beta
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentetaz
<b>NS</b>	: Nigella Sativa
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>PAI-1</b>	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
<b>PAS</b>	: Periodic Acid Schiff
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Solüsyonu
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>RAAS</b>	: Renin anjiotensin aldosteron sistemi
<b>RAGE</b>	: Receptor of advanced glycation end products (İleri glikozilasyon son ürünleri reseptörü)
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen ürünleri
<b>SDBY</b>	: Son dönem böbrek yetmezliği
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>TGF-β<sub>1</sub></b>	: Transforming growth factor- beta 1
<b>TNF-α</b>	: Tumor Necrosis Factor-alfa (Tümör nekrozis faktör-alfa)
<b>UAA</b>	: Üriner albumin atılımı
<b>UGA</b>	: Üriner glukoz atılımı

**UPA** : Üriner protein atılımı

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor (Damar endoteli büyüme faktörü)

## GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM)'nin prevalansı hızla artmakta ve 2000 yılında dünyada 171 milyon olan hasta sayısının 2030 yılında 366 milyon olacağı öngörülmektedir (1). Çeşitli organlarda hasara yol açan DM' nin hedef organları arasında böbrekler önemli yer almakta ve ve diyabetik nefropati (DNP) de DM ile paralel olarak hızla artmaktadır (2). Gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) nedenleri arasında %25-44'lük oranla birinci sırayı DM almaktadır (3). Ülkemizde de, Türk Nefroloji Derneği'nin 2007 verilerine göre SDBY nedeniyle düzenli hemodiyaliz tedavisi uygulanan hastalarda %26.1 oran ile DNP'liler ilk sıraya yükselmiştir (4). Endüstriyel yaşam biçimi, bu artışı hızlandırmaktadır (5).

Birçok etmen DNP gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (6). Genetik yatkınlığın yanı sıra hipertansiyon, dislipidemi, obezite, sedanter yaşam, beslenme bozukluğu gibi risk faktörleri DM ve komplikasyonlarının gelişimini hızlandırmaktadır (7). DM'lilerdeki hiperglisemiye bağlı renal kanlanma artışı ve intraglomerüler basınç yükselmesi renal bozulmayı kolaylaştırmaktadır.İleri glikolizasyon son ürünleri (AGEs), protein kinaz C (PKC) aktivasyon artışı, anormal polyol metabolizası ve oksidatif stresle oluşan reaktif oksijen ürünleri (ROS) da DNP gelişiminde rol almaktadır (8,9).

Hipergliseminin, DM komplikasyonlarının gelişiminde önemli rol alan sistemik renin-angiotensin- aldosteron sistemi (RAAS) ve daha çok doku RAAS'ının aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Doku RAAS aktivasyonu ile sayıları da artan Anjiotensin II (Ang II) Tip 1 (AT1) reseptörleri, DNP patogenezinde önemli yer almaktadır (10). AT1 reseptörlerinin uyarılması kan volümü ve basıncını artırır, intraglomerüler basıncı yükseltir, solüt, protein ve amino asitlerin ultrafiltrata geçişini hızlandırır. Ayrıca indirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazı aktive ederek süperoksit ( $O_2^-$ ) yapımını uyarır.  $O_2^-$ ,

nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek fonksiyonunu bozar ve peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) radikalini oluşturur. ROS yapımını da artırarak endotel, mezangium ve interstisyum hücrelerinin proliferasyonunu ve ‘transforming growth faktör beta-1’ (TGF- $\beta_1$ ) yapımını uyarır. TGF- $\beta_1$  de mezangial matriks protein sentezini artırır (11,12). Böylece, hemodinamik olarak başlayan değişiklikler yapısal bozulma ile birleşerek DNP gelişimine yol açar (10-13).

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ACEi) ve AT1 reseptör blokerleri (ARB) tedavisi ile yapılan klinik çalışmalarda, proteinürinin azaldığı ve DNP gelişiminin yavaşladığı bilinmektedir. Bu ilaçların renal koruyucu etkileri, öncelikle kan basıncı (KB) ve glomerüler basıncı düşürücü özelliklerinden kaynaklanmaktadır (14,15). Onozato ve ark.(16)’nın, deneysel DM geliştirdikleri ratlarda dört haftalık KB’ni düşürmeyen dozlardaki ACEi ve ARB tedavileri sonunda böbrek dokularındaki NADPH oksidaz, nöronal ve endotelyal NO sentetazda azalma gözlemleri bu görüşü desteklemektedir. Ancak renal dokuda ‘inducible Nitric Oxide Synthase’ (iNOS) ve kollajen birikimini incelememişlerdir.

Deneysel çalışmalarda, antioksidanlarla yapılan tedavilerin organ hasarını yavaşlattığı bildirilmektedir (17,18). Nigella Sativa (NS) ile yapılan çalışmalarda; immünomodülatör (19), antibakteriyel (20), hipotansif (21), hepatoprotektif (22), gastroprotektif (23), nöroprotektif (24), oksidatif stresi ve renal hasarın gelişimini azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Özellikle pankreas hücrelerini koruyucu, insülin duyarlılığını artırıcı ve insanlarda kan şekerini düşürücü etki yaptığı bildirilmiştir (25-27).

Son yıllarda radyofarmasötiklerin renal toksik etkilerini önlemekte (28) kullanılan N-asetil sistein (NAC), güçlü antioksidan özelliği olan bir tiol derivativesidir (29). Deneysel çalışmalarda, NAC ile diyabetik ve nondiyabetik nefropati oluşumunun yavaşladığı, dislipidemi ve ROS yapımının azaldığı gözlemlenmiştir (30).

Geleneksel olarak kullanılan NS ve klinikte kullanılan NAC’ın ciddi yan etkilerinin olmadığı bildirilmektedir (30-32). Son yıllarda, antioksidanların DM’de kullanımının yararlı olacağı görüşü ağırlık kazanmaktadır. Ancak, yaptığımız araştırmada, klinik ve deneysel DNP çalışmalarında, ARB ile antioksidanların kombinasyon tedavilerine rastlayamadık. Bu nedenle, KB ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR)’yi düşürmeyen dozlarda ARB blokeri olan irbesartan ile NS ve NAC tedavilerinin deneysel DNP’ye etkilerini araştırmayı amaçladık.



## GENEL BİLGİLER

### DIABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden kronik ve progresif bir metabolizma hastalığıdır. Pankreastan insülin salınımının mutlak ya da göreceli yetersizliği ve/veya insüline periferik dokuların direnci sonucu gelişen bu hastalığın genetiği, etyopatogenezi ve klinik seyri de heterojen özelliktedir (33).

Diabetes ve Mellitus adı, Yunanca akıp giden anlamına gelen dia+betes ve bal kadar tatlı anlamına gelen mellitus kelimelerinden türetilmiştir. Diabetes adı ilk kez Kapadokya'da M.S. 2. yüzyılda Arateus tarafından kullanılmıştır. Arateus, çok idrar yapan ve kilo kaybeden insanları sifonlu fiçıya benzeterek hastalığa 'Diabetes' adını vermiş ve klinik bulgularla tanı koymuştur. Susruta ve diğer Hintli doktorlar M.S. 5-6. yüzyılda, şeker hastalarının idrarının tatlı olduğunu, bu nedenle karıncaların, sineklerin ve diğer böceklerin bu idrara üşüştüğünü gözlemlemişler ve hastalığın iki formu olduğunu yazmışlardır. Bir formunda hastaların zayıf ve genç olduğu, uzun yaşamadan kısa sürede öldüğü, diğer grupta ise hastaların şişman ve daha yaşlı olduğu belirtilmiştir. Bu, günümüzün sınıflamasında belirtilen Tip 1 ve Tip 2 DM sınıflamasına çok benzemektedir (33).

Hastalığın tanısı, en az 8 saatlik açlık sonrası sabah plazma glukozunun  $\geq 126$  mg/dl olması veya poliüri, polidipsi, glukozüri, ketonüri, açıklanamayan kilo kaybı ve bulanık görme gibi semptomlar varlığında herhangi bir zamanda bakılan plazma glukoz düzeyinin  $\geq 200$  mg/dl bulunması ile konulmaktadır. Oral glukoz tolerans testi olarak uygulanan suda eritilmiş 75 gr anhidroz glukozun içiminden 2 saat sonraki glukoz düzeyinin  $\geq 200$  mg/dl olması DM tanısı koydurur (34).

Coğrafik bölge, kentsel-kırsal alan, yaş grubu ve cinsiyete göre dağılımı farklılık göstermekle birlikte sık görülen bir hastalıktır. Sınıflamada dört klinik tip yer almaktadır. Bunlardan üçü (Tip 1, Tip 2 ve Gestasyonel DM) primer, dördüncüsü (spesifik diyabet tipleri) sekonder diyabet formları olarak tanımlanmaktadır (35).

Tip 1 DM, mutlak insülin eksikliğine yol açan pankreas beta hücre yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Tüm diyabet olgularının %10-15'ini oluşturmaktadır. Etyolojisi tam bilinmemekle birlikte genetik (%10) ve çevresel faktörlerin ortak etkisi ile gelişmektedir. Her yaşta görülebilirse de genellikle 30 yaşın altında ortaya çıkar ve hastaların çoğu normal-düşük kiloludur. Tip 1 DM etyolojik olarak immun aracılı ve idiopatik olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Bazı yazarlarca Tip 1A ve Tip 1B olarak da adlandırılır. Genellikle Tip 1 DM adı; immun aracılı için kullanılır ve hastaların %90'ı bu grupta yer alır. Pankreas beta hücrelerinin bileşenlerine karşı otoantikolar bulunmaktadır. İdiopatik tip (Tip 1B) ise nadir görülür ve beta hücre otoimmünitesini gösteren immunolojik bulgu yoktur. Bu hastaların kan insülin düzeyleri düşüktür ve insülin direnci bulunmaz (36). Tip 1 DM kliniği hızlı şekilde ortaya çıkar. Bazı hastalarda ise yıllar süren yavaş bir gelişim göstererek Tip 2 DM gibi seyreder. Yıllar içinde insülin eksikliği giderek artarak oral antidiyabetiklere yanıt veremez hale gelir. Böyle hastalar yavaş seyirli bir otoimmünite gösterebilir (latent autoimmune diabetes in adults, LADA veya slow onset diabetes in adults, SODA) (37).

Tip 2 DM insülin direnci ve/veya insülin sekresyon defekti ile karakterizedir. Tüm diyabetik hastaların %90'ı Tip 2 DM grubundadır. Hastalar sıklıkla obez veya kiloludur. Çoğunlukla 30 yaş sonrası ortaya çıkar. Ancak obezite artışına paralel olarak son 10 yılda çocukluk veya adolesan çağlarındaki Tip 2 DM'lilerde belirgin artış gözlenmektedir. Tip 2 DM etyolojisinde güçlü bir genetik yatkınlık (%60) söz konusudur. Ailede genetik yoğunluk arttıkça sonraki nesillerde diyabet riski artar ve hastalık daha erken yaşlarda ortaya çıkar. Genellikle sinsi başlangıçlıdır ve hastaların çoğunda başlangıçta semptom yoktur (38).

Etyolojik sınıflamada; Tip 1 ve 2 DM'den başka gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğum sonrası düzelen gestasyonel diyabet ve sekonder diyabet tipleri de vardır. Beta hücre fonksiyonlarının genetik defekti (Maturity Onset Diabetes of Young, MODY) (1-6), insülinin etkisindeki genetik defektler, pankreasın ekzokrin doku hastalıkları, endokrinopatiler, ilaçlar ve kimyasal ajanlar, infeksiyonlar, immun aracılı diyabet formları ve diyabetle ilişkili genetik sendromlar, sekonder DM tiplerini oluşturmaktadır (38).

Diyabet, yüksek oranda akut ve kronik komplikasyonlara yol açmaktadır. Akut komplikasyonları arasında diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar koma, laktik asidoz ve

hipoglisemi sayılabilir. Kronik komplikasyonlar ise makrovasküler ve mikrovasküler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Makrovasküler komplikasyonlar başlıca hipertansiyon, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar ile periferik arter hastalığından oluşur. Mikrovasküler komplikasyonların başında retinopati, nefropati ve nöropati gelir (38). Aşağıda ana başlık altında inceleyeceğimiz DNP oluşum mekanizmaları diğer mikrovasküler komplikasyonların gelişimine benzemektedir.

## **DIYABETİK NEFROPATİ**

Diyabetik nefropati olarak adlandırılan klinik sendrom;

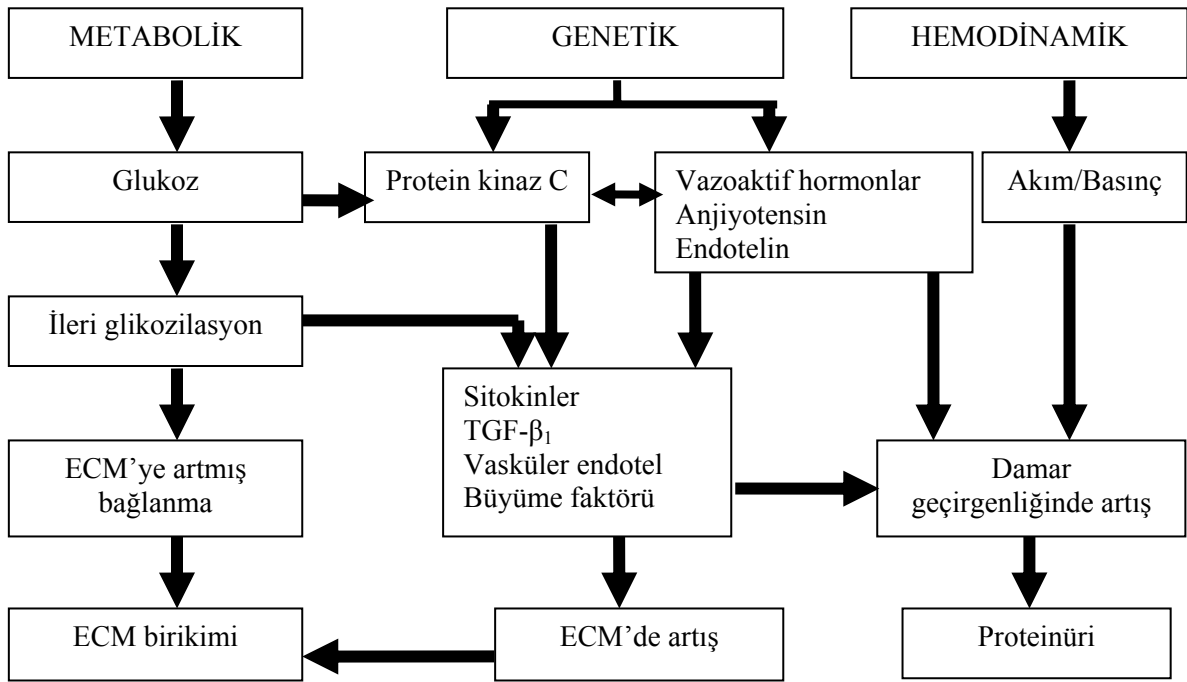
- Persistan albuminüri,
- Kan basıncında yükselme,
- Renal yetmezliğe ilerleyen GFR’de progresif azalma,
- Kardiyovasküler morbidite ve mortalitede artış ile karakterizedir (39).

Gelişmiş ülkelerde düzenli diyaliz tedavisi gören hastalarda DM ilk sırada yer almaktadır. Avrupa, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’de düzenli diyaliz tedavisi uygulanan hastaların %35-44’ünü DM’ye bağlı SDBY oluşturmaktadır (40). Ülkemizde de 2005 Türk Nefroloji Derneği raporlarında %25,3 prevalansla birinci sırada yer alan DM insidansı 2008 yılında %30.7’ye yükselmiştir (41). Özellikle Tip 2 DM artışından kaynaklanan DNP insidansı son 10 yılda iki kat artış göstermiştir. Bu süreçte diyalize giren diyabetik hasta sayısı da %61 artmıştır (42).

Diyabetik nefropati, hem Tip 1 hem de Tip 2 DM’nin rölatif olarak en sık görülen komplikasyonudur. SDBY gelişim riskinin diyabet hastalığı olmayanlara oranla Tip 1 DM’de 33 kat, Tip 2 DM’de 7 kat fazla olduğu bildirilmektedir (43). Yirmi yıllık izlem sonucunda Tip 1 DM’de %30-40, Tip 2 DM’de %15-25 oranında DNP geliştiği gözlenmiştir (38). Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DNP gelişimini etkileyen risk faktörleridir (44). Glisemi kontrolünün bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, yüksek proteinli diyetle beslenme, sigara kullanımı ve albuminüri varlığı prognozu kötüleştirmektedir (45).

Genetik yatkınlığın DNP gelişiminde oldukça önemli rol oynadığı düşünülmektedir (46). Hemodinamik ve metabolik faktörler arasındaki karmaşık etkileşim genetik yatkınlık varlığında DNP gelişimini kolaylaştırmaktadır (47). DM’deki hiperglisemi kan volüm artışına neden olmaktadır. Bu da renal kanlanma ve intraglomerüler basınç artışı ile DNP gelişimini başlatmaktadır. Artan glukoz böbrek, göz ve sinir gibi dokularda insülin bağımsız olarak

hücre içine girerek fonksiyonunu bozmaktadır. Hiperglisemi ve buna bağlı oksidatif stres artışı ile poliyol yolu aktive olmakta, protein-lipid-lipoprotein-aminoasitlerin glikozilasyonu ile AGEs'in yapımı artmaktadır (48). Hemodinamik değişimler ve metabolik bozukluklar birlikte ve/veya bağımsız olarak hücre içi sinyal iletimini aktive ederek sitokinlerin yapımını artırmaktadır. Böylece hemodinamik olarak başlayan değişikliklere, nefronun fonksiyonel ve yapısal bozulmaları da eklenerek süreç içinde DNP gelişmektedir (Şekil 1) (44).



ECM: Extrasellüler matriks; TGF-β<sub>1</sub>: Transforming growth faktör beta-1.

### Şekil 1. Diyabetik nefropatinin patogenezi

Hiperglisemi ile oluşan DNP gelişim süreci ilk aşamalarda klinik bulgu vermeyebilir. Bu süreç 5 evrede incelenmektedir (49,50):

- Evre I (hiperfiltrasyon): GFR normal değerinin %30-40'ı oranında artmıştır. Glomerüllere gelen kan akımı arttığı için böbrekler büyümüş ve glomerül içi basınç artmıştır.
- Evre II (sessiz dönem): Genellikle ilk beş yılda gelişir. GFR ilk evreye göre azalmakla beraber normalin üzerinde veya normal değerlerdedir. Glomerüler bazal membran (GBM)'da kalınlaşma ile mezangial hücreler ve matrikste artış başlamıştır.
- Evre III (mikroalbuminüri): Çoğunlukla DM başladıktan 6-15 yıl sonra gelişir. İdrarla albumin atılımı 30-300 mg/gün veya 20-200 µg/dk mikroalbuminüri olarak değerlendirilir. GFR yılda yaklaşık 1.1 ml/dk azalır. Düzenli tedavi uygulanmayan sürekli mikroalbuminürisi olan Tip 1 DM'li hastaların %80'i 10-15 yıl içerisinde klinik veya açık

albuminüri olarak adlandırılan aşamaya ilerler. Tip 2 DM'li hastalarının çoğu tanı konduğunda bu dönemdedir.

- Evre IV (açık nefropati): Genellikle 15-25 yılda gelişir. Günde  $\geq 300$  mg/gün veya  $\geq 200$   $\mu\text{g}/\text{dk}$  albumin atılımı vardır. İdrardaki albumin basit testlerle saptanabilir ve albumin atılımı yılda %10-20 oranında artış gösterir. GFR, normal değer altındadır ve yıllar içerisinde kişiden kişiye değişmekle birlikte 2-20 ml/dk/yıl hızıyla azalır. Hastaların hemen tümü bu evrede hipertansiftir ve HT varlığı prognozu kötüleştirir.

- Evre V (SDBY): Genellikle 25-30 yılda gelişir. Bu evre herhangi bir nedenle oluşan diğer SDBY ile benzerdir. GFR ileri derecede azalmış, böbrek kapasitesinin %5-10'unun altına inmiş ve böbrek yetmezliğine ait semptomlar belirgin hale gelmiştir. Bu evredeki tedavi yalnızca diyaliz veya transplantasyondur. Tip 1 DM'li hastaların %50'si, Tip 2 DM'li hastaların %20-30'u 10 yıl içinde evre IV'den evre V'e ilerler.

### **Patogenez**

**Genetik:** Düzenli glisemik kontrolle DNP gelişiminin yavaşlatıldığı hatta önlenildiği bilinmektedir. Ancak benzer süre ve şiddette hiperglisemiye maruz kalan hastalarda farklı derecelerde mikrovasküler komplikasyonların ortaya çıkması klinisyenlerin ilgisini genetik ilişki üzerine çekmiştir. Ailesinde veya kardeşinde DNP olan Tip 1 veya Tip 2 DM'li hastalarda DNP gelişim riskinin artmasıyla da genetik yatkınlığın önemi anlaşılmaktadır (51).

Yapılan çalışmalarda DM komplikasyonlarının gelişme riski ile çeşitli genler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bunlardan bazıları; 5' insülin gen polimorfizmi, G2m23+ immunglobulin allotipi, ACE insersiyon/delesyon polimorfizmi, HLA-DQB1\*0201/0302 allelleri, aldoz redüktaz gen polimorfizmi, polimorfik CCTTT, NO sentetaz (NOS) 2A'dır (52). Üzerinde en çok çalışılan ACE gen polimorfizmi ile ilgili bulgular da çelişkilidir. Bazı çalışmalarda ACE gen/DD polimorfizmi olan Tip 2 DM hastalarının DNP gelişimi, ağır proteinüri ve progresif renal yetmezlik açısından yüksek risk altında olduğu bildirilmiştir (53). Buna karşı 19 çalışmayı içeren bir derlemede, Tip 1 veya Tip 2 DM hastalarında, DNP ile bu gen arasındaki ilişki doğrulanamamıştır (54). Çalışmalarda etkenin monogenik olmasından çok multigenik olma olasılığı üzerinde durulmaktadır (51).

**Hiperglisemi:** Kronik hiperglisemik bir süreç olan DM komplikasyonlarının gelişmesinde glukozun aracılık ettiği birçok metabolik değişiklik rol oynamaktadır. Renal hasar gelişiminde birbirinden bağımsız etkileri olduğu düşünülen bu metabolik olayların

karşılıklı etkileşim içinde bulunduğu ve birlikte aktive oldukları anlaşılmıştır. Hiperglisemi ile yapımı artan ROS'un bu metabolik yolların aktivasyonu ve karşılıklı etkileşiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (55).

### **Metabolik değişiklikler:**

a. Nonenzimatik glikozillenme ve ileri glikolizasyon son ürünleri (AGEs): AGEs, bir enzim aracılık etmeksizin amimoasit, lipid ve lipoproteinlerin kendiliğinden indirgenmesiyle oluşur. Maillard reaksiyonu adı verilen bu sürecin ilk basamağında karbonil ve amino gruplarının birleşmesi sonucu labil Schiff bazları oluşur. Bu bazlar, daha sonraki seri reaksiyonlarla Amadori cisimlerine dönüşür. Son 2-3 aydaki glisemik kontrol hakkında bilgi veren hemoglobin A1c (HbA1c), bir Amadori cisimidir. Amadori cisimleri hipergliseminin düzeyine bağlı olarak geri dönüşümsüz AGEs (pentosidine, pyralline, karboksimetil-lisin)'e dönüşürler (56) (Şekil 2).

İleri glikolizasyon yolağı, DNP gelişimi kadar ateroskleroz gelişimi, arteriyel duvar ve miyokardiyal kalınlaşma gibi kardiyovasküler komplikasyonlarda da önemli rol oynamaktadır. AGEs, etkilerini çeşitli mekanizmalarla göstermektedir;

■ Proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonu ile hücre proliferasyonu ve kapiller geçirgenliğin artmasına yol açarlar (57).

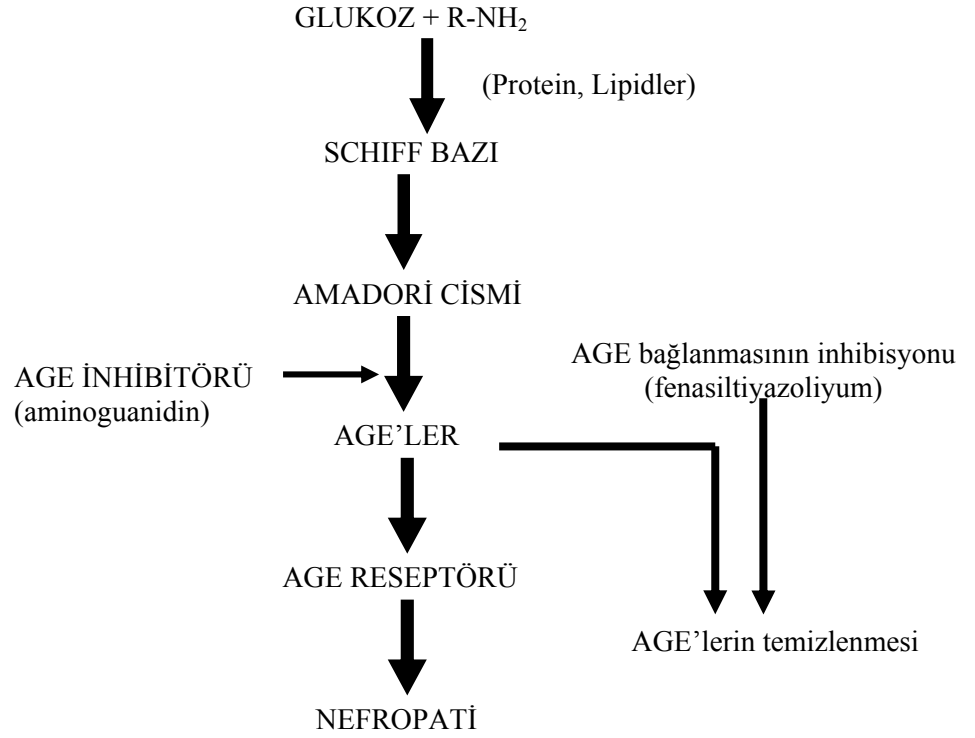
■ Kollajen, laminin, vitronektin gibi bazı önemli matriks proteinlerine geri dönüşümsüz şekilde bağlanarak GBM ve matriks bileşenlerini bozarlar. Matriks proteinlerini etkileyerek vasküler geçirgenliğin artışı ve bölgeye mononükleer hücre göçüne neden olurlar.

■ Hücre dışı matriks bağlantılarını etkileyerek sinyal iletilerini bozarlar.

■ Nitrik oksit yapımını engelleyerek, endotel disfonksiyonuna yol açar ve ateroskleroz gelişimini hızlandırır (58,59).

■ İleri glikolizasyon son ürünleri, bu reseptörlerden bağımsız etkilerinin yanısıra reseptör aracılı mekanizmalarla da biyolojik etkilerini gösterebilmektedirler. Bu reseptörlerden en önemlisi, ileri glikolizasyon son ürünleri reseptörü (RAGE)'dir. RAGE, immunglobulin süperfamilyasına ait olan, monosit/makrofajlar, endotel hücreler, böbrek mezangial hücreleri ve podositler gibi çeşitli hücrelerde eksprese olan, hücre içindeki bir sinyal transdüksiyon reseptörüdür (60). AGEs'in RAGE'ye bağlanması ile nükleer faktör kappa beta (NF-kB) aktive olur. NF-kB aktivasyon artışı, renal bozulmaya yol açar ve inflamasyona, vazokonstriksiyona ve koagülasyona neden olan sitokin ve mediatörlerin salınımını uyarır (61).

■ Ayrıca NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta_1$  gen ekspresyonunu uyarır. Artan TGF- $\beta_1$ 'de kollajen sentezi ve mezangial matriks artışına yol açarak glomerüloskleroza neden olur. Böylece moleküller ve hücrel reaksiyonlar zinciri ile hemodinamik ve striktürel değişikliklerle başlayan renal bozulma ilerler.



AGEs: İleri glikolizasyon son ürünleri.

## Şekil 2: İleri glikolizasyon son ürünlerinin oluşumu

Deneysel DNP modellerinde; AGEs üretimini baskılayan aminoguanidinin, nefropatiyi ve retinopatiyi önlemede etkili olduğu gösterilmiştir. Proteinlerin AGEs'e bağlanmasını engelleyen phenacylthiazoliumbromide (PTB) ile renal hasarın gerilediği, damar esnekliğinin önemli ölçüde korunduğu gösterilmiştir (62). Bu nedenle AGEs oluşumunu inhibe eden 2,3-diaminophenazine, AGE çapraz bağlarını koparan piridoksamin ve OBP-9195 gibi ajanların son yıllarda geliştirilmesine önem verilmektedir (63).

b. Protein kinaz C aktivasyonunun artması: Hipergliseminin, diaçilgliserol (DAG) yapımı ve oksidatif stresi artırarak PKC aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir.

■ Bu enzimin aktivasyonu ile yapımı artan vazodilatatör prostaglandinler glomerüler hiperfiltrasyona neden olmaktadır (51).

■ Mezangial hücre kültürlerinde ve diyabetik ratların glomerüllerinde, TGF- $\beta_1$  aktivasyonu ve bunun yol açtığı fibrinonektin ve Tip IV kollajen yapımının arttığı gösterilmiştir. TGF- $\beta_1$  aktivasyonunun glomerüloskleroza neden olan mezangial hücrelerin extrasellüler matriks (ECM) yapımını artırdığı bilinmektedir ( 51,64).

■ Protein kinaz C aktivasyonu, podositlerde permeabilite artırıcı faktör olan ‘Vascular endothelial growth factor’ (VEGF) sentezini arttırarak glomerüler geçirgenlik artışına neden olmaktadır (65,66).

■ Aynı zamanda mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) aktivitesini de arttırmaktadır. Yüksek glikoz konsantrasyonlarında iki enzimin koaktivasyonu, bu enzimlerin birbirleriyle bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (51).

Diyabetli hayvanlarda PKC  $\beta$  izoform inhibitörleriyle yapılan tedavide, retina ve renal glomerüllerindeki PKC aktivitesinin, glomerül filtrasyon hızının ve üriner albumin atılımının hasta kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (67).

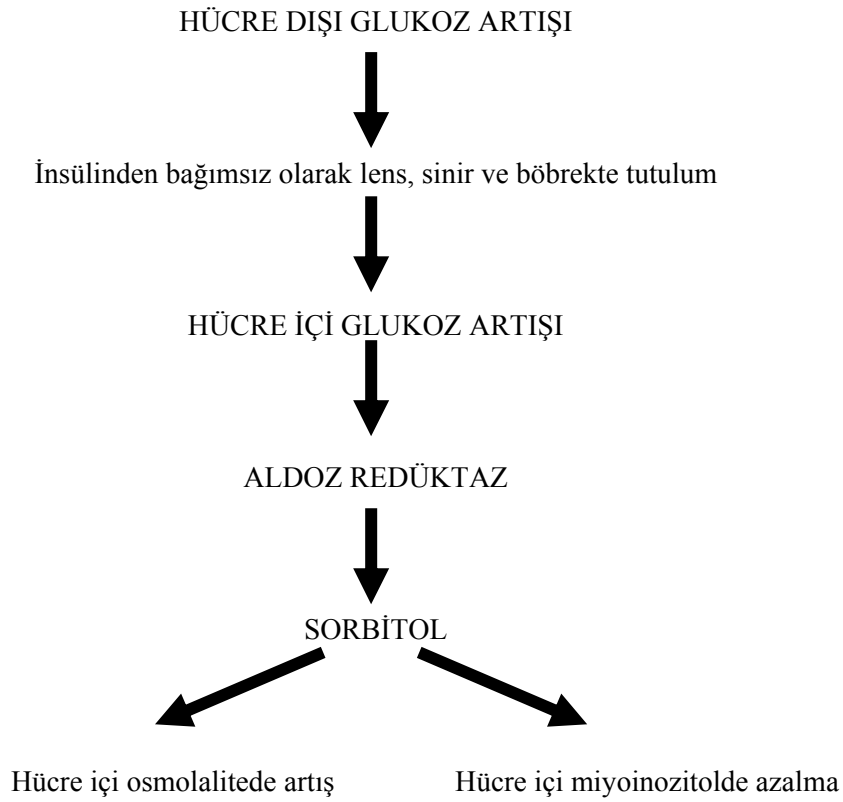
c. Polyol yolu: Polyol aktivasyonu sonucu glukoz , aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole ve sorbitol de sorbitol dehidrojenaz enzimi ile fruktoza dönüşmektedir. Hücre içi glukoz artışı ile aktive olan bu yolağın çeşitli etkileri bulunmaktadır. Birincisi, glukozun sorbitole dönüşümü glutatyon rejenerasyonu için önemli bir substrat olan NADPH kullanımını gerektirir. Bu nedenle hücrelerdeki NADPH ve glutatyon azalmakta ve oksidatif stres artmaktadır. İkincisi, bu reaksiyonlar süresinde AGEs prekürsörleri olan 3-deoksiglukan gibi ara ürünler oluşmaktadır (68,69) (Şekil 3).

d. Aldoz redüktaz yolu: Glukoz artışı, aldoz redüktaz yolu aktivasyonu ile hem hücre içindeki polyolün birikimine hem de kullanımına bağlı hücre içi miyoinozitolün azalmasına neden olur. Aldoz redüktaz sistemindeki aktivasyonunun kendisi de protein kinaz C aktivasyonunu uyarır (63).

e. Heksozamin yolu: Hücre içinde artan glukozun heksozamin yolağına geçmesi de diyabet komplikasyonlarını hızlandırmaktadır. Bu yolla oluşan fruktoz-6-fosfat hız kısıtlayıcı enzim olan glutamin:fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) aracılığıyla glikozamin-6-fosfata dönüştürülür. Hiperglisemi, hız kısıtlayıcı enzim aktivitesini daha fazla fruktoz-6-fosfat üretimine yol açacak şekilde etkiler. Fruktoz-6 fosfat seviyelerinin artışı ve mitokondri iç zarında elektrokimyasal gradiyentin bozulmasına yol açan, hiperglisemiyle indüklenen mitokondrial süperoksit yapımının artması gliseraldehit fosfat dehidrojenaz (GAPDH)’ın inhibisyonuna yol açar. Diğer olası mekanizmalarda olduğu gibi aşırı mitokondrial ROS üretimi sonuçta NAD<sup>+</sup> yetersizliğine yol açar. Bu yolak aynı zamanda lipo-glikotoksisiteye



bağlı gelişen insülin direncinde de önemlidir. Ancak heksozamin yolunun hipergliseminin indüklediği gen transkripsiyonundaki artışa hangi mekanizmayla yol açtığı tam aydınlatılamamıştır. Transkripsiyon faktörü olan Sp1'in, hiperglisemi ile aktive olan damar düz kas hücrelerindeki plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)'in promotor aktivitesine yol açtığı düşünülmektedir. Sp1'in, PAI-1 geninde transkripsiyon değişikliklerine neden olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, hiperglisemiyle aktive olan heksozamin yolağı, hem gen ekspresyonunda hem de protein fonksiyonlarında değişiklik yaparak diyabet komplikasyonlarının patogenezinde rol oynamaktadır (59).



**Şekil 3. Polyol yolu**

**Hemodinami:** Hiperfiltrasyonun, DNP gelişiminin en erken etkeni olduğu düşünülmektedir. Hiperfiltrasyon, hiperglisemi aracılığıyla vazoaaktif hormonların neden olduğu afferent arteriöl dilatasyonu ve kısmen de pre-postglomerüler kapiller otoregülasyon bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Afferent arteriöl dilatasyonu ile glomerüle gelen kan akımı artar ve glomerül içi hidrostatik basınç yükselir. RAAS aktivasyonu ile efferent arteriöldeki vazokonstriksiyonla basınç daha da artar. Bu özellik öncelikle Tip 1 DM'de göze çarpmaktadır (48). Düşük proteinli diyet, HT'un kontrolü, efferent arteriöl konstriksiyonunu engelleyen ACEi ve ARB grubu ilaçlarla glomerül içi basınç düşürüldüğünde proteinüri

azalmakta ve renal hasar gelişimi yavaşlamaktadır. Glisemiye bağlı hemodinamik değişikliklerin DNP gelişimindeki etkisi çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (76,77).

**Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi :** Deneysel diyabetik çalışmalarda Ang II'nin tetiklediği bir dizi hemodinamik anormallik bulunmuş ve renal hasarı önlemede RAAS inhibisyonunun önemi üzerinde durulmuştur. DM'de glomerül ve interstisyumda lokal RAAS'ın aktivasyonunun arttığı ve RAAS'ı baskılayıcı ilaçların DNP gelişimini yavaşlattığı bildirilmektedir (77,78). Çalışmalarda, RAAS inhibisyonu ile DM'de oluşan renal TGF- $\beta_1$  artışının gerilediği, filtrasyon membranındaki nefrin proteinindeki azalmanın düzeldiği ve PKC aktivasyonunun engellendiği gözlenmiştir (79).

Güçlü bir vazokonstriktör olan endotelinin, DNP gelişimindeki etkilerini inceleyen çalışmaların bulguları çelişkilidir. Bazı çalışmalarda, endotelin inhibitörlerinin renal koruyucu etkileri gözlenirken, bazılarında etkin bulunmamıştır (80,81). Bu farklılık, çalışmanın yöntemi veya kullanılan inhibitörlerin reseptör seçicilikleri ile ilgili olabileceği gibi endotelinin DNP gelişiminde merkezi rol almamasından da kaynaklanabilir.

Vazokonstriktör faktörler gibi diğer vazoaktif faktörler ile ilgili çalışmalar da giderek artmaktadır. Glomerüler vazomotor tonus, vazokonstriktörlerle birlikte bradikinin ve atrial natriüretik pepid gibi vazodilatörlerin de etkisi altındadır. ACE ve nötral endopeptidaz (NEP)'ları etkileyen yeni bileşikler hem ACE hem de NEP inhibisyonu yapmaktadır. Ayrıca Ang II oluşumunu ve bradikinin yıkımını azaltmaktadır. DNP'yi de içeren böbrek hastalıklarında bu bileşiklerin koruyuculuğu gösterilmiştir (82).

**Oksidatif stres:** Hücre hasarına yol açan ROS ürünleri ile hasarı önleyici antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasının, diyabet ve komplikasyonlarının oluşumunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (70). Hipergliseminin damar düz kas hücreleri, mezangial ve tübüler epitelyal hücreler, mitokondriyumda ROS oluşumunu artırdığı bilinmektedir (68,71). Hiperglisemiyle artan ROS, direkt olarak DNA, protein ve lipidler üzerinden makromoleküler hasara yol açar. Sinyal molekülleri gibi davranarak stres-duyarlı yolları indükleyerek de hücre harabiyetini neden olur (71,72). Nefropati gelişimi üzerindeki başlıca etkileri aşağıda sıralanmıştır:

■ Hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu ile glomerüler vasküler geçirgenliği artırmaktadır (73).

■ Lipid peroksidasyonu ile oluşan prostaglandinler, renal vazokonstriksiyon ve nefronda hemodinamik değişikliğe yol açmaktadır (74).

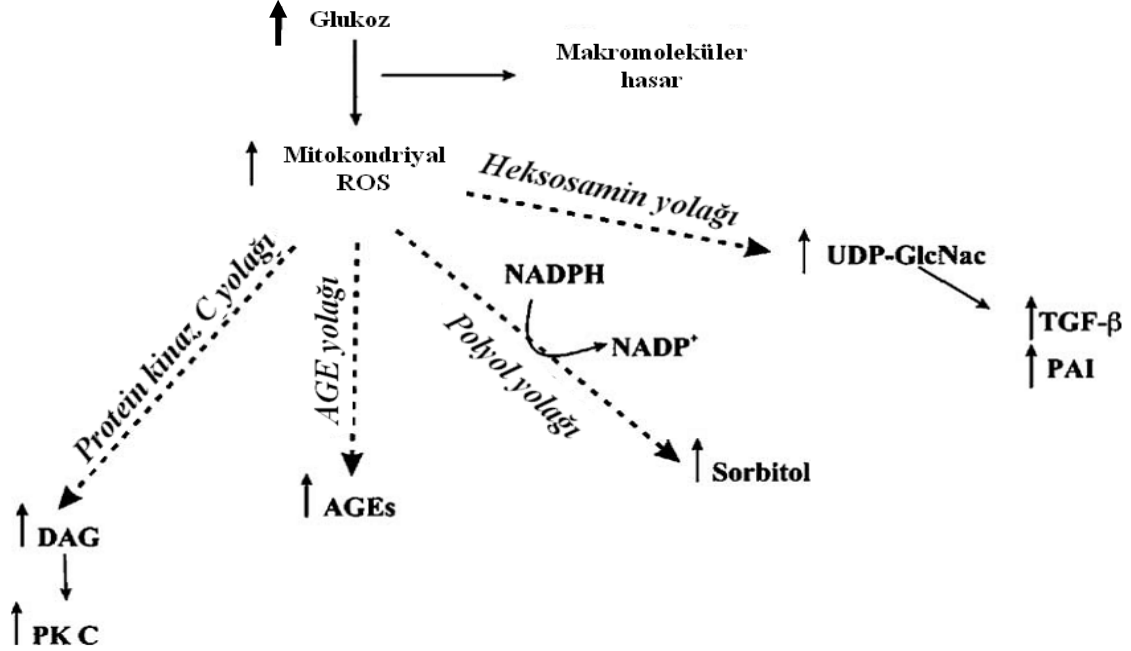
■ Artmış yağ asitleri de glukozu benzer şekilde, mezangial ve endotelial hücrelerde NADPH oksidazı aktive ederek ROS üretimini artırmaktadır. Hiperlipidemi ile oksidize LDL'nin artışı da ROS yapımını uyararak ateroskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır (11).

■ Güçlü antioksidanlardan olan E vitamini, N-asetil sistein ve taurine ile PKC yolunun blokajı da, ROS'un bu yolu aktive ettiğini göstermektedir (11).

■ Reaktif oksijen ürünleri, AGEs sentezini indükleyerek TGF- $\beta_1$  aktivasyonu ile ECM protein sentezini artırmaktadır. Bu nedenle, glomerüler matris artışının yanı sıra tübulo-interstisyel fibrosis gelişiminde de önemli rol almaktadır.

■ Reaktif oksijen ürünleri, AGE-RAGE etkileşimine aracılık ederek NF-kB sinyal yolağını aktive etmektedir. Bu aktivasyon NF-kB bağımlı inflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır (75).

■ Lokal anjiyotensin II artışı ile hücre proliferasyonu, fibrozis gelişimi ve proteinüri oluşturmaktadır.



**ROS:** Reaktif oksijen ürünleri; **DAG:** Diaçil gliserol; **PKC:** Protein kinaz-C; **AGEs:** İleri glikolizasyon ürünleri; **NADP:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; **NADPH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced); **UDP-GlcNac:** Uridine diphosphate O-linked Nacetylglucosamine; **TGF- $\beta_1$ :** Transforming growth factor- $\beta_1$ ; **PAI:** plasminogen activator inhibitor.

**Şekil 4. Hiperglisemi ile ortaya çıkan ROS üretimi ve bu nedenle patolojik yolların aktivasyonu (—, direkt rol; ----, indirekt rol)**

**Sitokinler ve Büyüme Faktörleri:** Geleneksel olarak DM, immün olmayan bir hastalık olarak bilinmektedir. Yeni çalışmalar immunolojik ve inflamatuvar mekanizmaların hastalığın oluşumu ve progresyonun da yer aldığını göstermiştir. Sitokinler arasında interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-18 (IL-18) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )'nın DNP'nin gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (83).

■ İnterlökin-1; kemotaktik faktörler ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır. İntraglomerüler prostaglandin sentezi ile vasküler endotel hücre geçirgenliğinin artmasına yol açar. Renal tübül epitelyal hücrelerin hiyalürin üretimini uyararak, bu hücrelerin artmasına neden olmaktadır.

■ İnterlökin-6'nın; glomerüler bazal membran kalınlaşması, mezangial hücre proliferasyonu ve endotel geçirgenliğinin artması ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir.

■ İnterlökin-18 de; IL-1, interferon- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin oluşumunu uyararak ve endotel hücrelerin apoptozisine neden olmaktadır.

■ Tümör nekrozis faktör-alfa ise; çok çeşitli biyolojik etkilerle DNP gelişimine katkıda bulunmaktadır. Direkt sitotoksik etkisinin yanı sıra glomerüler hemodinamiklerle endotel geçirgenliği artırarak, apoptoz ve hücre adhezyonunu etkileyerek böbrek hasarına yol açmaktadır (51,83).

Son yıllarda, DNP oluşum ve progresyonunda etkisi en çok araştırılan büyüme faktörlerinden biri TGF- $\beta_1$ 'dir. Böbrekte kollajen oluşumunda kilit sitokin olan TGF- $\beta_1$  bu etkiyi matriks proteinlerinin sentezini artırarak ve bu proteinlerin yıkımını azaltarak göstermektedir. TGF- $\beta_1$ 'in, hemodinamik ve metabolik yollar arasındaki etkileşimde hipertansiyon ve hiperglisemi arasındaki sinerjide önemli rol aldığı düşünülmektedir. Özetle, TGF- $\beta_1$  DNP'deki fonksiyonel ve yapısal değişikliklerin oluşmasındaki direkt etkilerinin yanı sıra indirekt etkileri ile birden çok fonksiyona sahip bir sitokindir. Bu nedenle son dönemlerde TGF- $\beta_1$ 'e karşı uygun antagonistlerin araştırılması DNP önlenmesinde ve tedavisinde ana amaçlardan biri olmalıdır (84).

Geniş bir aile olan heparin-bağlayıcı büyüme faktörlerinin üyesi olan VEGF, fizyopatolojik olaylarda kuvvetli angiogenik ve mitojenik molekül olarak davranmaktadır. Glukoz artışı, TGF- $\beta_1$  ve Ang II VEGF ekspresyonunu uyararak endotel NO sentezine yol açmaktadır. NO artışı da DNP'de erken dönemde görülen vazodilatasyon ve hiperfiltrasyon gibi hemodinamik değişime neden olmaktadır. Hiperglisemi ile artmış olan VEGF ayrıca, glomerüler bazal membranın önemli bir bileşeni olan tip IV kollajenin  $\alpha_3$  zincir sentezini de

uyarmaktadır. Kollajen üretiminin artışı da DNP’de görülen bazal membran kalınlaşmasına yol açmaktadır. Diyabetik ratlara verilen anti-VEGF antikoru ile hiperfiltrasyon, albuminüri ve glomerüler hipertrofiye azalma VEGF’nin DNP gelişimindeki fonksiyonel rolünü göstermektedir (84).

Deneysel diyabet çalışmalarında, platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) (85), connective tissue growth factor (CTGF) (86) gibi diğer bazı büyüme faktörleri de DNP patogenezi ile ilişkili bulunmuştur.

Diyabetik nefropati patogenezi de rol oynayan başlıca etkenler Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1. Diyabetik nefropati patogenezi de rol oynayan başlıca etkenler**

Genetik etkenler
Kötü glisemik kontrol (Hemoglobin A1c >%7.5-8.0)
Hemodinamik anormallikler (renal kan akımı, GFR hızı ve intraglomerüler basınç artışı)
Vasküler geçirgenlikte artış
Sistemik hipertansiyon
Metabolik bozukluklar (anormal polyol metabolizması, AGEs oluşumu, Protein kinaz C aktivasyonu, sitokin üretim artışı)
Büyüme faktörlerinin salınımı
Karbohidrat/lipid/protein metabolizmasında anormallikler
Nefron yapısında bozulma (glomerüler hipertrofi, GBM kalınlaşması, mezangial genişleme)
İyon pompalarında bozukluklar ( $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ pompa aktivasyonunda artış ve $\text{Ca}^{++}$ - “ATPase” aktivasyonunda azalma)

**GFR:** Glomerüler Filtrasyon Hızı; **AGEs:** İleri glikolizasyon son ürünleri; **GBM:** Glomerüler Bazal Membran;  **$\text{Na}^+$ :** Sodyum;  **$\text{H}^+$ :** Hidrojen;  **$\text{Ca}^{++}$ :** Kalsiyum; **ATPase:** Adenosine triphosphatase.

**Prorenin:** Çocuklarda ve genç erişkinlerde yapılan klinik çalışmalarda plazma prorenin aktivitesinde gözlenen artış, proreninin DNP gelişmesinde risk faktörü oluşturduğunu düşündürmektedir. Hayvan deneylerinde mezangium ve podositlerde lokalize olan böbrekteki prorenin reseptörlerinin blokajının renal koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir. Prorenin, hücre içi sinyaller aracılığıyla renin-anjiyotensin sistemini hem direkt hem de indirekt olarak etkilemektedir. Prorenin, özgün doku reseptörüne bağlanarak p44/p42 MAPK’ları harekete geçirmektedir (51).

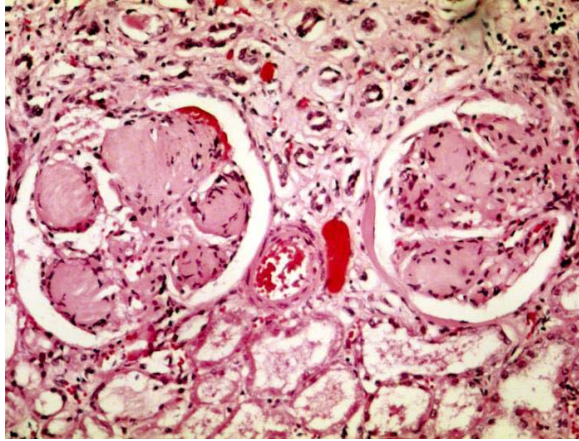
## **DİYABETİK NEFROPATİDE HİSTOPATOLOJİ**

Diyabetik böbrekte başlıca üç ana histopatolojik değişiklik görülür (64). Glomerüloskleroz, vasküler tutulum, tübülointerstisyel bozulma.

### **Glomerüloskleroz**

Diyabetik nefropatinin en karakteristik özelliği glomerülosklerozdur. Difüz interkapiller glomerüloskleroz, nodüler glomerüloskleroz ve bazal membran kalınlaşması ile üç farklı şekilde olabilir.

En sık görülen glomerüler lezyon tipi difüz interkapiller glomerülosklerozdur. Başlangıçtaki değişiklik, mezangial matriksin genişlemesidir. Artarak genişleyen mezangial matriks alanları birbiriyle birleşerek komşu kapiller lümene doğru yayılır, zamanla tüm glomerül hiyalinize olur. Bozulma, böbreğin tüm glomerüllerini etkileyecek şekilde yaygındır ve glomerülün tamamını tutacak şekilde difüzdür. İlk defa 1936 yılında Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanan nodüler interkapiller lezyonlar iyi sınırlanmış, eozinofilik, PAS pozitif yapılar olup glomerül çevresel loblarının merkezine yerleşmişlerdir (87). %20-40 oranında görülen bu lezyonlar DNP için patognomiktir ve geç dönemde izlenir (Şekil 5).

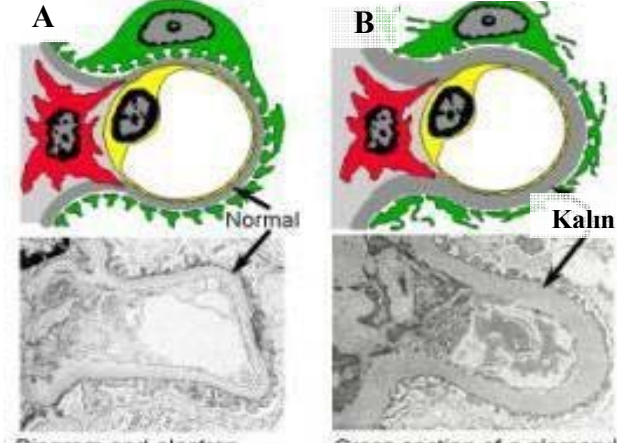


**Şekil 5. Nodüler glomerüloskleroz**

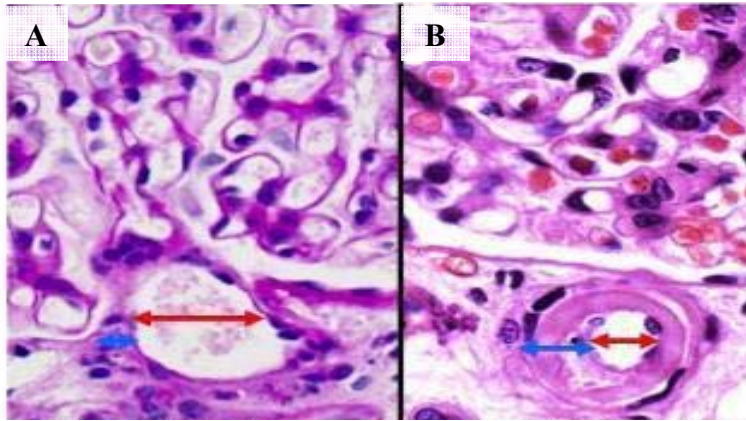
Diyabete özgü olmayan bir diğer lezyon ise bowman kapsülünde yer alan homojen ve eozinifilik yapıdaki fibrin cap'tır.

## Vasküler Tutulum

Efferent ve afferent arteriollerin tüm duvarını tutan ve zamanla duvarın yerini alan hiyalin değişiklik vardır. Efferent arteriolde görülmesi diyabete özgüdür (Şekil 6, 7).



Şekil 6. Diyabette izlenen bazal membran kalınlaşması: A-Normal glomerüler kapiller, B-Diyabetik glomerüler kapiller. Diyagram ve elektron mikroskopik fotoğrafta kesitsel normal glomerül kapilleri ve normal bazal membranı görülmektedir. Diyabetik kesitte glomerül kapillerinin diyabetle hasarlanmasını böbrek biyopsisinde izliyoruz. Bazal membranın anormal kalınlaşması göze çarpmaktadır.



Şekil 7. Diyabete bağlı vasküler değişiklikler: A-Normal arteriöl, B-Diyabetik arteriöl. Sağlıklı glomerül ve komşu normal arteriöl görülmektedir. Lümen geniş, duvar ince, kan akışı seyrindedir. Diyabetik olanda arteriöl duvarı kalınlaşmış-hiyalinize, lümeni daralmış ve glomerül bozulmuştur.

### **Tübülointerstisyel Bozulma**

Tübülointerstisyel değişiklikler DM'de sık gelişir. İleri vakalarda, belirgin tübüler atrofi ve bazal membranında kalınlaşma, interstisyel fibroz görülür. DM'ye özgün tek tübüler lezyon Armani-Ebstein lezyonudur. Daha çok kötü kontrollü DM'lilerde görülen, pars rectadaki proksimal tüp hücrelerinde glikojen içeren vakuoller oluşmasıdır. DM'de sık görülen assendan üriner enfeksiyonlar da tübülointerstisyel bozulma yoluyla DNP gelişimini hızlandırabilir. Özel bir interstisyel lezyon olan papiller nekroz DM'lilerde daha sık gelişmektedir.

### **RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ**

Renin anjiotensin aldosteron sistemi ; kardiyovasküler, renal, adrenal fonksiyonları kontrol eden, arteriyel basıncı ve su-elektrolit dengesini düzenleyen, koordine çalışan hormonal kaskattır (88). Klasik RAAS, renal afferent arterioldeki jukstaglomerüler hücrelerden renin sentezi ile başlamaktadır. Renin, karaciğerde yapılan anjiotensinojen (AGT)'i anjiotensin I (Ang I)'e çevirmektedir. Ang I, Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) aracılığıyla biyolojik olarak aktif olan Ang II'ye dönüşmektedir. ACE aynı zamanda bradikinin oluşumunu da uyarmaktadır. Ang II de sonradan değişik proteolitik enzim sistemleriyle Ang (1-7), anjiotensin 2-8 heptapeptid (Ang III) veya anjiotensin 3-8 hexapeptid (Ang IV)'e dönüşmektedir (89), (Şekil 8).

### **Klasik (Sistemik) Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi**

**Renin:** Finli fizyolog Robert Tigerstedt ve İsveçli öğrencisi Per Bergman 1896-1897 yılları arasında Karolinska Enstitüsünde yaptığı deneylerde renini keşfetmişlerdir. Tavşan böbreği korteks emülsiyonlarının KB'nı yavaşça artırdığını gözlemlemişler, ısıtma ile etkisi kaybolan bu maddenin bir protein olduğunu düşünmüşler ve bu proteine 'renin'adını vermişlerdir (90). Prorenin katepsin B enzimi ile renine dönüşmektedir. Aktif renin, AGT'in Ang I'e dönüşümünde sadece enzim olarak davranan, biyolojik olarak aktif olmadığı düşünülen, yaklaşık 40 kDa ağırlığında aspartil proteazdır. Esas olarak afferent arteriol jukstaglomerüler hücrelerinde, daha az oranda da özelleşmiş, düz kas benzeri hücrelerde sentezlenir. Gen lokalizasyonu 1. kromozomdadır. Jukstaglomerüler aparat hücrelerine giden sempatik sinirlerin uyarılması, böbrek kan akımının azalması, tübüluslara geçen ultrafiltratın  $Na^+$  düzeyinin azalması, böbrekteki renin salınımını uyarır (89).



**Anjiotensinojen:** 50-100 kDa ağırlığında, büyük oranda karaciğerde olmak üzere böbrekler, adrenal glandlar, akciğer, kalp, vasküler dokular, testisler ve gastrointestinal traktusda da sentezlenen bir  $\alpha_2$  globulindir. Renin aracılığıyla Ang I'e dönüşür ve organizmadaki etkinliği net olarak bilinmemektedir. Plazmadaki konsantrasyonu glikokortikoidler, östrojen ve oral kontraseptiflerle artmaktadır (91).

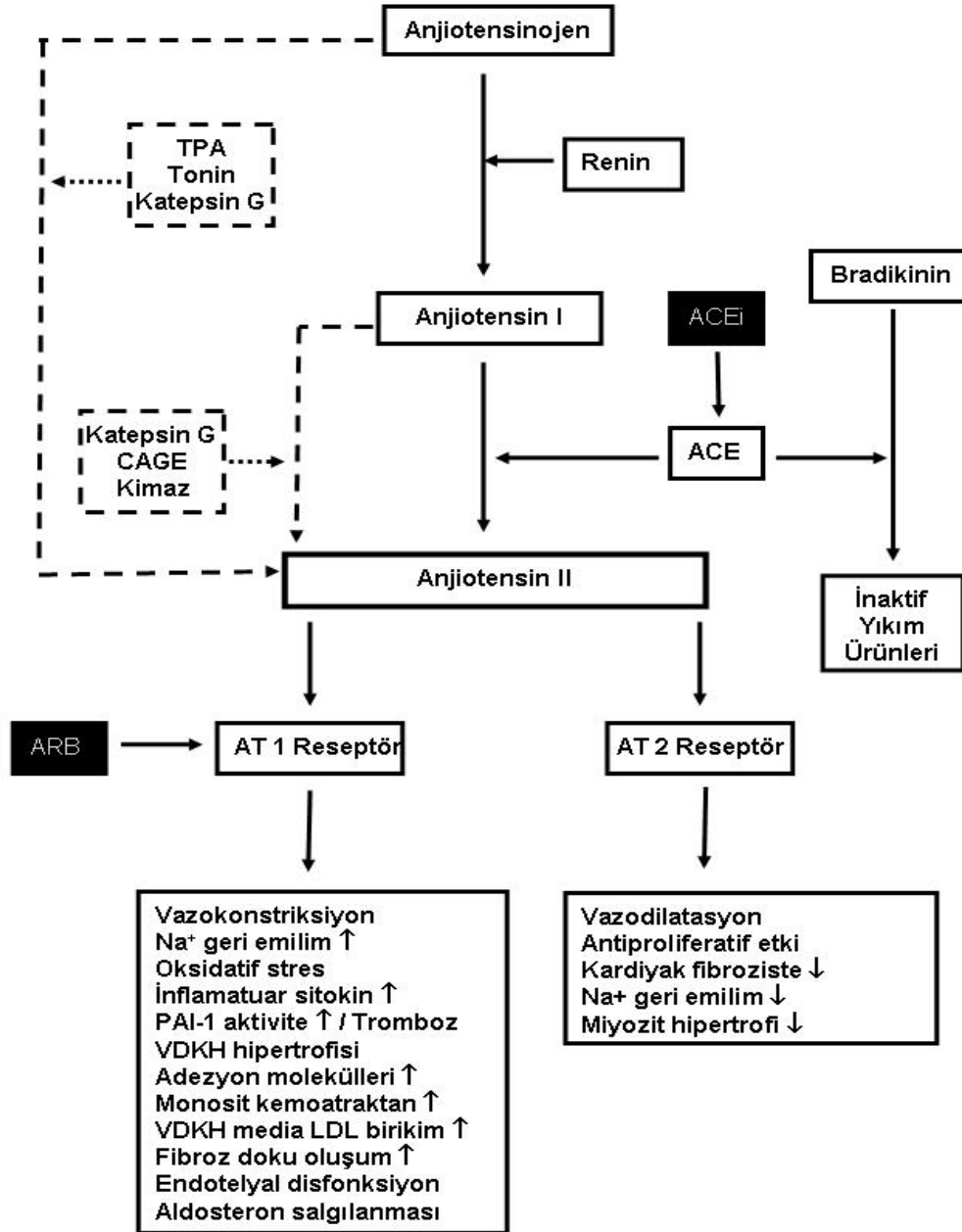
**Anjiotensin I:** Dolaşımdaki Ang I'in %90'ı, ACE aracılığıyla akciğerde yüksek biyoaktiviteli Ang II'ye dönüştürülür (89).

**Anjiotensin Dönüştürücü Enzim:** Yapısında iki çinko grubu bulunan bir metalloproteaz olan ACE, Ang I'in Ang II'ye dönüşümünde ve bradikinin yıkımında da rol aldığı için, RAAS ve kallikrein-kinin sisteminde kilit görev yapar. Bradikininin inaktif peptidlere dönüşmesini sağlayan ACE, kininaz II olarak ta adlandırılır. ACE inhibisyonu, dokularda kininlerin (bradikinin ve kalidin) birikmesine bağlı anjiyoödem, kuru öksürük, boğazda kuruma ve gıcıklanma gibi yan etkilere yol açabilir. Gen lokalizasyonu 17. kromozomda olan ACE'nin iki ayrı mRNA ile kodlanan iki formu vardır. Yüksek molekül ağırlıklı formu (170 kD) endotel, epitel, nöronal hücrelerde, düşük moleküler ağırlıklı (90kD) formu ise germinal hücrelerde bulunur. Organizmadaki dağılımı yaygın olan ACE, öncelikle damar endoteli, kalp, adrenal bezler ve akciğerlerde bulunur. Fizyolojik koşullardaki en yüksek ACE etkinliği, akciğer endotelinde bulunduğundan Ang I'in çoğu akciğerlerde Ang II'ye dönüşür (92,93).

**Anjiotensin II :** Ang II, RAAS'ın asıl aktif mediatörüdür. ACE, dolaşımla akciğerlere taşınan Ang I'in karboksi ucundaki iki aminoasiti uzaklaştırıp aktif oktapepid olan Ang II'ye dönüştürür (94). Ang II oluşmasını sağlayan alternatif yollar da vardır. Örneğin bazı patolojik durumlarda kimaz aracılığıyla Ang I'den Ang II oluşmaktadır. Normalde vasküler dokuda aktif olmayan kimaz enzimi, hasarlanmış ve aterosklerotik damar duvarlarında aktive olur ve Ang II oluşumunu sağlar. İnterstisyel sıvıda bulunan serin proteaz inhibitörleri, kimaz enzimini etkin şekilde inhibe ederler (90).

**Aldosteron:** Başlıca Ang II ve potasyumun etkisiyle adrenal korteks zona glomeruloza tabakasında sentezlenen steroid hormondur. Aldosteronun, ter ve tükürük bezleri, renal tübüler epitel ve distal kolondan sodyum emilimini ve potasyum salınımını uyarması genomik

aksiyonlarla oluşur. Etkisini bu hücrelerdeki özgün nükleer reseptörler aracılığıyla yapar. Yakın zamandaki çalışmalarda, aldosteronun nongenomik etkilerinin olduğu da gösterilmiştir. Nongenomik etkilerini, klasik mineralokortikoid inhibitörlere duyarlı olan reseptörler aracılığıyla doğrudan gerçekleştirmektedir. PKC ve kalsiyum artışına yol açarak kalp, damarlar ve böbrekte inflamasyon ve fibrozisi uyarmaktadır. Ang II'ye benzer şekilde, dokuda kolajen birikimini artırarak miyokarda fibrozise neden olmaktadır (95, 96).



**TPA:** Tissue plasminojen aktivatör; **CAGE:** Kimostatin-duyarlı anjiyotensin II oluşturuca enzim; **AT1:** Anjiotensin II tip 1 reseptörü; **ARB:** Anjiotensin II tip 1 reseptör blokerleri; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **PAI-1:** Plazminojen aktivatör inhibitörü-1; **VDKH:** Vasküler düz kas hücre; **LDL:** Low density lipoprotein; **ACE:** Angiotensin converting enzyme; **ACEi:** Angiotensin converting enzyme inhibitor.

**Şekil 8. Renin-anjiotensin-aldosteron sistemi**

### **Doku (Lokal) Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi**

Sistemik ya da sirküler olarak adlandırılan klasik RAAS'a ait bileşenlerin olağan dışı yerlerde saptanması (beyinde renin saptanması v.s) ve endokrin etkilerle bu durumun açıklanamaması, lokal veya doku RAAS'ının bulunmasını sağlamıştır (97). Doku ya da lokal RAAS; Ang II ve diğer anjiotensin peptidleri ve ilgili reseptörlerin üretimi için gerekli tüm bileşenleri içermektedir. Buna ek olarak renin/prorenin reseptörlerine de sahiptir. Bu da RAAS'ın sadece endokrin değil aynı zamanda parakrin ve intrakrin sistem olduğunu gösterir (90). Lokal RAAS'ın tüm bileşenlerinin kalpte, beyinde, pankreasta, plasentada, testislerde, yağ dokusunda ve vasküler dokuda bulunabileceği gösterilmiştir (98). Organizma RAAS aktivitesinin %10-20'sini sistemik RAAS, %80-90'ını lokal RAAS oluşturur. Her iki RAAS'ın birbirlerini tamamlayıcı tarzda işlev gördükleri bildirilmektedir (90,99). Sistemik RAAS'ın sistemik volümün ve elektrolit balansın düzenlenmesinde, lokal RAAS'ın proliferasyon, büyüme, protein sentezi ve organ fonksiyonları üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Böbrekteki RAAS'ın sistemik kan basıncını ve Na<sup>+</sup> reabsorpsiyonunu regüle ettiği, beyindeki RAAS'ın nörotransmisyonu kolaylaştırdığı, vasopressin salınımını ve sempatik deşarjı arttırdığı varsayılmaktadır. Doku RAAS'ının potansiyel önemi giderek artmaktadır. ACEi'lerinin antihipertansif etkilerinin plazmadakinden çok dokudaki ACE inhibisyonu ile daha güçlü ilişkili olması sistemik RAAS aktivitesi normal veya düşük olan hipertansif hastaların RAAS inhibitörleri ile etkin şekilde tedavi edilebilmesi bu görüşü desteklemektedir (97).

### **Anjiotensin II ve Reseptörleri**

Anjiotensin II etkilerini başlıca, iyi tanımlanmış AT<sub>1</sub> ve Ang II tip 2 (AT<sub>2</sub>) olarak adlandırılan iki reseptör üzerinden göstermektedir. AT<sub>1</sub> ve AT<sub>2</sub>'nin alt grupları, Ang II bağlamada benzer özellikler göstermesine karşın genomik yapıları ve yerleşimleri ile dokuya özgün ekspresyonu ve düzenlenmesi farklılıklar göstermektedir. Her ikisi de G protein ailesine mensuptur. AT<sub>1</sub> reseptörü, 3. kromozoma lokalize, 359 aminoasitten oluşan ve 40.9 molekül ağırlığında transmembran grup reseptörlerindedir. Hücre dışındaki N-terminali ve transmembran helezon, Ang II'nin bağlanmasında majör rol oynar (100). 363 aminoasitten oluşan ve AT<sub>1A</sub> veya AT<sub>1B</sub> ile zayıf aminoasit dizilim benzerliği gösteren AT<sub>2</sub> reseptörü X kromozomunda lokalizedir. Ang II'nin AT<sub>3</sub> ve AT<sub>4</sub> adıyla iki reseptörü daha tanımlanmış ancak bunların farmakolojisi tam olarak karakterize edilmemiştir (101,102).

Anjiotensin II tip 1 reseptörünün fonksiyonları (103-108);

- Vazokonstriktör etkilidir.
- Böbrek tubüllerinden Na reabsorbsiyonunu artırır.
- İntraglomerüler basınç ve kapiller permeabilite artışına neden olur.
- Protoonkogenik uyarıyla kemotaksis ve migrasyonu hızlandırır, damar hücrelerinde proliferasyon ve hipertrofi ile intimal hiperplazi ve anjiogenezise yol açar.
- Miyokarda kontraktilite, hipertrofi, kollajen sentezi ve fibrozisi artırıcı etki yapar.
- Trombositlerin adezyonu ve agregasyonuna yol açması ve PAI-1 aktivitesini artırması protrombotik etkisinden sorumludur.
- ‘Transforming growth factor- $\beta_1$ ’ in yapımını arttırarak renal fibrozise neden olur.
- ‘Vascular endothelial growth factor’ yapımını uyararak kapiller geçirgenliği artırır.
- Süperoksit radikal oluşumunu uyarır.
- Adrenal korteksten aldosteron salınmasını uyarır.
- Endotelin sekresyonunu artırır.
- Beyindeki subfornikal organ üzerinden susama hissini artırır, baroreseptör reflekse cevabı azaltır.
- Tuza karşı iştah artışına yol açar .
- Ön hipofizden ACTH salınımını, arka hipofizden ADH salınımını artırır.
- Postganglionik sempatik sinirlere direkt etki ile norepinefrin salınımını uyarır.
- İnsülin direncine neden olur.

Anjiotensin II tip 2 reseptörünün fonksiyonları (109,112);

- Vazodilatör etkilidir. Bu etkisini nitrik oksit (NO) ve bradikinin aracılığı ile yaptığı düşünölmektedir.
- Renal vasköler direnci azaltıcı ve natriürezisi artırıcı etki yapar.
- Yapılan çalışmalarda; programlı hücre ölümü olan apoptozisi artırdığı gösterilmiştir.
- Damar düz kas hücreleri,vasköler endotel ve miyokard hücrelerinde proliferasyonu baskılayıcı etkileri vardır.
- Prostaglandin yapımını artırır.
- Anjiogenezis baskılanmasında rol alır.
- Doku rejenerasyonuna katkıda bulunur.
- Kollajen doku artışını baskılar.
- Fetal doku gelişiminde önemli rol alır.

## **RENİN ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ VE DİYABETİK NEFROPATİ**

Son 20 yıldır RAAS ile diyabetik renal hastalığın ilerlemesi arasındaki ilişki yoğun şekilde araştırılmaktadır (113). DM'lilerde HT, retinopati, nefropati ve kardiyovasküler hastalıkların sık gelişmesi RAAS'ın diyabetik komplikasyonların oluşması ve progresyonundaki önemini göstermektedir. RAAS bileşenlerinden özellikle Ang II'nin DNP patogenezindeki rolü iyi bilinmektedir. Ang II etkilerini, hem direkt reseptörleri aracılığıyla hem de indirekt olarak hücre içi sinyalleri uyararak vozoaktif ajanların, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımını artırarak göstermektedir (114).

### **Anjiotensinin II'nin Sistemik ve Glomerüler Hemodinamik Etkileri**

Anjiotensin II, kuvvetli bir vazokonstriktör olarak öncelikle periferel vasküler direnci artırarak KB'nı yükseltir. Direkt olarak böbrek proksimal tubüllerinden veya aldosteron aracılığıyla distal tubül ve kortikal toplayıcı kanallardan Na tulumunu artırarak renal Na kaybını azaltır. Ayrıca susama hissi, tuza karşı iştah ve intestinal Na reabsorbsiyonunu uyararak hücre dışı sıvı volümünün artmasına yol açar. DM'de bağımsız regüle edilen lokal RAAS'ın, aktivitesinin artışı ve sistemik RAAS ile iletişim içinde çalıştığı düşünülmektedir (115). Çalışmalar DM'de plazma renin aktivitesinin baskılandığını, doku renin düzeyinin artmış olduğunu göstermiştir. Böbrek interstisyel sıvı Ang II konsantrasyonunun plazmanın 1000 katı yüksek olduğu belirlenmiştir (116). Ang II, glomerülerden geçen kan akımınının, efferent arteriollerde tonusun ve intraglomerüler basıncın ayarlanmasında kilit rol oynar. Hiperglisemi ile artan renal Ang II, renal kan akımını artırır, glomerül içi basıncı yükseltir ve GFR'nin artmasına yol açar. Efferent arteriollerde vazokonstriksiyonla basınç daha da artar. Tüm bunlar renal bozulmayı hızlandıran filtrasyon membran geçirgenliğinin artışı ve proteinüri ile sonuçlanır.

### **Anjiotensinin II'nin Hemodinamik Yol Dışındaki Etkileri**

Anjiotensin II aktivite artışının hemodinamik etkilerinden başka etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır (117):

■ Glomerüler basınç artışına yol açmasından bağımsız olarak glomerüllerin makromoleküllere olan geçirgenliğini etkilemektedir.

■ Doku hasarı ve onarımı ile ilgili mekanizmaları etkilemekte, inflamasyon ve fibrozise neden olmaktadır.

- Proliferatif ve protrombotik aktiviteleri ile endotelial disfonksiyona yol açmaktadır.

### **Proteinüri ve Anjiotensin II etkileri**

Proteinürinin, DM'deki glomerül içi basınç artışı ve makromoleküllere karşı geçirgenlik artışı gibi iki etki ile başladığı çalışmalarla gösterilmiştir (118). DM'deki proteinüri; akut dinamik değişikliklere eklenen kronik yapısal değişikliklerle artmaktadır. DNP başlangıcında oluşan glomerüler podosit kaybı ve ayaksı çıkıntılardaki genişlemenin ACE inhibisyonu veya AT1 reseptör blokajıyla geriye döndürülebilmesi Ang II etkisinin önemini göstermektedir (119). Aldosteron da benzer şekilde, DNP'yi içeren proteinüriye neden olan böbrek hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yeni yapılan çalışmalarda aldosteron kaçağı olan Tip 2 DM hastalarında üriner albumin atılımının kaçak olmayanlardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (120).

### **Büyüme Faktörü Olarak Anjiotensin II etkileri**

Glomerüler mezangial, damar düz kas ve kalp hücreleri gibi birçok hücre tipinde Ang II büyüme faktörü görevi yapmaktadır (78). Ayrıca, damar ve mezangiyum hücrelerinde mitojen etki yapan büyüme faktörlerinin sentez ve salınımını uyarmaktadır. Bu da mezangial hücre proliferasyonu ile mezangial matrikste yapım artışı ve ekspansiyonuna yol açarak glomerül filtrasyon yüzeyini daraltmaktadır. Aynı zamanda AT1 reseptörü ile VEGF yapımını uyarmaktadır. Artan VEGF de hasarlanmış dokuda yeni damar oluşmasına ve solüt ile proteinlerin kapillerlerden kaçışının artışına neden olmaktadır (121).

### **Oksidatif Stres, Renal İnflamasyon ve Anjiotensin II Etkileri**

Anjiotensin II, AT1 reseptörü üzerinden renal ve düz kas hücrelerindeki NADPH oksidazı etkileyerek süperoksit radikal oluşturmakta ve oksidatif stresi artırmaktadır. NO ile etkileşime giren  $O_2^-$  yeni radikal olan  $ONOO^-$  oluşturmaktadır. Bunun sonucunda NO'nun fonksiyonu bozulmakta ve yararlılığı azalmaktadır. NO'nun sistemik inhibisyonu, hem korteks hem medullada renal kan akımını azaltır ve arteriyel kan basıncını yükseltir. NO'nun böbrek üzerindeki etkileri, vaza rektada dilatasyon ile vazopressin, noradrenalin ve Ang II'nin vazokonstrüktör etkilerine karşı koruyucu özelliktedir. Ayrıca Henle kulpunun çıkan kalın kolu ve kollektör tüplerden medüllaya elektrolit taşınmasını baskılamaktadır (122).

Oksidatif stres, hücrenin duvarındaki fosfolipidlerde bozukluklara yol açarak lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır (123,124). Diyabetli hastalarda

oksidatif stresin artması aşırı kullanım sonucu antioksidan kapasitenin yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Bu da diğer organlardakine benzer şekilde renal hücre ve dokunun bozulmasını hızlandırmaktadır (125).

### **Renal Matriks Sentezi, Fibrozis ve Anjiotensin II Etkileri**

Anjiotensin II çeşitli mekanizmalarla renal fibrozis gelişiminde rol oynamaktadır. Mezangial hücrelerin proliferasyonu glomerüloskleroz gelişiminde önemli rol alır. Ang II, hem fibronektin, laminin ve kollajen gibi ECM proteinlerinin sentezini artırarak hem de matriks proteinlerindeki artışı dengeleyen metalloproteinazları inhibe ederek mezangial hücre proliferasyonu ve matriks artışına yol açar. Mezangial matriksteki bu artış, Ang II tarafından uyarılan TGF- $\beta_1$  aracılığıyla olur (126). Ang II, glomerüler bozulmanın yanında tübülointerstisyel fibroze de neden olmaktadır. Ang II'nin fibroblastların miyofibroblastlara fenotipik değişimini uyarabileceği, aktive edilmiş fibroblastların çoğalabileceği ve periglomerüler ve peritübüler alanları doldurup tübülointerstisyel alanda matriks depolanmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca proinflamatuvar sitokin gibi davranan Ang II, inflamatuvar yanıtın çeşitli aşamalarına katılarak da fibrozis gelişiminde yer almaktadır. Direkt kemotaksis ile ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi kemotaktik faktörlerin sentezini uyarmaktadır. Proinflamatuvar mediyatörleri (sitokinler, kemokinler, adhezyon molekülleri, NF  $\kappa$ B) artırmaktadır. RAAS blokajı ile renal hasarlı dokudaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (127).

### **İnsülin Direnci ve Anjiotensin II Etkileri**

Birçok çalışmada, insülin direnci ile RAAS arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ang II infüzyonu ile insülin direncinin arttığı gösterilmiştir (108). Sistemik Ang II;  $\beta$  hücre apoptozisi, pro-inflamatuvar modulasyon, glukoneogenez ile hepatik glukoz salınımını azaltarak ve plazma trigliserid miktarını artırarak bozulmuş glukoz toleransına neden olur. Ayrıca, Ang II insülin reseptör substrat 1 ilişkili PI3K aktivitesini bozarak insülin rezistansına yol açar (128).

Lokal RAAS ve insülin direnci arasında da bağlantı vardır. Ang II, AT1 reseptörü aracılığıyla hücre proliferasyonu, inflamasyon ve trombosise yol açan MAPK'ı aktive etmektedir. RAAS'ın tüm bileşenleri yağ dokusunda da bulunmaktadır. Yağ hücrelerinden salınımı uyarılan TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinler de insülin direncine katkıda bulunur.

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri veya ARB'ler; periferel iskelet kaslara insülin ve glukoz dağılımını düzenleyerek; apoptozis, inflamasyon ve fibroziste rol olan Ang II'nin etkilerini tersine çevirerek; pankreastaki  $\beta$ -hücre ölümünü azaltarak ve insülin sekresyonu için gerekli  $\beta$ -hücre kütleini koruyarak; insülin direncine yol açan adipoz doku kütleini azaltarak; glukozun hücre içine taşınmasını artırarak insülin direncini azaltırlar (129).

Diyabetik nefropatide Ang II'nin tetiklediği olası mekanizmalar (130);

- Sistemik hipertansiyon gelişimi
- Glomerüler basıncın ve geçirgenliğin artışı
- Mezangial hücre kontraksiyonu ile filtrasyon yüzey alanının azalması
- Renal hücre proliferasyonu ve hipertrofisi
- Ekstrasellüler matriks üretiminin ve/veya yıkımının azalması
- Büyüme faktörlerinin (TGF-  $\beta_1$ ) uyarılması
- Süperoksit üretiminin uyarılması
- İnsülin direnci gelişimi

## **ANJİOTENSİN II TİP 1 RESEPTÖR BLOKERLERİ**

Diyabetik nefropatinin önlenmesi ve tedavi edilmesinde RAAS inhibisyonu esas rolü oynamaktadır (131). ACEi ve ARB'lerin ikisi de RAAS'ı inhibe ettiği halde, bu ilaçlar kısmen farklı mekanizmalarla bunu gerçekleştirmekte ve bu nedenle sonuçlar farklılık göstermektedir. Son yıllarda aşağıdaki nedenlerle Ang II'nin etkilerini engellemek amacıyla ACE inhibisyonu dışında alternatif ilaçların araştırılmasına yönelinmiştir (132-134):

- Hastalarda ACEi ile %5-20 oranında inatçı kuru öksürük gelişmesi
- Lokal RAAS'ın, özellikle dokuya geçişi az olan ACEi'leri tarafından tam olarak inhibe edilememesi
- Hastaların yaklaşık %40 kadarında aldosteron supresyonunda yetersizlik oluşması
- Hastaların %15 kadarında Ang II reaktivasyonu gelişmesi
- ACEi tedavisi sırasında oluşan aşırı bradikinin salınımının, beta 2 reseptörler aracılığıyla PKC artışına neden olması ve bu artışın, beta adrenerjik stimülasyon ve noradrenalin salınım artışına yol açması
- Bradikinin etkisi ile sinaptik kavşakta, noradrenalinin geri emiliminin engellenebilmesi



Anjiotensinin, renal ve kardiyovasküler etkilerinin büyük çoğunluğunu, dokudaki AT 1 reseptörleri aracılığı ile gerçekleştiğinin anlaşılması, ARB grubu ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır. ARB'ler, sistemik Ang II'nin yanı sıra lokal Ang II'nin de etkilerini engellerler (135). Ayrıca, sempatotik ve aldosteron salınımının dolaylı inhibisyonuna bağlı natriüretik etkileri de vardır (136). ARB'ler, AT1 reseptörlerinin blokajıyla birlikte AT2 reseptörlerini uyardığından bu reseptörlerin aşırı uyarılmasından kaynaklanan apoptozise bağlı uzun vadede ortaya çıkabilecek yan etkiler düşünülmektedir (137).

Günümüzde 'sartanlar' olarak bilinen ARB'ler losartan, kandesartan, eprosartan, irbesartan, olmesartan, telmisartan ve valsartan olmak üzere 7 üyeden oluşmaktadır. Temel yapı olarak benzil imidazol türevlerini içerirler. Kimyasal yapılarına değişik maddelerin eklenmesi ile bu farmasötik sınıfın üyeleri birbirlerinden farklılaşmaktadır. Losartan dışında en belirgin özellikleri aktif metabolit oluşturmamaları ve bu gruptaki tüm ilaçların proteinlere bağlanma oranlarının yüksek olmasıdır (138).

İrbesartan, diğer ARB'ler gibi benzilamid yapısında, Ang II'ye karşı yarışmalı olmayan, antagonist etkiye sahip seçici bir AT1 reseptör blokeridir. Oral yolla uygulanan irbesartan hızla emilir, biyoyararlılığı %60-80'dir ve gıdalar emilimini etkilemez. Dolaşımdaki irbesartanın %90'ı proteinlere bağlıdır. Eliminasyon yarı ömrü, doza bağımlıdır ve 12 ile 20 saat arasında değişir. Hem safra yollarından hem de böbreklerden atılan irbesartan'ın, böbrek ve karaciğer hastalığı olanlarda doz ayarlanmasına gerek yoktur (139).

Tip 2 DM hastalarında, "Program for Irbesartan Mortality and Morbidity Evaluation" (PRIME); ARB etkisini araştıran etkileyici bir çalışmadır. "Diabetic Nephropathy Trial" (IDNT) ve "The Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria" (IRMA-2) adlı iki enternasyonel çalışmadan oluşmaktadır. Bu çalışmalarla, ARB'lerin aşikar proteinüri gelişimini önleyebileceği (IRMA-2) veya nefropatinin ilerlemesini geciktirebileceği (IDNT) sorularına yanıt aranmaktadır (140). Çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü IDNT çalışmasında, Tip 2 DM ve nefropatisi olan 1715 hipertansiyonlu hastaya, 2.6 yıl boyunca plasebo, irbesartan, amlodipin tedavisi verilmiş. Çalışmanın sonucunda primer sonlanım noktası olarak seçilen üç parametrenin (bazal serum kreatinin artışı, son dönem böbrek yetmezliği gelişimi ve herhangi bir nedene bağlı ölüm) irbesartan grubunda düşük riskli bulunmuş (141). Çalışma sonunda, ABD ve Avrupa'da yapılan finansal analizlerde Tip 2 DM, nefropati ve hipertansiyonu olan hastaların, amlodipin veya standart antihipertansif tedavilerle karşılaştırıldığında irbesartan ile tedavi edilenlerin 3 yıl sonundaki maliyetin daha düşük olduğu görülmüş (142). IRMA-2 çalışması ise, Tip 2 DM ve

mikroalbuminürisi olan 590 hipertansiyonlu hastayı kapsayan çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışmada hastalar plasebo grubu ve günde bir kez 150 mg irbesartan alanlar veya 300 mg irbesartan alanlar olmak üzere üç gruba ayrılmış. Bu çalışmada, 2 yıllık izlem sonunda irbesartan'ın doz bağımlı olarak klinik albuminüriyi ve DNP oranını direkt olarak azalttığı gözlenmiş (143). Her iki çalışmada, ARB tedavisinin renal koruyucu etkilerinin kan basıncındaki değişikliklerden bağımsız olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (140,141,143).

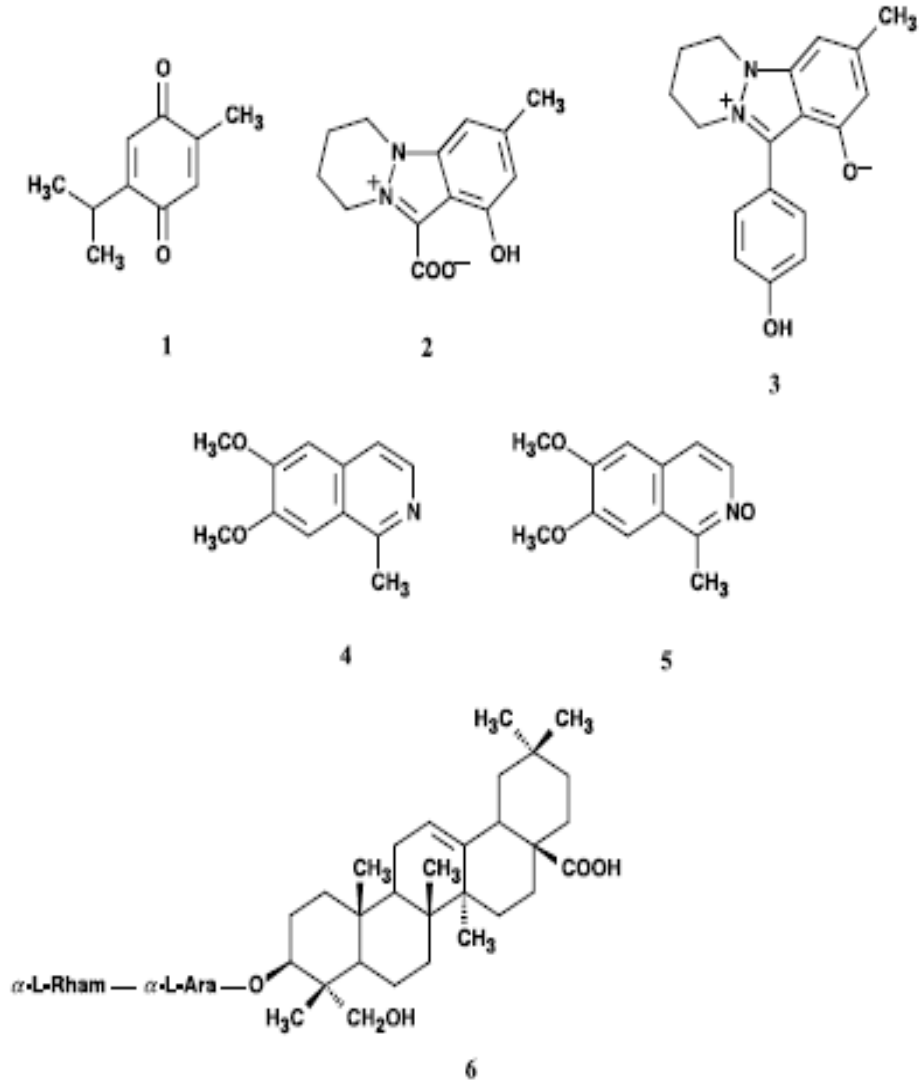
### **NİGELLA SATİVA VE DİYABET**

Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller) familyasına ait olan, black seed veya black cumin olarak bilinen NS, binlerce yıldır baharat olarak yiyeceklerin korunmasında ve çeşitli hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılmıştır. Son iki dekatta, NS'nin çeşitli vücut sistemleri üzerinde etkilerini araştıran in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmıştır (144).

Besin olarak kullanılan kısmı bitkinin kapsül içerisindeki tohumudur. NS tohumları uçuc (%0.38-0.49) ve sabit (%30-40) yağ, protein (%20-30), saponin, melantin, nigellin ve tanen içerir (145) (Şekil 9).

#### **Antioksidan Etkisi**

Sabit ve uçucu yağların esas komponenti olan NS'nin içindeki timokinon'un lipozomlardaki non-enzimatik lipid peroksidasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda, bu bileşiklerin çeşitli antioksidan etkilerine karşın prooksidan etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. NS yağının içindeki farklı bileşiklerin birbirlerini destekleyici etkilerinin olması farmakolojik çalışmalarda tohumdaki tüm yağın kullanılmasını önemli kılmaktadır. NS'nin birden çok faktörle ilgili antioksidan etkisi demir-kompleks aktivitesini kapsar gözükmemektedir. Serbest radikallerin birçok hastalık ve metabolik bozuklukların gelişimi ile ilişkili olması güçlü bir antioksidan olan NS'nin tamamlayıcı tıpta kullanılabileceğini düşündürmektedir (146). Bu antioksidan özelliği, CCl4 hepatotoksitesi (147), karaciğerdeki fibrozis ve siroz (148), Schistosoma mansoni enfeksiyonunun neden olduğu hepatik hasarlara (149) karşı kullanımının yararlarını açıklayabilir.



Şekil 9. *Nigella sativa* yağı içinde bulunan aktif bileşiklerin kimyasal yapısı

### Antidiyabetik Etki

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) araştırma komitesi 1980 yılında diyabet tedavisi için tamamlayıcı tıpta kullanılan hipoglisemik ajanların araştırılmasını önermiştir (150). Bu amaçla, hipoglisemik, enfeksiyon önleyici ve immunmodülatör etkilerinden ötürü NS yağı, deneysel DNP’de kullanılmıştır. Kan glukozu ve HbA1c değerlerini düşürdüğü gözlenen NS yağının hipoglisemik etkisinin mekanizması netleştirilememiştir (151). Karaciğerin glukoz üretimini azalttığı (151), intestinal glukoz absorpsiyonunu önlediği (152), oksidatif stresi azaltarak pankreasta beta hücre rezervini koruduğu (153) bildirilmiştir.

### **Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri**

Deneysel DNP çalışmalarında, NS yağının içinde bulunan uçucu yağ ve aktif bileşeni timokinon'un, KB'nı düşürdüğü gösterilmiştir. Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinin birden çok faktöre bağlı olduğu, triptaminerjik ve kolinerjik mekanizmaları direkt ve dolaylı yollardan etkilediği düşünülmektedir. Bu bulgular, NS yağının antihipertansif ajan olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir (21,31).

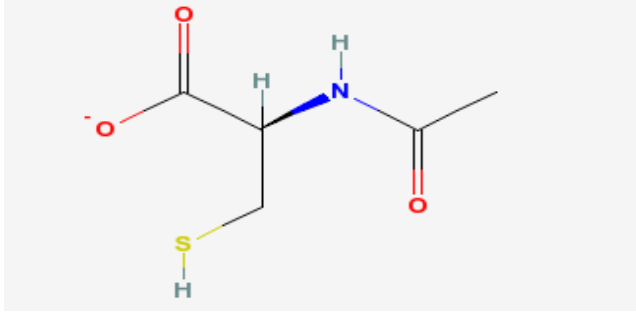
### **Kan Sayımı Üzerindeki Etkileri**

Çalışmalarda, NS'nin hemoglobin ve hemotokrit değerlerini yükseltici, lökosit ve trombosit sayıları ile kan trigliserid ve kolesterol değerlerini azaltıcı etkileri gözlenmiştir (154). Ayrıca, NS'nin analjezik, anti-inflamatuar (155), anti-hepatotoksik (22,31,147-149), anti-nefrotoksik (156), anti-karsinojenik (31,144) antimikrobiyal (20,31,146) ve antiparazitik (20,31,146) etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

### **N-ASETİL SİSTEİN VE DİYABET**

N-asetil sistein, hem indirgenmiş glutatyon hem de L-sistein amino asidinin asetilize edilmiş öncülüdür. 40 yılı aşkın süredir kronik akciğer hastalıklarında mukolitik ajan ve asetaminofen doz aşımına bağlı hepatotoksitede antidot olarak kullanılmaktadır (29). Yakın zamanda yapılan insan ve hayvan çalışmalarında NAC'ın güçlü antioksidan özelliği olduğu ve kanser, kalp hastalığı, HIV enfeksiyonu, ağır metal toksisitesi ve serbest radikal hasarı ile ilişkili hastalıkların tedavisinde tamamlayıcı ajan olarak kullanılabilceği bildirilmiştir. NAC'ın ayrıca Sjögren sendromu, sigaranın bırakılması, influenza, Hepatit C ve miyoklonik epilepsi tedavisinde de etkili olduğu bilinmektedir (157). N-asetil sistein,  $C_5H_9NO_3S$  kimyasal formülü ile moleküler ağırlığı 163.2 kDa olan sülfidril (SH) içeren bir tiol bileşiğidir (29), (Şekil 10). Oral alımın ardından çeşitli dokulardan hızla emilerek deasetilize olur. Barsaklar ve karaciğerde metabolize edilerek peptidlere yıkılır. İçerisindeki SH grubu metabolik aktivitenin çoğundan sorumludur. Asetil sağlayıcı amino grubu molekülün oksidasyona karşı korunmasında rol alır. Oral alınan NAC'ın yararlı etkilerinin çoğu hücre dışı sistin'in sistein'e indirgenmesi ya da SH metabolitlerinin kaynağını oluşturmasındandır. Bu özelliği ile GSH sentezini uyarmakta, glutatyon-S-transferaz aktivitesini ve detoksifikasyonu artırmakta ve reaktif oksidan radikallere direkt etki edebilmektedir (158). Jo ve ark. (159) 2009 yılında anjiyografi yapılan hastalarda, NAC verilenlerdeki kan kreatinin artışının bilinen klasik bir

antioksidan olan C vitamininden daha düşük olduğunu ve bu olumlu farklılığın DM'lilerde daha da belirginleştiğini bildirmişlerdir.



Şekil 10. N-asetil sisteinin kimyasal yapısı

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, 2007-2010 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı ve Deneysel Hayvanları Laboratuvar'ı işbirliğiyle yapıldı. Bağımsız, eş zamanlı kontrollü deneysel çalışma olarak planlanarak çalışma öncesinde Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca (TÜBAP 889) yapımı desteklendi (Ek 1).

### DENEKLERİN GRUPLANDIRILMASI

Çalışmamıza 3,5-4 aylık, ortalama ağırlıkları  $233,5 \pm 32,8$  gr olan Sprague-Dawley cinsi 81 adet erkek rat alındı. Ratlar Trakya Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarlarından sağlandı.

Sağlıklı kontrol için 7 adet rat ayrıldıktan sonra, geri kalan 74 rata Tip 1 DM oluşturulmak üzere sitrat tampon içerisinde çözülmüş streptozotosin (STZ) 45 mg/kg intraperitoneal uygulandı. 48 saat sonra kuyruktan alınan kan glukoz değeri  $\geq 250$  mg/dl olanlar DM'li kabul edildi. Kan glukoz değeri 250 mg/dl'nin altında olan 9 rat çalışma dışı bırakıldı ve 3 rat injeksiyon sonrası 24 saat içinde öldü. DM oluşturulmuş diğer 62 rat ağırlıklarına ve glukoz değerlerine göre dengeli bir şekilde 7 gruba dağıtıldı.

Ratlara verilen NS yağı, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nden aşağıda anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. NS tohumları bir karıştırıcı içinde toz haline getirildikten sonra 20 gr tohuma, 400 ml distile su eklendi ve buhar distilasyon

yöntemiyle ekstraksiyon yapıldı. Distilasyon süreci 200 ml distilat toplanana kadar devam etti. Distilat kloroformla üç kez ekstre edildi. Nem, anhidroz sodyum sülfat ile uzaklaştırıldı ve sonuçta elde edilen ekstrakt (ekstre) volatil (uçucu) yağ oluşana dek 40 °C su banyosunda buharlaştırıldı. 500 mg uçucu yağ 1 ml dimetil sülfoksid içinde çözüldükten sonra 9 ml salin her 1 ml çözeltiye 50 mg uçucu yağ derişimi elde edecek şekilde eklendi.

Ratlar, standart laboratuvar koşullarında (22±1°C ısı, %50-60 nem oranı, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) barındırıldılar. Çalışma boyunca, kafeslerde 2'şer rat olacak şekilde günlük temizlikleri yapıldı ve %21 protein içeren standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Hastalıklı kontrol grubunda 9 adet rat, NAC grubunda 5 adet rat, IR grubunda 4 adet rat, IR+NAC grubunda 2 adet rat, IR+NS grubunda 2 adet rat ve 7. grup olarak tasarlanan NS grubundaki 5 rat olmak üzere toplam 27 rat kilo kaybederek ve hiperglisemi-ketoasidoz tablosu içinde öldüler.

1. Grup I (Sağlıklı kontrol grubu, n= 7): 12 hafta boyunca içme suyu ve aynı yem verildi.
2. Grup II (Hastalıklı kontrol grubu, n=7): DM oluşturulan ratlara 12 hafta boyunca içme suyu ve aynı yem verildi.
3. Grup III (R grubu, n=8): DM oluşturulan ratlara 12 hafta boyunca 5 mg/kg/gün irbesartan 2'şer ml suda çözülerek oral yoldan verildi.
4. Grup IV (NAC grubu, n=6): DM oluşturulan ratlara 12 hafta boyunca 100 mg/kg/gün NAC 2'şer ml suda çözülerek oral yoldan verildi.
5. Grup V (IR+NAC grubu, n=8): DM oluşturulan ratlara 12 hafta boyunca 5 mg/kg/gün irbesartan ve 100 mg/kg/gün NAC 2'şer ml suda çözülerek oral yoldan verildi.
6. Grup VI (IR+NS grubu, n=6): DM oluşturulan ratlara 12 hafta boyunca 5 mg/kg/gün irbesartan ve 0.2 ml/gün Nigella sativa yağı 2'şer ml suda çözülerek oral yoldan verildi.

Günlük oral uygulama; sağlıklı gruba içme suyu, hastalıklı gruplara içme suyunda çözülmüş maddeler 2 ml olarak damlalıkla verildi.

## **LABORATUVAR TETKİKLERİ**

Ratlar, 12 haftalık tedavi sonunda Harvard metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. İdrar miktarları ve kiloları kaydedildi. Accu chek Go ölçüm aleti ile ratların kan glukoz değerleri kuyruktan ölçüldü. Ketamin (60-80 mg/kg) ve xylazin (5-10 mg/kg) intramuskuler anestezisi uygulanarak intrakardiyak yolla kanları alınan ratlar sakrifiye edildiler. Heparinli enjektörlere alınan kanın 2 ml'si ayrılarak aynı gün Biyokimya Laboratuvarı'nda Coulter LH 750 cihazında hemogram, Variant 2 cihazında HbA1c çalışıldı.

Kalan kan örnekleri soğuk santrifüjde çevrilerek plazmaları -70 °C derin dondurucuda saklandı. Daha sonra tüm grupların plazmaları birlikte incelenerek üre, kreatinin, total protein, albumin, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ürik asit, total kolesterol, trigliserid, HDL, C-reaktif protein (CRP), endotelin, TNF-α ölçümleri yapıldı. 24 saatlik idrar örneği 3000 devirde 5 dk santrifüj edilerek süpernatantlar 2 ml'lik ependorfta -70 °C'de saklandı. Saklanan idrar örneklerinde kreatinin, glukoz, albumin, total protein, Na<sup>+</sup> değerleri çalışıldı. Ayrıca idrarla atılan N-asetil glukozaminidaz (NAG), endotelin ve TNF-α değerleri ölçüldü. Ratların karınları açılarak, sağ ve sol böbrekleri çıkarıldı ve %0.9'luk NaCl ile yıkanıp sagittal olarak ikiye ayrıldı. Sol böbrek histopatolojik inceleme için formoline kondu. Diğer yarısı daha sonra süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) çalışılması için önceden hazırlanmış ve kodlanmış alüminyum folyolara sarılarak -70 °C'de derin dondurucuda tutuldu.

**Kreatinin klirensi:** -70 °C'de korunarak çözülen idrarda ve plazmada kreatinin, Biyokimya Laboratuvarı'nda Konelab Prime 60i cihazında çalışıldıktan sonra aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{GFR (ml/dk)} = \frac{U_{\text{Cr}} \times 24 \text{ saatlik idrar hacmi}}{P_{\text{Cr}} \times 24 \times 60 \text{ dk}}$$

$U_{\text{Cr}}$ : idrardaki kreatinin derişimi

$P_{\text{Cr}}$ : plazmadaki kreatinin derişimi

**Fraksiyone Na<sup>+</sup> atılımı:** -70 °C'de saklanan idrar örneğinde idrar ve plazma Na<sup>+</sup>'u ile idrar ve plazma kreatinini Biyokimya Laboratuvarı'nda Konelab Prime 60i cihazında çalışıldıktan sonra şu formülle fraksiyone Na<sup>+</sup> atılımı (FENa) hesaplandı:

$$\text{FENa} = \frac{U_{\text{Na}^+} \times P_{\text{Cr}}}{P_{\text{Na}^+} \times U_{\text{Cr}}} \times 100$$

$U_{\text{Na}^+}$ : idrardaki Na<sup>+</sup> derişimi

$P_{\text{Na}^+}$ : plazmadaki Na<sup>+</sup> derişimi



**Üriner glukoz atılımının incelenmesi:** -70 °C’de saklanan idrar örneğinde idrar glukozu Biyokimya Laboratuvarı’nda çalışıldı ve UGA (mg/gün/100gr) şu formülle hesaplandı:

$$UGA = \frac{U_{\text{glukoz}} \times 100}{\text{Kilo}2 \times 100} \times \text{İdrar Volumü}$$

**Üriner albumin atılımının incelenmesi:** 24 saatlik idrar örneği 3000 devirde 5 dk santrifüj edilerek süpernatantlar 2 ml’lik ependorfta -70 °C’de saklandı. Biyokimya Laboratuvarı’nda İmmulite Albumin kiti ile ( LOT No: LKHA10308, Üretici firma: BioDPC) İmmulite 1000 otoanalizöründe kimyasal immünoassay yöntemiyle tek seferde toplu olarak çalışıldı ve üriner albumin atılımı (mikrogram/gün/100gr) şu formülle hesaplandı:

$$UAA = \frac{U_{\text{alb}} \times 100}{\text{Kilo}2 \times 100} \times \text{İdrar Volumü} \times 1000$$

**Üriner protein atılımının incelenmesi:** -70 °C’de saklanan idrar örneğinde protein Biyokimya Laboratuvarı’nda çalışıldı ve UPA (mg/gün/100gr) şu formülle hesaplandı:

$$UPA = \frac{U_{\text{protein}} \times 100}{\text{Kilo}2 \times 100} \times \text{İdrar Volumü}$$

**İdrarda N-asetil Glukozaminidaz atılımının incelenmesi:** -70 °C’de saklanan idrar örneklerinde NAG, Roche Diagnostic Mannheim kiti (Katalog No:875 406) kullanılarak, Shimadzu UV 1208 cihazında, Biyofizik Laboratuvarında çalışıldı. Deney aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır:

Testin içinde 1. şişede tampon solüsyonu, 2. şişede substrat solüsyonu ve 3. şişede reaksiyonu durduran ayıraç olmak üzere 3 şişe bulunmaktadır.

Solüsyonların hazırlanışı;

Tampon solüsyonu: İçindekiler 55 ml’lik distile edilmiş su ile karıştırıldı.

Substrat solüsyonu: Tampon solüsyonuna 55 ml distile su ilave edilerek karıştırıldıktan sonra substrat solüsyonu ile muamele edildi.

Reaksiyonu durduran ayıraç: 3. şişe 110 ml distile su ile çözdürüldü. Numune tüpüne ve kör tüpüne 1 ml substrat solüsyonu konup 37 °C’de 5 dk bekletildi. 5 dk sonunda numune tüpüne

0.05 ml idrar eklendi. Karıştırılarak 15 dk'da 37 °C'de inkübe edildi. 15 dk sonunda bu karışıma reaksiyonu durduran ayıraçtan 2 ml ilave edildi. Vortekste karıştırıldı ve 10 dk bekletildi. Spektrofotometre 580 nm dalga boyunda körle sıfırlandı. Standart ve numuneler okundu.

Örneğin absorbans değeri

$$\text{NAG mU/ml} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Standartın absorbans değeri}} \times \text{Standartın konsantrasyonu (7.72mU/ml)}$$

**Tümör nekrozis faktör-alfa:** -70 °C'de saklanan idrar ve serum örneklerinde, Diaclone Rat TNF- $\alpha$  Eliza kiti (Katalog No: 865-000-192, LOT No: K80218) ile Biyokimya Laboratuvar'ında Bio-Tek Instruments EL 309 cihazında mikro ELİZA yöntemiyle çalışıldı. Rat TNF- $\alpha$  antijeni ve Rat TNF- $\alpha$  spesifik biotinlenmiş poliklonal antikorlar eş zamanlı olarak inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra streptavidin peroksidaz enzimi eklendi. İnkübasyon ve bağlanmamış enzimin uzaklaştırılması için yapılan yıkamadan sonra bağlı enzime etki eden bir substrat solüsyonu eklendi ve renkli reaksiyon ürünü elde edildi. Bu renkli ürünün yoğunluğu örnekteki mevcut rat TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Her örneğin absorbansı spektrofotometre ile ölçüldü. Birincil dalga boyu 450 nm ve referans dalga boyu 620 nm olarak kabul edildi. Dikey ekseninde ortalama absorbans, yatay ekseninde yer alan rat TNF- $\alpha$  standart konsantrasyonu ile doğrusal standart eğri çizildi. Her bir örnekteki rat TNF- $\alpha$  miktarı standart eğrideki rat TNF- $\alpha$  konsantrasyonu kullanılarak elde edilen OD değeri ile belirlendi. İdrar TNF- $\alpha$ 'nın birimi ng/gün/100gr, serum TNF- $\alpha$ 'nın birimi pg/ml olacak şekilde hesaplandı.

**Endotelin:** -70 °C'de saklanan idrar ve serum örneklerinde, Phoenix Endotelin-1 Eliza kiti (Katalog No: EK-023-01) ile Biyokimya Laboratuvar'ında Bio-Tek Instruments EL 309 cihazında mikro ELİZA yöntemiyle çalışıldı. Bu kitteki immunoplate ikincil bir antikorla önceden kaplanmış ve özgün olmayan bağlama alanları bloke olmuştur. İkincil antikorun Fab fragmanı her iki biotinlenmiş peptid, peptid standartı ve örnekteki hedef peptidler ile birincil antikorun Fc fragmanına yarışmalı olarak bağlanmaktadır. Biotinlenmiş peptid, substrat reaksiyonunu katalize eden streptavidin peroksidaz (SA-HRP) ile reaksiyona girdi. Sarı rengin yoğunluğu biotinlenmiş peptid-SA-HRP kompleksinin miktarı ile doğru orantılı iken standart çözeltiler ya da örneklerdeki peptid miktarı ile ters orantılıdır. Bunun nedeni,

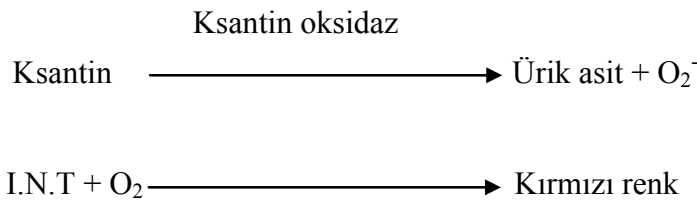
biotinlenmiş peptidin standart peptid ile ya da örneklerin peptid antikorlarıyla yarışmalı olarak bağlanmasıdır. İmmunoplate mikrotitre plate okuyucuya yerleştirilerek absorbansı 450 nm dalga boyunda okundu. Standart peptidin bilinen konsantrasyonu X eksenine, ona karşılık gelen OD Y eksenine yerleştirilerek bir doğrusal eğri çizildi. Örneklerdeki endotelin miktarı idrar endotelin birimi mikrogram/gün/100gr, serum endotelin birimi ng/ml olacak şekilde hesaplandı.

**C-reaktif protein:** -70 °C’de saklanan serum örneklerinde, BioVendor Rat CRP Eliza kiti (Katalog No: RH951CRP01R) ile Biyokimya Laboratuvar’ında Bio-Tek Instruments EL 309 cihazında mikro ELİZA yöntemiyle toplu olarak çalışıldı. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edildi.

**Böbrek dokusu:** -70 °C’de saklanan böbrek kortekslerinden eşit ağırlıkta örnekler alındı. Örnekler homojenizatör ile 2 ml soğuk distile su içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Çalışmanın objektif olması için gruplara neler uygulandığı belirtilmeksizin kodlanmış olan homojenatlar Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı’na SOD ve GSH incelenmesine sunuldu.

### SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Süperoksit dismutaz aktivitesi Randox’un RANSOD (Katalog No: SD 125) kiti ile Biyokimya Laboratuvar’ında ölçüldü. SOD’un görevi, oksidatif enerji süreçleri sırasında oluşan toksik süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu sağlamaktır. Kiti çalışma yöntemi, süperoksit radikalleri oluşturmak üzere ksantin ve ksantin oksidazı (XOD) kullanır. Oluşan süperoksit radikalleri 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazol klorid (I.N.T) ile tepkimeye girerek kırmızı renk oluşturur. Yöntemin temeli bu reaksiyonun SOD tarafından inhibisyon derecesine dayanır.



SOD



### Spektrofotometrik Yöntem

Ölçümler 505 nm dalga boyunda, 37 °C’de, Shimadzu UV-1208 spektrofotometrede yapıldı. 0.05 ml süpernatanta 1.7 ml miyar eklenip iyice karıştırıldı, daha sonra bu karışıma 0.25 ml ksantin oksidaz eklendi ve aynı anda süre başlatıldı. 30 saniye sonra başlangıç absorbansı (A<sub>1</sub>) ve bundan 3 dk sonra son absorbans (A<sub>2</sub>) okundu. Aynı işlemler standart ve kör için de yapıldı.

### Sonuçların Hesaplanması

Kör, standart ve örnekler için Δ A hesaplandı.

$$\Delta A = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartların ve örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ std./ dak. X100})}{(\Delta A \text{ kör/ dak.})}$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\Delta A \text{ örn./ dak. X100})}{(\Delta A \text{ kör/ dak.})}$$

Standartlardan yapılan ölçümler sonucunda yatay eksene U/ml SOD, düşey eksene % inhibisyon değerleri gelecek şekilde standart eğri hazırlandı. Örneklerden yapılan ölçümlerde SOD değeri standart eğriden U/ml süpernatant olarak çıkarıldı. Ölçülen protein miktarına göre enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanarak U/mg protein olarak gösterildi.

$$\text{SOD (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD U/ml süpernatant}}{\text{mg protein/ml süpernatant}}$$

### **GLUTATYON AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ**

Renal dokuda GSH aktivitesi Trevigen Instructions HT Glutathione Assay kiti (Katalog No: 7511-100-K) kullanılarak Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda ölçüldü. Bu kit glutasyon miktarının belirlenmesinde enzimatik geri dönüşüm metodunu kullanmaktadır. Glutasyon redüktaz okside glutasyonu indirgenmiş glutatyona dönüştürür. GSH'ın sülfidril grubunun 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asitle (DTNB, Ellman ayıracı) reaksiyonu sonucu 404 veya 414 nm dalga boyunda soğrulan sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşur. Bu reaksiyon esnasında oluşan bir başka bileşik olan karışık disülfid, glutasyon redüktaz tarafından indirgendikten sonra glutatyona geri dönüşür ve daha fazla TNB elde edilir. TNB üretim miktarı bu geri dönüşüm reaksiyonu ile doğru orantılıdır. Aynı zamanda örnekteki glutasyon miktarı ile de doğru orantılıdır. TNB'nin 405 ya da 412 nm'deki absorbansının ölçülmesi örnekteki glutasyon miktarını göstermekte kesin kabul edilen yoldur.

#### **Spektrofotometrik Yöntem**

Ölçümler 412 nm dalga boyunda Shimadzu UV-1208 spektrofotometrede yapıldı. Alınan böbrek dokuları 150 nM NaCl kullanılarak yıkandı. %5 metafosforik asit eklenip homojenize edildi. Homojenatlar 4 °C'de 12000-14000x g'de 10 dk santrifüje edilip berrak süpernatantlar elde edildi.

#### **Sonuçların Okunması**

Her örnekten elde edilen absorbans değerleri ile inkübasyon süresi (dk) arasında doğrusal bir eğri oluşturuldu. Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki GSH yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak pmol/mg protein cinsinden ifade edildi.

GSH kalibrasyon eğrisinin denklemi:  $y=0.02884+0.002178x$

### **HİSTOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

Histopatolojik incelemeler için doku örnekleri, Bouin ile tespit edilerek parafine gömüldü ve hazırlanan kesitler, PAS boyası ile boyandı. İmmünohistokimyasal boyama için

kesitler, rutin deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerine tabi tutuldular. Rehidratasyon aşamasından sonra kesitler, antijenik maskelenmenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponu (pH: 6,1 L distile suda 2,1 gr sitrik asid ve 15 ml NaOH) içinde mikrodalga fırınına verildi. Fırın dışına alınan kesitler distile su ve fosfat tamponundan geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi için kesitlere fosfat tampon solüsyonu (PBS) içerisinde hazırlanan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu 10 dk uygulandı. Distile su ve PBS'de yıkanan kesitler, iNOS (Cat. # RB-1605-P, Neomarkers, USA) primer antikoruyla 60 dk inkübe edildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlere sıra ile 30'ar dk biyotinli sekonder antikor (Super sensitive detection kit for rat; anti-rabbit Ig; Biogenex GP 900-9R, kullanıma hazır) ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (Super sensitive label for animal detection; Biogenex GP 900-9R) uygulandı. Distile su ve PBS'den geçirilen iNOS antikoru ile muamele edilen kesitler diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Zıt boyama için tüm kesitler Mayer'in hematoksileni ile işlemlendirildi ve kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Merkezi'ndeki SS064 Minitab Release 13 programı (Lisans No: WCP 1331.00197) kullanılarak istatistiksel inceleme yapıldı. Gruplardaki rat sayısı ve bağımsız değişken karşılaştırılması nedeniyle önce Kruskal-Wallis testi ile grupların verileri arasındaki farklılık araştırıldı. Anlamlı farklılık bulunan grupların verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Veriler normal dağılıma uygun olduğunda Pearson Korelasyon Testi, verilerin en az birinin normal dağılıma uygun olmaması veya verilerin en az birinin kategorik olması durumunda Spearman Korelasyon Testi kullanıldı. Değerler ortalama±standart sapma (ort±SD) olarak alındı. p<0.05 değerler anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamız 7 adet sağlıklı kontrol, 7 adet hastalıklı kontrol, 8 adet irbesartan, 6 adet NAC, 8 adet IR+NAC ve 6 adet IR+NS olmak üzere toplam 42 adet ratla tamamlandı. Tüm grupların birlikte değerlendirilmesinde, ilk ağırlık, total protein, albumin, ürik asit, total kolesterol, HDL, CRP ile renal dokuda SOD ve GSH değerleri arasında anlamlı farklılık görülmedi. Buna karşılık çalışma sonundaki ağırlık, plazma glukoz değeri, HbA1c, böbrek ağırlığı, idrar volümü, GFR, günlük idrarla atılan glukoz (UGA), albumin (UAA), protein (UPA), NAG, FENa, serum TNF- $\alpha$ , idrar TNF- $\alpha$  ve idrar endotelin değerlerinde gruplar arasında istatistiksel farklılık gözlemlendi.

Çalışma başlangıcındaki ratların ilk ağırlıkları 180-340 gr arasında bulundu. Çalışma sonunda, sağlıklı kontrol grubunda kilo artışı olurken, DM gruplarında kilo kaybı gözlemlendi. On iki hafta sonundaki plazma glukoz değeri sağlıklı kontrol grubunda  $149 \pm 23,6$  mg/dl idi. Hasta kontrolde  $534 \pm 94,6$  mg/dl ( $p=0,0006$ ), IR grubunda  $468 \pm 108$  mg/dl ( $p=0,0003$ ), NAC grubunda  $548 \pm 45,1$  mg/dl ( $p=0,001$ ), IR+NAC grubunda  $471 \pm 90,9$  mg/dl ( $p=0,0003$ ), IR+NS grubunda  $421 \pm 90,6$  mg/dl ( $p=0,001$ ) olarak sağlıklı kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu. Sağlıklı kontrol grubunda HbA1c  $\%3,4 \pm 0,3$  ve UGA  $0,26 \pm 0,22$  mg/gün/100gr iken; hasta kontrolde HbA1c  $\%10 \pm 2,4$  ( $p=0,0006$ ) ve UGA  $5053 \pm 1266$  mg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ), IR grubunda HbA1c  $\%8,6 \pm 2,3$  ( $p=0,0003$ ) ve UGA  $3699 \pm 811$  mg/gün/100gr ( $p=0,0003$ ), NAC grubunda HbA1c  $\%8,8 \pm 1,4$  ( $p=0,001$ ) ve UGA  $2902 \pm 649$  mg/gün/100gr ( $p=0,001$ ), IR+NAC grubunda HbA1c  $\%7,9 \pm 1,6$  ( $p=0,0003$ ) ve UGA  $2925 \pm 1523$  mg/gün/100gr ( $p=0,0003$ ), IR+NS grubunda HbA1c  $\%9,1 \pm 2,5$  ( $p=0,001$ ) ve UGA  $2220 \pm 887$  mg/gün/100gr ( $p=0,001$ ) bulundu. Bu değerler sağlıklı kontrole göre belirgin derecede yüksekti ve DM ile

uyumluydu. Bunun yanı sıra sağlıklı kontrol grubuna göre glomerüler fonksiyon ve yapısal bozulmanın göstergeleri olan idrarla atılan albumin ve protein ile tübüler fonksiyon ve yapı bozulma göstergesi olan FENa ve idrarla NAG atılımı değerlerindeki belirgin artışlar renal hasar gelişiminden kaynaklanmaktadır.

Çalışma gruplarının verileri Tablo 2-7’de verilmiştir. Her grubun verileri detaylı olarak o gruplara ait başlıklar altında incelendi.



**Tablo 2. Sağlıklı kontrol grubunun verileri**

Rat No	İlk kilo (gr)	Son kilo (gr)	Glukoz (mg/dl)	HbA1c (%)	Hb (gr/dl)	Üre (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	Total Protein (gr/dL)	Albumin (gr/dl)	Ürik asit (mg/dl)
1	251	305	169	3,4	13,5	34	0,5	5,7	3,15	1,6
2	285	322	158	3,1	13,6	41	0,53	6,2	3,15	1,6
3	272	360	136	3,5	13,5	28	0,47	5,9	3,15	1,4
4	210	203	117	3,1	12,7	27	0,51	6,1	3,8	1,3
5	213	211	121	3,3	12,9	32	0,47	6,2	3,1	1,5
6	203	310	174	4	13,3	41	0,47	6	3,85	1,1
7	205	220	165	3,2	13,6	43	0,35	5,9	3,4	1,2

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:** Hemoglobin.

**Tablo 2 (devam). Sağlıklı kontrol grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>T.kol (mg/dl)</b>	<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>	<b>CRP (ng/ml)</b>	<b>Serum TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	<b>Serum endotelin (ng/ml)</b>	<b>Na<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	<b>K<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	<b>Böbrek ağırlığı (gr/100gr)</b>	<b>İdrar volümü (ml)</b>	<b>GFR (ml/dk/100gr)</b>
1	59	40	18	123,75	38,65	0,65	126	5,3	3,89	6	0,16
2	55	29	17	119,36	37,26	0,58	131	6	3,63	8	0,32
3	46	47	16	106,74	36,75	0,58	124	5,5	3,24	11	0,45
4	36	45	13	103,14	84,81	0,66	136	5,1	5,32	7	0,26
5	37	48	18	120,5	51,98	0,54	135	5,3	5,24	9	0,3
6	58	50	20	115,37	76,05	0,56	130	5,5	3,81	11	0,31
7	52	51	25	122,47	43,03	0,64	133	5,6	4,56	12	0,48

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **GFR:**Glomerüler filtrasyon hızı.

**Tablo 2 (devam). Sağlıklı kontrol grubunun verileri**

Rat No	UGA (mg/gün 100gr)	UAA (mcg/gün/100gr)	UPA (mg/gün/ 100gr)	İdrar NAG (mU/gün/ 100gr)	FENa (%)	İdrarTNF- $\alpha$ (ng/gün /100gr)	İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)	SOD (U/mg protein)	GSH (pmol/mg protein)
1	0,02	4,92	3,93	0,23	0,18	0,27	0,01	2,46	16,44
2	0,3	6,21	5,09	0,28	0,11	0,35	0,02	2,72	33,10
3	0,55	7,64	4,77	0,31	0,11	0,44	0,03	2,32	4,62
4	0,28	16,86	2,34	0,15	0,18	0,18	0,04	2,58	5,33
5	0,51	28,75	3,11	0,32	0,2	0,26	0,05	2,68	1,68
6	0,04	8,87	7,1	0,45	0,15	0,35	0,01	2,63	5,24
7	0,11	13,64	8,45	1,27	0,16	0,16	0,01	2,11	10,96

UGA: Üriner glukoz atılımı; UAA: Üriner albumin atılımı; UPA: Üriner protein atılımı; NAG: N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; FENa: Fraksiyonel Na atılımı; TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör-alfa; SOD: Süperoksit dismutaz; GSH: Glutasyon.

**Tablo 3. Hastalıklı kontrol grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>İlk kilo (gr)</b>	<b>Son kilo (gr)</b>	<b>Glukoz (mg/dl)</b>	<b>HbA1c (%)</b>	<b>Hb (gr/dl)</b>	<b>Üre (mg/dl)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>Total Protein (gr/dL)</b>	<b>Albumin (gr/dl)</b>	<b>Ürik asit (mg/dl)</b>
<b>1</b>	200	147	600	11,6	12,4	65	0,36	6	3,85	1,8
<b>2</b>	225	190	536	10	10,4	49	0,56	6,7	3,85	1,6
<b>3</b>	217	210	327	4,8	9,4	68	0,54	6,4	3,15	1,3
<b>4</b>	232	207	538	10,1	9,46	44	0,49	6,3	3,5	1,7
<b>5</b>	192	162	569	10,9	11,4	63	0,58	6,2	3,5	1,4
<b>6</b>	255	195	578	11,1	9,2	46	0,39	5,8	3,3	2
<b>7</b>	260	188	591	11,4	9,1	63	0,47	5,6	3,4	1,9

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:**Hemoglobin.

**Tablo 3 (devam). Hastalıklı kontrol grubunun verileri**

Rat No	T. kol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CRP (ng/ml)	Serum TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Serum endotelin (ng/m)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Böbrek ağırlığı (gr/100gr)	İdrar volümü (ml)	GFR (mldk/100gr)
1	45	48	20	102,1	377,26	0,6	134	6,8	8,3	100	1,67
2	54	69	27	121,14	52,18	0,66	137	6,2	6,84	76	0,5
3	44	101	16	11,24	56,36	0,74	135	6,1	6,86	83	0,52
4	67	37	20	44,98	521,50	0,51	132	6,5	6,38	94	0,66
5	50	131	20	113,74	272,81	0,74	137	5,1	6,54	102	0,68
6	62	70	17	128,83	45,22	0,64	137	6,4	6,76	86	0,97
7	58	65	25	116,8	44,62	0,68	135	7	6,92	98	0,75

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **GFR:** Glomerüler filtrasyon hızı.

**Tablo 3 (devam). Hastalıklı kontrol grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>UGA (mg/gün 100gr)</b>	<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	<b>UPA (mg/gün/ 100gr)</b>	<b>İdrar NAG (mU/gün/ 100gr)</b>	<b>FENa (%)</b>	<b>İdrarTNF-<math>\alpha</math> (ng/gün /100gr)</b>	<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	<b>SOD U/mg protein)</b>	<b>GSH (pmol/mg protein)</b>
<b>1</b>	5238,1	170,07	21,29	11,16	0,42	2,97	0,11	3,03	10,33
<b>2</b>	5188	100	10,4	27,24	1,05	3,76	4,2	3,12	12,73
<b>3</b>	3964,24	98,81	79,05	21,74	1,14	2,39	0,13	2,33	6,26
<b>4</b>	3060,68	113,53	79,92	5,27	1,87	9,13	0,81	2,86	9,73
<b>5</b>	6573,33	157,41	14,92	10,07	0,94	17,25	1,03	3	26,59
<b>6</b>	4860,10	110,26	18,52	11,47	0,48	8,57	0,12	2,42	6,42
<b>7</b>	6489,89	130,32	23,46	8,34	0,99	12,31	0,41	2,19	8,78

**UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon.

**Tablo 4. İrbesartan grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>İlk kilo (gr)</b>	<b>Son kilo (gr)</b>	<b>Glukoz (mg/dl)</b>	<b>HbA1c (%)</b>	<b>Hb (gr/dl)</b>	<b>Üre (mg/dl)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>Total Protein (gr/dl)</b>	<b>Albumin (gr/dl)</b>	<b>Ürik asit (mg/dl)</b>
1	225	165	560	10,6	12,6	51	0,49	6	3,5	1,2
2	195	173	600	11,6	12,5	101	0,57	5,9	2,8	2,5
3	209	200	305	6,2	14,7	28	0,44	6,5	3,5	1,6
4	180	166	435	7,5	11,7	105	0,58	6,3	3,85	1,7
5	186	154	600	11,6	10,3	68	0,66	7,4	3,5	2,6
6	225	204	385	6,3	10,5	35	0,5	7,3	3,5	4,9
7	328	305	448	7,8	13,2	56	0,54	6,3	3,4	1,6
8	330	280	409	6,9	13,2	46	0,52	5,7	2,8	1,1

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:**Hemoglobin.

Tablo 4 (devam). İrbesartan grubunun verileri

Rat No	T.kol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CRP (ng/ml)	Serum TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Serum endotelin (ng/ml)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Böbrek ağırlığı (gr/100gr)	İdrar volümü (ml)	GFR (mldk/100gr)
1	53	98	20	41,43	87,39	0,61	138	4,8	6,73	58	0,3
2	73	221	17	120,75	55,56	0,69	140	5,5	6,85	89	0,8
3	66	22	22	82,81	120,62	1,36	134	4,5	6,43	78	0,37
4	58	64	26	121,39	66,50	0,55	130	5,5	7,89	76	0,33
5	105	272	23	117,05	37,85	0,71	135	7,6	7,5	66	0,31
6	58	121	16	121,48	42,03	0,6	136	5,6	5,59	75	0,72
7	44	75	12	36,49	68,49	0,54	136	5,2	3,7	78	0,3
8	41	105	11	121,48	38,05	0,6	134	5	5,71	90	0,33

T. kol: Total kolesterol; HDL: High density lipoprotein; CRP: C-reaktif protein; TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör-alfa; Na<sup>+</sup>: Sodyum; K<sup>+</sup>: Potasyum; GFR: Glomerüler filtrasyon hızı.



**Tablo 4 (devam). İrbesartan grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>UGA (mg/gün 100gr)</b>	<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	<b>UPA (mg/gün/ 100gr)</b>	<b>İdrar NAG (mU/gün/ 100gr)</b>	<b>FENa (%)</b>	<b>İdrarTNF-<math>\alpha</math> (ng/gün /100gr)</b>	<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100)</b>	<b>SOD (U/mg protein)</b>	<b>GSH (pmol/mg protein)</b>
<b>1</b>	3385,09	87,88	36,21	8,08	1,3	3,97	0,00	2,46	8,38
<b>2</b>	5195,95	128,61	23,77	5,71	0,64	8,96	1,24	2,15	7,31
<b>3</b>	3295,5	97,5	8,86	6,79	1,09	5,88	0,62	2,24	10,42
<b>4</b>	4097,59	114,46	34,93	9,43	1,49	13,18	0,75	2,16	11,89
<b>5</b>	4135,71	107,14	41,66	9,94	2,2	12,25	1,23	2,33	7,91
<b>6</b>	3812,5	91,91	37,02	6,29	0,52	4,76	0,23	2,89	12,71
<b>7</b>	2480,66	63,93	9,31	5,04	0,86	5,30	0,15	2,33	9,29
<b>8</b>	3188,57	80,36	11,99	5,21	1,01	5,91	0,16	2,58	15,41

**UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon.

**Tablo 5. NAC grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>İlk kilo (gr)</b>	<b>Son kilo (gr)</b>	<b>Glukoz (mg/dl)</b>	<b>HbA1c (mg/dl)</b>	<b>Hb (gr/dl)</b>	<b>Üre (mg/dl)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>Total Protein (gr/dl)</b>	<b>Albumin (gr/dl)</b>	<b>Ürik asit (mg/dl)</b>
1	231	288	510	9,6	11,2	39	0,58	6,5	3,5	2
2	221	156	600	9,1	11,2	86	0,53	5,4	3,5	1,4
3	230	196	586	6,3	9,53	50	0,55	5,8	2,8	1,9
4	200	126	576	8,4	11,9	143	0,5	4,3	2,8	2
5	275	290	490	8,9	13,9	45	0,32	5,6	3,5	1,2
6	260	302	527	10,4	12,8	72	0,49	6,2	3,1	1,3

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:** Hemoglobin.

Tablo 5 (devam). NAC grubunun verileri

Rat No	T.kol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CRP (ng/ml)	Serum TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Serum endotelin (ng/ml)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Böbrek ağırlığı (gr/100gr)	İdrar volümü (ml)	GFR (ml/dk/100gr)
1	58	64	24	114,38	53,37	0,54	133	6,8	5,69	107	0,45
2	46	71	18	89,23	99,33	2,04	131	5,7	8,17	67	0,34
3	53	138	22	34,67	255,11	0,6	132	5,7	6,19	58	0,22
4	51	153	16	24,51	52,58	0,62	127	5,5	10,08	44	0,29
5	62	67	36	120,84	53,97	0,71	135	6,4	5,85	110	0,41
6	57	126	28	96,77	77,05	1,03	130	5,9	6,35	61	0,17

T. kol: Total kolesterol; HDL: High density lipoprotein; CRP: C-reaktif protein; TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör-alfa; Na<sup>+</sup>: Sodyum; K<sup>+</sup>: Potasyum; GFR: Glomerüler filtrasyon hızı.

**Tablo 5 (devam). NAC grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>UGA (mg/gün 100gr)</b>	<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	<b>UPA (mg/gün/ 100gr)</b>	<b>İdrar NAG (mU/gün/ 100gr)</b>	<b>FENa (%)</b>	<b>İdrarTNF-<math>\alpha</math> (ng/gün/100gr)</b>	<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	<b>SOD U/mg protein)</b>	<b>GSH (pmol/mg protein)</b>
<b>1</b>	2808,75	92,88	8,84	5,61	0,86	8,08	0,06	2,38	6,36
<b>2</b>	3586,22	107,37	85,9	5,54	1,35	14,86	0,31	2,46	1,62
<b>3</b>	3228,47	73,98	29,12	5,74	1,39	3,62	0,06	2,34	6,36
<b>4</b>	3296,51	87,3	9,5	5,94	1,31	3,77	0,41	3,05	20,39
<b>5</b>	2750	94,83	36,41	6,75	0,9	5,34	0,25	2,51	23,4
<b>6</b>	1744,16	50,5	5,45	3,31	1,19	2,8	0,19	2,95	9,81

**UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon.

**Tablo 6. IR+NAC grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>İlk kilo (gr)</b>	<b>Son kilo (gr)</b>	<b>Glukoz (mg/dl)</b>	<b>HbA1c (%)</b>	<b>Hb (gr/dl)</b>	<b>Üre (mg/dl)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>Total Protein (gr/dl)</b>	<b>Albumin (gr/dl)</b>	<b>Ürik asit (mg/dl)</b>
1	242	210	491	10,10	13,20	54	0,56	6,4	3,5	1,4
2	265	215	414	6,9	12,7	50	0,54	6,3	3,5	1,4
3	215	182	542	7,1	12,3	85	0,56	5,4	3,4	1,3
4	205	168	522	10,6	13,2	79	0,52	5,3	2,8	1,3
5	194	207	500	6,9	10,1	80	0,6	6,7	3,5	1,4
6	200	340	356	6,2	14,7	38	0,43	5,8	3,85	2,2
7	190	193	600	7,5	12,3	25	0,52	5,6	3,5	1,3
8	340	323	345	7,8	12,3	90	0,64	5,8	2,8	2,5

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:** Hemoglobin.

**Tablo 6 (devam). IR+NAC grubunun verileri**

Rat No	T.kol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CRP (ng/ml)	Serum TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Serum endotelin (ng/ml)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Böbrek ağırlığı (gr/100gr)	İdrar volümü (ml)	GFR (mldk/100gr)
1	49	78	16	118,62	43,42	0,48	132	5,4	7,14	75	0,4
2	45	64	21	116,75	63,32	0,5	134	5,9	9,23	65	0,35
3	49	45	21	123,7	46,61	2,65	125	5,2	7,12	72	0,3
4	48	65	20	109,25	64,71	0,58	132	5,6	7,02	79	0,58
5	33	38	12	107,77	196,82	1,76	132	6,4	6,16	62	0,21
6	55	50	19	116,21	80,03	0,69	120	5,2	4,01	24	0,22
7	63	26	25	112,36	82,22	1,92	135	4,3	6,86	96	0,45
8	89	395	9	118,77	56,16	0,56	135	4,8	5,4	76	0,24

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:**Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **GFR:** Glomerüler filtrasyon hızı.

**Tablo 6 (devam). IR+NAC grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>UGA (mg/gün/100gr)</b>	<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	<b>UPA (mg/gün/100gr)</b>	<b>İdrar NAG (mU/gün/100gr)</b>	<b>FENa (%)</b>	<b>İdrarTNF-<math>\alpha</math> (ng/gün/100gr)</b>	<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	<b>SOD U/mg protein)</b>	<b>GSH (pmol/mg protein)</b>
1	2610,71	160,36	33,93	1,5	0,93	0,97	0,38	2,52	1,68
2	4111,63	75,58	23,46	5,44	0,91	10,95	3,24	2,93	15,84
3	2824,62	102,59	16,62	1,7	1,47	1,92	0,4	3,23	8,91
4	4796,43	117,56	12,51	6,63	0,85	8,18	0,77	2,46	6,73
5	2656,71	74,88	14,08	10,45	1,52	1,81	0,08	3,5	26,75
6	832,24	17,65	12,35	1,07	0,49	3,1	0,41	3,06	10,41
7	4620,93	128,81	25,87	2,14	1,47	3,09	0,35	2,41	14,88
8	950,59	58,82	3,74	3,29	1,07	2,82	0,34	2,02	7,16

**UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon.

**Tablo 7. IR+NS grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>İlk kilo (gr)</b>	<b>Son kilo (gr)</b>	<b>Glukoz (mg/dl)</b>	<b>HbA1c (mg/dl)</b>	<b>Hb (gr/dl)</b>	<b>Üre (mg/dl)</b>	<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	<b>Total Protein (gr/dL)</b>	<b>Albumin (gr/dl)</b>	<b>Ürik asit (mg/dl)</b>
<b>1</b>	250	250	407	8,4	12,4	47	0,58	5,6	3,4	1,7
<b>2</b>	220	222	503	11,6	9,7	113	0,59	5,2	3,5	2,3
<b>3</b>	275	280	467	10,6	11	82	0,54	6	2,8	2,8
<b>4</b>	255	250	376	11,6	15,1	80	0,6	6,7	3,5	1,4
<b>5</b>	260	255	504	6,2	9,6	62	0,53	6,2	3,15	1,5
<b>6</b>	180	150	269	6,3	11,2	56	0,54	6,3	2,8	1,6

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:** Hemoglobin.



Tablo 7 (devam). IR+NS grubunun verileri

Rat No	T.kol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL (mg/dl)	CRP (ng/ml)	Serum TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Serum endotelin (ng/ml)	Na <sup>+</sup> (mEq/L)	K <sup>+</sup> (mEq/L)	Böbrek ağırlığı (gr/100gr)	İdrar volümü (ml)	GFR (ml/dk/100gr)
1	47	120	15	120,94	39,84	0,61	135	5	4,98	95	0,3
2	138	410	15	38,17	79,83	1,95	141	5,4	6,64	75	0,41
3	80	424	9	30,77	92,17	0,67	130	5	5,42	80	0,33
4	33	38	12	125,73	42,03	0,82	132	6,4	5,72	80	0,22
5	47	59	20	107,23	43,23	1,03	135	6,7	5,73	88	0,28
6	49	46	26	106,74	45,41	0,61	136	5,1	5,67	19	0,1

T. kol: Total kolesterol; HDL: High density lipoprotein; CRP: C-reaktif protein; TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör-alfa; Na<sup>+</sup>: Sodyum K<sup>+</sup>: Potasyum; GFR: Glomeruler filtrasyon hızı.

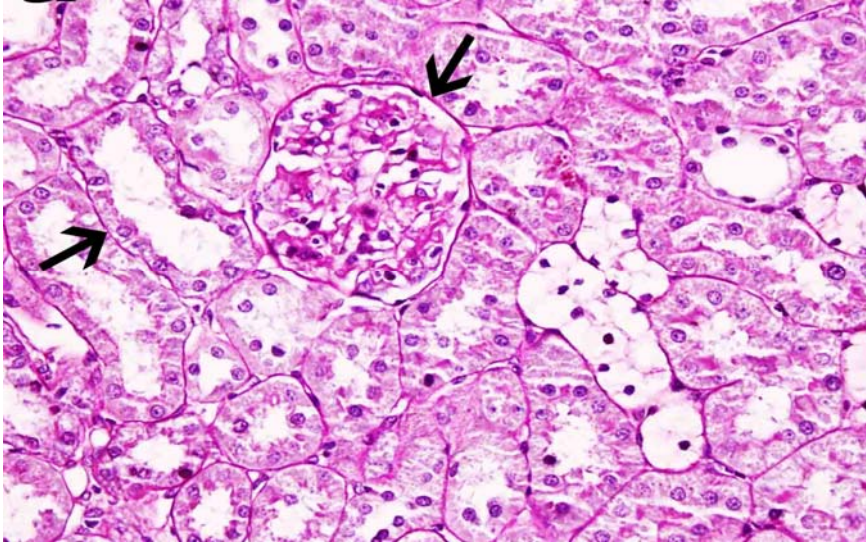
**Tablo 7 (devam). IR+NS grubunun verileri**

<b>Rat No</b>	<b>UGA (mg/gün/100gr)</b>	<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	<b>UPA (mg/gün/100gr)</b>	<b>İdrar NAG (mU/gün/100gr)</b>	<b>FENa (%)</b>	<b>İdrarTNF-<math>\alpha</math> (ng/gün/100gr)</b>	<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	<b>SOD U/mg protein)</b>	<b>GSH (pmol/mg protein)</b>
1	1086,8	95	29,72	8,36	1,28	5,29	0,53	2,47	15,66
2	3030,41	84,46	33,75	3,07	0,8	4,99	0,22	2,99	5,95
3	2905,71	71,43	6,43	26	0,91	3,44	0,04	2,46	5,14
4	2832	80	15,04	5,86	1,52	15,78	1,37	2,47	15,29
5	2315,61	120,78	34,51	1,55	1,25	1,2	0,22	2,83	19,39
6	1151,4	42,56	6,84	0,84	1,3	0,53	0,08	2,47	15,53

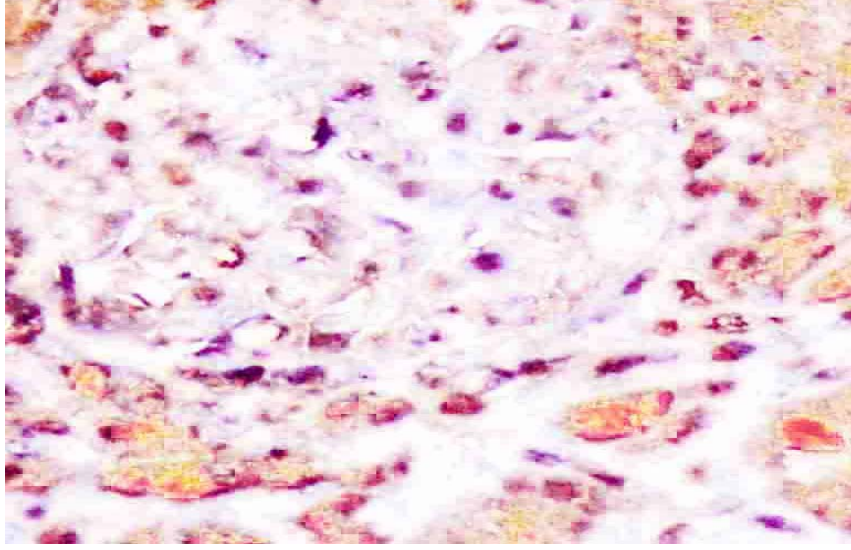
**UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:**Glutasyon.

## SAĞLIKLI KONTROL GRUBU

Bu gruba ait veriler tüm gruplar için bazal değer olarak kabul edildi. Ortalama değerleri şöyle bulundu: İlk ağırlık 234±34,5 gr; son ağırlık 276±63,1 gr; serum glukozu 149±23,6 mg/dl; HbA1c %3,4±0,3; Hb 13,3±0,4 gr/dl; üre 35,1±6,6 mg/dl; kreatinin 0,47±0,06 mg/dl; total protein 6±0,18 mg/dl; albumin 3,37±0,33 mg/dl; ürik asit 1,39±0,2 mg/dl; total kolesterol 49±9,6 mg/dl; trigliserid 44,3±7,7 mg/dl; HDL 18,1±3,7 mg/dl; CRP 116±8 ng/ml; serum TNF- $\alpha$  52,64±7,49 pg/ml; serum endotelin 0,6±0,05 ng/ml; Na<sup>+</sup> 131±4,5 mEq/L; K<sup>+</sup> 5,5±0,3 mEq/L; böbrek ağırlığı 4,2±0,8 gr/100gr; idrar volümü 9,14±2,3 ml; GFR 0,33±0,11 ml/dk/100gr; UGA 0,26±0,22 mg/gün/100gr; UAA 12,4±8,4 mcg/gün/100gr; UPA 4,97±2,17 mg/gün/100gr; idrarda NAG 0,43±0,38 mU/gün/100gr; FENa %0,16±0,03; idrarda TNF- $\alpha$  0,29±0,1 ng/gün/100gr; idrarda endotelin 0,02±0,02 mcg/gün/100gr; renal dokuda SOD 2,5±0,22 U/mg protein ve GSH 11,05±10,88 pmol/mg protein. PAS ve iNOS antikorlarıyla muamele edile böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde, bu grupta glomerül ve tübüler bazal membranların düzenli yapıda olduğu gözlemlendi. Glomerüller mezangiumda ve peritübüler interstisyumda düşük oranda PAS pozitifliği saptandı. Bu grubun glomerüllerinde iNOS antikorlarına immun pozitif reaksiyon veren hücreler görülmedi (Şekil 11,12).



Şekil 11. Sağlıklı kontrol grubun ‘periodic acid schiff’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (‘Periodic acid schiff’ x 200)



**Şekil 12. Sağlıklı kontrol grubun 'inducible nitric oxide synthase' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

#### **HASTALIKLI KONTROL GRUBU**

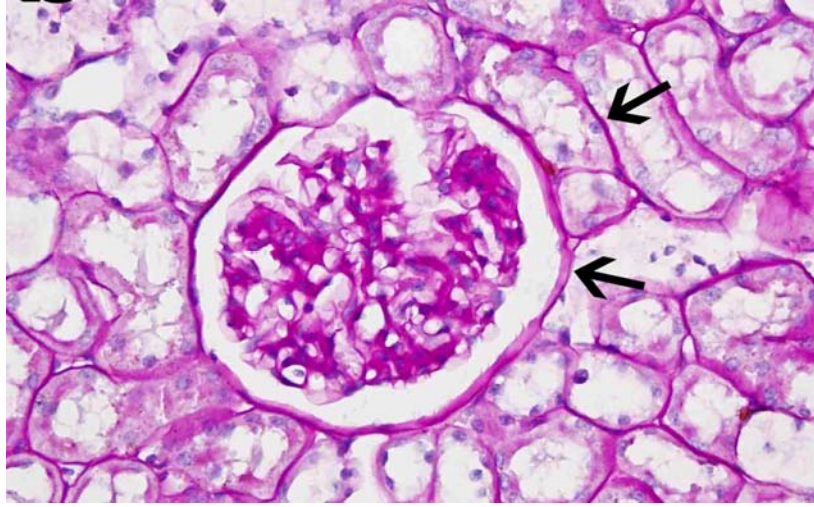
Bu gruptaki ratlar, diğer tedavi gruplarındaki ratlar gibi 2. günden itibaren kan glukoz değerleri 250 mg/dl ve üzerinde bulunan diyabetik ratlardı ve çalışma sonundaki serum glukoz değeri  $534 \pm 94,6$  mg/dl ( $p=0,0006$ ) ve HbA1c  $\%10 \pm 2,4$  ( $p=0,0006$ ) sağlıklı gruba göre belirgin derecede yüksek bulundu.

Bu gruba ait ilk ağırlık  $225,86 \pm 9,69$  gr; kandaki kreatinin  $0,48 \pm 0,08$  mg/dl; total protein  $6,14 \pm 0,37$  mg/dl; albumin  $3,51 \pm 0,26$  mg/dl; ürik asit  $1,67 \pm 0,26$  mg/dl; total kolesterol  $54,3 \pm 8,6$  mg/dl; HDL  $20,7 \pm 4$  mg/dl; CRP  $91,3 \pm 45$  ng/ml; endotelin  $0,65 \pm 0,08$  ng/ml ve renal dokudaki SOD  $2,71 \pm 0,38$  U/mg protein ve GSH  $11,55 \pm 7$  pmol/mg protein bulundu. Sağlıklı kontrol grubuna göre bu verilerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

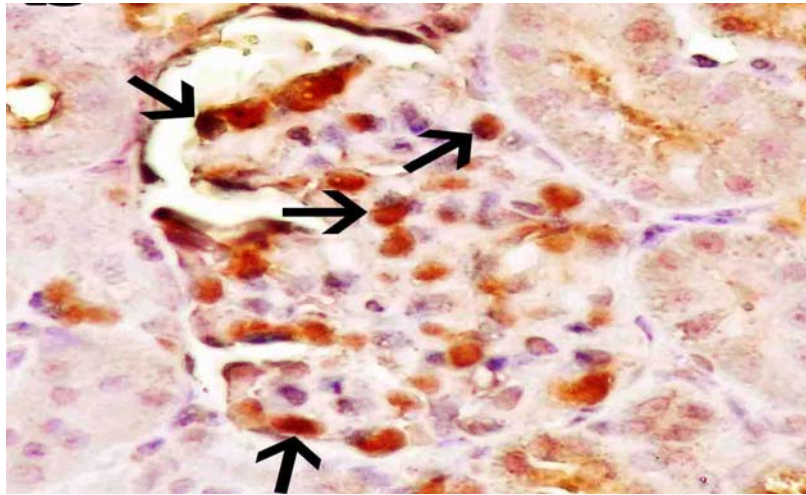
Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; çalışma sonundaki ağırlık  $186 \pm 23,1$  gr ( $p=0,002$ ) ve Hb  $10,2 \pm 1,3$  ( $p=0,0006$ ) anlamlı olarak düşük bulundu. Üre  $56,9 \pm 10,1$  mg/dl ( $p=0,0006$ ); trigliserid  $74,4 \pm 32$  mg/dl ( $p=0,038$ );  $\text{Na}^+$   $135 \pm 1,9$  mEq/L ( $p=0,038$ );  $\text{K}^+$   $6,3 \pm 0,6$  mEq/L ( $p=0,017$ ) değerleri ile böbrek ağırlığı  $6,9 \pm 0,6$  gr/100gr ( $p=0,0006$ ) ve idrar volümü  $91,3 \pm 9,8$  ml ( $p=0,0006$ ); GFR  $0,82 \pm 0,4$  ml/dk/100gr ( $p=0,0006$ ); UGA  $5053 \pm 1266$  mg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); UAA  $126 \pm 28,2$  mcg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); UPA  $35,4 \pm 30,4$  mg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); idrarda NAG  $13,6 \pm 7,88$  mU/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); FENa  $\%0,99 \pm 0,48$  ( $p=0,0006$ ); serum TNF- $\alpha$   $196 \pm 196$  pg/ml ( $p=0,005$ ); idrarda TNF- $\alpha$   $8,06 \pm 5,49$  ng/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); idrarda endotelin  $0,97 \pm 1,47$  mcg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ) olarak

sağlıklı kontrol grubun değerlerine göre belirgin derecede yüksek bulundu.

‘Periodic acid schiff’ ve iNOS antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesitleri, ışık mikroskopunda incelendiğinde; Bowman kapsülü, glomerül ve tübüler bazal membranların düzenli yapılarının bozulduğu, tübüler dilatasyonların geliştiği gözlemlendi. Bowman kapsülü, glomerüler mezangium ve peritübüler interstisyumda yüksek oranda PAS pozitifliği saptandı. Bu grubun glomerüllerinde iNOS antikorlarına immun pozitif reaksiyon veren hücrelerinin sayısının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 13, 14).



**Şekil 13. Hasta kontrol grubun ‘periodic acid schiff’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (‘Periodic acid schiff’ x 200)**



**Şekil 14. Hasta kontrol grubun ‘inducible nitric oxide synthase’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

## İRBESARTAN TEDAVİSİ UYGULANAN GRUP

İrbesartan tedavisi uygulanan grubun da çalışma sonundaki serum glukoz değeri  $468 \pm 108$  mg/dl ( $p=0,0003$ ) ve HbA1c  $\%8,6 \pm 2,3$  ( $p=0,0003$ ) sağlıklı gruba göre belirgin derecede yüksek bulundu.

Çalışma başındaki ağırlık  $234 \pm 60,5$  gr, kreatinin  $0,54 \pm 0,07$  mg/dl; total protein  $6,43 \pm 0,63$  mg/dl; albumin  $3,36 \pm 0,37$  mg/dl;  $\text{Na}^+$   $135 \pm 3$  mEq/L;  $\text{K}^+$   $5,5 \pm 0,9$  mEq/L; ürik asit  $2,15 \pm 1,24$  mg/dl; total kolesterol  $62,3 \pm 20,2$  mg/dl; HDL  $18,4 \pm 5,3$  mg/dl; CRP  $95,4 \pm 37,2$  ng/ml; serum TNF- $\alpha$   $64,6 \pm 28,5$  pg/ml; serum endotelin  $0,7 \pm 0,27$  ng/ml; renal dokuda bakılan SOD  $2,39 \pm 0,25$  U/mg protein ve GSH  $10,4 \pm 2,77$  pmol/mg protein değerleri hem sağlıklı hem de hastalıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmadı.

Bu grupta, Hb değeri  $12,3 \pm 1,5$  gr/dl sağlıklı kontrol grubuna benzer bulunurken, hastalıklı kontrol gruptan anlamlı ( $p=0,009$ ) olarak yüksek bulundu. Üre  $61,3 \pm 28,5$  mg/dl ve trigliserid  $122 \pm 83,4$  mg/dl değerleri sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek, çalışma sonundaki ağırlık  $206 \pm 56,6$  gr anlamlı ( $p=0,014$ ) düşük bulundu. Hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık yoktu.

İdrar volümü  $76,3 \pm 10,7$  ml, UAA  $96,5 \pm 20,3$  mcg/gün/100gr, idrarda NAG  $7,06 \pm 1,89$  mU/gün/100gr sağlıklı kontrole göre anlamlı ( $p=0,0003$ ) yüksek, hastalıklı kontrole göre anlamlı düşük bulundu. GFR  $0,43 \pm 0,2$  ml/dk/100gr sağlıklı kontrole göre benzer bulunurken hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı ( $p=0,029$ ) düşük idi.

Böbrek ağırlığı  $6,3 \pm 1,3$  gr/100gr ( $p=0,006$ ); UGA  $3699 \pm 811$  mg/gün/100gr ( $p=0,0003$ ); UPA  $25,5 \pm 13,7$  mg/gün/100gr ( $p=0,0003$ ); FENa  $\%1,17 \pm 0,23$  ( $p=0,0003$ ); idrarda TNF- $\alpha$   $7,53 \pm 3,53$  ng/gün/100gr ( $p=0,0003$ ); idrarda endotelin  $0,57 \pm 0,47$  mcg/gün/100gr ( $p=0,0003$ ) sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek; hastalıklı kontrole göre düşüktü ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

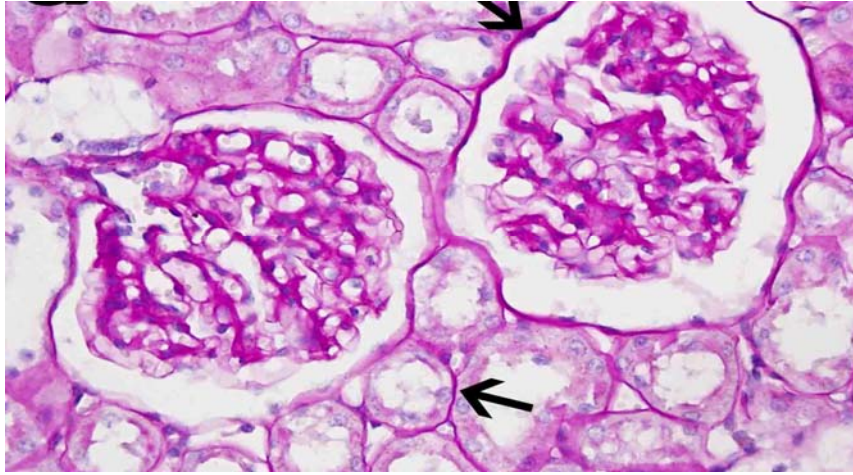
‘Periodic acid schiff’ ile reaksiyon veren böbrek kesitleri incelendiğinde; glomerüler mezangium ve peritübüler interstisyumda PAS pozitifliğinin, bu grupta hastalıklı kontrole göre azaldığı izlendi. Benzer şekilde glomerüllerde iNOS’a pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısının da hasta kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Bu gruptaki histopatolojik değişikliklerin NAC grubu ile benzer olduğu izlendi (Şekil 15, 16).

## N-ASETİL SİSTEİN TEDAVİSİ UYGULANAN GRUP

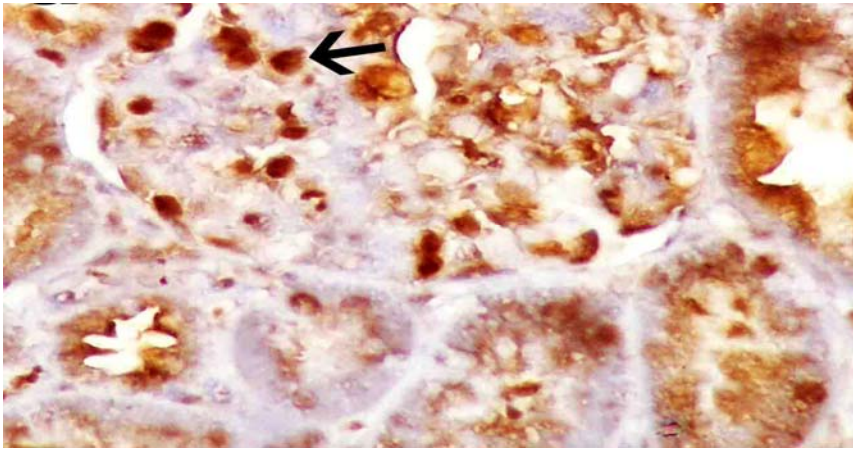
Bu grubun çalışma sonundaki serum glukoz  $548 \pm 45,1$  mg/dl ( $p=0,001$ ) ve HbA1c  $\%8,8 \pm 1,4$  ( $p=0,001$ ) değerleri sağlıklı gruba göre belirgin derecede yüksek bulundu.



Çalışma başındaki ağırlık  $236 \pm 27,1$  gr, çalışma sonundaki ağırlık  $226 \pm 76,8$  gr hemoglobin  $11,8 \pm 1,5$  gr/dl; kreatinin  $0,5 \pm 0,09$  mg/dl; total protein  $5,63 \pm 0,77$  mg/dl; albumin  $3,2 \pm 0,35$  mg/dl; ürik asit  $1,63 \pm 0,37$  mg/dl; total kolesterol  $54,5 \pm 5,7$  mg/dl; HDL  $24 \pm 7,3$  mg/dl; CRP  $80,1 \pm 40,9$  ng/ml; serum TNF- $\alpha$   $98,6 \pm 78,9$  pg/ml; serum endotelin  $0,92 \pm 0,57$  ng/ml; renal dokuda bakılan SOD  $2,62 \pm 0,31$  U/mg protein ve GSH  $11,32 \pm 8,65$  pmol/mg protein hem sağlıklı hem de hastalıklı kontrol grubuna benzer bulundu.



**Şekil 15. İrbesartan grubunun 'periodic acid schiff' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti ('Periodic acid schiff' x 200)**

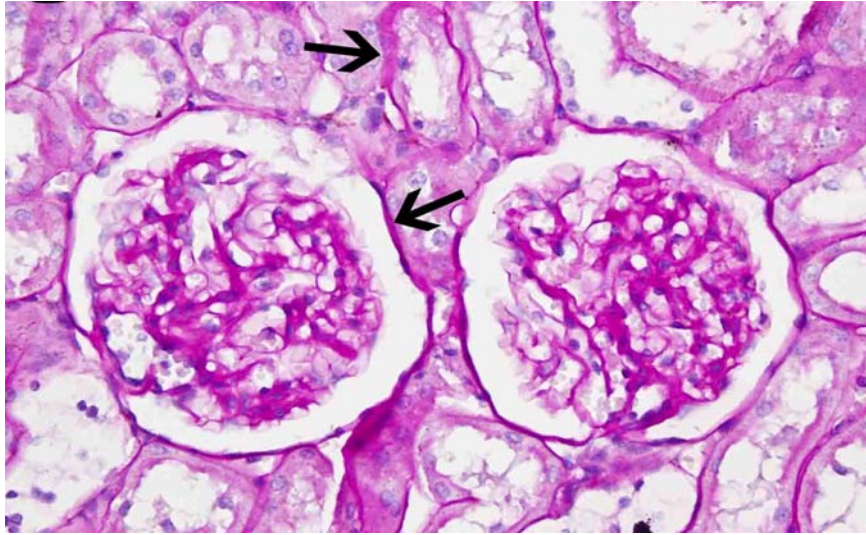


**Şekil 16. İrbesartan grubunun 'inducible nitric oxide synthase' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

Üre  $72,5 \pm 38,8$  mg/dl ( $p=0,008$ ) ve trigliserid  $103 \pm 40,2$  mg/dl ( $p=0,001$ ) değerleri sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulundu. Hastalıklı kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık yoktu.

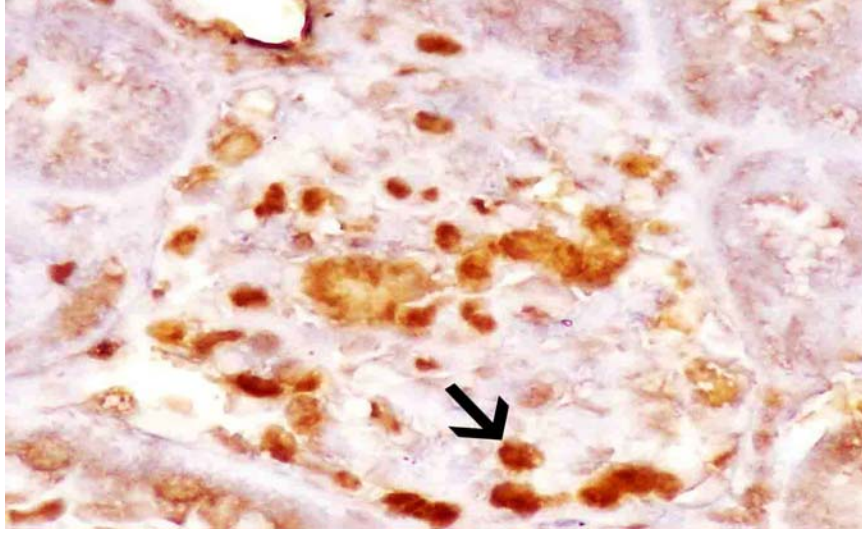
Sodyum değeri  $131 \pm 2,7$  mEq/L sağlıklı kontrol grubuna benzer ancak hastalıklı kontrol grubuna göre anlamlı ( $p=0,014$ ) düşük bulundu. UGA  $2092 \pm 649$  mg/gün/100gr ve idrar NAG  $5,48 \pm 1,15$  mU/gün/100gr değerleri sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek ( $p=0,001$ ), hastalıklı kontrole göre anlamlı olarak ( $p=0,008$  ve  $p=0,02$ ) düşük bulundu. GFR  $0,31 \pm 0,11$  ml/dk/100gr ile UAA  $84,5 \pm 19,9$  mcg/gün/100gr sağlıklı kontrolden farklı değilken hastalıklı kontrole göre belirgin derecede düşük ( $p=0,001$  ve  $p=0,005$ ) bulundu. Sağlıklı kontrole göre;  $K^+$   $6 \pm 0,5$  mEq/L ( $p=0,035$ ), böbrek ağırlığı  $7,1 \pm 1,7$  gr/100gr ( $p=0,001$ ); idrar volümü  $74,5 \pm 27,4$  ml ( $p=0,001$ ); UPA  $29,2 \pm 30,4$  mg/gün/100gr ( $p=0,0006$ ); FENa  $1,14 \pm 0,53$  ( $p=0,001$ ); idrarda TNF- $\alpha$   $6,41 \pm 4,54$  ng/gün/100gr ( $p=0,001$ ); idrarda endotelin  $0,21 \pm 0,14$  mcg/gün/100gr ( $p=0,001$ ) anlamlı olarak yüksek bulundu. Hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmadı.

Bu grubun PAS ve İNOS antikorlarıyla karşılaştırılan böbrek kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; Bowman kapsülü, glomerül ve tübüler bazal membranlardaki düzenin hasta kontrol grubundakine göre daha iyi korunduğu gözlemlendi. Ayrıca, hasta kontrol grubundaki glomerüller mezangium ve peritübüler interstisyumda gözlenen yüksek orandaki PAS pozitifliğinin bu grupta azaldığı gözlemlendi. Glomerüllerde İNOS'a pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısının da hasta kontrol grubuna göre azaldığı izlendi (Şekil 17, 18).



**Şekil 17. N-asetil sistein grubunun 'periodic acid schiff' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti ('Periodic acid schiff' x 200)**





**Şekil 18. N-asetil sistein grubunun ‘inducible nitric oxide synthase’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

## **İRBESARTAN+N-ASETİL SİSTEİN KOMBİNASYON TEDAVİSİ**

### **UYGULANAN GRUP**

Bu grubun çalışma sonundaki serum glukoz değeri  $471 \pm 90,9$  mg/dl ( $p=0,0003$ ) ve HbA1c  $7,9 \pm 1,6$  ( $p=0,0003$ ) sağlıklı gruba göre belirgin derecede yüksek bulundu.

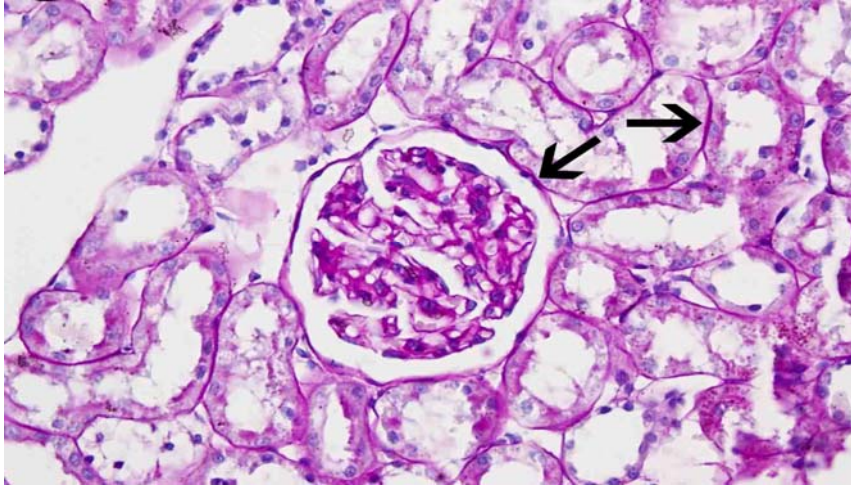
Sağlıklı ve hastalıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; çalışma başındaki ağırlık  $231 \pm 50,9$  gr; çalışma sonundaki ağırlık  $230 \pm 64,8$  gr; total protein  $5,91 \pm 0,5$  mg/dl; albumin  $3,36 \pm 0,37$  mg/dl; ürik asit  $1,6 \pm 0,47$  mg/dl; total kolesterol  $53,9 \pm 16,5$  mg/dl; trigliserid  $95,1 \pm 122$  mg/dl; HDL  $17,9 \pm 5,3$  mg/dl; CRP  $115 \pm 5,3$  ng/ml; serum TNF- $\alpha$   $79,2 \pm 49,5$  pg/ml; serum endotelin  $1,14 \pm 0,84$  ng/ml; renal dokuda bakılan SOD  $2,77 \pm 0,49$  U/mg protein ve GSH  $11,55 \pm 7,64$  pmol/mg protein değerleri arasında istatistiksel fark bulunmadı.

Hemoglobin değeri  $12,6 \pm 1,3$  gr/dl, hastalıklı kontrol grubundan anlamlı ( $p=0,009$ ) derecede yüksek ancak sağlıklı kontrol grubuna benzer bulundu. Üre  $62,6 \pm 24,1$  mg/dl ve kreatinin  $0,55 \pm 0,06$  mg/dl değerleri sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek, hastalıklı kontrole göre benzer bulundu.

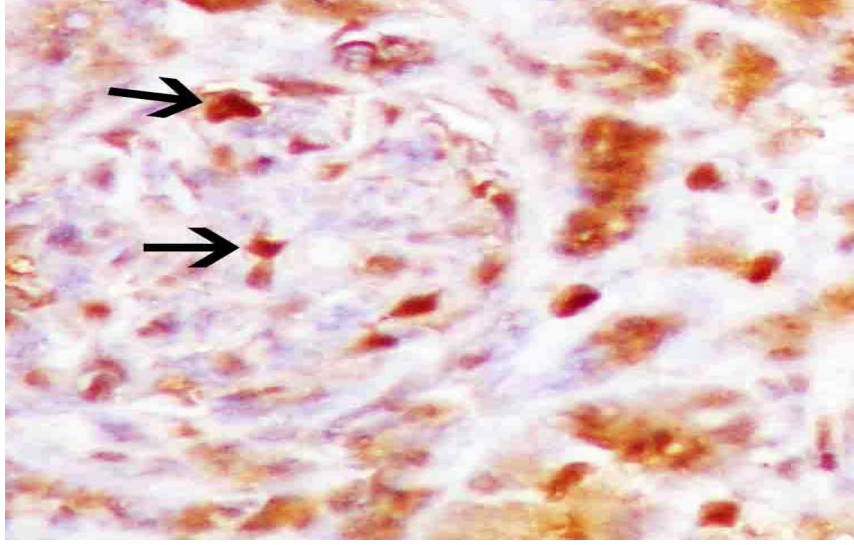
Hastalıklı kontrol grubuna göre  $\text{Na}^+$   $131 \pm 5,3$  mEq/L ve  $\text{K}^+$   $5,4 \pm 0,7$  mEq/L değerleri anlamlı düşük bulunurken, sağlıklı kontrol grubundan farklı değildi. Hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında, idrar volümü  $68,6 \pm 20,7$  ml ( $p=0,006$ ); UGA  $2925 \pm 1523$  mg/gün/100gr ( $p=0,009$ ); UAA  $92,03 \pm 15,08$  mcg/gün/100gr ( $p=0,024$ ); ve idrarda NAG  $4,03 \pm 3,27$

mU/gün/100gr (p=0,009) değerleri anlamlı düşük, sağlıklı kontrole göre anlamlı (p=0,0003) yüksek bulundu. GFR  $0,34\pm 0,13$  ml/dk/100gr değeri hastalıklı kontrole göre anlamlı düşük (p=0,001) idi, sağlıklı kontrolden farklı değildi. Böbrek ağırlığı  $6,6\pm 1,5$  gr/100gr (p=0,002); UPA  $17,8\pm 9,5$  mg/gün/100gr (p=0,006); FENa  $\%1,09\pm 0,37$  (p=0,0003); idrarda TNF- $\alpha$   $4,11\pm 3,53$  ng/gün/100gr (p=0,0003); idrarda endotelin  $0,74\pm 1,03$  mcg/gün/100gr (p=0,0003) sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulundu. Hastalıklı kontrole göre istatistiksel farklılık bulunmadı.

Bu grubun renal dokuları ışık mikroskopunda incelendiğinde; Bowman kapsülü, glomerüler mezangium ve peritübüler interstisyumdaki PAS pozitifliğinin hastalıklı kontrol grubuna göre azaldığı, kombinasyonsuz ayrı ayrı uygulanan IR ve NAC tedavi gruplarına oranla bu azalmanın daha belirgin olduğu görüldü. iNOS antikorlarına immun pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısının da hastalıklı kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın IR ve NAC gruplarından daha belirgin olduğu izlendi. Bu gruptaki iNOS reaksiyonunun IR+NS kombinasyon tedavi grubuna oranla daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 19, 20).



**Şekil 19. İrbesartan+N-asetil sistein grubunun ‘periodic acid schiff’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (‘Periodic acid schiff’ x 200)**



**Şekil 20. İrbesartan+N-asetil sistein grubunun ‘inducible nitric oxide synthase’ antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

### **İRBESARTAN+NİGELLA SATİVA KOMBİNASYON TEDAVİSİ UYGULANAN GRUP**

Bu grubun serum glukoz değeri  $421 \pm 90,6$  mg/dl ( $p=0,001$ ) ve HbA1c  $\%9,1 \pm 2,5$  ( $p=0,001$ ) sağlıklı gruba göre belirgin derecede yüksek bulundu. Serum glukozu hastalıklı kontrole göre anlamlı ( $p=0,022$ ) düşük bulundu.

Çalışma başındaki ağırlık  $240 \pm 14,08$ ; Hb  $11,5 \pm 2,1$  gr/dl total protein  $6 \pm 0,53$  mg/dl; albumin  $3,19 \pm 0,33$  mg/dl;  $\text{Na}^+$   $135 \pm 3,8$  mEq/L;  $\text{K}^+$   $5,6 \pm 0,8$  mEq/L; ürik asit  $1,88 \pm 0,55$  mg/dl; total kolesterol  $65,7 \pm 38,7$  mg/dl; trigliserid  $183 \pm 184$  mg/dl; HDL  $16,2 \pm 6,1$  mg/dl; CRP  $88,3 \pm 42,4$  ng/ml; serum TNF- $\alpha$   $57,1 \pm 22,8$  pg/ml; renal dokuda bakılan SOD  $2,62 \pm 0,23$  U/mg protein ve GSH  $12,83 \pm 5,85$  pmol/mg protein değerleri hem sağlıklı hem de hastalıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmadı.

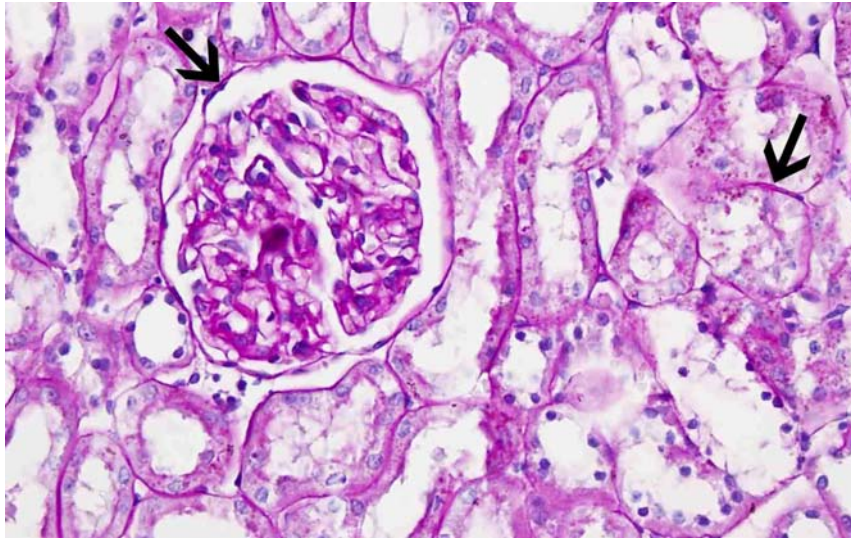
Üre  $73,3 \pm 23,7$ mg/dl ( $p=0,001$ ); kreatinin  $0,56 \pm 0,03$  mg/dl ( $p=0,001$ ) ve serum endotelin  $0,95 \pm 0,51$  ng/ml ( $p=0,035$ ) değerleri sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulundu. Hastalıklı kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmadı. Çalışma sonundaki ağırlık  $235 \pm 45,3$  gr sağlıklı kontrolden farklı değilken hastalıklı kontrole göre anlamlı ( $p=0,034$ ) yüksek bulundu.

Sağlıklı kontrole karşılaştırıldığında; böbrek ağırlığı  $5,7 \pm 0,5$  gr/100gr ( $p=0,005$ ); idrar volümü  $72,8 \pm 27,3$  ml ( $p=0,001$ ); UGA  $2220 \pm 887$  mg/gün/100gr ( $p=0,001$ ); UAA  $82,4 \pm 25,9$  mcg/gün/100gr ( $p=0,001$ ); UPA  $21,1 \pm 13,2$  mg/gün/100gr ( $p=0,014$ ); idrarda NAG  $7,61 \pm 9,43$

mU/gün/100gr(p=0,002); FENa %1,18±0,27 (p=0,001); idrarda TNF- $\alpha$  5,2±5,53 ng/gün/100gr (p=0,001); idrarda endotelin 0,41±0,5 mcg/gün/100gr (p=0,005) değerleri anlamlı yüksek ve GFR değeri 0,28±0,11 ml/dk/100gr benzer bulundu.

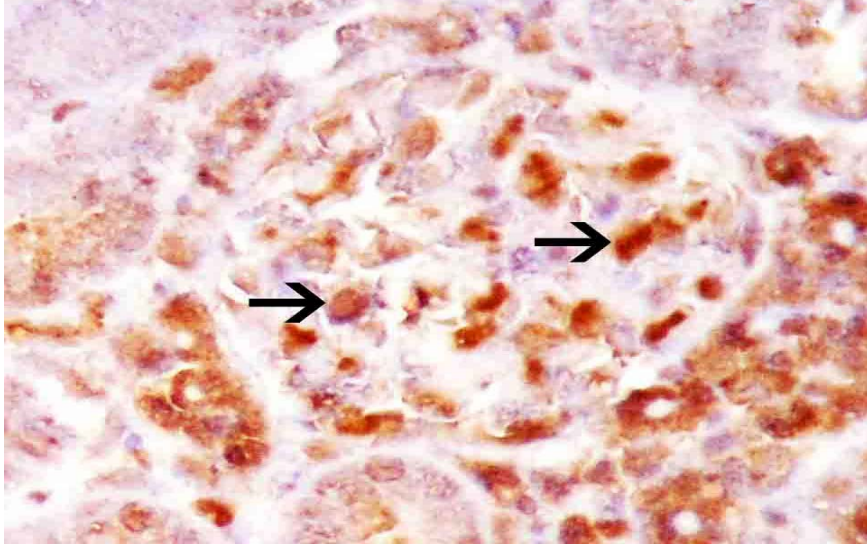
Hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında; böbrek ağırlığı (p=0,005); UGA (p=0,001); UAA (p=0,014) ve GFR(p=0,001) anlamlı düşük bulundu. İdrar volümü (p=0,101); UPA (p=0,628); idrarda NAG (p=0,101) FENa (p=0,366); idrarda TNF- $\alpha$  (p=0,366); idrarda endotelin (p=0,534) değerleri düşüktü ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Böbrek kesitlerindeki PAS reaksiyonu incelendiğinde; glomerüler mezangium ve peritübüler interstisyumda PAS pozitifliğinin, bu grupta hastalıklı kontrole göre azaldığı izlendi. IR ve NAC gruplarına oranla bu azalmanın daha belirgin olduğu gözlemlendi. Her iki kombinasyon tedavi gruplarında PAS tutulumunun benzer olduğu izlendi. Benzer şekilde glomerüllerde iNOS'a pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısının da hastalıklı kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın IR ve NAC gruplarından daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 21, 22).



**Şekil 21. İrbesartan+Nigella sativa grubunun 'periodic acid schiff' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti ('Periodic acid schiff' x 200)**





**Şekil 22. İrbesartan+Nigella sativa grubunun 'inducible nitric oxide synthase' antikorlarıyla muamele edilen böbrek kesiti (immunperoksidaz x 400)**

Tablo 8 ve Tablo 9'da tüm grupların sağlıklı kontrol ve hasta kontrol ile istatistiksel anlamda karşılaştırılmaları verildi.

**Tablo 8. Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP Parametreler</b>	<b>GRUP-I</b> Sağlıklı kontrol	<b>GRUP-II</b> Hastalıklı kontrol		<b>GRUP-III</b> IR Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.± Sd</b>	<b>p</b>
<b>İlk kilo (gr)</b>	234±34,5	225,86±9,69	0,716	234±60,5	0,643
<b>Son kilo (gr)</b>	276±63,1	186±23,1	<b>0,002</b>	206±56,6	<b>0,014</b>
<b>Glukoz (mg/dl)</b>	149±23,6	534±94,6	<b>0,0006</b>	468±108	<b>0,0003</b>
<b>Hb A1c (mg/dl)</b>	3,4±0,3	10±2,4	<b>0,0006</b>	8,6±2,3	<b>0,0003</b>
<b>Hb (gr/dl)</b>	13,3±0,4	10,2±1,3	<b>0,0006</b>	12,3±1,5	0,054
<b>Üre (mg/dl)</b>	35,1±6,6	56,9±10,1	<b>0,0006</b>	61,3±28,5	<b>0,021</b>
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0,47±0,06	0,48±0,08	0,53	0,54±0,07	0,072
<b>T. protein (mg/dl)</b>	6±0,18	6,14±0,37	0,38	6,43±0,63	0,152
<b>Albumin (mg/dl)</b>	3,37±0,33	3,51±0,26	0,26	3,36±0,37	0,779
<b>Ürik asit (mg/dl)</b>	1,39±0,2	1,67±0,26	0,053	2,15±1,24	0,121

**HbA1c:** Hemoglobin A1c; **Hb:** Hemoglobin; **T. protein:** Total protein; **IR:** İrbesartan; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması

GRUP Parametreler	GRUP-IV NAC Grubu		GRUP-V IR+NAC Grubu		GRUP-VI IR+NS Grubu	
	Ort.± Sd	p	Ort.± Sd	p	Ort.±Sd	p
İlk kilo (gr)	236±27,1	0,836	231±50,9	0,463	240±14,08	0,805
Son kilo (gr)	226±76,8	0,101	230±64,8	0,189	235±45,3	0,445
Glukoz (mg/dl)	548±45,1	<b>0,001</b>	471±90,9	<b>0,0003</b>	421±90,6	<b>0,001</b>
Hb A1c (mg/dl)	8,8±1,4	<b>0,001</b>	7,9±1,6	<b>0,0003</b>	9,1±2,5	<b>0,001</b>
Hb (gr/dl)	11,8±1,5	0,073	12,6±1,3	0,054	11,5±2,1	0,051
Üre (mg/dl)	72,5±38,8	<b>0,008</b>	62,6±24,1	<b>0,04</b>	73,3±23,7	<b>0,001</b>
Kreatinin (mg/dl)	0,5±0,09	0,295	0,55±0,06	<b>0,02</b>	0,56±0,03	<b>0,001</b>
T. protein (mg/dl)	5,63±0,77	0,366	5,91±0,5	0,612	6±0,53	0,731
Albumin (mg/dl)	3,2±0,35	0,445	3,36±0,37	0,778	3,19±0,33	0,628
Ürik asit (mg/dl)	1,63±0,37	0,295	1,6±0,47	0,694	1,88±0,55	0,051

HbA1c: Hemoglobin A1c; Hb: Hemoglobin; T. protein: Total protein; NAC: N-asetil sistein; IR: İrbesartan; NS: Nigella sativa; Ort.: Ortalama; Sd: Standart derivasyon.

**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP Parametreler</b>	<b>GRUP-I</b> Sağlıklı kontrol	<b>GRUP-II</b> Hastalıklı kontrol		<b>GRUP-III</b> IR Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>T. kol (mg/dl)</b>	49±9,6	54,3±8,6	0,456	62,3±20,2	0,189
<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	44,3±7,7	74,4±32	<b>0,038</b>	122±83,4	<b>0,014</b>
<b>HDL (mg/dl)</b>	18,1±3,7	20,7±4	0,259	18,4±5,3	0,955
<b>CRP (ng/ml)</b>	116±8	91,3±45	0,383	95,4±37,2	0,613
<b>Serum TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	52,64±7,49	196±196	<b>0,005</b>	64,6±28,5	0,799
<b>Serum endotelin (ng/ml)</b>	0,6±0,05	0,65±0,08	0,165	0,7±0,27	0,536
<b>Na<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	131±4,5	135±1,9	<b>0,038</b>	135±3	0,054
<b>K<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	5,5±0,3	6,3±0,6	<b>0,017</b>	5,5±0,9	0,463

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **IR:** İrbesartan; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.



**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b> <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-IV</b> NAC Grubu		<b>GRUP-V</b> IR+NAC Grubu		<b>GRUP-VI</b> IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort. ±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>T. kol (mg/dl)</b>	54,5±5,7	0,445	53,9±16,5	0,867	65,7±38,7	0,836
<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	103±40,2	<b>0,001</b>	95,1±122	0,336	183±184	0,138
<b>HDL (mg/dl)</b>	24±7,3	0,138	17,9±5,3	0,779	16,2±6,1	0,366
<b>CRP (ng/ml)</b>	80,1±40,9	0,051	115±5,3	0,694	88,3±42,4	0,445
<b>Serum TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	98,6±78,9	0,363	79,2±49,5	0,571	57,1±22,8	0,938
<b>Serumendotelin (ng/ml)</b>	0,92±0,57	0,234	1,14±0,84	0,613	0,95±0,51	<b>0,035</b>
<b>Na<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	131±2,7	0,945	131±5,3	0,955	135±3,8	0,181
<b>K<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	6±0,5	<b>0,035</b>	5,4±0,7	0,613	5,6±0,8	0,628

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **NAC:** N-asetil sistein; **IR:** İrbesartan; **NS:** Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart deviasyon.

**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b> <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-I</b> Sağlıklı kontrol	<b>GRUP-II</b> Hastalıklı kontrol		<b>GRUP-III</b> IR Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>Böbrek ağırlığı (gr/100gr)</b>	4,2±0,8	6,9±0,6	<b>0,0006</b>	6,3±1,3	<b>0,006</b>
<b>İdrar volümü (ml)</b>	9,14±2,3	91,3±9,8	<b>0,0006</b>	76,3±10,7	<b>0,0003</b>
<b>GFR (ml/dk/100gr)</b>	0,33±0,11	0,82±0,4	<b>0,0006</b>	0,43±0,2	0,281
<b>UGA (mg/gün/100gr)</b>	0,26±0,22	5053±1266	<b>0,0006</b>	3699±811	<b>0,0003</b>
<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	12,4±8,4	126±28,2	<b>0,0006</b>	96,5±20,3	<b>0,0003</b>
<b>UPA (mg/gün/100gr)</b>	4,97±2,17	35,4±30,4	<b>0,0006</b>	25,5±13,7	<b>0,0003</b>
<b>İdrar NAG (mU/gün/100gr)</b>	0,43±0,38	13,6±7,88	<b>0,0006</b>	7,06±1,89	<b>0,0003</b>

**GFR:** Glomerüler filtrasyon hızı; **UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **IR:** İrbesartan; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart deviasyon.

**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b> <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-IV</b> NAC Grubu		<b>GRUP-V</b> IR+NAC Grubu		<b>GRUP-VI</b> IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>Böbrek ağırlığı (gr/100gr)</b>	7,1±1,7	<b>0,001</b>	6,6±1,5	<b>0,002</b>	5,7±0,5	<b>0,005</b>
<b>İdrar volümü (ml)</b>	74,5±27,4	<b>0,001</b>	68,6±20,7	<b>0,0003</b>	72,8±27,3	<b>0,001</b>
<b>GFR (ml/dk/100gr)</b>	0,31±0,11	0,945	0,34±0,13	0,955	0,28±0,11	0,534
<b>UGA (mg/gün/100gr)</b>	2902±649	<b>0,001</b>	2925±1523	<b>0,0003</b>	2220±887	<b>0,001</b>
<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	84,5±19,9	<b>0,001</b>	92,03±15,8	<b>0,0003</b>	82,4±25,9	<b>0,001</b>
<b>UPA (mg/gün/100gr)</b>	29,2±30,4	<b>0,005</b>	17,8±9,5	<b>0,006</b>	21,1±13,2	<b>0,014</b>
<b>İdrar NAG (mU/gün/100gr)</b>	5,48±1,15	<b>0,001</b>	4,03±3,27	<b>0,0006</b>	7,61±9,43	<b>0,002</b>

**GFR:** Glomerüler filtrasyon hızı; **UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **NAC:** N-asetil sistein; **IR:** İrbesartan; **NS:** Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart deviasyon.

**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b>  <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-I</b>	<b>GRUP-II</b>		<b>GRUP-III</b>	
	Sağlıklı kontrol	Hastalıklı kontrol		IR Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>FENa (%)</b>	0,16±0,03	0,99±0,48	<b>0,0006</b>	1,17±0,23	<b>0,0003</b>
<b>İdrar TNF-α (ng/gün/100gr)</b>	0,29±0,1	8,06±5,49	<b>0,0006</b>	7,53±3,53	<b>0,0003</b>
<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	0,02±0,02	0,97±1,47	<b>0,0006</b>	0,57±0,47	<b>0,0003</b>
<b>SOD (U/mg protein)</b>	2,5±0,22	2,71±0,38	0,318	2,39±0,25	0,397
<b>GSH (pmol/mg protein)</b>	11,05±10,88	11,55±7	0,456	10,4±2,77	0,345

**FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF-α:** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon; **IR:** İrbesartan; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

**Tablo 8 (devam). Sağlıklı kontrol ile hasta grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b>  <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-IV</b>  NAC Grubu		<b>GRUP-V</b>  IR+NAC Grubu		<b>GRUP-VI</b>  IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort. ±Sd</b>	<b>p</b>
<b>FENa (%)</b>	1,14±0,53	<b>0,001</b>	1,09±0,37	<b>0,0003</b>	1,18±0,27	<b>0,001</b>
<b>İdrar TNF-<math>\alpha</math> (ng/gün/100gr)</b>	6,41±4,54	<b>0,001</b>	4,11±3,53	<b>0,0003</b>	5,2±5,53	<b>0,001</b>
<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	0,21±0,14	<b>0,001</b>	0,74±1,03	<b>0,0003</b>	0,41±0,5	<b>0,005</b>
<b>SOD (U/mg protein)</b>	2,62±0,31	0,731	2,77±0,49	0,397	2,62±0,23	0,534
<b>GSH (pmol/mg protein)</b>	11,32±8,65	0,731	11,55±7,64	0,613	12,83±5,85	0,445

**FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **NAC:** N-asetil sistein; **IR:** İrbesartan; **NS:** Nigella sativa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutasyon; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

**Tablo 9. Hasta kontrol ile tedavi grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b>  <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-II</b>	<b>GRUP-III</b>		<b>GRUP-IV</b>		<b>GRUP-V</b>		<b>GRUP-VI</b>	
	Hastalıklı kontrol	IR Grubu		NAC Grubu		IR+NAC Grubu		IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>İlk kilo (gr)</b>	225,86±9,69	234±60,5	0,687	236±27,1	0,664	231±50,9	0,802	240±14,08	0,552
<b>Son kilo (gr)</b>	186±23,1	206±56,6	0,779	226±76,8	0,445	230±64,8	0,152	235±45,3	<b>0,034</b>
<b>Glikoz (mg/dl)</b>	534±94,6	468±108	0,397	548±45,1	0,731	471±90,9	0,152	421±90,6	<b>0,022</b>
<b>Hb A1c (mg/dl)</b>	10±2,4	8,6±2,3	0,463	8,8±1,4	0,073	7,9±1,6	0,054	9,1±2,5	0,836
<b>Hb (gr/dl)</b>	10,2±1,3	12,3±1,5	<b>0,009</b>	11,8±1,5	0,073	12,6±1,3	<b>0,009</b>	11,5±2,1	0,136
<b>Üre (mg/dl)</b>	56,9±10,1	61,3±28,5	1	72,5±38,8	0,628	62,6±24,1	0,536	73,3±23,7	0,295
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0,48±0,08	0,54±0,07	0,28	0,5±0,09	0,836	0,55±0,06	0,189	0,56±0,03	0,073
<b>T. protein (mg/dl)</b>	6,14±0,37	6,43±0,63	0,463	5,63±0,77	0,181	5,91±0,5	0,397	6±0,53	0,628
<b>Albumin (mg/dl)</b>	3,51±0,26	3,36±0,37	0,694	3,2±0,35	0,234	3,36±0,37	0,694	3,19±0,33	0,181
<b>Ürik asit (mg/dl)</b>	1,67±0,26	2,15±1,24	0,867	1,63±0,37	0,945	1,6±0,47	0,397	1,88±0,55	0,731

**HbA1c:** Hemogloblin A1c; **Hb:** Hemogloblin; **T. protein:** Total protein; **IR:** İrbesartan; **NAC:** N-asetil sistein; **NS:** Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

**Tablo 9 (devam). Hasta kontrol ile tedavi grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b> <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-II</b>	<b>GRUP-III</b>		<b>GRUP-IV</b>		<b>GRUP-V</b>		<b>GRUP-VI</b>	
	Hastalıklı kontrol	IR Grubu		NAC Grubu		IR+NAC Grubu		IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>T. kol (mg/dl)</b>	54,3±8,6	62,3±20,2	0,613	54,5±5,7	0,945	53,9±16,5	0,694	65,7±38,7	0,945
<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	74,4±32	122±83,4	0,281	103±40,2	0,234	95,1±122	0,397	183±184	0,731
<b>HDL (mg/dl)</b>	20,7±4	18,4±5,3	0,463	24±7,3	0,445	17,9±5,3	0,463	16,2±6,1	0,101
<b>CRP (ng/ml)</b>	91,3±45	95,4±37,2	0,694	80,1±40,9	0,445	115±5,3	0,613	88,3±42,4	0,836
<b>Serum TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	196±196	64,6±28,5	0,336	98,6±78,9	1	79,2±49,5	0,779	57,1±22,8	0,138
<b>Serum endotelin (ng/ml)</b>	0,65±0,08	0,7±0,27	0,613	0,92±0,57	0,836	1,14±0,84	1	0,95±0,51	0,295
<b>Na<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	135±1,9	135±3	1	131±2,7	<b>0,014</b>	131±5,3	<b>0,029</b>	135±3,8	0,628
<b>K<sup>+</sup> (mEq/L)</b>	6,3±0,6	5,5±0,9	0,054	6±0,5	0,295	5,4±0,7	<b>0,021</b>	5,6±0,8	0,138

**T. kol:** Total kolesterol; **HDL:** High density lipoprotein; **CRP:** C-reaktif protein; **TNF- $\alpha$ :** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **Na<sup>+</sup>:** Sodyum; **K<sup>+</sup>:** Potasyum; **IR:** İrbesartan; **NAC:** N-asetil sistein; **NS:** Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

**Tablo 9 (devam). Hasta kontrol ile tedavi grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b>  <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-II</b>	<b>GRUP-III</b>		<b>GRUP-IV</b>		<b>GRUP-V</b>		<b>GRUP-VI</b>	
	Hastalıklı kontrol	IR Grubu		NAC Grubu		IR+NAC Grubu		IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.± Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>Böbrek ağırlığı (gr/100gr)</b>	6,9±0,6	6,3±1,3	0,336	7,1±1,7	0,295	6,6±1,5	0,867	5,7±0,5	<b>0,005</b>
<b>İdrar volümü (ml)</b>	91,3±9,8	76,3±10,7	<b>0,021</b>	74,5±27,4	0,366	68,6±20,7	<b>0,006</b>	72,8±27,3	0,101
<b>GFR (ml/dk/100gr)</b>	0,82±0,4	0,43±0,2	<b>0,029</b>	0,31±0,11	<b>0,001</b>	0,34±0,13	<b>0,001</b>	0,28±0,11	<b>0,001</b>
<b>UGA (mg/gün/100gr)</b>	5053±1266	3699±811	0,072	2902±649	<b>0,008</b>	2925±1523	<b>0,009</b>	2220±887	<b>0,001</b>
<b>UAA (mcg/gün/100gr)</b>	126±28,2	96,5±20,3	<b>0,04</b>	84,5±19,9	<b>0,005</b>	92,03±15,08	<b>0,024</b>	82,4±25,9	<b>0,014</b>
<b>UPA (mg/gün/100gr)</b>	35,4±30,4	25,5±13,7	0,867	29,2±30,4	0,628	17,8±9,5	0,397	21,1±13,2	0,628
<b>İdrar NAG (mU/gün/100gr)</b>	13,6±7,88	7,06±1,89	<b>0,021</b>	5,48±1,15	<b>0,02</b>	4,03±3,27	<b>0,009</b>	7,61±9,43	0,101

**GFR:** Glomerüler filtrasyon hızı; **UGA:** Üriner glukoz atılımı; **UAA:** Üriner albumin atılımı; **UPA:** Üriner protein atılımı; **NAG:** N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; **IR:** İrbesartan; **NAC:** N-asetil sistein; **NS:**Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.



**Tablo 9 (devam). Hasta kontrol ile tedavi grupların verilerin karşılaştırılması**

<b>GRUP</b>  <b>Parametreler</b>	<b>GRUP-II</b>  Hastalıklı kontrol	<b>GRUP-III</b>  IR Grubu		<b>GRUP-IV</b>  NAC Grubu		<b>GRUP-V</b>  IR+NAC Grubu		<b>GRUP-VI</b>  IR+NS Grubu	
	<b>Ort.±Sd</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.± Sd</b>	<b>p</b>	<b>Ort.±Sd</b>	<b>p</b>
<b>FENa (%)</b>	0,99±0,48	1,17±0,23	0,536	1,14±0,53	0,366	1,09±0,37	0,779	1,18±0,27	0,366
<b>İdrar TNF-α (ng/gün/100gr)</b>	8,06±5,49	7,53±3,53	0,867	6,41±4,54	0,731	4,11±3,53	0,094	5,2±5,53	0,366
<b>İdrar endotelin (mcg/gün/100gr)</b>	0,97±1,47	0,57±0,47	0,694	0,21±0,14	0,234	0,74±1,03	0,779	0,41±0,5	0,534
<b>SOD (U/mg protein)</b>	2,71±0,38	2,39±0,25	0,121	2,62±0,31	0,945	2,77±0,49	0,694	2,62±0,23	0,836
<b>GSH (pmol/mg protein)</b>	11,55±7	10,4±2,77	0,694	11,32±8,65	0,731	11,55±7,64	0,779	12,83±5,85	0,731

**FENa:** Fraksiyonel Na atılımı; **TNF-α:** Tümör Nekrozis Faktör-alfa; **SOD:** Süperoksit dismutaz; **GSH:** Glutatyon; **IR:** İrbesartan; **NAC:** N-asetil sistein; **NS:** Nigella sativa; **Ort.:** Ortalama; **Sd:** Standart derivasyon.

Özetle; çalışma başlangıcında gruplar arası rat ağırlıkları benzerdi. Çalışma sonunda sağlıklı grupta kilo artışı olurken, DM gruplarında kilo kaybı oluştu. 12 hafta sonunda sağlıklı kontrol grubuna göre; hastalıklı kontrol grubunun ortalama ağırlığı anlamlı düşük bulundu ( $p=0,002$ ). NAC, IR+NAC ve IR+NS gruplarındaki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışma sonunda, sağlıklı gruba göre tüm hasta grupları karşılaştırıldığında (Tablo 8); kan glukozu, HbA1c değerleri anlamlı yüksek bulundu. Üre değeri yüksek bulunurken, kreatinin değeri IR+NAC ve IR+NS gruplarında anlamlı yüksek bulundu. Hb değerlerindeki düşüklük ile serum TNF- $\alpha$  ve GFR değerindeki yükseklik sadece HK grubunda anlamlı idi. T. protein, albumin, ürik asit, total kolesterol, HDL değerleri benzer ancak trigliserid değeri HK, IR ve NAC gruplarında anlamlı yüksek bulundu. HK grubunda kan  $Na^+$ ,  $K^+$  ve NAC grubundaki  $K^+$  değeri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu. Hasta gruplarının tümünde böbrek ağırlığı, günlük idrar volümü ve glukoz atılımı sağlıklı gruptan yüksek bulundu. Glomerüler hasar göstergelerinden albumin ve protein ile tübüler hasar göstergesi olan FENa ve NAG değerleri de belirgin derecede yüksek bulundu. Kanda CRP, endotelin değerleri benzer bulunurken, idrarla atılan endotelin ve TNF- $\alpha$  değerleri glomerülo-tübüler hasarı gösterecek düzeyde sağlıklı gruptan yüksek bulundu. Renal dokuda bakılan SOD ve GSH değerleri ise benzer bulundu.

Çalışma sonunda, hastalıklı kontrol grubuna göre tedavi grupları karşılaştırıldığında (Tablo 9); IR+NS grubunda çalışma sonundaki kilo anlamlı yüksek idi. Kan glukozu anlamlı düşük iken, HbA1c değerleri benzer bulundu. Hb değeri IR ve IR+NAC grubunda anlamlı yüksek bulundu. Üre, kreatinin, T. protein, albumin, ürik asit, total kolesterol, trigliserid, HDL değerleri arasında istatistiksel farklılık yoktu.  $Na^+$  değeri NAC ve IR+NAC grubunda,  $K^+$  değeri ise IR+NAC grubunda hastalıklı kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. Hasta kontrol grubuna oranla, böbrek ağırlığı IR+NS grubunda ve idrar volümü IR ve IR+NAC grubunda düşük bulunurken, GFR ve albumin atılımı tüm tedavi gruplarında anlamlı düşük bulundu. Protein atılımı ve FENa değerleri arasında istatistiksel fark saptanmadı. Hasta kontrol grubuna göre, günlük idrarla atılan glukoz IR grubu ve NAG değerlerindeki belirgin düşüş IR+NS grubu dışındaki diğer tedavi gruplarında anlamlı derecede düşük bulundu. Tedavi gruplarının kanda CRP, endotelin, TNF- $\alpha$  değerleri ile idrarla atılan endotelin ve TNF- $\alpha$  değerleri hastalıklı kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmadı. Renal doku SOD ve GSH değerleri arasında farklılık saptanmadı.

## HASTA GRUPLARIN VERİLERİ ARASINDAKİ KORELASYON İLİŞKİLERİ

**Hemoglobin A1c** ile: glukoz r:583, p:000; kolesterol r:349, p:040; idrar volümü r:339, p:040; GFR r:428, p:010; UGA r:425, p:011; idrar TNF- $\alpha$  r:438, p:009.

**Glomerüler Filtrasyon Hızı** ile: glukoz r: 393, p: 019; serum kreatinin r: -470, p: 004; idrar völümü r: 512, p: 002; UAA r: 515, p: 002; UGA r: 645, p: 000; FeNa r: -494, p: 003.

**Böbrek Ağırlığı** ile: kilo r: -723, p: 000; glukoz r: 441, p: 008; üre r: 445, p: 007; UAA r: 403, p: 016; UGA r: 502, p: 002; İdrar endotelin r: 355, p: 036.

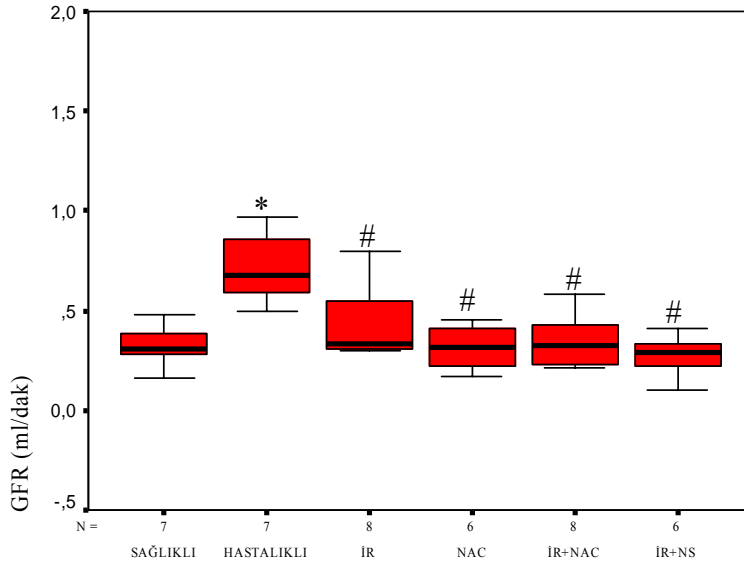
**Üriner Glukoz Atılımı** ile: glukoz r: 561, p: 000; idrar volümü r: 453, p: 029; TNF- $\alpha$  r: 513, p: 002; NAG r: 384, p: 023.

**Üriner Albumin Atılımı** ile: glukoz r: 547, p: 001; idrar volümü r: 547, r: 000; kilo r: 496, p: 045; endotelin r: 34, p: 045; UGA r: 606, p: 000.

**İdrar endotelin** ile: TNF- $\alpha$  r: 518, p: 001; böbrek ağırlığı r: 399, p: 018; hCRP r: 399, p: 018.

**Glutatyon** ile: SOD r: 460, p: 005; trigliserid r: -354, p: 033; Kolesterol r: -339, p:046.

Sağlıklı kontrol, hastalıklı kontrol ve grupların birbiri arasındaki GFR, üriner glukoz, albumin ve NAG atılımı Şekil 17-20'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

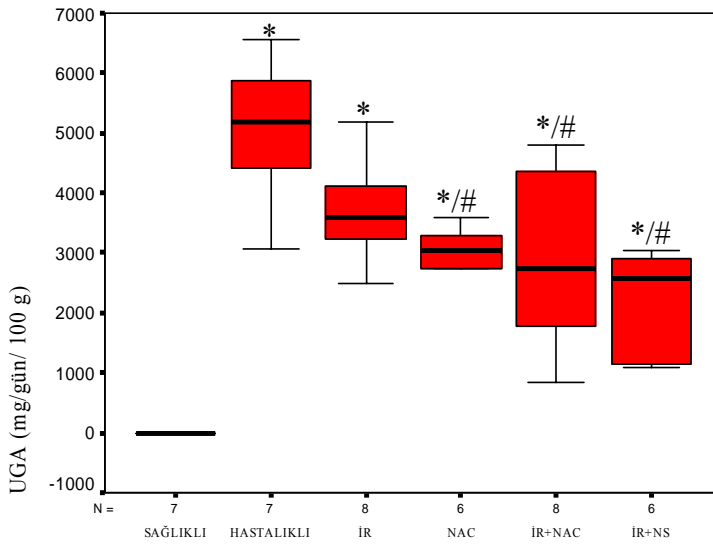


#### GRUPLAR

\*= Sağlıklı kontrole göre  $p < 0,01$ ; #= Hastalıklı kontrole göre  $p < 0,05$ .

**GFR:** Glomerüler Filtrasyon Hızı; **İR:** Irbesartan; **NAC:** N-Asetil sistein; **NS:** Nigella Sativa.

**Şekil 23. Glomerüler filtrasyon hızının sağlıklı kontrol, hastalıklı kontrol ve grupların birbiri arasındaki karşılaştırması**

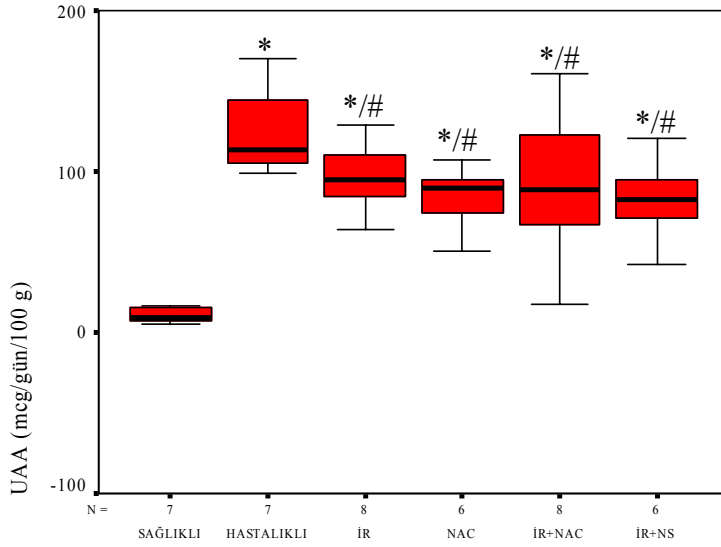


#### GRUPLAR

\*= Sağlıklı kontrole göre  $p < 0,001$ ; #= Hastalıklı kontrole göre  $p < 0,05$ .

**UGA:** Üriner Glukoz Atılımı; **GFR:** Glomerüler Filtrasyon Hızı; **İR:** Irbesartan; **NAC:** N-Asetil sistein; **NS:** Nigella Sativa.

**Şekil 24. Üriner glukoz atılımı sağlıklı kontrol, hastalıklı kontrol ve grupların birbiri arasındaki karşılaştırması**

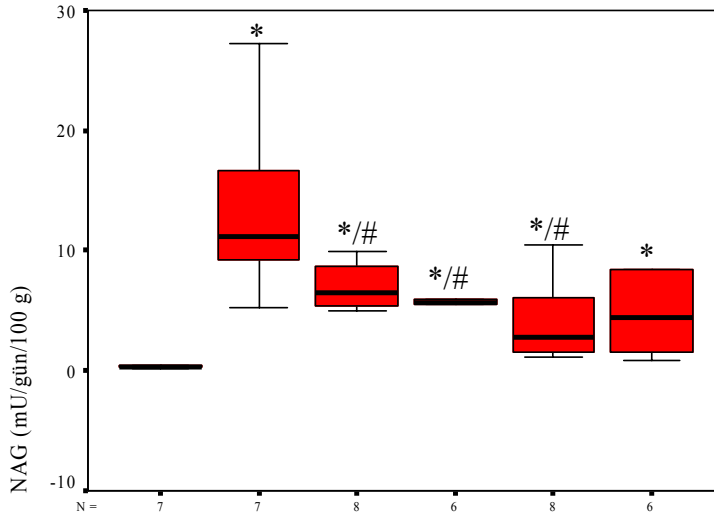


#### GRUPLAR

UAA:Üriner albumin atılımı; İR: İrbesartan; NAC: N-asetil sistein; NS:Nigella sativa

\*= Sağlıklı kontrole göre p <0,001; #= Hastalıklı kontrole göre p <0,05

**Şekil 25. Üriner albumin atılımı sağlıklı kontrol, hastalıklı kontrol ve grupların birbiri arasındaki karşılaştırması**



#### GRUPLAR

\*= Sağlıklı kontrole göre p <0,001; #= Hastalıklı kontrole göre p <0,05.

NAG: N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz; İR: İrbesartan; NAC: N-asetil sistein; NS:Nigella sativa.

**Şekil 26. N-Asetil-beta-D-Glukozaminidaz sağlıklı kontrol, hastalıklı kontrol ve grupların birbiri arasındaki karşılaştırması**

## TARTIŞMA

Kronik böbrek hastalığı (KBH) 21. yüzyılın çok ciddi sağlık sorununu oluşturmaktadır. Düzenli diyaliz tedavisi gören SDBY'li hasta sayısının, 2002 yılında 122 ülkede 1,4 milyon olduğu bildirilmiştir (160). ABD'de 2003'te 650.000 olan bu sayının, 2010'da iki milyona ulaşacağı öngörülmektedir (161). Dünyadaki kronik hastalıklar arasında, çok yüksek oranda yer alan DM'ye bağlı KBH sık gelişmektedir (162). Endüstriyel yaşam ve beslenme ile birlikte DM prevalansı da hızla artmaktadır. İki bin yılında 171 milyon olan dünyadaki DM'li sayısının 2030'da 366 milyona ulaşması beklenmektedir (1). Ülkemizdeki DM'li hasta sayısı da benzer şekilde artmaktadır. İki bin iki yılındaki 'Turkish Diabetes Epidemiology Study' (TURDEP) çalışmasında, %7,2 prevalans ile 5 milyon insanın DM'li olduğu ve bozulmuş glukoz intoleransı ile bu sayının daha da yüksek olduğu öngörülmüştür (163). Türk Nefroloji Derneği'nin 2007- 2009 yılları arasında 23 ildeki 18 yaş üstü 10.872 yetişkin bireyde, küme örnekleme yöntemi ile yaptığı 'Chronic Renal Disease in Turkey' (CREDIT) çalışmasında DM prevalansının %12,7'ye ulaştığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, genel populasyonun KBH prevalansının %17,6 ile oldukça yüksek olduğu ve DM'lilerin %26,6 sında KBH geliştiği gözlenmiştir. KBH'luların %5,4'ünü Evre 3-5 arasındaki (GFR değeri 60 ml/dk altında veya mikroalbuminüri ya da makroalbuminüri) hastalar oluşturmaktadır. Özellikle GFR değeri  $\geq 90$  ml/dk olan ve albuminürisi bulunmayan hastaların değerlendirilebilme zorluğu nedeni ile DM'ye bağlı olanı da içeren KBH prevalansının daha yüksek olması beklenmektedir (164). Ülkemizdeki KBH oranı, ABD'de %11 olarak bildirilenden belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (165).

Gelişen ve gelişmekte olan ülkelerdeki kronik hastalık profilinin değişmesi ile Tip 2 DM, günümüzde SDBY'e yol açan hastalıklar arasında major nedeni oluşturmaktadır (162).

1991'de düzenli diyaliz tedavisi gören DM'ye bağlı SDBY oranı, Doğu Almanya'da %11 iken, aynı sosyo-kültürel yapıda ancak endüstriyel gelişimi daha yüksek olan Batı Almanya'da %33 bulunmuştur (166). Aynı tarihlerde, ABD'de %34 olan ve 2005'te %40'a çıkan diyaliz tedavisindeki DM'li SDBY oranının, 10 yıl içinde %50'ye çıkması beklenmektedir (167).

Teknolojik yaşamla artan obezite, metabolik sendrom ve hipertansiyonun ülkemizdeki DM artışından önemli derecede sorumlu olduğunu düşünmekteyiz. CREDIT çalışmasında DM'ye benzer şekilde hipertansiyon (%32.7), metabolik sendrom (%31.3), abdominal obezite (%32.1) ve obezite (%20.1) prevalansları belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (164). Bağımsız şekilde renal bozulmayı hızlandıran bu risk faktörlerinin ülkemizdeki DM ve KBH artışında önemli rol aldığını düşünmekteyiz (7). Diyaliz tedavisindeki DM'ye bağlı SDBY'lilerde son yıllardaki hızlı artış düşüncemizi desteklemektedir. 1998'de %11,6 olan düzenli diyaliz tedavisi gören DM'ye bağlı SDBY'li prevalansı 2003'te %19,8 ile ilk sırada yer almaktadır. 2008'de bu hastaların prevalansı %27,9 ve insidansı %30,7 ile daha da yükselmiştir. Diyaliz hastalarının çoğunluğunu Tip 2 DM'lilerin oluşturması ve mortalitenin diyabetik olmayanlardan iki kat fazla olması, bu oranların özünde daha yüksek olduğunu düşündürmektedir (164). DM'ye bağlı komplikasyonların tedavisindeki gelişmelerle bu hastalardaki yaşamın uzatılmasının da DNP gelişimindeki artışta rolü olduğu unutulmamalıdır.

Paleolitik genlerle taşınan Tip 2 DM gibi Tip 1 DM de çoklu etkenlerle ilişkili olarak ortaya çıkan, mortalitesi ve morbitiditesi yüksek bir hastalıktır. Böbrekler DM'nin hedef organları arasında önemli yer alırlar (167). Toplumlardaki sıklığı farklılık göstermekle birlikte Tip 1 DM'lilerin %30-40'ında, Tip 2 DM'lilerin %15-25'inde DNP gelişmektedir. DM'lilerin %10'unu Tip 1, %90'unu Tip 2'liler oluşturduğundan düzenli diyaliz tedavisindeki hastaların çoğu Tip 2 DM'lidir (168). Farklı tipte olmalarına karşın DM'ye bağlı renal bozulma süreci benzerdir. Mekanizma tam aydınlatılamamakla birlikte artan glukoz ve metabolitlerinin DNP gelişiminde major etken olduğuna inanılmaktadır. Hipergliseminin derecesi ve süresi renal bozulmada baskın rol almaktadır. Glukoz ve metabolitlerine bağlı osmotik basınç artışı kan volum, renal kanlanma ve glomerüler, kapiller hidrolik basıncın artmasına neden olur. Filtrasyon membranından ultrafiltrat, solüt ve protein geçişi hızlanır, glomerül ve tübüllerin iş yükü artar. Süreç içinde glomerüllerin ve tübüllerin önce fonksiyonları giderek yapısı bozulur. DM'ye sıklıkla eşlik eden trigliserid ve aterojenik lipidlerin artışının yol açtığı lipid peroksidasyon ürünleri ile glukoz ve metabolitlerin yapımını uyardığı ROS, renal bozulmayı hızlandırır. Böylece hemodinamik olarak başlayan, metabolik bozulmalarla güçlenen olaylar,

önce nefronun fonksiyonunu ve giderek yapısını bozarak KBH'ya yol açar. Glisemi ile aktivasyonu artan RAAS, hemodinamik ve metabolik bozukluğun yanı sıra inflamasyonu da uyararak bu süreçte önemli rol alır (44,46,47).

Hem DM gelişimi hem de renal bozulmaya yol açan etmenlerin çoğunluğu düzeltilbilir özelliktedir. Yaşam ve beslenme biçiminin düzenlenmesi ile DM'nin diğer komplikasyonları gibi renal hastalık gelişimi de önlenabilir ve ötelenebilir. Erken evredeki düzenli ve sıkı glisemik kontrol ile DNP gelişiminin önlendiği bilinmektedir (167). Son yıllarda, antioksidanların kullanımının renal koruyuculukta ve KBH progresyonunun yavaşlatılmasında yararlı olacağı bildirilmektedir (18,169).

Genetik yapının DNP gelişiminde önemli rol aldığı ve kadın cinsiyetin renal bozulmaya daha yatkın olduğu bilinmektedir. Hereditenin Tip 1'de %10, Tip 2'de %60 rol almasına karşı Tip 1 DM'nin %37'si, Tip 2 DM'nin %20'sinde KBH gelişmektedir. Ancak, düzenli glisemik kontrol ile bazı hastalarda nefropati gelişirken, diğerlerinde gelişmemesinin tam açıklanamamakla birlikte genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir (170). Ayrıca, genetik yapıyla sıkı ilişkili olan aterojenik lipidlerin artışı da DNP gelişimini hızlandırmaktadır (170). Ülkemizdeki DM'lilerin %26.6'sında gelişen KBH'da, %50'sinde HDL düşüklüğü, %45'inde trigliserid ve %25'inde de LDL yüksekliği gözlenmesi dislipideminin etkinliğini düşündürmektedir (164). Ülkemizdeki obezite artışının da insülin direnci ve metabolik bozulmayla DM gelişimine önemli katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz (171). Ayrıca hızla artmakta olan hipertansiyon da bu süreci hızlandırmaktadır (164). Hipertansiyonlu hastalardaki DM prevalansının normotansiflerin 2.5 katı daha fazla olması da görüşümüzü desteklemektedir (172).

Düzenli antihipertansif kullanımı ile kan basıncı ve glomerüler kanlanma düzeltildiğinde, insülin direnci ve renal bozulma da azalmaktadır. 1990 başlarında antihipertansif olarak kullanılmaya başlanan ACEi olan kaptopril'in Tip 1 DM'lilerdeki renal hastalık gelişimini azalttığı gözlenmiştir. Hemodinamik etkisinin, DNP gelişimini önlemede baskın rol oynadığı düşünülmüş ve ACEi'lerinin Tip 1 DM'de kullanımının yararlı olacağı bildirilmiştir (173). Daha sonraki çalışmalar da düzenli kan basıncı kontrolü ile DNP gelişiminde yavaşlama olması bu görüşü güçlendirmiştir (171). İngiltere'deki uzun süreli 'United Kingdom Prospective Study Group' (UKPDS) çalışmasında, beta bloker olan atenolol'un kaptopril'e benzer şekilde Tip 2 DM'lilerde, renal koruyucu etki yaptığı gözlenmiştir. Bu nedenle, antihipertansiflerin renal koruyuculuğunun, ilacın grubundan bağımsız olarak kan basıncını düşürücü etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (174). Ancak, kalsiyum kanal blokerinin tek başına kullanımının proteinüriyi azaltıcı etkisinin plaseboya



benzediği, ACEi ile kombine verildiğinde Tip 2 DM'deki proteinürüyi azalttığı gözlenmiştir. Renal koruyucu özelliklerinden ötürü Tip 1'e benzer şekilde Tip 2 DM'de ACEi'lerinin kullanımının yeğlenmesi önerilmektedir (175,176). Ayrıca, ACEi'lerinin renal koruyucu etkilerinin güçlülüğü, RAAS aktivasyonunun renal bozulmayla ilişkisinin göstergesidir. Hemodinamik değişimler Tip 1 DM'de ve metabolik bozukluklar Tip 2'de daha belirgin olduğu halde her iki DM'de sistemik RAAS baskılanırken lokal RAAS'ın aktivasyonu artar (177). Tip 2 DM'ye sıklıkla eşlik eden sedanter yaşam ve obeziteye bağlı yağ kitle artışı lokal RAAS yapımını da uyarır. DM'nin hedef organları arasında önemli yer alan kalp, beyin ve özellikle böbreklerde RAAS bileşenlerinin sentezi artar (98,178). Lokal RAAS aktivasyonu, sistemik ve özellikle dokulardaki hemodinamik ve metabolik bozulmaları daha da artırır ve hem lokal etki ile üretildiği organı, hem de sistemik etki ile diğer organların bozulmasını hızlandırır (90). Sağlıklı insanda, plazmanın 500-1000 katı yüksek olan renal dokudaki RAAS'ın artışı vazokonstriksiyonla nefronun hemodinamik fonksiyonunu bozar. AT1 reseptör aktivasyonu ile de mezangial hücrelerin ve matriksin artışına yol açarak nefronun yapısını bozar. Ayrıca, renal Na<sup>+</sup>-su tutulumu ve sistemik vasküler konstriksiyon ile kan volümü ve basıncını artırır. İnsülin direnci ile dislipidemi ve metabolik bozukluğa neden olur. Ang II artışı da dokudaki AT1 reseptör aracılığı ile hücredeki NADPH oksidazı uyararak O<sub>2</sub><sup>-</sup> yapımını artırır. O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO ile reaksiyona girerek vazodilatatör, antiproliferatif ve fibrinolitik fonksiyonlarını bozar ve yeni bir ONOO<sup>-</sup> radikal üretimi ile antioksidan kullanımını ve organ bozulmasını hızlandırır. Bu nedenlerle, son yıllarda lokal RAAS baskılanmasını içeren çalışmalara önem verilmektedir (178). Dokuya geçişi değişken ve az olan ACEi'lerinin lokal RAAS'ı yeterince baskılamadığı ve ARB'lerin dokuda daha güçlü etki yaptığı bildirilmiştir (179). Ancak, 1970'lerden bu yana bilinmesine karşın sardan ailesinden olan ARB'lerin klinik kullanımına 1995'lerde başlanmıştır (89). DNP'ye etkinliğini inceleyen çalışmalar sürdürülmektedir (179,180). Onazoto ve ark. (16), dokuya geçişi yüksek olan ACEi olan kinapril ile ARB olan irbesartan'ın deneysel DNP oluşturulan ratlarda, proteinürüyi benzer düzeyde azalttığını bildirmişlerdir. İnoda ve ark.(180) da, ARB ile deneysel DM'li ratların albuminüri düzeyinde azalma gözlemişlerdir. Her iki çalışmada kan basıncını düşürmeyen dozda ARB'nin kullanılması, renal koruyucu özelliklerinin ilaçların kan basıncını düşürücü etkilerinden bağımsız olduğunu göstermektedir (16,180). ARB'lerin bu etkileri, DM'de artan ve metabolik bozulmayla ilişkili olan lokal RAAS'ın baskılanmasından kaynaklanmaktadır (180). Metabolik bozulmanın baskın olduğu Tip 2 DM'de de Tip 1 DM'dekine benzer şekilde renal koruyucu etki yapmaları bu görüşü desteklemektedir. 'Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist

Losartan' (RENAAL) ve 'Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial' (IDNT) klinik çalışmalarında Tip 2 DM'lilerde kullanılan ARB'lerin, belirgin renal koruyucu etkileri gözlenmiştir (140,141,143,181). Ayrıca, lokal RAAS aktivasyonun baskılanması ile tuz-su retansiyonun önlenmesi de renal koruyucu etkiyi desteklemektedir. DM'de artan intraglomerüler basınç, nefronun iş yükündeki ve oksidatif ürünlerin yapımındaki artış, lokal RAAS baskılanması ile önlenmekte, hücre proliferasyonu ve matriks yapımındaki uyarı baskılanmaktadır. Böylece, nefronun dinamik ve yapısal bozulması yavaşlamaktadır (16).

Klinik ve deneysel çalışmalarda, artmış glukoz ve metabolitleri ile lokal RAAS aktivasyonunun yol açtığı oksidatif stres ve ROS artışı, DM'ye bağlı organ hasarlarının oluşumunda önemli rol aldığı gözlenmiştir (182,183). Hiperglisemi ile böbrek hücrelerine direkt giren glukoz ve yapımı artan AGEs, renal dokuda ROS artışına yol açar (11,182-184). Deneysel DM oluşturulan ratların böbrek kortekslerinde,  $O_2^-$  gibi oksijen radikallerini inaktive eden SOD ve GSH gibi antioksidanların azaldığı gözlenmiştir (185). Tüketimi artan antioksidanların azalması ile renal doku bozulmasının hızlandığı ve bu nedenle DNP gelişiminin yavaşlatılmasında antioksidanların kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir (18,125). Antioksidan etkileri bilinen NS'nın, deneysel çalışmalarda DM ve renal koruyucu özelliklerinin olduğu bildirilmiştir (186). Aynı şekilde antioksidan özellikleri bilinen NAC ile yapılan radyokontrastlı çalışmalarda, renal koruyucu etkilerinin olduğu gözlenmiştir (28,187). Biz de çalışmamızda geleneksel olarak kullanılan çörek otu yağı özü olan NS ve benzer şekilde toksik etkileri olmayan ve klinikte kullanılan NAC'ın ayrı ayrı ve renal koruyucu özelliği bilinen ARB blokeri olan irbesartanla kombinasyon tedavilerinin deneysel DNP gelişimine etkilerini incelemeyi amaçladık.

Nitrözüre bileşiği içeren STZ, insülinde bağımsız şekilde pankreas hücrelerine girer ve pankreastaki N-acetyl glukozamin (NAG)'e karşı çalışır. Beta hücrelerinin ölümüne yol açarak insülin yetersizliği ile Tip 1 DM geliştirir. Aynı zamanda, NO artışı ile ATP azalmasına ve  $O_2^-$  yapımını uyararak oksidatif stres artışı ile de DM oluşumuna katılmaktadır (188). Bu etkilerden ötürü, aşırı glukoz artışları ile 24-48 saat gibi kısa sürede rat ölümlerine yol açabilmektedir. 15 g/L sükroz içeren içme suyu ile bu ölümler azaltılabilmektedir. Ayrıca, 75-150 mg/kg dozlarda kullanıldığında kimyasal toksisiteye bağlı tübüler nekroz gelişebilmektedir. Bizim çalışmamızda, 45 mg/kg intraperitoneal STZ ile ratların büyük çoğunluğunda 48 saat sonra Tip 1 DM geliştiği görüldü. Çalışmamıza alınan ratların 3'ü ilk 48 saatte ve geriye kalanların çoğunluğu 1 ay içinde olmak üzere toplam %37'si diğer çalışmalara benzer şekilde öldü (189). Bu tablo, hiperglisemiye bağlı hiperosmolarite ve ketoasidozla seyreden DM'li hastaların, tedavi edilmediklerinde sıklıkla ölümle

sonlanmalarına benzerdi. Özellikle Tip 1 DM'ye benzer deneysel DM modellerinde bu ölümler yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda da ketoasidoz, hiperkatabolizmaya bağlı beslenme bozukluğu ve sekonder ektoparazitoz gelişimi ile diğer çalışmalardan daha düşük olmakla birlikte ölüm oranı yüksek ve DM oluşturulan ratların ağırlıkları, bazal değerlerinden ve sağlıklı gruptan düşük bulunmuştur (189,190). Bu durum, mortalite artışına yol açan hiperglisemiye bağlı katabolizma ve ketoasidozdan kaynaklanmaktadır (191).

Çalışmamızda, DM oluşturulan ratlarda, hem fonksiyonel hem de yapısal renal bozulma oluştu ve hemodinamik değişikliklere bağlı nefron fonksiyonlarındaki bozulmanın, daha baskın olduğunu gözledik. DM'li ratların çalışma sonundaki kiloları artmadığı ve bazal değerlerinden daha düşük olduğu halde böbrek ağırlıkları sağlıklı gruptan yüksek bulundu. Böbreklerin büyümesi öncelikli olarak DM'nin yol açtığı hemodinamik değişikliklere bağlı renal kanlanma ve intraglomerüler basınç artışı ile ilişkili nefronların genişlemesinden kaynaklanmaktadır. Kilo kaybına karşın, idrar volümleri ve özellikle GFR değerlerindeki artış, nefronun hidrolik basıncının arttığını göstermektedir. Belirgin glukozüriye eşlik eden ve sağlıklı grubun en az yedi katı olan hasta gruplarındaki açık albuminüri de filtrasyon membranındaki hidrolik basınç artışının göstergesidir (192). Hasta kontrol grubuna göre; son kilo ağırlığının, IR+NS grubunda anlamlı derecede ulaşması ve diğer tedavi gruplarında anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olmasının yanında IR ve IR+NAC gruplarından anlamlı derecede yüksek olan idrar völüm artışı ve tüm tedavi gruplarından GFR değerinin anlamlı derecede yüksek bulunması intrarenal hemodinaminin değiştiğini göstermektedir. Bu da GFR'deki artışın, renal kanlanma artışından çok RAAS aktivasyonuna bağlı efferent arteriol konstriksiyonu gibi intrarenal hemodinamik değişikliklerden kaynaklandığını düşündürmektedir (98).

Çalışmamızda, üç aylık deneysel DM'nin sonunda rat böbreklerinin hemodinamik fonksiyonlarının yanı sıra yapılarının da bozulduğunu, hemodinamik değişikliğe bağlı nefronlardaki genişlemeye ek olarak yapısal bozulmanın da böbrek ağırlığının artışında etkili olduğunu gözledik. Diyabetik rat gruplarındaki belirgin albüminüri renal parankimal yapının bozulduğunu göstermektedir. Renal yapı ve fonksiyonlardaki bu bozulmanın renal yetmezlik düzeyine ulaştığını gözlemledik. Anlamsız olmakla birlikte ağır proteinüriye eşlik eden değişik derecedeki ürik asit artışları ve tüm hasta gruplarındaki anlamlı üre artışları dehidratasyonun yanı sıra renal yetmezliğin geliştiğini düşündürmektedir. İdrarla atılan FENa ve NAG değerlerindeki belirgin artışlar glomerüllerin yanı sıra tübüllerin de bozulduğunu göstermektedir. Tübüler fonksiyon ve yapının bozulması ile ultrafiltrattaki sodyumun emilimi bozulduğu için idrarla atılımı artmaktadır. Aynı şekilde NAG atılımındaki artış da renal tübüler

fonksiyon veya yapısal bozulmadan kaynaklanır. Molekülünün büyüklüğü (140.000D) nedeniyle dolaşımdan ultrafiltrata geçemediğinden idrarla atılan NAG, proksimal tübüler epitelyel hücre lizozomal kaynaklıdır. Ultrafiltrata geçen albumin artışı ile bu hücrelerin metabolizmaları ve ilişkili olarak salgıladıkları NAG'ın idrarla atılımı da artar. Tübüler hücrelerdeki hasarlarda idrar NAG atılımı belirgin şekilde artar (190). DM'li hastalarda yapılan çalışmalarda, tübüler fonksiyon ve yapısal bozulmanın göstergesi olan NAG'ın idrarla atılımının arttığı gösterilmiştir (193). Dünya Sağlık Örgütü raporlarında, mikroalbuminürinin hücre proliferasyonu-GBM kalınlaşmasının başladığı DNP'nin erken evresinde olduğu bildirilmektedir. İnsanda günlük albumin atılımının  $\geq 30-300$  mg/gün ya da  $\geq 20-200$   $\mu\text{g}/\text{dk}$  olan değerler mikroalbuminüri ve 15-29 mg/gün olan değerler sınırdaki mikroalbuminüri olarak tanımlanmaktadır. Antijenik yapısı nedeniyle mezangial hücre ve matriks artışını, glomerüller ve tübüler duvarın bozulmasını hızlandıran albuminüri kardiyovasküler hastalık gelişiminde risk faktörü olarak kabul edilmektedir (194). Mikroalbuminüri, sağlıklı insan albumin atılımının iki kat artmış olmasıdır. Çalışmamıza alınan ratlarda bu atılımın çok daha yüksek olması, makro düzeydeki albuminüri ve NAG atılım artışı hem glomerül hem de tübüler yapısal bozulma geliştiği görüşümüzü desteklemektedir.

Çalışmamızda, dislipideminin DM'nin erken evresinde geliştiğini gözledik. Anlamli olmamakla birlikte kolesterol düzeylerindeki hafif artışlar, DM'li insanlardakine benzer şekilde belirgin trigliserid artışları oluştu. IR+NAC ve IR+NS tedavi gruplarındaki belirgin artışın anlamli bulunmaması, bu iki gruptaki ratların trigliserid değerlerindeki değişkenliğin yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Klinik incelemelerde, DM gelişiminden uzun süre önce (8-10 yıl) dislipideminin geliştiği ve özellikle yüksek değerlere ulaşan trigliseridin, pankreas hücrelerine toksik etki yaparak DM gelişimini ve organ hasarlarını hızlandırdığı bilinmektedir (195). Aterojenik lipidlerin konsantrasyonları ile ilişkili olan oksitlenmeleri hem vasküler endotel geçirgenliği artırır, hem de makrofajların subendotele geçişi köpük hücre oluşumunu hızlandırarak ateroskleroza başlatır (167,171).

Vasküler duvar hücreleri ve moleküllerinin yavaş ilerleyen inflamatuvar reaksiyonlar zinciri sonucu ateroarteriosklerozis oluşur. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonu olan DNP gelişiminde inflamatuvar olaylar önemli rol alır (83). Çalışmamızdaki diyabetik ratların, idrarla atılan TNF- $\alpha$  ve Endotelin-1 düzeylerindeki belirgin derecedeki artış DNP gelişiminde inflamasyonun etkisini göstermektedir (196,197). Daha önceki çalışmalarda, idrarla atılan TNF- $\alpha$ 'nın renal hipertrofi ve Na retansiyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (198). Tip 2 DM'li hastaların idrarla atılan TNF- $\alpha$  değerlerinin, sağlıklı insanlarınkinden belirgin derecede yüksek olduğu ve albumin atılımı ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (199). Bizim

çalışmamızda sağlıklı gruptan belirgin şekilde yüksek olan idrardaki TNF- $\alpha$  ile HbA1c, UGA ve üriner endotelin doğrusal pozitif ilişkili bulundu. Ancak, üriner albumin ile bu doğrusal ilişki saptanmadı. Benzer şekilde, büyüme faktörü ve vasküler bozulma göstergesi olan endotelin-1'in idrardaki artışı ve TNF- $\alpha$  ile pozitif ilişkisi de inflamasyonun DNP gelişimini artırdığını göstermektedir (200). Sağlıklı gruba göre DM oluşturulan ratlarda, idrarla atılan endotelin 26 kat ve renal doku TGF- $\beta_1$  mRNA 2,5 kat daha yüksek bulunmuştur (201). Çalışmamızda da, DM oluşturulan grupların idrar endotelini sağlıklı gruptan yaklaşık 20-50 kat daha yüksek bulundu. İdrar endotelin-1 ile renal ağırlık ve serum CRP değerleri ile pozitif doğrusal ilişkili bulundu. Bu da inflamasyonun renal bozulmada rol aldığı görüşünü desteklemektedir (196,197). Ek olarak böbrek kesitlerindeki iNOS antikorlarına karşı artmış reaksiyon da inflamasyonun renal bozulmayı güçlendirdiğinin bulgusu olarak değerlendirildi (202). Glukoz ve metabolitlerinin yol açtığı AGEs ve RAAS aktivasyonu ile oluşan ROS, hem direkt olarak hem de antioksidan kapasiteyi azaltarak DM'deki bozulmayı kolaylaştırmaktadır (203). Bizim çalışmamızda, DM'li ratların renal korteks SOD ve GSH gibi antioksidanlarında azalma saptanmadı, hasta kontrol ve tedavi gruplarının değerleri arasında farklılık gözlenmedi. Bu durum ARB'lerin hücre içi oksidatif stresi baskılamada yetersiz kalması (204) ve kullanılan antoksidan dozlarının prooksidan etki yapacak düzeyde olmasından kaynaklanmış olabilir (205). Ayrıca, renal dokuda NADPH oksidaz ve ROS değerleri ölçülmediği için antioksidanların yapım/kullanım durumu değerlendirilemedi. Buna karşın, GSH'nın SOD'la pozitif ve lipid peroksidasyonu artırıcı özellikteki kolesterol, trigliseridle negatif doğrusal ilişki bulması DM'de artan oksidatif stresin DNP gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir (17).

Çalışmaya alınan DM'li grupların verilerinin karşılaştırılmasında; hasta kontrol grubunda kilo kaybı ve kan glukozundaki artış IR+NS grubuna göre anlamlı bulundu. HbA1c değerindeki yükseklik tedavi gruplarına göre anlamlı dereceye ulaşmazken, IR ve IR+NAC gruplarına göre hemoglobin değerindeki düşüklük anlamlı dereceye ulaşmıştı. Bu bulgular, tedavi edilmeyen DM'lilerdeki katabolizma ve beslenme bozukluğunun glisemi ile ilişkisini göstermektedir. Anlamlı olmamakla birlikte trigliserid değerinin tedavi gruplarından düşük olması da beslenme bozukluğu görüşümüzü desteklemektedir. Kan TNF- $\alpha$  değerinin tedavi gruplarından anlamsız da olsa belirgin derecede yüksek olması inflamatuvar olayların tedavisiz DM'lilerde daha fazla olduğunun göstergesidir. Belirgin artışa karşın farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, kan TNF- $\alpha$  değerleri arasındaki farklılığın çok geniş olmasından kaynaklanmıştır. Hasta kontrol grubundaki idrar volüm artışının tüm tedavi gruplarından daha fazla olması ve bu artışın IR ve IR+NAC gruplarına göre anlamlı dereceye ulaşması, üriner

glukoz ile birlikte GFR artışlarının tedavi gruplarına göre anlamlı derecede bulunması, DM'nin erken evrelerinde başlayan renal bozulmanın tedavi edilmeyenlerde daha güçlü olduğunu göstermektedir. Klinik proteinüri evresindeki albuminürinin, tedavi gruplarının değerlerinden anlamlı derecede yüksek olması, renal fonksiyonların yanı sıra belirgin derecede renal yapısal bozulmanın geliştiğinin göstergesidir. İdrar NAG değerinin, tedavi gruplarındakinin en az iki katı kadar artması ve bu farkın IR, NAC ve IR+NAC gruplarına göre anlamlı dereceye ulaşması, tedavi edilmeyen DM'lilerde glomerüllerle birlikte tübüllerin de hem fonksiyonun hem de yapısının bozulduğunu göstermektedir (206). Histopatolojik incelemede, tedavi gruplarına oranla belirgin olan mezangial hücre ve matriks artışı, lobulasyon oluşumları ve bazal membranda kalınlaşma ile glomerüllerin, tübüler dilatasyon ve epitelial hücrelerdeki dejenerasyonlar ile tübüler bozulmanın daha hızlı geliştiğini gözledik. Kanda ve idrarda TNF- $\alpha$  artışı ve iNOS antikörlerine karşı renal korteks hücrelerindeki reaksiyonun daha fazla olması inflamasyonun tedavi edilmeyen DM'ye bağlı renal bozulmanın hızlanışında rol aldığını düşündürmektedir (202).

Tedavide kullanılan ARB, antioksidanın tek başına ve kombinasyon tedavilerinin DNP gelişimine etkileri incelendiğinde; irbesartan tedavisi ile DNP gelişiminin önceki çalışmalara benzer şekilde yavaşladığını gözledik (16,180,207). Kan basıncını düşürmeyen dozda kullanıldığından, bu etkileri dokusal AT1 reseptör blokajına bağlıdır. Sistemik etkiden daha çok DM'ye bağlı intrarenal hemodinami ve metabolik değişimleri düzelterek DNP gelişimini yavaşlatmaktadır (16). Hasta kontrol grubuna göre anlamlı derecedeki Hb yüksekliği ve anlamsız olmakla birlikte kan glukozu ve onun uzun süreli göstergesi olan renal bozulmayla ilişkisi bilinen HbA1c'nin daha düşük olması, ARB'lerin kan basıncını düşürücü etkisinden bağımsız şekilde de intrarenal hemodinamik ve metabolik bozulmayı önleyici etkisini göstermektedir (14,15). Kan basıncını düşürmediği halde idrar volümü, GFR ve idrarla atılan glukoz, albumin, NAG değerlerindeki belirgin düşüş öncelikle intrarenal hemodinamik etkisine bağlıdır. Bu bulgular, DM'ye bağlı AT1 reseptör aktivasyon ve sayılarındaki artışın intrarenal hemodinamik değişiklik ve DNP gelişimine önemli etkisi olduğunu göstermektedir (10,135). Bu bulgular, etkinlikleri doza bağlı olsa da, düşük dozdaki ARB tedavileri ile de intrarenal hemodinamik ve metabolik değişikliklerin baskılandığı ve DNP gelişiminin yavaşladığı düşüncesini desteklemektedir (16,180,207). Anlamsız da olsa idrar volümü ve özellikle GFR'nin anlamlı derecedeki düşüşü, öncelikle ARB'nin intraglomerüler hidrolik basınç artışını önleyici etkisinden kaynaklanmaktadır (77). Glomerüler kapiller hidrolik basınç artışıyla ilişkili olan, üriner albumin atılımının GFR ile doğrusal pozitif ilişkili olarak azalması da düşük doz ARB ile intraglomerüler basıncın

azaldığını göstermektedir. Albuminüriye paralel şekilde üriner NAG atılımı da azalmıştır. Bu azalma, ultrafiltrata geçen albumin miktarındaki düşüklük nedeni ile tübüler iş yükünün ve/veya tübüler bozulmanın azalmasına bağlıdır (194). Anlamsız bulunsa da kan ve özellikle idrar TNF- $\alpha$  değerinin hasta kontrol grubundan yaklaşık üç kat düşük olması, HbA1c, glukoz dışında idrar endotelini ile de pozitif ilişkili bulunması ARB'nin inflamasyonu baskılayıcı etkisini göstermektedir. AT1 reseptör aktivasyonuna bağlı ROS artışını baskılayıcı özelliği de inflamasyonu azaltarak DNP gelişimini yavaşlatmaktadır (200). İrbesartan ile renal korteksteki iNOS antikorlarına karşı reaksiyonun azalması bu düşüncüyü desteklemekle birlikte, renal korteks SOD ve GSH değerlerinde belirgin değişiklik oluşmadı. Bu durum, AT1 reseptör ve ROS yapımının baskılanmasına bağlı antioksidan yapım gereksiniminin azalması veya irbesartanla oksidatif baskılanmanın yetersiz kalmasına bağlı antioksidan kullanımının artışı kaynaklanmış olabilir (77,204,208). Ancak, ROS ve NADPH oksidaz ölçümü yapılmadığından, antioksidan yapımı ve kullanımı hakkında değerlendirme yapılamamıştır. Bulgularımız, ARB'nin renal koruyucu özelliklerinin öncelikle hemodinamiyi düzeltici etkilerinden kaynaklandığını, antiinflamatuvar ve oksidatif stresi azaltıcı etkilerinin de renal koruyuculuklarını güçlendirdiğini düşündürmektedir.

Hücre içinin güçlü antioksidan olan GSH'nın prekürsoru NAC tedavisinin, bildirilen renal koruyucu özelliğinin deneysel DM'de de geçerli olduğunu gözledik (28,159,187). Diyabete bağlı renal bozulmayı önleyici etkileri, irbesartanla benzer özellikte bulundu. Bazal değere göre kilo kaybı %4.2, hasta kontrol (%17,3) ve irbesartan grubundan (%11) daha düşüktü. Anlamsız da olsa, irbesartan grubuna göre trigliserid artışı daha az, HDL artışı daha fazla idi. Kan glukozu ve renal ağırlığın hasta kontrol gruba benzerliğine karşı, hemoglobin değerindeki artış ile HbA1c ve idrar volümündeki düşüş irbesartan grubuna benzer bulundu. Anlamsız olmakla birlikte NAC tedavisi ile GFR ve idrarla atılan glukoz, albumin, NAG değerlerindeki azalma, irbesartan ile gözlenen renal koruyuculuktan daha belirgindi. Serum TNF- $\alpha$  değerini, hasta kontrol grubun yarısına kadar düşürdüğü ancak irbesartan grubuna göre bu düşüşün daha zayıf olduğu bulundu. İdrarla atılan TNF- $\alpha$ 'yı azaltıcı etkisi anlamsız da olsa irbesartandan daha iyi idi. Bu bulgular, antioksidan kullanımı ile DM'ye bağlı renal bozulmanın yavaşlatılacağı görüşünü desteklemektedir (17,125). Ayrıca, NAC'ın dislipidemi ve inflamasyonu azaltıcı etkisinin de renal koruyuculuğa katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz (208). Ancak renal doku SOD ve GSH konsantrasyonunda belirgin bir değişiklik oluşmaması, NAC'ın ROS aktivasyonunu baskılanmasına bağlı, antioksidan yapım azalmasından kaynaklanabilir. Ya da kullanılan NAC dozu prooksidan etki yaparak antioksidan kullanımını artırmış olabilir. Renal doku ROS ölçülmediğinden bu durum belirlenememiştir. Ancak

NAC'ın nefron fonksiyonlarının yanı sıra renal histopatolojide de iyileştirici etki yaptığını gözledik. Mezangial hücrelerdeki proliferasyon,mezangial matriks artışı, glomerülo-tübüler bazal membran kalınlaşmaları ve epitel hücrelerdeki dejenerasyonu irbesartan grubuna benzer şekilde azaltmıştır. iNOS antikörlerine karşı renal kortikal hücrelerin reaksiyon sayı ve şiddetindeki azalma da irbesartan grubuna benzer bulundu. Bulgularımız, DM tedavisinde, NAC'ın böbrek fonksiyon ve yapısının korunmasında baskın rol alan antioksidan özelliğinin yanı sıra dislipidemi ve antiinflamatuvar özelliklerinden de yararlanılabileceğini ve organ bozulmalarının azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, irbesartan ve antioksidanların tek başına kullanılmalarına oranla, kombine kullanımlarında renal koruyucu etkilerinin daha güçlü olduğunu gözledik. İrbesartanla NAC'ın kombine kullanıldığı grupta kilo kaybı %1 gibi çok düşük bulundu. Kan glukozu ve HbA1c anlamsız olmakla birlikte kayda değer şekilde düşüktü. IR+NAC kombinasyonu, hasta kontrole göre IR grubuna benzer şekilde hemoglobinde artışa, idrar volümünde azalmaya yol açtı. GFR ve idrarla atılan glukoz, albumin, NAG değerini düşürdü. NAG'daki diğer tedavi gruplarından daha belirgindi. Ayrı kullanımlarına oranla trigliserid artışı daha düşük idi. İdrarla TNF- $\alpha$  atılımındaki azalma belirgin derecede ve irbesartan grubundan anlamlı derecede düşüktü. Bu düşüş, HbA1c ve üriner glukoz, endotelin ile pozitif ilişkili bulundu. Histopatolojik incelemede de, irbesartan ve NAC'nin tek başına verilmesinden daha fazla renal düzelme gözlendi. Benzer şekilde, renal kortikal hücrelerin iNOS antikörlerine reaksiyon veren hücre sayı ve aktivitelerinde daha belirgin azalma görüldü. Antioksidanların, ARB'lerin hemodinamik ve yapısal renal koruyucu etkilerini güçlendirdiğini gözledik. Bu bulgular, antioksidanların, ARB'lerin metabolik ve öncelikle antiinflamatuvar etkilerini potansiyalize edişi ile açıklanabilir (17). Ayrıca, ARB ile oluşan AT1 reseptör blokajına bağlı oksidatif stres baskılanmasının, antioksidanların etkileri ile desteklenmesinden de kaynaklanmaktadır. İrbesartanın, NS ile kombinasyon tedavisinin etkileri; IR+NAC tedavisine benzer şekilde, tek başına IR kullanımından daha güçlü bulundu. IR+ NAC ile kilo kaybı, %2,1 azaldı. Hasta kontrol grubuna göre; anlamlı dereceye ulaşan renal ağırlıktaki düşme diğer tedavi gruplarından daha belirgindi. Kan glukozunda anlamlı derecede düşüş ile anlamsız derecede HbA1c ve idrar volümünde azalma, hemoglobinde artışla olumlu etki yapmıştır. Serumdaki TNF- $\alpha$  anlamsız ancak daha belirgin düşük bulunmuştur. Buna karşı trigliserid artışı diğer tedavi gruplarından daha fazla idi. GFR ve albumin atılımında azalma diğer tedavi gruplarından daha belirgindi. İdrar NAG değerinde belirgin azalma irbesartan grubuna benzer olmakla birlikte fark hasta kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamsız bulundu. IR+NS ile üriner glukoz atılımındaki azalma diğer tedavi



gruplarından daha fazla ve bu fark irbesartan grubu ile anlamlı dereceye ulaşmıştır. Renal kortikal SOD aktivasyonu diğer hasta gruplarına benzer, GSH konsantrasyonunda anlamsız derecede hafif artış gözlenmiştir. Histopatolojik incelemede, DNP gelişimindeki yavaşlamanın tek başına irbesartan kullanımından daha belirgin ve IR+NAC tedavisine benzer olduğunu gözledik. Mezangial hücre proliferasyonu-matriks artışı, glomerülo-tübüler bazal membran kalınlaşmaları, tübüler dilatasyonlar ve epitel hücre dejenerasyonlarını IR+NAC tedavisine benzer şekilde azaltmıştır. Kan ve idrar glukoz değerlerinin tüm hasta gruplarından daha düşük olması, geleneksel görüşü destekler şekilde Nigella Sativa'nın antiglisemik etkisinin daha güçlü olduğunu göstermiştir. (26,27,151-153). Bu nedenle, Nigella Sativa'nın öncelikle glisemiye düşürücü özelliği ile renal koruyucu etki yaptığını düşünmekteyiz. Kan TNF- $\alpha$  değerindeki düşüşün diğer tedavi gruplarından daha fazla olması, antiinflamatuvar özelliklerinin de renal koruyuculuğunu güçlendirdiğini düşündürmektedir. IR+NAC grubuna benzer ve diğer hasta gruplarından daha düşük olan üriner TNF- $\alpha$ 'nın, kan ve idrar glukozu ile doğrusal pozitif ilişkili olması Nigella Sativa'nın antiinflamatuvar etkisinin olduğu görüşünü desteklemektedir (146). NAC'a benzer şekilde Nigella Sativa da irbesartan'ın renal koruyucu etkilerini güçlendirmiştir. Bu etkiyi öncelikle glisemiye azaltarak daha azda antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle gerçekleştirdiğine inanmaktayız.

Özetle, çalışmamıza alınan ve STZ ile deneysel DM geliştirilen ratlarda, 12 hafta sonunda gliseminin daha da arttığını ve belirgin şekilde diyabetik renal patolojik değişikliklerin geliştiğini gözledik. Diyabete bağlı mortalite diğer çalışmalardan daha düşük oranda olsa da yüksek bulundu (189). Erken evredeki ölümlerden az da olsa STZ'nin yol açtığı akut gliseminin, daha sonraki ölümlerden DM'ye bağlı keto-asidoz, metabolik bozukluk ve dehidratasyonun sorumlu olduğunu düşündük. Verilen tedavi şekli ile mortalitenin belirli ilişkisini saptamadık. DM oluşturulan gruplarda, 3 ay sonra belirgin şekilde hemodinamik ve metabolik değişikliklerin geliştiğini gözledik. Tüm gruplarda GFR, idrar volümü ve glukozüri artışı ile birlikte intrarenal hemodinaminin bozulduğunu, açık albuminüri ile glomerüllerin ve idrarla atılan belirgin NAG artışı ile tübüllerin bozulduğunu gözledik. Böbreklerdeki ağırlık artışına ek olarak, histopatolojik incelemede, mezangial hücre ve matriks artışı, glomerülo-tübüler bazal membran kalınlaşması, tübüler dilatasyon ve epitel hücre dejenerasyonu ile diyabetik renal yapısal bozulmanın erken evrede geliştiğini saptadık.

İrbesartan tedavisi ile; idrar volümü, glomerüler filtrasyon, glukozüri, albuminüri, proteinüri ile glomerülo-tübüler fonksiyon ve yapısal bozulmanın azaldığını ve DNP gelişiminin yavaşladığını gözledik. AT1 reseptör blokajı ile DNP'ye bağlı intrarenal hemodinamik değişimlerdeki düzelmeyi, öncelikli olarak bu olumlu etkide rol aldığını

düşündük. DM'ye bağlı artmış intraglomerüler basıncı geriletmediğinden iş yükleri azalan glomerüllerin yanı sıra tübüllerin de fonksiyon bozulmasını yavaşlatmıştır. İdrar volüm ve NAG atılımındaki belirgin azalma glomerüllerin yanında tübülerinde korunduğunu göstermektedir. Histopatolojik incelemede, irbesartanın hem glomerül hem de tübüler yapısal bozulmayı azalttığını gözledik. İdrar ve kan glukoz değerlerinde kayda değer ve idrar TNF- $\alpha$  değerinde hafif düşüş sağlaması, irbesartanın antiinflamatuvar ve metabolizmayı düzeltici özelliklerinin de renal koruyuculukta etkili olduğunu düşündürmektedir. Renal doku antioksidan kapasitedeki hafif düşüşler ise irbesartanın oksidatif stresi baskılamada yetersiz kalışı ya da kullanılan dozun düşüklüğünden kaynaklanmış olabilir. Benzer şekilde, antioksidan olarak tek başına kullanılan NAC'ın DNP'yi yavaşlattığını gözledik. Kan glukozunu düşürmediği halde, lipid profili ve glomerülo-tübüler fonksiyonlarını iyileştirici özelliği irbesartana oranla daha etkili bulundu. GFR ve idrarla glukoz, albumin, NAG atılımını azaltıcı etkisi, irbesartan'a oranla daha belirgindi. Kanda daha yüksekçe olan glukozun, idrarla atılımının daha düşük olması, NAC'ın tübüler fonksiyonları IR'den daha iyi koruduğunu düşündürmektedir. Buna karşı renal kesitlerin incelenmesinde DNP'ye özgün histopatolojideki düzelme ve iNOS antikorlarına karşı reaksiyonlar irbesartan grubuna benzer bulundu. NAC'ın renal koruyucu etkileri öncelikle renal dokudaki antioksidan etki ve dolayısı ile de inflamasyonu baskılayıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır. Kan TNF- $\alpha$  değerini azaltıcı etkisinin irbesartandan daha güçsüz olmasına karşın, idrarla atılan TNF- $\alpha$  ve özellikle endotelinin daha düşük olması, NAC'ın intrarenal inflamasyonu baskılayıcı etkisinin IR'den daha güçlü olduğunu düşündürmektedir.

İrbesartan'ın, tek başına kullanılmasına oranla NAC ve NS ile kombinasyon tedavilerinin, glomerüler ve tübüler fonksiyonlar ile yapıların bozulmasını ve DNP gelişimini daha fazla yavaşlattığını gözledik. Her iki antioksidanla, renal koruyucu etkileri potansiyalize olan irbesartan'ın, NAC kombinasyonu ile antiinflamatuvar ve NS kombinasyonu ile anti-gliseremik etkisinin daha güçlendiğini gözledik. İrbesartan'ın, tek başına kullanımına oranla, renal dokudaki SOD ve GSH değerlerindeki hafif artışlar kombinasyon kullanımının antioksidan kapasiteyi güçlendirdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, insanlardakine benzer şekilde, hiperglisemiye bağlı metabolik bozukluk ve keto-asidozla ilişkili mortalitenin deneysel DM'de de yüksek olduğunu ve renal bozulmanın DM'nin çok erken evrelerinde başladığını, tedavi edilmeyenlerde renal hastalık gelişiminin hızlandığını gözledik. Diyabete bağlı renal bozulmada, intrarenal hemodinamik değişikliklere yol açan RAAS aktivasyonunun, ağırlıklı olarak rol oynadığını, inflamatuvar olayların, oksidatif stres ve metabolik bozuklukların renal bozulma ile ilişkili olduğunu

düşündük. ARB'ler ile intrarenal hemodinami, kısmen inflamasyonun ve gliseminin düzeldiğini, antioksidanlarla kombine kullanım ile bu etkilerin daha güçlendiğini gözlemledik. Sonuç olarak bulgularımız, renal korumada öncelikle RAAS baskılayıcı tedavinin gerekli olduğunu, bu etkilerin güçlendirilmesi için toksik etkileri olmayan antioksidanlarla kullanımının yararlı olacağını düşündürmektedir. Ancak, daha geniş kapsamlı ve daha uzun süreli deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇLAR

Çalışmamız, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı işbirliğiyle yapıldı. Çalışmamıza 3,5-4 aylık, ortalama ağırlıkları  $233,5 \pm 32,8$  gr olan Sprague-Dawley cinsi 81 adet erkek rat alındı. 7 tanesi sağlıklı kontrol grubu için ayrıldıktan sonra, geri kalan 74 rat 45 mg/kg intraperitoneal STZ verildi. 48 saat sonra kuyruktan alınan kan glukoz değeri  $\geq 250$  mg/dl olanlar DM'li kabul edildi. DM gelişen ratlar; Hastalıklı kontrol, İrbesartan, N-asetil sistein, İrbesartan+N-asetil sistein, Nigella Sativa ve İrbesartan+Nigella Sativa olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Nigella Sativa grubuna ayrılan ilk 5 rat hiperglisemi-ketoasidoz ve ektoparazitöz tablosu içinde öldüğünden ve rat sayısı sınırlandırılmış olduğundan, bu grupta çalışmaya devam edilemedi. Deneysel Tip 1 DM oluşturduğumuz ratlarda, KB'nı düşürmeyen dozlarda ARB (İrbesartan), antioksidanlar (NAC ve NS) ve kombinasyon tedavilerinin, böbrek fonksiyonlarına, renal histopatoloji ve korteks dokusunda SOD, GSH konsantrasyonlarına ve DNP gelişimine etkilerini inceleyerek karşılaştırdık.

1. Intraperitoneal verilen STZ ile ratların %87,8'inde DM gelişti. Hasta kontrol grubu dışındakilere 12 hafta süre ile tedavi uygulandı.

2. Sağlıklı gruba göre; 12 hafta sonunda tüm hasta gruplarında DM'nin erken evresinde hemodinamik ve renal histopatolojik değişikliklerle DNP geliştiği gözlemlendi.

3. Hasta kontrol grubunda; sağlıklı kontrol gruba göre, 12 haftalık çalışma sonunda anlamlı derecede rat ağırlığı (%17,3) ve hemoglobin değerinde düşüş, glukoz, HbA1c, üre, trigliserid, sodyum ve potasyum değerlerinde yükselme saptandı. Böbrek ağırlığı ve idrar volümü, GFR değeri, FENa ile idrarla atılan glukoz, albumin, protein, NAG, TNF- $\alpha$  ve endotelin değerlerinde anlamlı artış bulundu.

4. İrbesartan tedavisi verilen grupta; çalışma sonunda rat ağırlığında %11 düşüş saptandı. Hastalıklı kontrol grubuna göre, anlamlı derecede hemoglobin artışı ile idrar volümü, GFR ve idrarla atılan albumin, NAG değerlerinde azalma oluştu. İdrarla atılan glukoz, endotelin ve serum TNF- $\alpha$  değerlerinde anlamsız ancak belirgin düşüşle DNP gelişiminin yavaşladığı gözlemlendi.

5. N-asetil sistein tedavisi verilen grupta; çalışma sonunda rat ağırlığı %4 azaldı. Hastalıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, GFR ve idrarla atılan glukoz, albumin, NAG değerlerinde anlamlı, idrar volümü ve atılan endotelin, kan TNF- $\alpha$  değerlerinde anlamsız düşüşle, irbesartan grubuna benzer şekilde DNP gelişiminde yavaşlama görüldü.

6. İrbesartan+N-asetil sistein tedavisi verilen grupta; kilo kaybı %1 ile diğer gruplara göre en düşük bulundu. Hastalıklı kontrol grubuna göre, anlamlı derecede hemoglobin değerinde artış, idrar volümü, GFR ve idrarla glukoz, albumin, NAG atılımında, serum sodyum ve potasyum değerlerinde düşüş saptandı. Serum ve idrar TNF- $\alpha$ , idrar endotelin değerlerinde anlamsız olan ancak irbesartana göre anlamlı olan idrardaki belirli TNF- $\alpha$  düşüş ile renal fonksiyonlarda düzelme oluştu.

7. İrbesartan+Nigella Sativa tedavisi verilen grupta; çalışma sonunda rat ağırlığında %2,1 düşüş saptandı. Hastalıklı kontrol grubuna göre, böbrek ağırlığı, kan glukozu, GFR ve idrarla atılan glukoz, albumin değerlerinde anlamlı, NAG'da anlamsız azalma bulundu. İdrar volümü, serum ve idrar TNF- $\alpha$ , idrar endotelin değerlerinde belirgin düşüşün yanında irbesartana oranla anlamlı düşük bulunan TNF- $\alpha$  değerleri ile DNP gelişiminin yavaşladığını gözledik.

8. İrbesartan+N-asetil sistein grubunda renal korteksteki SOD düzeyinde, İrbesartan+Nigella Sativa grubunda ise GSH düzeyinde hafif derecede yükselme saptandı. Diğer gruplarda renal dokudaki SOD ve GSH düzeyinde değişiklik bulunmadı.

9. Renal kesitlerin histopatolojik incelenmesinde; hasta kontrol grubunda daha belirgin olmak üzere, tüm hasta gruplarında, mezangial hücrelerde ve matrikste artış ile glomerüller ve tübüler bazal membranlarda kalınlaşma şeklinde DNP'ye özgün renal patoloji geliştiği gözlemlendi. İR ve NAC tedavisi ile bu histopatolojik değişikliklerde benzer şekilde azalma olduğu ve İR'in NAC ve NS kombinasyon tedavileri ile bu düzelmenin daha da belirginleştiğini gözledik. PAS ile iNOS antikorlarına karşı reaksiyonların IR ve NAC grubunda benzer şekilde azaldığı ve bu azalmanın kombinasyon tedavi gruplarında, daha da belirginleştiği gözlemlendi.

## ÖZET

Diabetes Mellitus, gelişmiş ülkelere benzer şekilde ülkemizde de artarak kronik böbrek yetmezliğinin birincil nedenini oluşturmaktadır. Glukoz ve metabolitlerine bağlı renin anjiotensin ve aldosteron sisteminin aktivasyonu ve oksidatif stres artışı renal bozulmada önemli rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda, renin-anjiotensin- aldosteron sisteminin baskılanmasının diyabetik nefropati gelişimini yavaşlattığı, antioksidan olan N-asetil sistein ile dislipidemi ve reaktif oksijen ürünleri yapımının azaldığı, diyabetik ve nondiyabetik nefropati oluşumunun yavaşladığı, Nigella Sativa ile kan glukozu ve oksidatif stresin azaldığı bildirilmiştir. Yaptığımız araştırmada, anjiotensin reseptör blokerleri ile antioksidanların kombinasyon tedavilerine rastlayamadık. Bu nedenle, çalışmamızda; deneysel Tip 1 Diabetes Mellitus oluşturulan ratlarda, kan basıncını düşürmeyen dozlarda Anjiotensin II Tip 1 reseptör blokeri olan irbesartan, antioksidan olan N-asetil sistein ve Nigella'nın irbesartanla kombinasyon tedavilerinin diyabetik nefropati üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışma sonunda, 24 saatlik idrar toplandıktan sonra sakrifiye edilen ratlarda, renal fonksiyon ve metabolik göstergeler ile renal dokuda süperoksit dismutaz, glutatyon ölçümleri yapıldı. Renal korteks kesitlerinde kollajen ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz birikimleri incelendi. Sağlıklı, hasta kontrol ve tedavi gruplarının verileri karşılaştırıldı. Hasta kontrol grubuna göre, irbesartan tedavisi uygulanan grupta; anlamlı derecede hemoglobin değerinde yükseklik, glomerüler filtrasyon hızı, idrar volümü, idrarla atılan albumin, N-asetil glukozaminidaz değerlerinde düşüklük ile renal fonksiyonlarda düzelme gözlemlendi. N-asetil sistein grubunda glukoz atılımının daha düşük olması dışında biyokimyasal ve renal histopatolojik değişiklikler irbesartan grubuna benzer bulundu. İrbesartan ile N-asetil sistein kombinasyon tedavisinde anlamlı derecedeki hemoglobin yüksekliği ve anlamsız derecede

trigliserid,hemoglobin A1c ile idrar volümü ve idrarla atılan protein değerinde azalma gözlemlendi.İrbesartan'ın Nigella Sativa ile kombinasyon tedavisinde anlamlı derecede rat ve renal ağırlık ile kan glukoz artışındaki düzelme etkilerinin daha olumlu olduğu gözlemlendi. Renal doku antioksidanlarından süperoksit dismutaz ile glutatyon değişmedi. Mezangial hücreler ve matriks artışı, glomerülo-tübüler bazal membran kalınlaşmaları ve epitel hücrelerdeki dejenerasyon irbesartan ve N-asetil sistein gruplarında benzer şekilde azalmış, irbesartan'ın her iki antioksidanla kombinasyon tedavileri ile histopatolojideki düzelme belirginleşmiştir.Renal kortikal kollajen birikimi ve indüklenebilir nitrik oksit reaksiyonundaki azalma irbesartan ve N-asetil sistein tedavilerine oranla kombinasyon tedavilerinde daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Bulgularımız, diyabetik renal bozulmanın önlenmesinde, sıkı glisemik kontrole ek olarak renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin baskılanmasının gerekli olduğunu, antioksidanların bu renoprotektif etkileri güçlendirdiğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Deneysel diyabet, Diyabetik nefropati, Anjiyotensin reseptör blokerleri, N-asetil sistein, Nigella Sativa

# **COMPARISON OF COMBINATION THERAPIES INCLUDING IRBESARTAN AND ANTIOXIDANTS IN EXPERIMENTAL DIABETIC NEPHROPATHY**

## **SUMMARY**

Diabetic nephropathy is the leading cause of chronic renal failure in our country as well as in other well developed countries. Related to the increased glucose and its metabolites, activation of renin-angiotensin-aldosterone system, and increased oxidative stress are important in renal deterioration. The studies indicate that suppression of renin-angiotensin-aldosterone system slow down diabetic nephropathy; N-acetyl cysteine, which is an anti-oxidant substance, decrease dyslipidemia and production of reactive oxygen species in addition to slowing down both diabetic and non-diabetic nephropathy; and *Nigella sativa* decreases blood glucose and oxidative stress. We reviewed the literature about clinical and experimental studies of diabetic nephropathy but could not find a study involving combination therapy of anti-oxidant medication and angiotensin receptor blockers. For these reason, in our study; we aimed to study the effects of angiotensin tip II receptor blocker irbesartan at a dose without blood pressure lowering effect and the combination of irbesartan and antioxidant N-acetyl cysteine and *Nigella sativa* on experimental type 1 diabetic rats with diabetic nephropathy.

At the end of the study, the renal functions, metabolic markers and super oxide dismutase, glutathion measurements in renal tissue were assessed at sacrificed rats after a 24 hour urine collection. Collagen and inducible nitric oxide synthase deposits were evaluated in



renal cortex specimens. The data of healthy, sick control and treatment groups were compared. In the irbesartan treatment group, improvement in renal function was observed compared to the sick control group because of significant increase in haemoglobin and significant decrease in glomerular filtration rate, urine output, urinary excreted albumin and N-acetyl glucosaminidase. Biochemical and renal histopathological changes in the N-acetyl cysteine group were similar to irbesartan group except the decrease in glucose excretion. In the combination therapy with N-acetyl cysteine and irbesartan, a significant increase in haemoglobin and a nonsignificant decrease in triglyceride, haemoglobin A1c, urinary output, and urinary protein excretion were observed. The findings of treatment with irbesartan in combination with Nigella was more beneficial because of the decrement in blood glucose and increment in both renal and rat weights. No change was observed in the renal tissue antioxidants, namely superoxide dismutase and glutathion. Mesangial cell proliferation, increased mesangial matrix, glomerulo-tubular basement membrane thickening, and degeneration of epithelial cells were similarly less in irbesartan and N-acetyl cysteine groups and there was a significant improvement in renal histopathology of the rats given irbesartan in combination with both antioxidants. Regression of renal cortical collagen deposits and the number of cells that gave positive reaction to inducible nitric oxide synthase was lower in combination groups compared to irbesartan and N-acetyl cysteine groups.

Our findings suggested that in addition to tight glycaemic control, suppression of renin-angiotensin-aldosterone system is crucial and administration of anti-oxidants improve this renoprotective effect for preventing renal deterioration due to diabetes mellitus.

**Key words:** Experimental diabetes mellitus, Diabetic nephropathy, Angiotensin receptor blockers, N-acetyl cysteine, Nigella sativa

## KAYNAKLAR

1. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009;335:165–89.
2. Nelson RG, McCarty DJ, Pettitt DJ, Bennett PH. Kidney diseases in diabetes. In: Haris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennett PH (Eds.). *Diabetes in America*. 2<sup>nd</sup> ed. Maryland: National Institutes of Health; 1995. p.349-400.
3. King H, Aubert R, Herman W. Global burden of diabetes 1995-2025. Prevalance numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-31.
4. Türk Nefroloji Derneği. Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplatasyon, Registry 2007. Türk Nefroloji Derneği Yayınları 2008:6-18.
5. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH et al. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(1):79-83.
6. Molnar M, Wittman I, Nagy J. Prevalance course and risk factors of diabetic nephropathy in type-2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit* 2000;6(5):929-36.
7. Ruggenenti P, Remuzzi G. Nephropathy of type-2 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2157-69.
8. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996;98:1667-75.
9. Bloomgarden ZT. American diabetes association 60<sup>th</sup> scientific sessions, 2000. Nephropathy. *Diabetes Care*. 2001; 24:598-601.
10. Vidotti DB, Casarini DE, Cristowam PC, Leite CA, Schor N, Boim MA. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Renal Physiol* 2004;286(6):1039-45.

11. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:221–6.
12. Li JH, Huang XR, Zhu H, Johnson R, Lan H. Role of TGF- $\beta$  signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int* 2003;63:2010-6.
13. Jaimes EA, Galceran JM, Raij L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 1998;54:775-84.
14. Lewis EJ, Husicker LG. The effects of ACE inhibition on diabetic nephropathy. *N Eng J Med* 1993;329:1456 -62.
15. Parving HH. The effects of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2001; 345:870-8.
16. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002;61:186-94.
17. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a ‘causal’ antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.
18. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
19. El-Kadi A, Kandil O, Tabuni AM. *Nigella sativa* cell-mediated immunity. *Arch AIDS Res* 1987;1:232–233.
20. Hanafy MSM, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J Ethnopharmacol* 1991;34:275–78.
21. Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M. Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapy* 2000; 55:379–82.
22. Kanter M, Coskun O, Budancamanak M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(42):6684–8.
23. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(42):6662–6.
24. Kanter M, Coskun O, Kalayci M, Buyukbas S, Cagavi F. Neuroprotective effects of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury in rats. *Hum Exp Toxicol* 2006;25(3):127–33.
25. Kanter M, Coskun Ö, Korkmaz A, Öter Ş. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;279(1):685-91.

26. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the  $\beta$ -cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozocin-induced diabetic rats. *Tohoku J Exp Med* 2003;20:213–9.
27. Najmi A, Nasiruddin M, Khan RA, Haque SF. Effect of *Nigella sativa* oil on various clinical and biochemical parameters of insulin resistance syndrome. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2008;28(1):11-4.
28. Efrati S, Dishy V, Averbukh M, Blatt A, Krakover R, Weisgarten J et al. The effect of N-acetylcysteine on renal function, nitric oxide and oxidative stress after angiography. *Kidney Int* 2003;64:2182-7.
29. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alt Med Rev* 1998;3(2):114-27.
30. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related endpoints. *Carcinogenesis* 2001;22(7):999-1013.
31. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *nigella sativa*. *Phytother Res* 2003;17:299–305.
32. Hsu C, Yen H, Yin M, Tsai C, Hsieh C. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/Ca mice. *J Nutr* 2004;134:3245-9.
33. Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması. Erdoğan G (Editör). *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2005. s.342-8.
34. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31(1):55-60.
35. American Diabetes Association. Summary of revisions for the 2006 clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 2006;29(1):3.
36. Yılmaz T. Tip 1 Diabetes Mellitus İmamoğlu Ş (Editör). *Diabetes Mellitus 2006 1.baskı* İstanbul: Deomed Yayıncılık, 2006. s.55-6.
37. Eisenborth JS, Polonsky KS, Buse JB. Type 1 diabetes mellitus. In: Lorsen R, Kronenberg H, Melmed S, Polonsky KS (Eds). *Williams textbook of endocrinology*. 10<sup>th</sup> ed. Pennsylvania: Elsevier Science; 2003. p.1485-508.
38. Orhan Y. Diabetes mellitus. Sencer E (Editör). *Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s.246-51.
39. Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2509-17.
40. Ruilope LM. What is the impact of PRIME on real-life diabetic nephropathy? *Int J Clin Pract* 2004;58(3):268–76.
41. Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K, Altıparmak MR, Seyahi N. Türkiye'de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon, Registry 2005. İstanbul: Türk Nefroloji Derneği Yayınları, 2006:1-87.

42. Harvey JN. Trends in the prevalence of diabetic nephropathy in type 1 and type 2 diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12(3):317-22.
43. Bakris GL, Whelton P, Weir M, Mimran A, Keane W, Schiffrin E. The future of clinical trials in chronic renal disease: outcome of an NIH/FDA physician specialist conference. Evaluation of clinical trial endpoints in chronic renal disease study group. *J Clin Pharmacol* 2000;40:815-25.
44. Altıparmak MR, Apaydın S. Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). Her yönüyle diabetes mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s.383-99.
45. Earle KA, Porter KK, Otsberg J, Yudkin JS. Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:286-90.
46. Merta M, Reiterova J, Rysavá R, Kmentová D, Tesar V. Genetics of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(5):24-5.
47. Cooper ME. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 1998;352:213-9.
48. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44:1957-72.
49. Selby JV, Fitz Simmons SC, Newman JM, Katz PP, Sepe S, Showstack J. The natural history and epidemiology of diabetic nephropathy. Implications for prevention and control. *JAMA* 1990;263:1954-60.
50. Mogensen CE, Schmitz O. The diabetic kidney: from hyperfiltration and microalbuminuria to end-stage renal failure. *Med Clin North Am* 1988;72:1465-92.
51. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract* 2008;4(8):444-50.
52. P.-H. Groop, Forsblom C. Diabetic nephropathy-an acquired or inherited disease? *Int Congr Ser* 2003;1253:149-61.
53. Movva S, Alluri RV, Komandur S, Vattam K, Eppa K, Mukkavali KK et al. Relationship of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with nephropathy associated with type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *J Diabetes Complications* 2007;21:237-41.
54. Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel J, Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme-insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1653-63.
55. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int* 2000;58(77):26-30.
56. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med* 2008;233(1):4-11.
57. Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:254-8.

58. Vlassara H. Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med* 1994;124:19-25.
59. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992;15:1835-43.
60. Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82(1):75–9.
61. Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67(1):3–21.
62. Cooper ME, Thallas V, Forbes J, Scalbert E, Sastra S, Darby I et al. The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2000;43:660-4.
63. Gruden G, Viberti GC. Pathogenesis of diabetic nephropathy. In: Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (Eds). *Joslin's diabetes mellitus*. 14<sup>th</sup> ed. Boston: Lippincott William&Wilkins; 2005. p.853-66.
64. DeFronzo RA. Diabetic nephropathy. In: Becker KL, Bilezikian JP, Bremner WJ, Hung W, Kahn CR, Loriaux DL, Nylén ES, Rebar RW, Robertson GL, Snider RH, Wartofsky (Eds.). *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.1403–18.
65. Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, Tomari S, Nagata M. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 ;290(1):177-84.
66. Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K, Kaneda Y, Kumamoto M, Nakashima Y. Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann NY Acad Sci* 1997;811:311-24.
67. Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007;55:498–510.
68. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Inves* 2004;34:785–796.
69. Palm F, Hansell P, Ronquist G, Waldenström A, Liss P, Carlsson PO. Polyol-pathway-dependent disturbances in renal medullary metabolism in experimental insulin-deficient diabetes mellitus in rats. *Diabetologia* 2004;47:1223–31.
70. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:167–78.
71. Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:42–5.
72. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Ziang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signalling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 Suppl 3:241-5.

73. Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM. Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:664-8.
74. Takahashi K, Nammour RM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostoglandin, 8-epiprostoglandin F2  $\alpha$ , in the rat: Evidence for interaction with tromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90:136-41.
75. Coughlan MT, Mibus AL, Forbes JM. Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:190-3.
76. Noda M, Matsuo T, Nagano-Tsuge H, Ohta M, Sekiguchi M, Shibouta Y et al. Involvement of angiotensin II in progression of renal injury in rats with genetic non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Jpn J Pharmacol* 2001;85:416-22.
77. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH et al. RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-9.
78. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:93-8.
79. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Booner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001;44:874-7.
80. Benigni A, Colosio V, Brena C, Bruzzi I, Bertani T, Remuzzi G. Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes* 1998; 47:450-6.
81. Jandeleit-Dahm K, Allen TJ, Youssef S, Gilbert RE, Cooper ME. Is there a role for endothelin antagonists in diabetic renal disease? *Diabetes Obes Metab* 2000;2:15-24.
82. Tikkanen T, Tikkanen I, Rockell MD, Allen TJ, Johnston CI, Cooper ME et al. Dual inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme in rats with hypertension and diabetes mellitus. *Hypertension* 1998;32:778-85.
83. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:433-42.
84. Candido R, Allen TJ. Haemodynamics in microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18:286-304.
85. Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995;47:935-44.
86. Twigg SM, Chen MM, Joly AH, Chakrapani SD, Tsubaki J, Kim HS et al. Advanced glycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in diabetes mellitus. *Endocrinology* 2001;142:1760-9.

87. Kimmelstiel K, Wilson C. Inter-capillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 1936;12:83-105.
88. Carey RM, Siragy HM. Newly Recognized components of the renin-angiotensin system. potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24(3):261-71.
89. Akalın S, Akçiçek F, Büyüköztürk K, Canberk A, Çağlar N, Eryılmaz Y ve ark. Anjiotensin II ve anjiotensin II antagonistleri. İstanbul: Print Center; 2001:58-65.
90. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008 Sep;264(3):224-36.
91. Catanzaro DF. Angiotensinogen: physiology, molecular biology, and relevance to hypertension. In: Oparil S, Weber MA (Eds). *Hypertension*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. p.77-89 .
92. Fabiani ME, Dinh DT, Nasis L, Johnson CL. Angiotensin-converting enzyme: basic properties distribution and functional role. In: Oparil S, Weber MA (Eds). *Hypertension*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. p.90-100 .
93. Şen S. Primer hipertansiyon patogeneğinde renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin rolü *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2004;13(2) 45-50.
94. Leung PS, Carlsson PO. Tissue renin–angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas *Journal of Molecular Endocrinology* 2001;26:155–64.
95. Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BMW, Theisen K et al. Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3517-22.
96. Sato A, Liu JP, Funder JW. Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology* 1997;38:410-6.
97. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747–803.
98. Julie LL, Sigmund CD. Overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system *Endocrinology* 144(6):2179–2183.
99. Miyazaki M, Takai S. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the role of chymase. *Hypertens Res* 2001;24:189-93.
100. Hunyady L, Balla T, Catt KJ. The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor. *Trend Pharmacol Sci* 1996;17:135-40.
101. Unger T, Culman J, Gohlke P. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection: pharmacological rationale and evidence. *J Hypertens* 1998;16:3-9.
102. Duncan JA, Scholey JW, Miller JA. Angiotensin II type 1-receptor gene polymorphisms in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:111-6.



103. Ortiz MC, Manriquez MC, Romero JC, Luncos LA. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension* 2001;38:655-9.
104. Hollenberg NK. Implications of species difference for clinical investigation: studies on the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:150-4.
105. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R et al. Effects of high glucose and TGF-beta 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 2002;62:901-13.
106. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt PA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-7.
107. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Allison KM, Anderson S. Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:573-83.
108. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 2004;43:255-62.
109. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Brief Review* 1999;33:613-21.
110. Yamada T, Akishita M, Pollman M, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin type I receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998;63:289-95.
111. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1996;28:635-40.
112. Ardaillou R. Angiotensin II receptor. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:30-9.
113. Gilbert RE, Krum H, Wilkinson-Berka J, Kelly DJ. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabet Med* 2003;20:607-21.
114. Ribeiro-Oliveira A Jr, Nogueira AI, Pereira RM, Boas WWV, Dos Santos RA, Simões e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(4):787-803.
115. Anderson S. Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease. *Kidney Int* 1997;52:107-10.
116. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 2006;98:463-71.
117. Perazella MA, Setaro JF. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol* 2003;10:184-196.

118. Andersen S, Blouch K, Bialek J, Deckert M, Parving HH, Myers BD. Glomerular permselectivity in early stages of overt diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:2129–37.
119. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:342–8.
120. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003;41(1):64-8.
121. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-7.
122. Werner C, Baumhäkel M, Teo KK, Schmieder R, Mann J, Unger T et al. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: Current perspective on rationale and patient selection. *Clin Res Cardiol* 2008;97:418–31.
123. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2995-3004.
124. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 2002;61:599-608.
125. Scott JA, King GL. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2004;1031:204-13.
126. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001;38:635-38.
127. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:321–9.
128. Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y, Whitehouse BJ, Huang GC, Amiel SA et al. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia* 2006;49:321–31.
129. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;302:128–39.
130. Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:274-81.
131. Anderson S, Komers R. Inhibition of the renin-angiotensin system: is more better? *Kidney International* 2009;75:12–4.

132. Plavin PF, Goyene TT, Corool P, Menard J. Clinical investigation of the renin-angiotensin-aldosterone system. In: Davison AM, Cameron SS, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, Winerals C (Eds). Oxford Textbook of Clinical Nephrology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Pres; 1998. p.1423-32.
133. Rozzini R, Sabatini T, Frisoni GB, Trabucchi M. Angiotensin receptor blockers. Arch Intern Med 2000;160:1905-11.
134. Nalbantgil S, Koylan N, Yocket Ü, Yılmaz H, Nalbantgil İ, Önder R. Türk toplumunda ACE inhibitörlerine bağlı öksürük insidansı. İlaç ve Tedavi Dergisi 1997;10:551-5.
135. Conlin PR, Spence JD, Williams B, Ribeiro AB, Saito I, Benedict C et al. Angiotensin antagonists for hypertension: are there differences in efficacy? Am J Hypertens 2000;13:418-26.
136. Givertz MM. Manipulation of the renin-angiotensin system. Circulation 2001;104:14-8.
137. Wenzel UO, Krebs C, Benndorf R. The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2009 Oct 27. [Epub ahead of print]
138. Grobecker H (Çeviri: Midilli K) Üresin Y (Editör). Anjiotensin-II reseptör antogonistleri Farmakoloji ve tedavide kullanımları. İstanbul:Yüce Yayım;2004: 29-31.
139. Johnston CI. Pharmacology of irbesartan. Expert Opin Investig Drugs 1999;8(5):655-70.
140. Ravera M, Ratto E, Vettoretti S, Parodi D, Deferrari G. Prevention and treatment of diabetic nephropathy: the program for irbesartan mortality and morbidity evaluation. J Am Soc Nephrol 2005;16:48–52.
141. Mogensen CE. The reno-protective role of AT1-receptor blockers. J Hum Hypertens 2002;16:52–8.
142. Palmer AJ, Tucker D, Valentine WJ, Roze S, Gabriel S, Cordonnier DJ. Cost-effectiveness of irbesartan in diabetic nephropathy: a systematic review of published studies. Nephrol Dial Transplant 2005;20:1103–9.
143. Lewis EJ, Lewis JB. Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II receptor antagonist. Clin Exp Nephrol 2003;7:1–8.
144. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Braz J Med Biol Res 2007;40:839-47.
145. Kaya MS, Kara M, Özbek H. Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunun insan hücre sel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. Genel Tıp Derg 2003;13(3):109-12.
146. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. Int Immunopharmacol 2005;5:1749–70.

147. Nagi MN, Alam K, Badary OA. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:143-59.
148. Turkdogan MK, Agaoglu Z, Yener Z, Sekeroglu R, Akkan HA, Avcı ME. The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits, new hopes. *Dtsch Tierarz Wschr* 2000;108:71-3.
149. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* in mice. *J Ethnopharmacol* 2002;79:1-11.
150. [No authors listed]. WHO expert committee on diabetes mellitus: second report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1980;646:1-80.
151. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci* 2004;77:123-9.
152. Meddah B, Ducroc R, El Abes Faouzi M, Eto B, Mahraoui L, Benhaddou-Andaloussi A et al. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol* 2009;121:419-24.
153. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter Ş. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;279:685-91.
154. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol* 2002;79:23-6.
155. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol* 2001;76:45-8.
156. El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin induced toxicity in rats. *J Pharm Bel* 1998;53:87-95.
157. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2009;80(3):265-9.
158. Ziment I. Acetylcysteine: A drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988;42:513-20.
159. Jo SH, Koo BK, Park JS, Kang HJ, Kim YJ, Kim HL et al. N-acetylcysteine versus ascorbic acid for preventing contrast-induced nephropathy in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography: NASPI study-a prospective randomized controlled trial. *Am Heart J* 2009;157(3):576-83.
160. Moeller S, Gioberge S, Brown G. ESRD patients in 2001: global overview of patients, treatment modalities and development trends. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2071-6.
161. Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2753-8.

162. Atkins RC. The changing patterns of chronic kidney disease: the need to develop strategies for prevention relevant to different regions and countries. *Kidney Int* 2005;68(98):83-5.
163. Satman I, Yılmaz MT, Şengül A. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP) *Diabetes Care* 2002;25:1551-6.
164. Süleymanlar G. CREDIT (Chronic Renal Disease in Turkey) Çalışmasının Ön Sonuçları. 26. Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Kongresi. Antalya, 2009.
165. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis.* 2003 ;41(1):1-12.
166. Martin S, Schramm W, Schneider B, Nesser K, Weber C, Lodwig V et al. Epidemiology of complications and total treatment costs from diagnosis of type 2 diabetes in Germany (ROSSO 4). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115(8):495-501.
167. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. American heart association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology and epidemiology and prevention. *Circulation* 2003;108(17):2154-69.
168. Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K. Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon. İstanbul: Türk Nefroloji Derneği Yayınları;2007.s.1-10.
169. Luciak M. Antioxidants in the treatment of patients with renal failure. *Rocz Akad Med Białymst* 2004;49:157-61.
170. Correga-Giannella ML, Vieira SM. Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52(2):375-86.
171. Sasso FC, De Nicola L, Carbonara O, Nasti R, Minutolo R, Salvatore T et al. Cardiovascular risk factors and disease management in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2006;29(3):498-503.
172. Wittchen HU, Krause P, Höfler M, Pfister H, Ritz E, Göke B, et al. Hypertension, diabetes mellitus and comorbidity in primary care. *Fortschr Med Orig* 2003;27:19-27
173. Komers R, Maly J, Simkova R. Changes in blood pressure, proteinuria and renal hemodynamics in type I diabetes with manifestations of diabetic nephropathy after 2 months of captopril therapy *Cas Lek Cesk.* 1993;132(12):359-64.
174. UK Prospective Diabetes Study Group Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39 *BMJ*1998;317(7160):713–20.
175. Bakris GL, Copley JB, Vicknair N, Sadler R, Leurgans S . Calcium channel blockers versus other antihypertensive therapies on progression of NIDDM associated nephropathy. *Kidney Int.* 1996;50(5):1641-50.

176. Estacio RO, Jeffers BW, Hiatt WR, Biggerstaff SL, Gifford N, Schrier RWN. The effect of nisoldipine as compared with enalapril on cardiovascular outcomes in patients with non-insulin-dependent diabetes and hypertension. *Engl J Med*. 1998;338(10):645-52.
177. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA et al. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2003;(86):64-70.
178. Sibley S. Hypertension, obesity and the renin-angiotensin system: a tale of tight associations. *Minn Med* 2003;86(1):46-8.
179. Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1A meta-analysis of randomised clinical trials *Diabetes Metab* 2004;30(6):487-96.
180. Inada Y, Murakami M, Tazawa S, Akahane M. A new angiotensin AT1 receptor antagonist, ameliorates nephropathy and hyperlipidemia in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:270-6.
181. Tershakovec AM, Keane WF, Zhang Z, Lyle PA, Appel GB, McGill JB et al. Effect of LDL cholesterol and treatment with losartan on end-stage renal disease in the RENAAL study. *Diabetes Care*. 2008;31(3):445-7.
182. Koo JR, Ni Z, Oviesi F, Vaziri ND. Antioxidant therapy potentiates antihypertensive action of insulin in diabetic rats. *Clin Exp Hypertens* 2002;24(5):333-44.
183. Kitada M, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Araki S, Kashiwagi A et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003;52(10):2603-14.
184. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J* 2003;17(12):1762-4.
185. Kimura F, Hasegawa G, Obayashi H, Adachi T, Hara H, Ohta M et al. Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro- and macrovascular complications. *Diabetes Care* 2003;26(4):1246-50.
186. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009;20(5):741-52.
187. Heyman SN, Goldfarb M, Shina A, Karmeli F, Rosen S. N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: Studies in rats. *Kidney International* 2003;63:634-41.
188. Matkovic B, Kotorman M, Varga IS, Hai DQ, Varga C. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol Hung* 1997-1998;85:29-38.
189. Ersöz HÖ, Gogas D, Budak Y, Akalın S. Deneysel diyabet modelinde nefropatinin erken döneminde spesifik anjiotensin antagonisti losartanın etkileri. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3(4):106-11.

190. Dođutan H. Deneysel diyabetik nefropatide anjiotensin konverting enzim inhibitörü ve anjiotensin reseptör blokerinin renal fonksiyonlara etkisi (tez) Edirne:Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2004.
191. Corstjens AM, Horst IC, Zijlstra JG, Groeneveld AB, Zijlstra F, Tulleken JE. Hyperglycaemia in critically ill patients:marker or moderator of mortality? Crit Care 2006;10(3):216.
192. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS et al. Urine biomarkers predict the cause of glomeruler disease. J Am Soc Nephrol 2007;18(3):913-22.
193. Simon G, Morioka S, Synder DK. Increased serum and urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in human hypertension: early indicator of renal dysfunction. Clin Exp. Hypertens 1984;6:89-96.
194. Araki S, Haneda M, Koya D, Hidaka H, Sugimoto T, Isono M et al. Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes Diabetes 2007;56(6):1727-30.
195. Daousi C, Bain SC, Barnett AH, Gill GV. Hypertriglyceridaemia is associated with an increased likelihood of albuminuria in extreme duration (> 50 years) Type 1 diabetes. Diabet Med. 2008;25(10):1234-6.
196. Kalantarinia K, Awad AS, Siragy HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- $\alpha$  increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. Kidney Int 2003; 64 (4):1208-13.
197. Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi JF, Zheng N, Clozel M. Chronic Endothelin Receptor Blockade Prevents Both Early Hyperfiltration and Late Overt Diabetic Nephropathy in the Rat J Cardiovasc Pharmacol 2003;42(1):48-54.
198. DiPetrillo K, Coutermarsh B, Gesek FA. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. Am J Physiol Renal Physiol 2003;284:113-21.
199. Navarro JF, Mora C, Muros M, Garcia J. Urinary tumour necrosis factor- $\alpha$  excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients. Nephrol Dial Transplant 2006;21:3428-34.
200. Navarro JF, Mora-Fernández C. The role of TNF- $\alpha$  in diabetic nephropathy: Pathogenic and therapeutic implications. Cytokine and Growth factors Reviews 2006;17:441-50.
201. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL, Yamamoto T, Pollock DM, Carmines PK et al. Endothelin A Reseptor Blockade Reduces Diabetic Renal Injury via an Anti-Inflammatory Mechanism J Am Soc Nephrol 2007;18:143-154.
202. Lee HY, Noh H, Gang J, Xu ZG, Jeong HJ, Kang SW et al. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression Is Increased in Lipopolysaccharide (LPS) Stimulated Diabetic Rat Glomeruli: Effect of ACE Inhibitor and Angiotensin II Receptor Blocker Yonsei Medical Journal 2002;43(2):183-92.

203. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007;27(2):130-43.
204. Anjaneyulu M, Chopra K. Effect of irbesartan on the antioxidant defence system and nitric oxide release in diabetic rat kidney. *Am J Nephrol* 2004;24(5):488-96.
205. Sahin M, Sağdıç G, Elmas O, Akpınar D, Derin N, Aslan M et al. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacol Res* 2006;54(3):247-52.
206. Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica* 2005;48(2):75-80.
207. Sasso FC, Carbonara O, Persico M, Iafusco D, Salvatore T, D'Ambrosio R et al. Irbesartan reduces the albumin excretion rate in microalbuminuric type 2 diabetic patients independently of hypertension. *Diabetes Care* 2002;25:1913-2002.
208. Guo Z, Xia Z, Jiang J, McNeill JH. Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats by N-acetyl-L-cysteine *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 200;292:1728-36.



## **EKLER**

EK 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

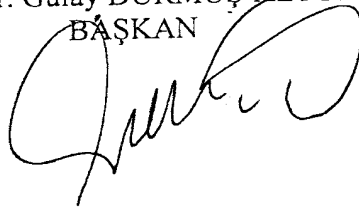
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 04

Karar Tarihi: 10.09.2007

Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10.09.2007 tarihinde "Deneysel Diyabetik Nefropatide irbesartan ve antioksidan tedavilerinin karşılaştırılması" adlı TÜHDYEK-2007/003 protokol no.'lu Prof. Dr. Saniye ŞEN'in yaptığı ve Dr. Hande PEYNİRCİ'nin tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın çalışmanın Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılacağı, yürütücüsünün Prof. Dr. Saniye ŞEN olduğu; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Gülay DURMUŞ-ALTUN  
BAŞKAN



Yrd.Doç.Dr. Hayati ARDA  
ÜYE

Fen-Edebiyat Fakültesi  
Öğretim Üyesi

(katılımcı)

Vet.Hek. Ziya ÇUKUR  
ÜYE

Deney Hayvanları Birimi  
Veteriner Hekimi



Hüseyin KOÇ  
ÜYE

Sivil Toplum Örgütü Üyesi  
Sivil Vatandaş

İlyas ÖZMEN  
ÜYE

Sivil Vatandaş

