

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN
BÖBREK GLOMERUL DEĞİŞİKLİKLERİNE E VİTAMİNİNİN
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Dr.İŞİL TEKMEN

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

99 5 22

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.ZİŞAN BULDAN

İZMİR – 1999

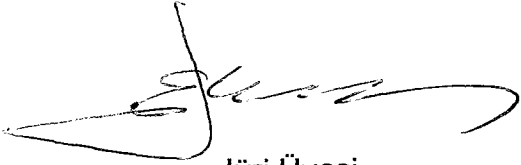
“ Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların böbrek glomerul değişikliklerine E vitamininin antioksidan etkisinin araştırılması ” isimli bu tez 17.06.1999 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Zişan BULDAN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Jüri Üyesi

Prof.Dr. Esin KORMAN



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Yılmaz ŞENYILMAZ

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1. TABLO VE RESİMLER LİSTESİ	1
2. ÖZET	3
3. SUMMARY	4
4. GİRİŞ VE AMAÇ	5
5. GENEL BİLGİLER	
5.1. Diabetes Mellitus.....	7
5.2. Diabetes Mellitus'un Dejeneratif Komplikasyonları.....	8
5.3. Oksidan Stres	12
5.4. Diabetes Mellitus ve Oksidan Stres.....	14
5.5. Deneysel Diyabet Modelleri	14
5.6. Böbrek Histolojisi.....	15
6. GEREÇ VE YÖNTEMLER	
6.1. Deney Hayvanları.....	18
6.2. Deney.....	18
6.3. Glomerüloskleroz İndeksi Hesaplanması	19
6.4. Kanda Glikoz Ölçümü	19
6.5. İstatistiksel Değerlendirme	20
7. BULGULAR	
7.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular	21
7.2. Diyabet Grubuna Ait Bulgular.....	21
7.3. E Vitamini Verilen Diyabet Grubuna Ait Bulgular.....	22
8. TARTIŞMA	35
9. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
10. KAYNAKÇA	39

1. TABLO VE RESİMLER LİSTESİ

- Tablo 1:** Tüm grupların; deney öncesi ve deney sonu kan şekeri, kilo değerleri ve glomeruloskleroz indeksi.
- Tablo 2:** Tüm grupların glomerüloskleroz oranı.
- Resim 1:** Kontrol grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 100
- Resim 2:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 100
- Resim 3:** Kontrol grubuna ait glomerül kesiti. PAS x 600
- Resim 4:** Diyabet grubuna ait glomerül kesiti. PAS (+) glikoprotein depolanması ve mezangiyal hücrelerde artış gözleniyor. Glomerül yumağında atrofi ve fibrozis mevcut. PAS x 600
- Resim 5:** Kontrol grubuna ait böbrek korteksi. HE x 200
- Resim 6:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Noduler glomerulosklerozis (→) ve glomerüler kapilerde yer yer anevrizmal dilatasyonlar (→) mevcut. HE x 200
- Resim 7:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Diffuz glomeruloskleroz, Bowman kapsülünde ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, tübül hücre sitoplazmasında glikojen depolanması (→) gözleniyor. PAS x 200
- Resim 8:** Diyabet grubuna ait glomerul kesiti. PAS (+)glikoprotein depolanması ve mezangiyal hücre artışı gözleniyor. Glomerul yumağında atrofi ve fibrozis mevcut. PAS x 400
- Resim 9:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Tübül hücrelerinde Armanni-Ebstein lezyonları (→) yaygın olarak gözleniyor. PAS x 200
- Resim 10:** Diyabet grubuna ait tübül epitellerinde Armanni-Ebstein lezyonları (→). PAS x 400.
- Resim 11:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerüllerde diffuz glomeruloskleroz, mezangiyal hücre artışı, tübül epitellerinde Armanni-Ebstein lezyonları. PAS x 100
- Resim 12:** E vitamini verilen diyabet grubuna ait korunmuş böbrek korteksi. Glomerüler yapılar ve tübüller normal yapısında izleniyor. PAS x 100
- Resim 13:** Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerüllerde PAS (+) glikoprotein artışı ve tübül hücrelerinde Armanni-Ebstein lezyonları (→) gözleniyor. PAS x 200
- Resim 14:** E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerüler yapılar

ve tübül hücreleri korunmuş olarak gözleniyor. (Resim 12'deki sahanın büyütülmüş görüntüsü) PAS x 200

Resim 15: E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 100

Resim 16: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 200

Resim 17: E vitamini verilen diyabet grubuna ait glomerul kesiti. PAS x 400

Resim 18: Diyabet grubuna ait glomerul kesiti. Glomerulde atrofi ve fibrozis, Bowman kapsülünün bazal membranında kalınlaşma gözleniyor. PAS x 400

Resim 19: E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi. HE x 100

Resim 20: Resim 19'da görülen glomeruln büyütülmüş görüntüsü. HE x 200



2.ÖZET

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN BÖBREK GLOMERUL DEĞİŞİKLİKLERİNE E VİTAMİNİNİN ANTIOKSIDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Diyabetes mellitus, lipid ve protein metabolizma bozukluğunun eşlik ettiği insülin eksikliği sendromudur. Son yıllarda birçok patolojide olduğu gibi diyabet komplikasyonlarının patogenizinde de serbest oksijen radikallerine ilgi artmıştır. Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif hasar "oksidan stres" olarak tanımlanır ve prooksidan-antioksidan dengenin prooksidan yönünde değişmesiyle karakterizedir. Diyabetik komplikasyonların etyolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir. Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücreli membranların bütünlüğünün korunması alfa-tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir. E vitaminin biyolojik aktivitesi; antioksidan özellikleri sonucu, serbest oksijen radikallerinin moleküler ve biyolojik sistemlere olan oksidatif zararlarından korumaktır.

Diyabetik nefropatinin klinik sendromu oluşmadan önce glomerül hemodinamiğinde değişiklikler olmaktadır. Bu evre fonksiyonel evredir, oluşan değişiklikler reverzibldir, uygun tedavi yöntemleriyle giderilmedikleri takdirde böbrek yetmezliğine giden ara evreye girilir. Bazal membran ve mezangiyumda reaktif, morfolojik bozukluklar oluşur.

Çalışmamızda, erken diyabet evresindeki reverzibl değişikliklere E vitaminin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Streptozotocin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, sekiz hafta sonunda böbrekler histopatolojik olarak incelendi ve diyabet oluşturularak E vitamini verilen gruba karşılaştırıldı. E vitamini ile tedavi edilen grubun böbreklerinde glomerulosklerozun, E vitamini verilmeyen diyabetik gruba göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($P<0.01$).

Anahtar Sözcükler: Diyabetes Mellitus, E vitamini, Glomerul.

3. SUMMARY

THE ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT EFFECT OF E VITAMINS ON KIDNEY GLOMERULE CHANGES IN EXPERIMENTAL INDUCED DIABETES IN RATS.

It is defined as a diabetes melitus, lipid and protein metabolism corruption accompanied by insuline deficiency. As is observed in many pathological fields, in recent years the pathogenic role of oxygen radicals in diabetic complications have become a source of interest. Oxidative damage inflicted by reactive oxygen species is also referred to as "oxidative stress" and reflects a shift in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former. Evidence has accumulated indicating that the generation of reactive oxygen species (oxidative stress) may play an important role in the etiology of diabetic complications. The preservation of cellular and subcellular membrane integrity is one of the leading functions of alpha-tocopherol as a significant endogen and exogen. The biological activity of vitamin E results principally from its antioxidant properties and subsuquently the protection of molecules and biological systems from oxidative damage by oxygen-derived free radicals.

Before the clinical syndromes of diabetic nephropathy develop, changes are witnessed in the glomerule hemodynamic. This phase is a functional phase and the developed changes are reversibl and will lead to the medial phase of kidney insufficiency unless appropriate treatment is practiced. Reactive, morfological deficiencies develop in the basal membrane and the mesangium.

Within our study, the scope was to examine the preservative effects of vitamin E on the reversibl developments in the early diabetic phase. With the rats that were influenced to diabetes through the injection of streptozotocin, the kidney were examined histopathologically, after eight weeks and compared with the results of the group that had been influenced with diabetes and treated with vitamin E. It was observed that the vitamin E treatment had significantly reduced the glomerulosclerose in the kidneys as in comparison with the control group ($P<0.01$).

Key Words: Diabetes Mellitus, vitamin E, glomerule.

4. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus; pankreasta insülin üreten β hücrelerinin inflamatuvar haraplanması sonucu oluşan insülin eksikliği, yokluğu veya hedef hücrede insülin reseptöründe rezistans gelişmesi ile meydana gelen kronik bir hastalıktır (1). Klinikte insuline bağımlı (IDDM) ve insuline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) olarak iki tipi bulunmaktadır (1,2).

Diyabet, gelişmiş ülkelerde körlüğün en belirgin nedeni olup, ateroskleroz ve böbrek yetmezliği diyabetde hala erken ölümün en sık nedenidir (2,3). Retinopati, nöropati ve nefropati diyabetin mikrovasküler dejeneratif komplikasyonları; ateroskleroz ve sekelleri (serebrovasküler olaylar, miyokard infarktüsü, gangrenler) ise makrovasküler komplikasyonları olarak kabul edilir. Birbirinden oldukça farklı olan bu klinik sendromların tümü, ortak bir patofizyolojik özellik taşır; önce vasküler lümeninde progressif bir daralma ve daha sonra hedef organda perfüzyon yetersizliği oluşur. Vasküler lümenindeki bu daralma aslında üç olayın kümülatif etkisidir. Birincisi; karbonhidrat içeren ve Periodic Acid Schiff (PAS) pozitif boyanan plazma proteinlerinin anormal bir şekilde ekstrasvazasyonu sonucunda, küçük ve büyük damarlarda lümenal alanda progressif bir kontaksiyondur. İkinci faktör; tüm diyabetik damarlarda ekstrasellüler matrikste artış olmasıdır. Birçok dokuda bazal membran kalınlaşması söz konusudur, böbrek glomerüllerinde mezenşimal matriks genişlemiştir ve kollogenin birikmesiyle aterosklerotik plaklar daha da gelişmektedir. Olayı etkileyen üçüncü faktör ise; endotel hücrelerinde ve arter duvarındaki düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi gelişmesidir (3,4).

Yapılan uzun süreli klinik çalışmalarda, diyabetin hiperglisemi ile oluşan sekonder komplikasyonları arasında açık bir bağlantı kurulmuştur. Fakat aşırı glukoz düzeyinin doku hasarına neden oluş mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (5,6). Son yıllarda birçok patolojide olduğu gibi, diyabetin komplikasyonlarının patogenezinde de serbest oksijen radikallerine ilgi artmıştır. Diyabetik komplikasyonların etyolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu hipotez, hipergliseminin serbest radikal üretimini arttırdığına dair bulgulara dayanır (4,5,7). Reaktif oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasar "oksidatif stres" olarak tanımlanır ve prooksidan-antioksidan dengenin prooksidan yönünde değişmesiyle karakterizedir (7,8). Hücreler oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan yada kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalara sahiptir. Hücrelerde

oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir:

1. Oluşan radikallerin detoksifikasyonu,
2. Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi,
3. Radikal oluşumun sınırlandırılması,

Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak, hücresel ve hücre altı membranlarının bütünlüğünün korunması alfa-tokoferol'ün başlıca fonksiyonlarından biridir. Lipitde çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle, kolayca membran fosfolipitlerine diffüze olabilmekte ve serbest oksijen radikallerinin biyomembranlarda oluşturabileceği lipit peroksidasyonunu reaksiyonu sona erdirerek önlemektedir (8,9,10,11,12,13).

Diyabetik nefropatinin klinik sendromu ortaya çıkmadan önce glomerül hemodinamiğinde değişiklikler olmaktadır. Erken diyabet evresinde oluşan bu değişiklikler reverzibldir. Uygun tedavi yöntemleriyle giderilmedikleri takdirde, senelerce sürebilen ara devreye girilir. Bazal membran ve mezangiyumda reaktif, morfolojik bozukluklar oluşur. Böbrek fonksiyonları henüz normaldir. 10-15 yıl sonra böbrek yetmezliğinin başlamasıyla son evreye girilir (3).

Bu projenin amacı; erken diyabet evresindeki rezervizbl değişikliklere E vitaminin antioksidan koruyucu etkisinin araştırılmasıdır. Bunun için, tek doz streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların, böbrek glomerüllerindeki değişiklikleri, yapısal düzeyde incelenecektir. E vitamininin koruyucu yönde etkisi gösterilebilirse, diyabet gelişme riski bulunan kişilere ve diyabetik hastalara erken dönemde önerilebileceği düşünülmektedir.

5.GENEL BİLGİLER

5.1. Diabetes Mellitus:

Diabetes mellitus; absolü yada rölatif insülin yetersizliği nedeniyle karbonhidrat metabolizmasındaki düzensizlik, hiperglisemi ve indirekt olarak protein, lipit metabolizmasındaki değişikliklerle belirli sistemik, metabolik bir hastalıktır (14). Kan glukozunun kronik yükseklığı ile karakterizedir. Tüm biyokimyasal değişiklikler endokrin pankreastaki β hücrelerinin eksikliği ve/veya insülinin hedef hücrelerdeki duyarlılığının azlığı sonucunda meydana gelir.

Diyabetes mellitus etyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Patogenezini, genetik zeminli otoimmün olaylar açıklamakla birlikte, immunolojik anormallikler de sorumlu tutulmaktadır. Viral enfeksiyonlar, beslenme, dış toksinler, fiziksel veya emosyonel stres patogenezde suçlanmaktadır (2,6,15).

Sınıflama:

- 1- Tip I (IDDM)
- 2- Tip II (NIDDM)
- 3- Gestasyonel DM
- 4- Sekonder DM (diğer hastalıklara sekonder gelişen)
- 5- Konjenital insülin rezistansına bağlı DM
- 6- Ailevi otoimmün DM

Diyabetlerin %90'ına yakını tip II, yaklaşık %5'i ise tip I diabetidir (16).

5.1.1. IDDM (=Insulin Dependent Diabetes Mellitus):

Bu tip diyabetin en karakteristik özelliği insülin eksikliğidir. Başlangıç, şiddetli hiperglisemi ile birlikte ani olup, insülin ile tedavi edilmez ise hızla ilerleyerek, ketoasidoz ve ölüme yol açabilir. Hastaların %50'si 21 yaşın altındadır, en yüksek insidans pubertededir. Klinik tablo şiddetlidir. Plazma insülin düzeyi düşüktür veya ölçülemez, çünkü pankreas β hücrelerinin total eksikliği vardır. Oral antidiyabetiklere yanıt vermez, insülin tedavisi her zaman gereklidir (1,14).

5.1.2. NIDDM (=Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus):

Hastalığın bu formu ileri yaşlarda başlar. Genellikle başlangıcı yavaş ve asemptomatik olduğu için metabolik bozukluğun başlangıç tarihinin kesin olarak saptanabilmesi zordur (14). Temel neden insülin salgısının yetersizliği değil, dokuların insüline duyarlılığının azalmasıdır. Bu yüzden plazma insülin düzeyi yeterli olsa bile insülin reseptörlerinin sayısı azalmış olduğu için insülin yetersiz kalmaktadır

(16). Diğ̈er bir önemli özellik, hastaların %80'inin normal kilolarının üzerinde olmalıdır (14). Obesitenin insülin rezistansı için risk faktörü olduğu düşünölmektedir (17). NIDDM'de, hem dokularda insülin reseptör sayısı azalmıştır, hem de kesin olarak henüz tanımlanmamış bir postreseptör defekti görölmektedir. Hiperglisemi, insüline bağımlı diyabetteki kadar yüksek olmayıp, genellikle diyetle regöle edilebilir.

5.2. Diabetes Mellitus'un Dejeneratif Komplikasyonları

Diabetes mellitus, pankreastan insülin salgılanmasının eksikliği ve/veya doku insülin yanıtının bozukluğu ile birlikte çok çeşitli komplikasyonlara yol açan metabolik bir hastalıktır (22). Retinopati, nöropati ve nefropati diyabetin mikrovasköler komplikasyonları; ateroskleroz ve sekelleri (serebrovasköler olaylar, miyokard infarktüsü, gangrenler) ise makrovasköler komplikasyonlarıdır (2,6).

1921'den önce, yani insülin bulunmadan önce diyabet hastalarının ana ölüm nedeni diyabetik ketoasidoz ile oluşın koma idi. Şimdi ise morbidite ve mortalitede ana neden kardiovasköler komplikasyonlar ve terminal böbrek yetmezliğıdir (3,11,18).

5.2.1. Komplikasyonların Patogenezi:

Diyabet komplikasyonlarının patogenezi hakkında hala çelişkili fikirler vardır. Son yıllarda başlıca 3 mekanizmanın etkin olduğu kabul edilmektedir (2,3,6,11,19,20).

- 1- Proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu
- 2- Anormal poliöl-miyoinozitol metabolizması
- 3- Değışmiş mikrovasköler hemodinamik

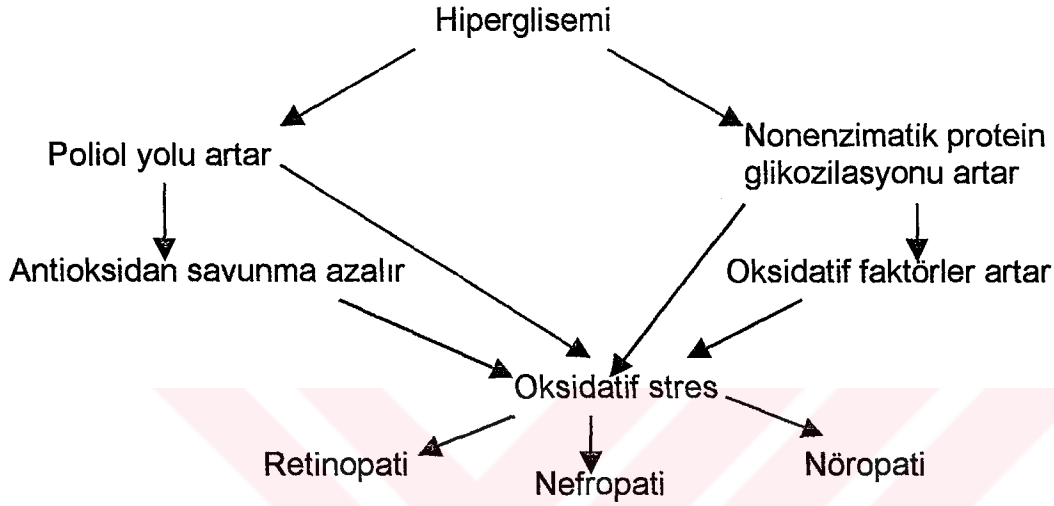
5.2.1.1. Proteinlerin Nonenzimatik Glikozilasyonu:

Normal koşullarda proteinlerin, vücutta enzimatik yolla glikozilasyonu yapılır. Proteinler yüksek glukoz düzeylerine uzun süre maruz kalırlarsa, glukoz nonenzimatik olarak protein molekülüne bağlanır. Bu da proteinin yapısının, dolayısıyla fonksiyonunun değışmesine yolaçar. Proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu; oksidatif faktörleri arttırarak oksidatif strese yol açar (5). Lens, glomeröl bazal membranı, aorta, koroner arterler diyabetik hastalarda sıklıkla glikozile olan dokulardır.

5.2.1.2. Poliöl Yolu:

Glukoz, aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole çevrilir. Bu enzim; retina, böbrek papillası, lens, Schwann hücreleri, aort vb. dokularda bulunur. Bu dokular yüksek glukoz düzeylerine maruz kalınca sorbitol oluşumu artar. Katarakt, retinopati, nöropati ve aort hastalığının patogenezinin polioller sorumlu tutulmuştur.

Hiperglisemi, oksidatif stres ve diyabetik komplikasyonlar arasındaki bağlantı şematik olarak özetlenmiştir (5).



5.2.1.3. Hemodinamik Değişiklikler

Damar harabiyeti uzun süreli diyabetin o kadar belirgin ve ayrılmaz bir parçasıdır ki, onun tabii bir komponenti gibidir. Mikroanjiopati, hastalığın en belirgin özelliğidir.

Kantitatif elektron mikroskopik incelemelerde diyabetin başlangıcından itibaren birkaç yıl içinde böbrek, göz, kas ve deri kapillerinde bazal membran kalınlaşması meydana geldiği gözlenir. Bu geç yapısal mikrovasküler anormalliklerin, diyabetin erken safhasındaki bazı hemodinamik bozukluklar sonucu geliştiği ve mikrosirkülasyondaki hidrostatik basınç artışının başlangıç olay olduğu düşünülmektedir. Hidrostatik basınç artışı damar duvarından plazma proteinlerinin sızıntısının artmasını, kolaylaştırmaktadır. Plazma proteinlerinin bir kısmı bazal membranda depolanmakta ve bazal membranın yapısını değiştirmektedir.

5.2.2. Diyabetin Dejeneratif Komplikasyonları:

Üç ana başlık altında incelenebilir (14,16,21).

1- Makrovasküler hastalık: Koroner, serebral ve periferdeki büyük damarların hastalığıdır. Başlıca lezyon aterosklerozdur.

2- Mikrovasküler hastalık: Kapiller mikroanjiopatidir. Esas olay bazal membran kalınlaşmasıdır. Glikoproteinden zengin bir madde bazal membranda depolanır. Medya tabakasında hiyalinizasyon, endotelde proliferasyon, damar lümeninde daralma sonucunda organ ve dokularda iskemik değişiklikler izlenmektedir. Klinikte mikroanjiopatiye bağlı komplikasyonlar; retinopati, nöropati ve nefropati şeklinde ortaya çıkar.

3- Nöropati: Tüm sinir sisteminde ortaya çıkar; diyabetin süresine bağlı olarak derecesi giderek artar. Sinirlerde motor ve duyu iletimi bozulur. Esas olay Schwann hücrelerinde bazal membran kalınlaşması ve miyelin harabiyetidir.

5.2.2.1. Diyabetik Nefropati:

Diyabetik nefropati, özellikle IDDM'de oldukça sık rastlanan bir komplikasyon ve başlıca klinik problemdir (6). Diabetes mellitustaki renal patolojik değişiklikler, intrarenal ve ekstrarenal arterlerde arterioskleroz ve glomerül kapiller yumağındaki mikroanjiyopatik değişiklikler sonucunda ortaya çıkar. Dört tip lezyon tanımlanmıştır:

- 1- Afferent ve efferent arteriyollerin arteriyosklerozu
- 2- Renal arter ve dallarının arteriyosklerozu
- 3- Glomerüloskleroz
- 4- Peritubuler glikojen, yağ ve mukopolisakkarit birikimi.

Diyabetteki glomerüler lezyonlar başlıca 3 çeşit olarak tanımlanmıştır:

1- Diffüz glomerüloskleroz: Birçok glomerülü tutar. Kapiller yumağın bazal membranında kalınlaşma ve mezangiyumda bazal membrana benzer madde artımı vardır. Bu bölgeler homojen pembe, PAS (+) boyanır. Zamanla glomerül kapiller lümeninde daralma, tüm glomerülde fibröz dokuya dönüşüm sonucu işlev kusuru geliş ve böbrek yetmezliğine neden olur (14).

2- Nodüler glomerüloskleroz: Glomerülün periferinde, yuvarlak, PAS (+) hiyalin bir kitle vardır. Bu hiyalin nodülde mezangiyal hücre nükleusları yer alır. Bu nodüllere "Kimmelstiel-Wilson nodülü" denir. Büyüyen nodül, kapilleri Bowman kapsülüne doğru sıkıştırır. Sonunda glomerül iskemiye bağlı tahrip olur.

3- Eksudatif lezyon: Diyabete özgü olmayan ve en az rastlanan lezyondur. Bowman kapsülü içinde, glomerüler yumağın kapsüler yüzeyine bağlı eozinofilik bir madde birikimi olur.

Glomerüler kapiller bazal membranını kalınlaştıran ve glomerüllerde toplanan maddeler glikoprotein yapısındadır ve PAS (+) boyanır. Adeta glikoproteinin depolanması vardır. Diyabetik glomerüllerin bazal membranında; hem glikoprotein miktarı artmıştır, hem de glikoproteinin içeriği değişmiştir. Normal yapıdaki bazal membranda glikoproteinin 2 ünitesi vardır:

1- Karbonhidrat ünitesi:

a)Glukoz, galaktoz, hidroksilizinden oluşan disakkarit zinciri.

b)Galaktoz, mannoz, füköz heksosaminler ve sialikasit içeren heteropolisakkarit zinciri.

2- Protein ünitesi: Kollogene çok benzer. Farkı, daha fazla hidroksilizin, daha az hidroksiprolin ve glukoz içermesidir.

Normalde, bazal membran içeriğindeki lizin ve hidroksilizin toplamı birbirine eşit olmasına karşın, diyabetiklerde hidroksilizin miktarı artmış, lizin miktarı azalmıştır (3,19,24).

Diyabetik nefropati gelişiminde klinik seyir 5 evreye ayrılır (6,23):

1.evre; hiperfonksiyon ve hipertrofi evresidir. Diyabetik nefropatinin klinik sendromu oluşmadan önce glomerül hemodinamiğinde değişiklikler olmaktadır. Bu evrede böbreğe gelen kan miktarı ve glomerüler kapillerdeki basınç artar. Bunların sonucu olarak glomerül filtratı da artar. Bu değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayan etkenler hiperglisemi ve intrarenal mikrosirkulasyondaki vazodilatasyondur. Böbreklerde yapısal olarak glomerüler hipertrofi vardır. Bazal membran ve mezangiyum normaldir. Ana patofizyolojik değişikliklerin glomeründeki genişleme ve intraglomerüler basıncın artması olduğu ileri sürülmektedir. Bu evrede oluşan değişiklikler reverzibl olduğu için bu aşamada tanı ve tedavi son derece önemlidir (42).

2.evre; essiz evredir. Glomerüler filtrasyon hızı artmış veya normal olabilir, idrarda albumin atılışı normaldir. Ana yapısal değişiklik, bazal membran kalınlaşması ve mezangiyal genişlemedir. Böbrek fonksiyonları henüz normaldir. Histopatolojik olarak kapiller bazal membranında belirgin, diffüz bir kalınlaşma, mikroanevrizmalar, nodüller ve diffüz glomerüloskleroz gözlenir (21).

3.evre; başlangıç diyabetik nefropati evresidir. Mikroalbuminüri görülmeye başlar.

4.evre; belirgin diyabetik nefropati evresidir. Glomerüllerde tıkanıklıklar ve mezangiyal yayılma artmıştır. Proteinüri oldukça yüksektir.

5.evre; üremik evredir. Terminal böbrek yetmezliği sahneye hakimdir.

5.3. Oksidan Stres

Oksidan stres; oksidan üretimi, antioksidan savunma, oksidatif hasarın tamiri olarak 3 komponentten oluşur. Oksidan üretiminin artması, antioksidan savunma ve tamir sistemlerinin azalması "oksidan stres" olarak tanımlanır (5,8,25). Hücreler oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan yada kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalara sahiptir. Normalde serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemleri dengededir.

5.3.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri:

Atomlardaki elektronlar, çevrelerindeki orbital denem alanda bulunur. Her orbital, birbirine ters yönde dönen iki elektron taşıyabilir. Eğer bir yörüngede tek elektron bulunuyorsa, o elektron çiftlenmemiş olarak adlandırılır. Serbest radikal, bir yada daha çok çiftlenmemiş elektron içeren herhangi bir atom veya moleküldür (10,25,26,27). Süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit (H_2O_2), siglet oksijen (1O_2), hipokloröz asit (HOCl) reaktif oksijen türü olarak anılan oksidanlardır.

5.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Hücresel Hasarlar:

Toksik etkilerinin yanı sıra, oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonun ayrılmaz bir parçasıdır. Tepkimelerin bir kısmında üretilen radikaller tekrar kullanılmaktadır. Önemli ölçüde birikime izin verilmez. Ancak radikal üretiminde artış veya eliminasyonunda azalma olduğunda toksik etki görülmeye başlar (10,25,26,27).

Oksidatif stres öncelikle lipid peroksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu; yağların, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tanımlanabilir (28). Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulur, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girer. Kalsiyumun hücre içinde artmasına bağlı olarak proteazlar aktive olur ve hücre iskeletinde hasar meydana gelir. Kalsiyum, endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına da neden olur.

Lipid peroksidasyonlarının son ürünleri; hidrokarbon gazlar ve toksik aldehitlerdir (29). Aldehitlerden malonildialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (29,30).

5.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri:

Hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyan maddeler antioksidan savunma sistemleri adı altında toplanır. Hücreler antioksidan enzim depoları ile donatılmışlardır, bununla birlikte küçük antioksidan moleküller büyük oranda diyetdeki meyve ve sebzelerle alınmaktadır (25,27).

Hücrelerde oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir:

- 1- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
- 2- Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
- 3- Radikal oluşumunun sınırlandırılması

Oksijen radikallerine karşı savunma sistemleri enzimler ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları olmak üzere iki grupta toplanırlar. Savunmada öncelikle etkili olanlar enzim sistemleridir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını süperoksit ve hidrojen peroksiti temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimleridir (8,10,26).

Enzimsel savunma dışında, düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucularını; lipide eriyebilir özellikte olanlar ve sitoplazmada bulunanlar olmak üzere iki grupta toplayabiliriz. E vitamini ve β karoten lipide eriyebilir özellikte antioksidan vitaminlerdir. Glutatyon, ürik asit, bilirubin ve askorbik asit sitoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili maddelerdir (8,19,26).

5.3.3.1. E Vitamini (alfa-tokoferol):

E vitamini zarlarda bulunan, zincir kırıcı bir antioksidandır (8,9,13,26), lipid peroksi radikalleri ile birleşerek lipid peroksidasyonunu önler (8,26).

Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak, hücresel ve hücre altı membranların bütünlüğünün korunması alfa-tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir. Lipide çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olabilmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek, serbest oksijen radikallerinin biyomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (8,31).

5.4. Diabetes Mellitus Ve Oksidan Stres

Diyabette, plazma serbest radikal konsantrasyonunun artması ve antioksidan savunmanın azalması oksidatif stresi oluşturmaktadır. Hipergliseminin serbest radikal konsantrasyonunu arttırdığı açıkça bilinmektedir (12). Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan plazma MDA düzeyi diyabetiklerde yüksek bulunmuştur (29). Doğal yolla yada kimyasal yolla oluşturulmuş diyabetde artmış lipid peroksidasyonu, dejeneratif komplikasyonların patogenezinin sorumlu tutulmuştur (7,12). Diyabetik hayvan ve insanlarda askorbik asit, E vitamini gibi antioksidanların plazma düzeyi düşmüş, dehidroaskorbat gibi oksidasyon ürünlerinin düzeyi artmıştır (32).

5.5. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabet kronik bir hastalıktır. Uzun dönem incelemeler, veri toplama açısından çok vakit alacağından hayvan modellerinde çalışmak büyük ölçüde bu sorunu çözer.

Çok çeşitli deneysel diyabet modelleri vardır. Hayvan diyabet modelleri genel olarak insan diyabetine benzerlik gösterir, ama hiçbir model tıpatıp aynı değildir.

- 1- Cerrahi Diyabet
- 2- Kimyasal Diyabet
- 3- Spontan Diyabet
- 4- Viral Diyabet
- 5- Transgenik Diyabet Modeli

Ençok tercih edilen yöntem kimyasal diyabettir. Deneysel çalışmalarda çeşitli ilaçlar ve kimyasallar diyabet benzeri tabloya neden olur. Bunlardan streptozotocin ve alloxan en spesifik ve kullanışlı olanlarıdır (22). β hücre yıkımı ile insanlardaki IDDM'a benzer diyabet oluştururlar (22,23).

5.5.1. Streptozotocin:

Streptomyces achromogenes'den izole edilmiştir, gr (+) ve gr (-) organizmalara etkili bir ajandır. Pankreas β hücrelerine bağlanarak diyabetojenik etkisini gösterir (43). Streptozotocinin diyabetojenik etki mekanizması tartışmalıdır. En fazla benimsenen teori; streptozotocinin yapısındaki fazladan glukoz molekülü yardımıyla β hücresi içine girip, DNA kırılımı yaptığıdır. Hücre içinde DNA'yı tamir amacıyla aktive olan poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin intrasellüler NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) moleküllerini kullandığı ve β hücrelerindeki NAD düzeyinin patolojik sınırlara inmesinin hücreyi nekroza götürdüğü belirtilmektedir (34,35,36).

Streptozotocin hasarı, enjeksiyondan sonraki 30 dakika ile 2 saat arasında irreverzibl olarak görülür (40). Major histopatolojik değişiklikler olarak; pankreas β hücresinde granüllerin total kaybı veya azlığı, büzülmüş β hücresi, nükleer piknozis, nükleer karyolizis, sitoplazma parçalanması, hücre membranının sınırlarının kaybı ve hücrenin yığıntı kitlesi haline dönüştüğü görülür. Sadece β hücrelerine toksik olduğundan alfa hücreleri normaldir. Streptozotocin, alloksana göre daha efektif ve β hücrelerine daha spesifiktir (22).

Sıçan, kobay, fare, maymun ve köpekte başarılı bir şekilde diyabet oluşturulur. Tek intraperitoneal veya intravenöz doz tercih edilir, denekler insülin tedavisi yapılmadan 1-2 yıl yaşarlar (22). 7 gün akut faz, 3 hafta ise kronik diyabet kabul edilir (41).

Streptozotocinle oluşturulan diyabet modelleri:

1- Tek doz: İntravenöz veya intraperitoneal tek doz streptozotocinle diyabet oluşturulur. IDDM'a benzer tablo meydana gelir (33).

2- Çok sayıda düşük doz: Subdiyabetojenik dozlarla arka arkaya 5 gün enjeksiyonla diyabet oluşturulur. Otoimmün diyabet meydana gelir (37).

3- Neonatal enjeksiyon: 2 günlük sıçanlara i.p. streptozotocin enjeksiyonu ile NIDDM'a benzer tablo oluşturulur (38).

5.5.2. Alloksan:

Selektif olarak β hücrelerini harap ederek diyabet oluşturur. Streptozotocinden daha eski bir ilaçtır, ancak daha az kullanılır. Çünkü hiperglisemisi daha şiddetlidir ve diyabet oluşumu daha zordur (39).

5.6. Böbrek Histolojisi:

Böbrek idrar sekresyonu yapan bileşik tubuler bir bezdir. Dışta ince, böbrek içine septum yollamayan bir kapsül bulunur. Böbreğin iç kısmı hemen hemen tamamen parenkimadan oluşur. Stroma özellikle kortekste son derece azdır. Parenkima; nefron ve kollektör tubul olarak ikiye ayrılır.

5.6.1. Nefron:

Basitçe epitelle döşeli uzun bir tüptür. Her böbrekte yaklaşık 1-4 milyon nefron bulunur. Nefron; Malpighi cisimciği ile başlar, kollektör tubullerin başlangıcına kadar devam eder. Nefronda birbirini izleyen 6 bölüm vardır.

1- Renal Korpüskül (Malpighi Korpüskülü): Nefronun başlangıç kısmı olan Malpighi korpüskülü, kortekste bulunur. Vasküler ve idrar kutbu olmak üzere iki kutbu

vardır. Vasküler kutup; afferent damarın girip, efferent damarın çıktığı kutuptur. İdrar kutbu ise; proksimal tubulus lümeni ile Bowman kapsül aralığının bağlandığı bölümdür.

Malpighi korpüskülü; Bowman kapsülü ve glomerulustan oluşur. Bowman kapsülü iki yapraklıdır. İçteki visseral yaprak, dıştaki parietal yaprak ve her iki yaprak arasında kalan boşluk Bowman kapsülü aralığı adını alır. Parietal yaprak; retiküler fibrilleri içeren, ince bir bazal laminaya oturmuş, tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşur. Visseral yaprak; kalın bir bazal laminaya oturmuş, podosit (episit) denen hücrelerden yapılmıştır.

Glomerulusa gelen damara afferent glomerüler arteriol, çıkan damara efferent glomerüler arteriol denir. Afferent arteriol glomerüle girince, çok sayıda küçük kapillere dallanır. Kapiller pencereci tiptedir ve yapısındaki poruslar diğer organlardaki kapillerden daha büyük, daha çok sayıdadır. Kapiller yumağın arasını dolduran bağ dokusuna mezangiyum, hücrelerine mezangiyal hücre denir. Bu hücreler; çekirdeklerinin çok koyu boyanmasıyla endotel hücrelerinden ayrılırlar. Sayıları azdır.; bazı patolojik durumlarda çoğalırlar. Fizyolojileri tam olarak bilinmemektedir.

Filtrasyon engeli: Kapiller içindeki kan ile Bowman kapsülü aralığı arasında yer alan yapılara filtrasyon engeli denmektedir. Sırayla; 1- Pencereci yassı kapiller endoteli, 2- bazal lamina, 3- pediseller arası filtrasyon aralıkları tarafından oluşturulur.

2- Tubulus kontortus proksimalis: Malpighi korpüskülünün idrar kutbunda, parietal yaprağın yassı epiteli proksimal tubulusun kübik epiteli ile devam eder. Tubulus kontortus proksimalis; nefronun en uzun, en kıvrımlı ve çapı en geniş kısmıdır. Distal kıvrımlı tubuluslardan daha uzun olduğu için korteks kesitlerinde daha fazla sayıda görülürler. Epiteli tek katlı kübik ya da tepesi kesik piramit şeklindedir. Hücreleri, distal tubulus epitelindekilerden büyüktür. Sitoplazmasında bol mitokondri bulunmasına bağlı olarak daha koyu eozinofilik boyanır. Komşu hücreler destere dişi gibi, karşılıklı girinti çıkıntılarla sıkıca birbirine kenetlendiğinden hücre sınırları seçilemez. Nükleusları; büyük, küre biçiminde ve soluk boyanır. Tubulusun apikal kenarında mikrovilluslar bulunduğu için ışık mikroskopunda çizgili kenarlı görülür. Tubulus rektus proksimalis ile devam eder.

3- Tubulus rektus proksimalis: Ferrein piramidleri içinde yer aldığı için proksimal tubulusların medullar segmenti olarak da adlandırılır. Hücrelerin özellikleri kontortus bölümüne benzer.

4- Henle Anısı: U harfi biçimindeki tübüler bölümdür. 3 bölümü vardır: 1) Proksimal tubulusun pars rektası, inen kolun proksimal kısmını oluşturur. 2) İnce kısım; bazal lamina üzerine oturmuş endotel hücrelerinden yapılıdır. 3) Distal tubulusun pars rektası; çıkan kolu oluşturur.

5- Tubulus rektus distalis: Kübik epitelle döşelidir, kortekse doğru yükselir. Tubulus kontortus distalis ile devam eder.

6- Tubulus kontortus distalis: Nefronun son bölümünü oluşturan ve korteks içinde kıvrıntılı seyreden kısa tubulustur. Epiteli, proksimal tubulustan daha kısa olduğu için lümen daha geniş ve düzgün sınırlıdır. Sitoplazması soluk boyanır, çizgili kenar yoktur. Korteksteki ilerleyişi sırasında kendi Malpighi korpüskülüne değer. Bu değme noktasında afferent arteriol ve distal tubulus hücreleri modifiye olur. Distal kıvrıntılı tubulus hücreleri, jukstaglomeruler bölgede silindirik hale dönüşürken, çekirdekleri de biraraya toplanır. Mikroskopik preparatlarda nükleusların yakın yerleşimi yüzünden daha koyu renkli görünen bu distal tubulus segmenti "makula densa" olarak adlandırılır. Makula densanın işlevinin tam olarak anlaşılmasına karşın, distal tubulustaki osmolariteye ilişkin verileri afferent arteriole iletiyor olabileceği düşünülmüştür. Afferent arteriolun medya tabakasındaki düz kas hücreleri ise değişikliğe uğrayarak epiteloid jukstaglomeruler hücrelere dönüşür. Tubulus kontortus distalisi kollektör tubul izler.

5.6.2. Kollektör Tubuluslar (Toplayıcı Kanallar):

Ferrein piramitleri içinde yerleşmiştir, boşaltıcı duktus sisteminin başlangıcını oluşturur. Bunları düz seyirli kollektör kanallar izler. Düz seyirli kollektör tubuluslar birleşerek duktus papillarisleri oluşturur. Duktus papillarisler, area kribrozada kaliks minorlere açılır.

Kollektör tubulusların en küçük çapta olanları kübik epitelle, büyük çapta olanları ise silindirik epitelle döşelidir. Hücreler soluk asidofilik boyanır, hücre sınırları belirgindir ve lümeni düzgündür. Bu soluk boyalı hücreler arasında, çok sayıda mitokondri içeren ve koyu boyanan hücrelere de rastlanır (44,45).

6. GEREÇ VE YÖNTEM

6.1. Deney Hayvanları:

Çalışmamızda, ağırlıkları 260-300 gr olan, 21 adet erkek Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. 12 saat aydınlık (07.00-19.00), 12 saat karanlık (19.00-07.00) ortamda, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de barındırılmışlardır. Deney hayvanlarına standart pellet yemi ve içme suyu verilmiştir.

6.2. Deney:

Deney hayvanları her biri yedişer sıçandan oluşan 3 gruba ayrılmıştır:

- 1- Kontrol grubu
- 2- Diyabetli + serum fizyolojik alan grup
- 3- Diyabetli + 100 mg/kg E vitamini alan grup (46,47).

Tüm sıçanlarda deneye başlamadan önce kan şekeri bakılmıştır. Kan şekeri normal sınırlarda bulunan sıçanlar deneye dahil edilmiştir.

Diyabet oluşturmak için bir gece önceden aç bırakılan sıçanlara sabah, intraperitoneal tek doz streptozotocin uygulanmıştır. Diyabet oluşturulacak 2. ve 3.grup sıçanlara 0.1 M/L sitrat tamponunda (pH 4,5) çözülmüş 65 mg/kg streptozotocin (33,48,49,50), 1.gruba ise eşit hacimde serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Streptozotocin enjeksiyonundan 48 saat sonra diyabeti doğrulamak için kuyruk veninden kan alınarak kan şekeri bakılmıştır. Kan şekerinin normal sınırları 5-10 milimol/L arasındadır (51). 11 mmol/L'nin üstü diyabetik olarak kabul edilmiştir (37). Deneye alınan bütün hayvanlarda kan şekeri 11 mmol/L'nin üzerinde bulunarak çalışmaya alınmıştır. Sonrasında iki haftada bir kan şekeri bakılmıştır.

Diyabeti doğrulandıktan sonra, 8 hafta boyunca, 3.grup sıçanlara intragastrik sonda ile 100 mg/kg/gün (46,47) E vitamini, 2.grup sıçanlara aynı miktarda serum fizyolojik verilmiştir.

8 haftanın sonunda hayvanlar 80 mg/kg ketalar anestezisi uygulanarak disseke edilmiştir. %10'luk tamponlanmış nötral formalin ile abdominal aortadan girilerek retrograd perfüzyon tekniği (52) ile böbrek dokusu perfüze edilmiştir. 24 saat süre ile %10'luk nötral formalinde tespit edilen dokular, bir gece boyunca akarsuda yıkanmıştır. Daha sonra dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edilip, xylol ile şeffaflandırılmış, üç ayrı parafin banyosunda ikişer saat bekletilerek, parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan rotari mikrotomunda 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak, hemotoksilen-eosin (HE) ve Periodic acid Schiff (PAS) ile boyanmıştır

(53,54). PAS ile boyanan böbrek kesitlerinde Saito ve arkadaşlarının metodu ile glomerüloskleroz derecesi hesaplanmıştır (18,55,56,57).

6.3. Glomeruloskleroz İndeksinin Hesaplanması

PAS ile boyanan böbrek kesitlerinde, her denek için 100 adet rastgele seçilmiş glomerül incelenerek, her glomerülün skleroz derecesi subjektif olarak 0-4 arası derecelendirilmiştir (18,55,56,57).

Derece 0: Değişiklik yok, normal görüntü.

Derece 1: Sklerotik bölge glomerülün %25'inden az ise (minimal)

Derece 2: Sklerotik bölge glomerülün %25-50'si kadar (orta)x

Derece 3: Sklerotik bölge glomerülün %50-75'i kadar

Derece 4: Sklerotik bölge glomerülün %75-100'ü kadar (ciddi).

$$\text{Glomerülosklerozİndeksi} = \text{GSİ} = \frac{(1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{N0 + N1 + N2 + N3 + N4}$$

N_x = Her skleroz derecesinin sayısı.

6.4. Kanda Glikoz Ölçümü:

Kan glikozu Randox'un GOD/PAP-LIQUID (Kat.No.GL 2623) kiti ile ölçülmüştür. Glikoz, glukoz oksidaz ile enzimatik olarak okside olur ve glukronik asitle hidrojen peroksit oluşur. Oluşan hidrojen peroksit 4-aminofenazon ve fenol ile reaksiyona girer ve sonuçta kırmızı-mor renkli bir madde olan quinoneimine oluşur. Yöntem, oluşan bu rengin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

6.4.1. Spektrofotometrik Yöntem:

İki tüp alınıp içlerine 1000 µl reagent konulmuştur. Birine 10 µl heparinize plazma eklenmiştir. 15-25°C'de 20 dakika beklenmiştir. Ölçümler 500 nm dalga boyunda, Shimadzu UV-1201V spektrofotometrede yapılmıştır. Örnek ve standart A değerleri okunmuştur.

6.4.2. Sonuçların Hesaplanması:

Spektrofotometreden okunan A değerinden aşağıdaki formül kullanılarak milimol-litre (mmol/L) veya miligram/desilitre (mg/dl) olarak glukoz konsantrasyonu hesaplanır.

$$\text{Glukozkonsantrasyonu (mmol / l)} : \frac{\text{Aörnek}}{\text{As tan dart}} \times 5.55$$

$$\text{Glukozkonsantrasyonu (mg / dl)} : \frac{\text{Aörnek}}{\text{As tan dart}} \times 100$$

6.5. İstatistiksel Değerlendirme

Grupların ortalamaları arasındaki fark, Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir.



7. BULGULAR

7.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular:

Yapılan histolojik kesitlerde kontrol grubuna ait böbrekler normal görünümdeydi (Resim 1,3,5). Korteksten alınan kesitlerde; glomerüler kapiller, Bowman kapsülünün iç ve dış yaprakları, glomerul çevresindeki proksimal ve daha az sayıdaki distal tubulusların normal olduğu gözlemlendi (Resim 1,3).

Deney öncesi ve deney sonu itibarıyla kan şekeri (KŞ) arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($P>0.05$), vücut ağırlıklarının (VA) deney sonunda arttığı gözlemlendi ($P<0.01$). Glomeruloskleroz indeksi (GSİ), diğer iki gruba göre düşük bulundu ($P<0.01$), (Tablo 1).

7.2. Diyabet Grubuna Ait Bulgular:

Diyabet grubunun histolojik kesitlerinde, yaygın olarak diffuz glomeruloskleroz (Resim 2,11,16) ve bazı glomerüllerde nodüler glomeruloskleroz (Resim 6) mevcuttu. Bazal membran ve mezangiyumda PAS(+) madde depolanması gözlemlendi (Resim 4,7,8). Mezangiyal hücrelerin çekirdekleri çok koyu boyanmasıyla endotel hücrelerin çekirdeklerinden ayrılır. Daha az sayıda olup, diyabet vb. patolojik durumlarda sayıları artar. Diyabet grubuna ait histolojik kesitlerde mezangiyal hücrelerde belirgin artış gözlemlendi (Resim 4,8). Tüm mezangiyal alanlar genişlemiştir (Resim 4,6,7,8,16). Glomerüler kapillerde yer yer anevrizmal dilatasyonlar mevcuttu (Resim 6). Birçok glomerulün vasküler lümeninde daralma izlendi (Resim 4,6,7,8,13). Glomerüllerde atrofi ve fibrozis oldukça belirgindi (Resim 6,8,11,18). Bowman kapsülünde (Resim 7,8,13,18) ve tubulus hücrelerinin bazal membranında kalınlaşma (Resim 7,10) gözlemlendi. Diyabete özgü, Armani-Ebstein lezyonları adı verilen, özellikle proksimal tubulusların epitel hücreleri içinde glikojen birikimi vakuoller biçiminde, PAS(+) boyanmış olarak izlendi (Resim 7,8,9,10,13,18)

Sekiz haftanın sonunda kan şekerinde artış, vücut ağırlığında azalma saptandı (Tablo 1). Glomeruloskleroz indeksi diğer iki gruba göre oldukça yüksek bulundu (Tablo 1). Kontrol grubunda normal glomerül (Derece 0) oranı %94 iken, diyabetik grupta %2 bulunmuştur. Ciddi sklerotik glomerül (derece 3 ve 4) oranı ise kontrol grubunda %0 iken, diyabetik grupta %50 idi (Tablo 2).

7.3. E Vitamini Verilen Diyabetik Grup:

Bu grubun, alınan histopatolojik kesitlerinde nadiren glomeruloskleroz gözlenirse de genel olarak glomerüller yapılar normaldi. Glomerül büyüklüğü, kapiller damar lümenlerinin genişliği, Bowman kapsülü, tübül epitellerinin bazal membranı kontrol grubu kesitlerle benzerlik gösteriyordu. Glomerül yumağında PAS (+) glikoprotein, tübül epitellerinde glikojen depolanması (Armani-Ebstein lezyonları) gözlenmedi (Resim 12,14,15,17,19,20).

Kan şekeri değerleri Streptozotocin enjeksiyonundan sonra her iki diyabetik grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($P<0.01$). Diyabetik gruplar arasında ise fark saptanmadı ($P>0.05$). Deney sonunda vücut ağırlığında azalma her iki diyabetik grupta vardı. Fakat E vitamini verilmeyen diyabetik grupta verilen gruba göre kilo kaybı daha fazlaydı ($P<0.01$) (Tablo 1).

Glomeruloskleroz indeksi (GSİ), kontrol grubuna göre fazla olmasına karşın, ikinci gruba göre belirgin derecede düşüktü (Tablo 1).

Normal glomerül (derece 0) oranı; diyabetik grupta %2, E vitamini alan grupta %41 bulunmuştur. Ciddi sklerotik glomerül (derece 3,4) oranı diyabetik grupta %50, E vitamini alan grupta ise %1 olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

TABLO 1

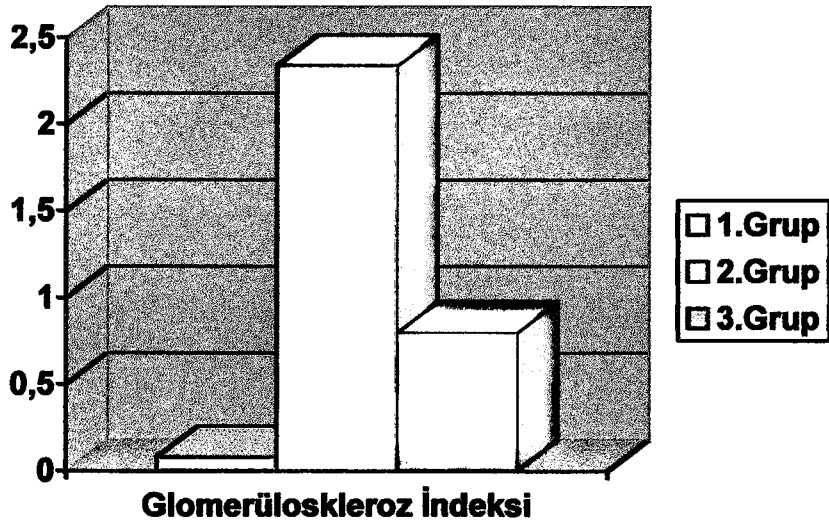
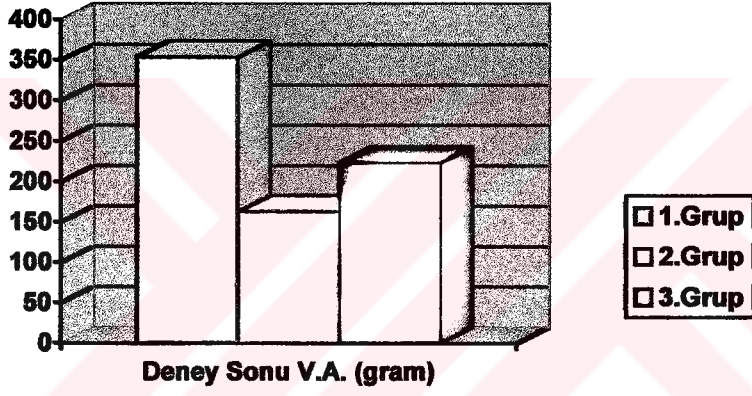
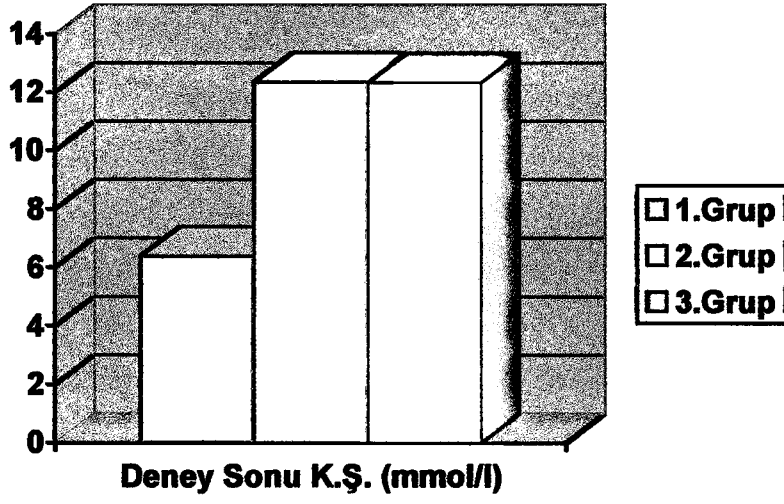
	1.Grup	2.Grup	3.Grup
Deney öncesi K.Ş. (mmol/l)	6.33±0.11	5.98±0.09	6.32±0.17
Deney sonu K.Ş. (mmol/l)	6.41±0.08	12.36±0.04*	12.34±0.04*
Deney öncesi V.A. (gram)	268.57±3.2	284.28±3.7	272.85±5.6
Deney sonu V.A. (gram)	354.28±8.6*	163.57±3.5*	223.57±12.8*
GSİ	0.08±0.01*	2.34±0.08*	0.80±0.09*

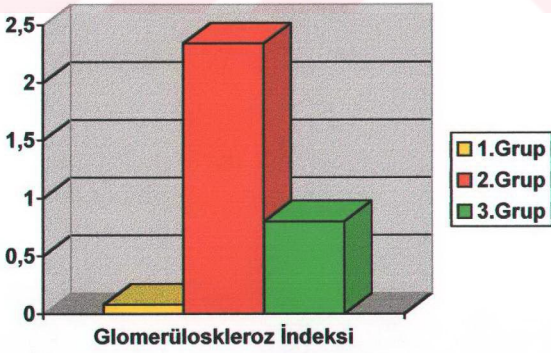
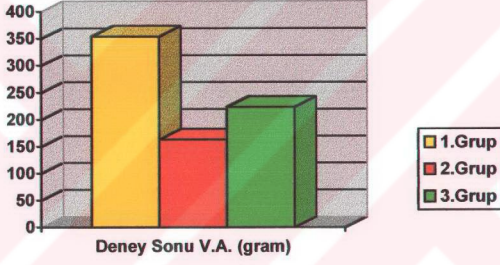
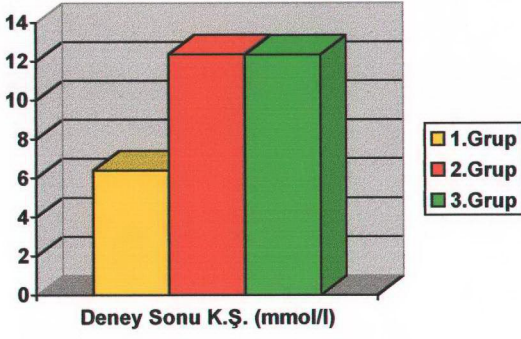
*: P<0.01, **1.Grup:** Kontrol **2.Grup:** Diyabet **3.Grup:** Diyabet + E vitamini
KŞ: Kan Şekeri, **VA:** Vücut Ağırlığı

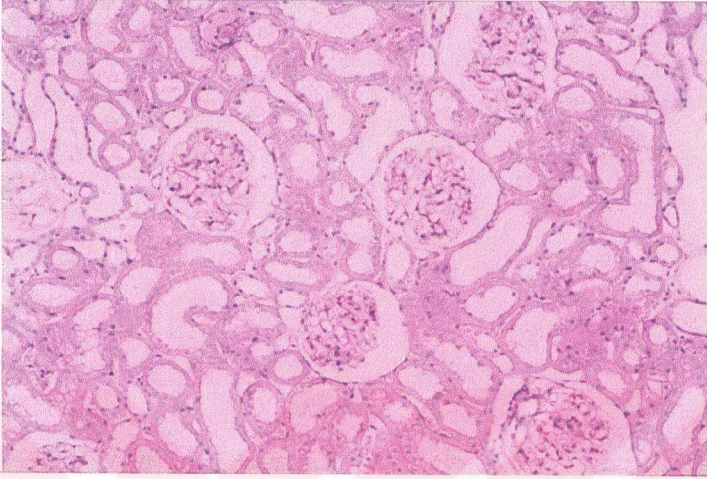
TABLO 2

	1.Grup	2.Grup	3.Grup
N ₀	%94	%2	%41
N ₁	%5	%17	%41
N ₂	%1	%31	%17
N ₃	0	%45	%1
N ₄	0	%5	0

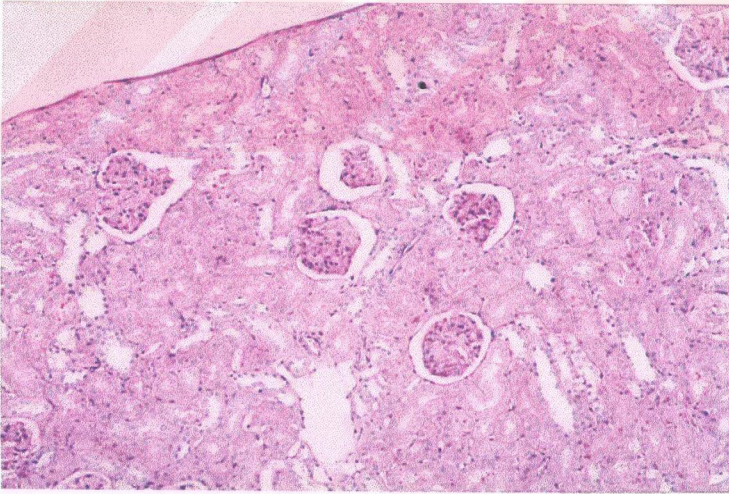
N= Glomerüloskleroz derecesi



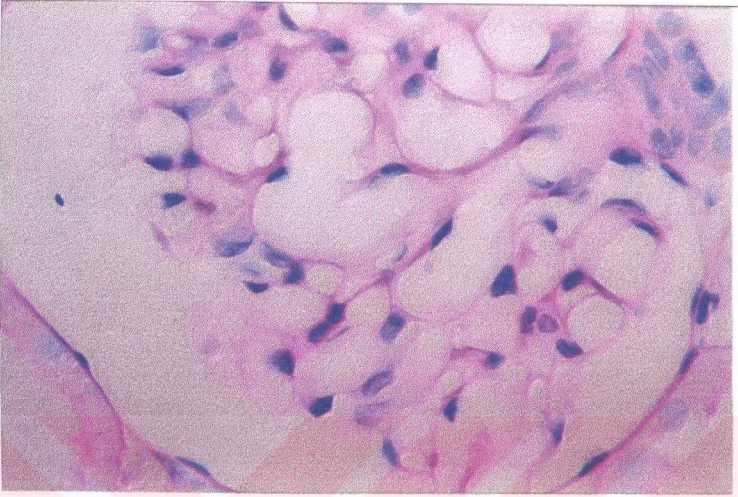




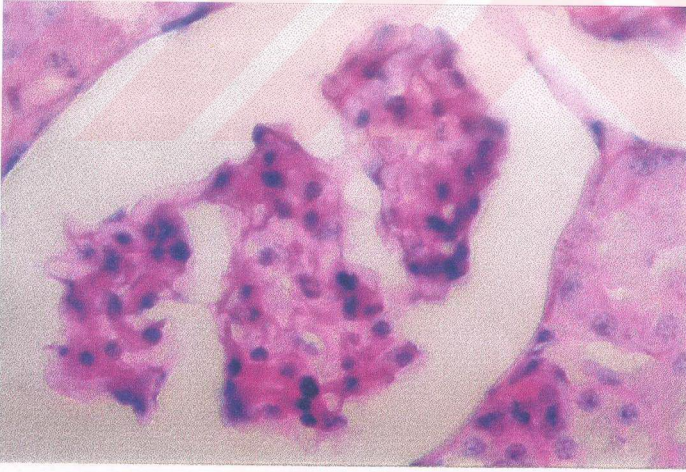
Resim 1: Kontrol grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 100



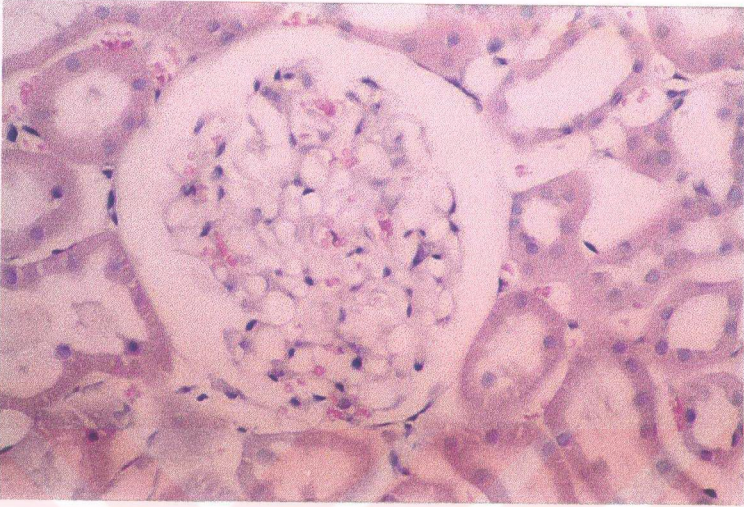
Resim 2: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 100



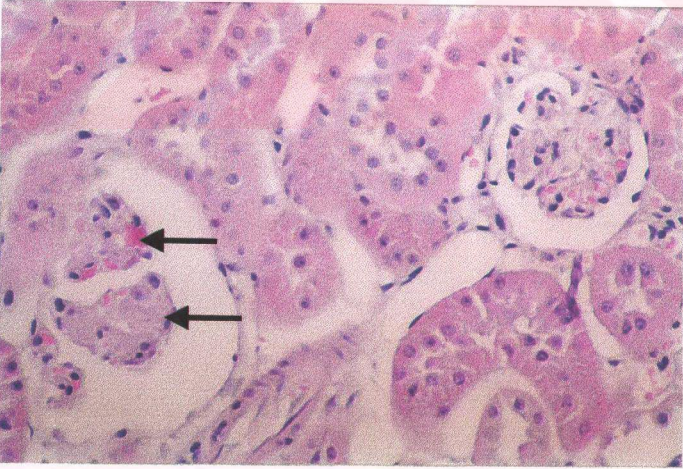
Resim 3: Kontrol grubuna ait glomerül kesiti. PAS x 600



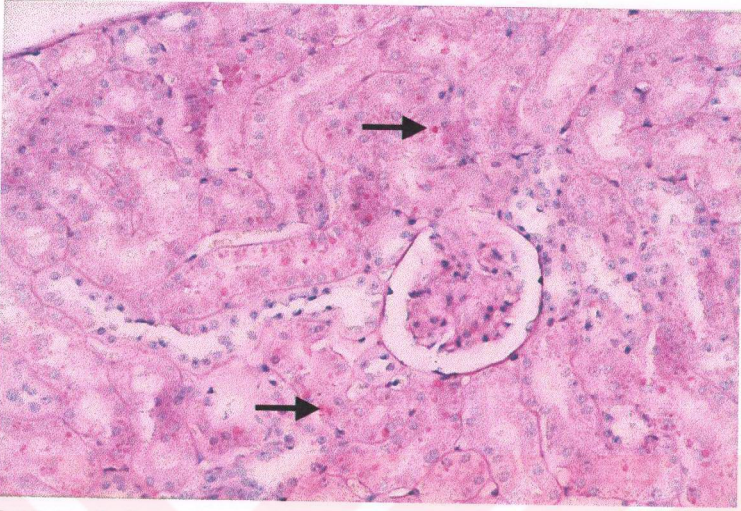
Resim 4: Diyabet grubuna ait glomerül kesiti. PAS (+) glikoprotein depolanması ve mezangiyal hücrelerde artış gözleniyor. Glomerul yumağında atrofi ve fibrozis mevcut. PAS x 600



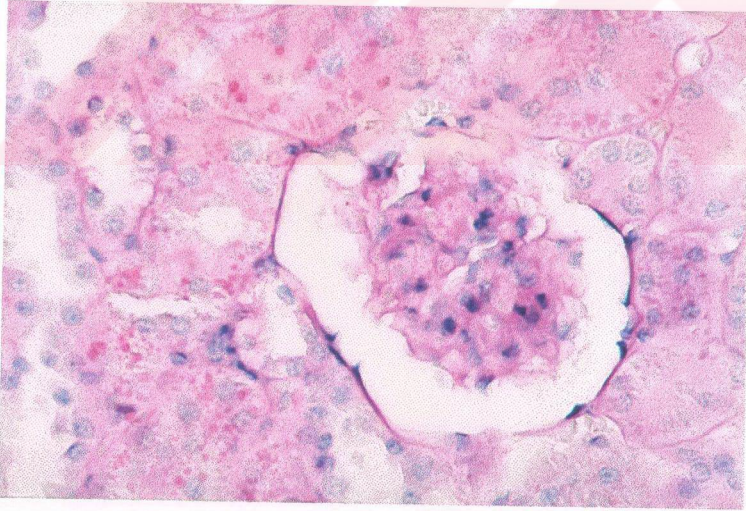
Resim 5: Kontrol grubuna ait böbrek korteksi. HE x 200



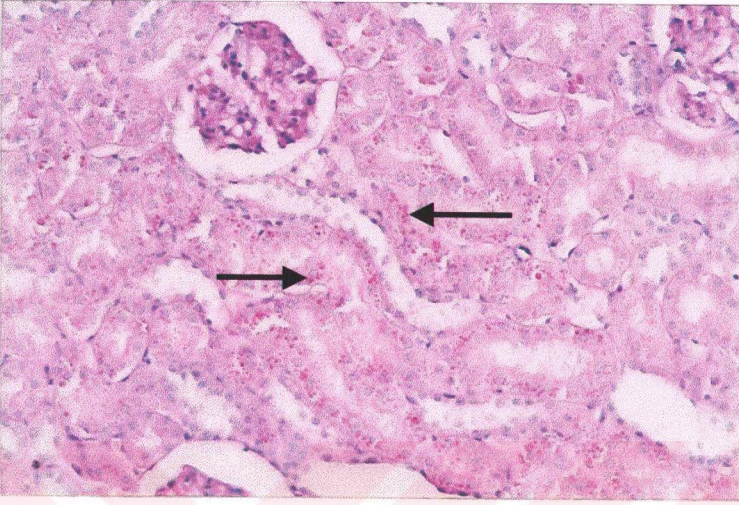
Şekil 6: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Noduler glomerulosklerozis (→) ve glomeruler kapillerde yer yer anevrizmal dilatasyonlar (→) mevcut. HE x 200



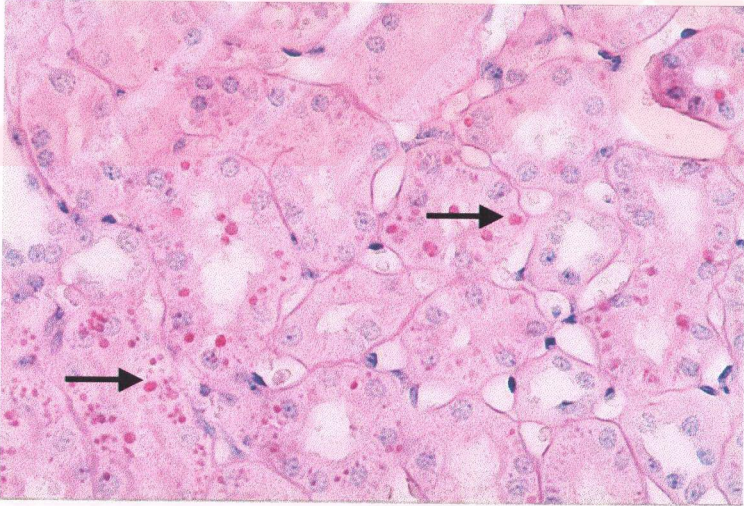
Şekil 7: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Diffüz glomeruloskleroz, Bowman kapsülünde ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, tübül hücre sitoplazmasında glikojen depolanması (→) gözleniyor. PAS x 200.



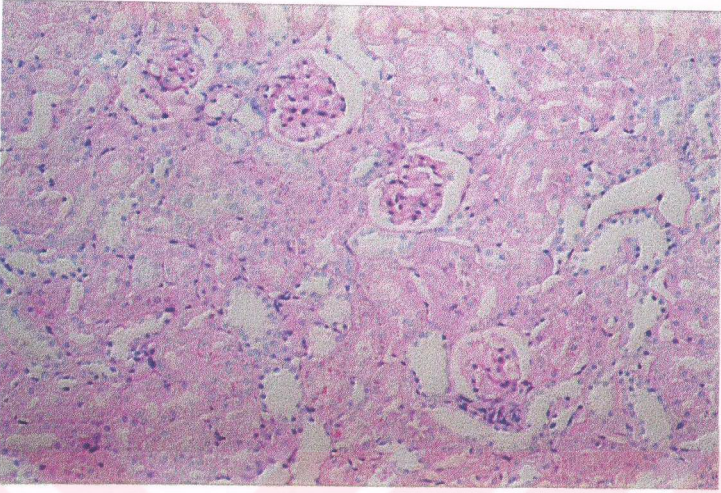
Resim 8: Diyabet grubuna ait glomerül kesiti. PAS (+) glikoprotein depolanması ve mezangiyal hücre artışı gözleniyor. Glomerul yumağında atrofi ve fibrozis mevcut. PAS x 400



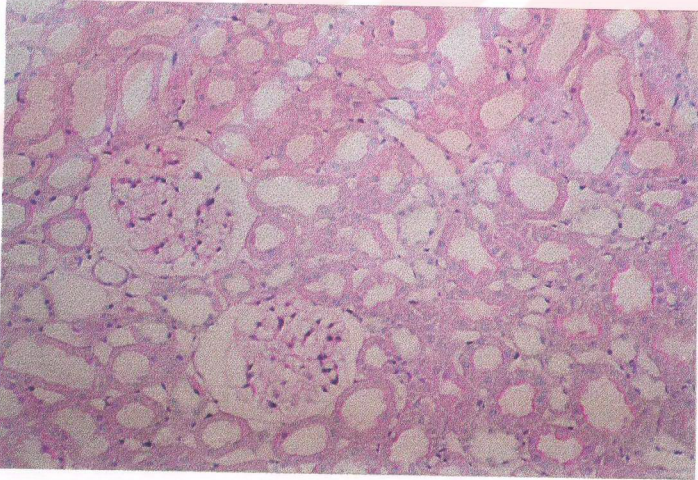
Resim 9: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Tübül hücrelerinde Ammann-Ebstein (→) lezyonları yaygın olarak gözleniyor. PAS x 200



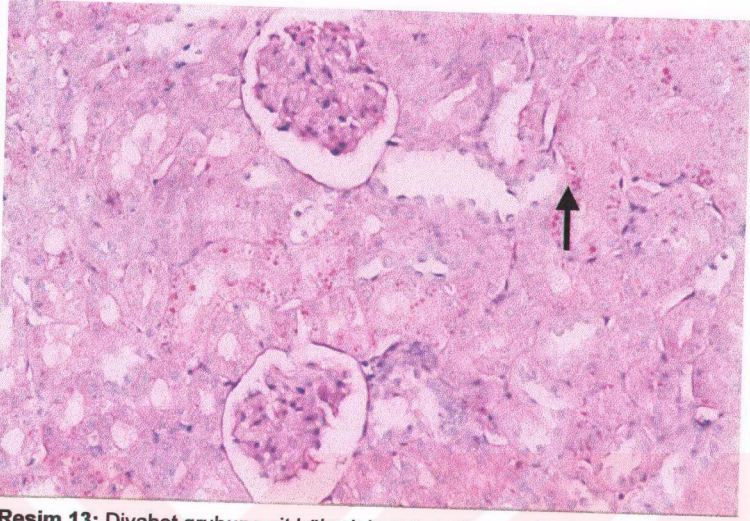
Resim 10: Diyabet grubuna ait tübül epitellerinde Ammann-Ebstein lezyonları (→). PAS x 400



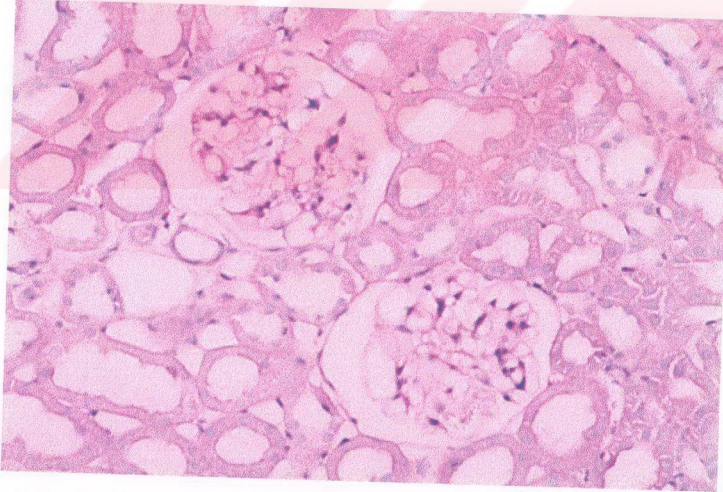
Resim 11: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerullerde diffüz glomeruloskleroz, mezangiyal hücre artışı, tübül epitellerinde Armani-Ebstein lezyonları. PAS x 100



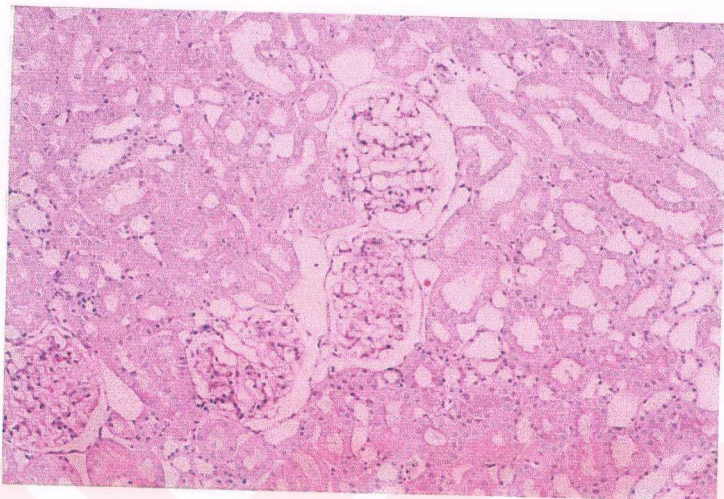
Resim 12:E vitamini verilen diyabet grubuna ait korunmuş böbrek korteksi. Glomerüler yapılar ve tübüller normal yapısında izleniyor. PAS x 100



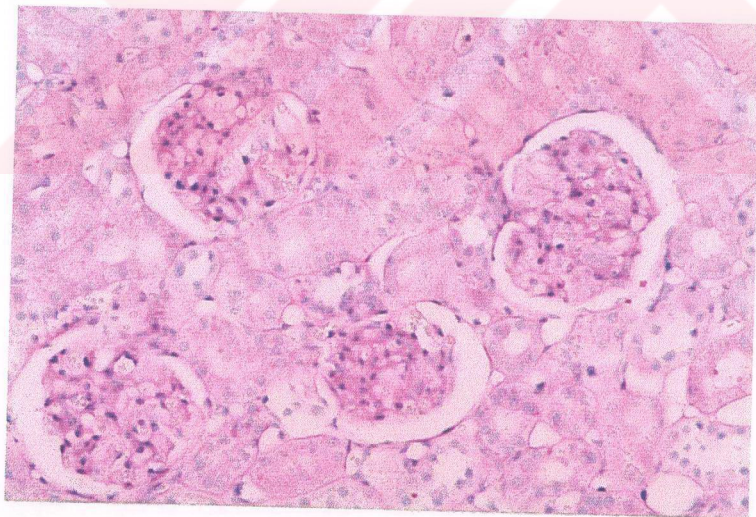
Resim 13: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerüllerde PAS (+) glikoprotein artışı ve tübül hücrelerinde Armani-Ebstein lezyonları (→) gözleniyor. PAS x 200



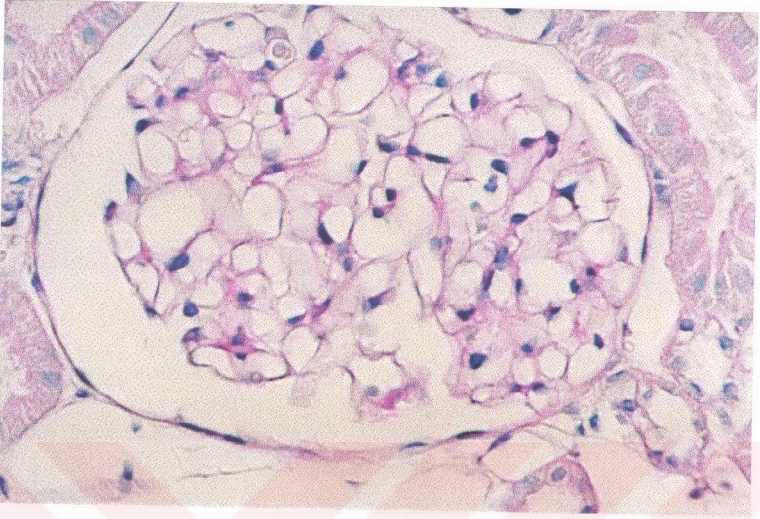
Şekil 14: E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi. Glomerüler yapılar ve tübül hücreleri korunmuş olarak gözleniyor (Resim 12'deki sahanın büyütülmüş görüntüsü). PAS x 200



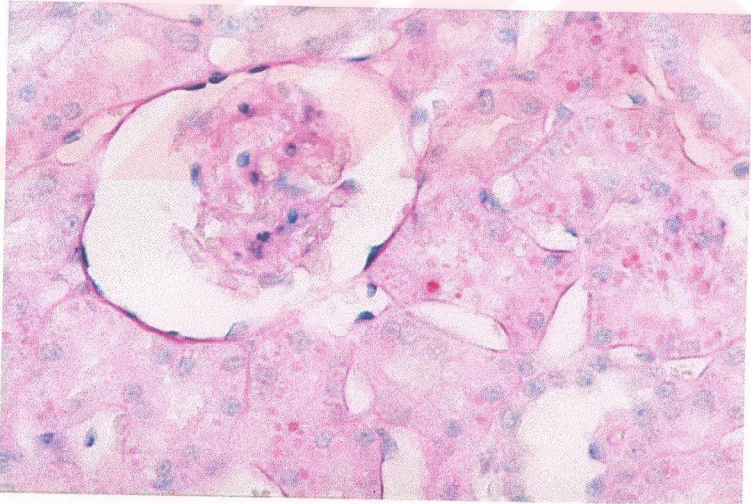
Resim 15: E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi.
PAS x 100



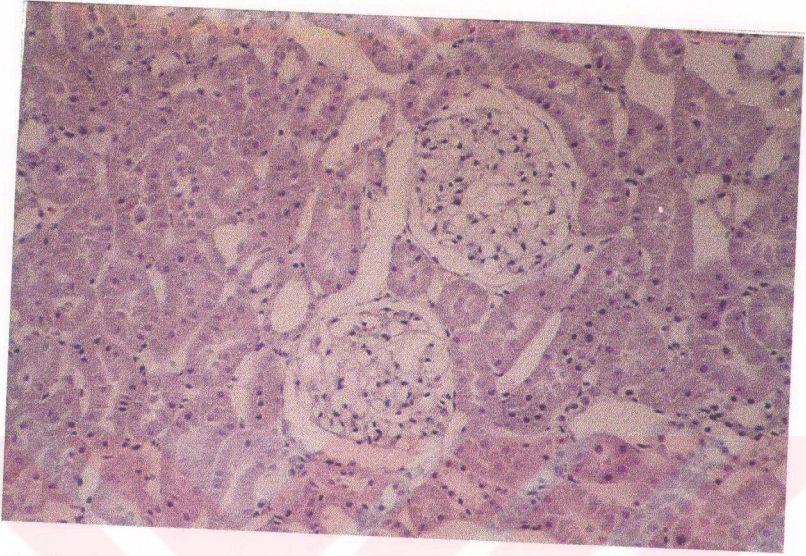
Resim 16: Diyabet grubuna ait böbrek korteksi. PAS x 200



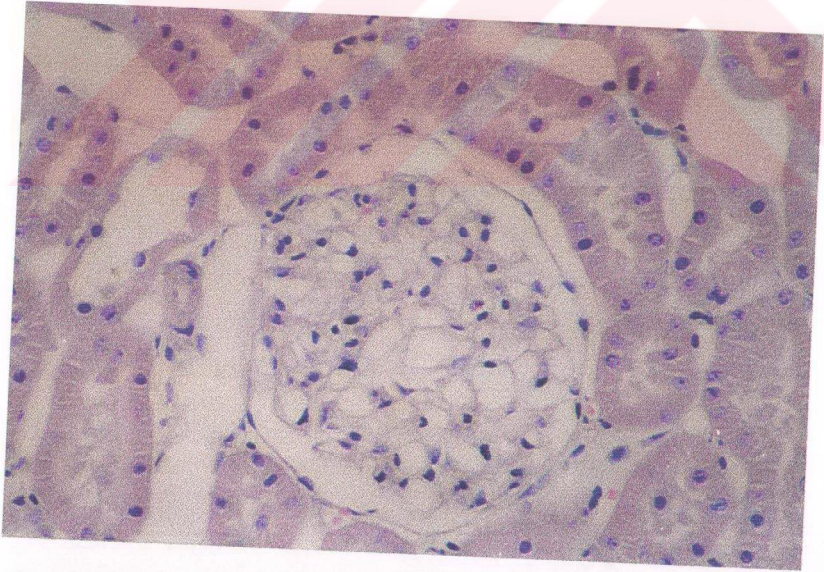
Resim 17: E vitamini verilen diyabet grubuna ait glomerul kesiti. PAS x 400



Resim 18: Diyabet grubuna ait glomerul kesiti. Glomerulde atrofi ve fibrozis, Bowman kapsülünün bazal membranında kalınlaşma gözleniyor. PAS x 400



Resim 19: E vitamini verilen diyabet grubuna ait böbrek korteksi. HE x 100



Resim 20: Resim 19'da görülen glomerülün büyütülmüş görüntüsü. HE x 200

8. TARTIŞMA

Diabetes mellitus, insülinin yokluğu, anormal sentezi yada etkisiz olması sonucu meydana gelen sistemik bir hastalıktır. Kronik bir hastalık olduğundan diyabetik insanlar üzerindeki uzun dönem incelemeler çok vakit alacağı için deney hayvanları üzerinde deneysel diyabet modellerinde çalışmak avantajlı olmaktadır (22). Bu amaçla kimyasal diyabete neden olan tek doz intraperitoneal veya intravenöz streptozotocin (stz.) veya alloksan verilmesi en çok tercih edilen deneysel diyabet modelleridir. Çünkü bu modelin uygulanması kolaydır, kalıcı diyabet oluşturur ve hayvan uzun süre diyabetik olarak yaşayabilir. Streptozotocinin, β hücrelerine selektif hasarlayıcı etkisinin olması ve böbrek, karaciğer gibi diğer organları hasarlayıcı toksik etkisinin olmaması nedeniyle alloksona göre daha çok kullanılmaktadır (33). Bu çalışmada, tek doz daha önce diyabete neden olduğu gösterilmiş olan 65 mg/kg dozda intraperitoneal Streptozotocin kullanılmıştır (33,49,58). Bu şekilde oluşan diyabet insandaki IDDM'e benzer (33).

Streptozotocin enjeksiyonundan 48 saat sonra kan şekeri (KŞ) yüksekliği meydana gelmektedir (59,60). Bu çalışmada da daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak Streptozotocin enjeksiyonundan 48 saat sonra tüm hayvanlarda kan şekerinin yükseldiği saptanmıştır ($p<0.01$). Stz.enjeksiyonundan sonraki 8 günde akut diyabet (60), 3 hafta sonra kronik diyabet oluşmaktadır (41).

Diyabet diyebilmemiz için kan şekerinin 11 mmol/l ve üstünde olması gereklidir (37). Bu çalışmada Stz.enjeksiyonu yapılan 2.ve 3.gruplarda deney sonunda kan şekeri ortalaması sırası ile $12,362\pm 0.109$ ve $12,342\pm 0.113$ olarak bulunmuştur. Her iki grubun KŞ. düzeyleri 1.gruptan istatistiksel olarak anlamlı yüksektir ($p<0.01$).

Rösen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 5 haftalık diyabet sonrası vücut ağırlığında kontrol ve diyabetik sıçanlar arasında anlamlı bir fark olmadığı halde, sadece 17 hafta ve daha uzun süreli diyabet sonunda anlamlı fark olduğu bildirilmiştir (61). Cortes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, stz.ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 4.günden itibaren kontrol grubuna göre anlamlı kilo kaybı gözlenmiştir (62). Çalışmamızda da Cortes ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu sonuçlar elde ettik. Diyabet oluşturulan tüm sıçanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı kilo kaybı saptadık ($p<0.01$).

Morel ve arkadaşları, Karasu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda E vitamininin diyabetteki kilo kaybına etkisi olmadığını göstermiştir (63,64). Bizim

çalışmamızda ise diyabetik gruptaki sıçanların kilo kaybı, E vitamini alan diyabetik gruba göre anlamlı olarak fazlaydı ($p < 0.01$).

Çalışmamızda diyabetik grup ile E vitamini alan diyabetik grubun kan şekerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bu sonuç literatürlerle uyumludur (32,47,61,63,64,65).

Diyabetik nefropati, özellikle IDDM'de oldukça sık rastlanan bir komplikasyon ve başlıca klinik problemdir (6). Diyabete bağlı glomerüloskleroz artışı çalışmalarla gösterilmiştir (18,47,50,66). Bizim çalışmamızda da Glomeruloskleroz İndeksi'nin (GSI) diyabetik grupta anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir.

Diyabetik nefropati gelişiminde klinik seyir 5 evreye ayrılır (6,23). Birinci evre, klinik sendrom oluşmadan önceki hiperfonksiyon ve hipertrofi evresidir. Böbreklerde yapısal olarak glomerüller hipertrofi vardır. Bazal membran ve mezangiyum normaldir. Bu evrede oluşan değişiklikler reverzibl olduğu için, bu aşamada tanı ve tedavi son derece önemlidir (42). İkinci evre, sesiz evredir. Ana yapısal değişiklik, bazal membran kalınlaşması ve mezangiyal genişlemedir. Böbrek fonksiyonları henüz normaldir. Histopatolojik olarak kapiller bazal membranında belirgin, diffüz bir kalınlaşma, mikroanevrizmalar, nodüller ve diffuz glomeruloskleroz gözlenir (21). Çalışmamızda, E vitamini verilmeyen diyabetik grupta yaygın, diffuz glomeruloskleroz mevcuttu. Tüm mezangiyal alanlar belirgin bir biçimde genişlemiştir. Bazal membran ve mezangiyumda PAS(+) madde depolanması, mezangiyal hücrelerde artış gözlemlendi. Birçok glomerülün vasküler lümeninde belirgin daralma izlendi. Tubulus hücre sitoplazmalarında diyabete özgü Armani-Ebstein lezyonları saptandı (14). E vitamini verilen grupta ise histolojik kesitler, kontrol grubu kesitlerle benzerlik gösteriyordu. Glomerüller yapılar E vitamini alan grupta korunmuştu.

Yapılan uzun süreli klinik çalışmalarda, diyabetik hiperglisemi ile oluşan diyabetin sekonder komplikasyonları arasında açık bir bağlantı kurulmuştur. Fakat aşırı glukoz düzeyinin doku hasarına sebep oluş mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (5,6). Son yıllarda birçok patolojide olduğu gibi diyabetin komplikasyonlarının patogenezinde de serbest oksijen radikallerine ilgi artmıştır. Çünkü yapılan çalışmalar hipergliseminin serbest radikal üretimini arttırdığını göstermektedir (4,5,7). Serbest radikallerin oluşturduğu hasara "oksidatif stres" denir ve prooksidan-antioksidan dengenin prooksidan yönünde değişmesiyle karakterizedir (7,8). Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olan E vitamininin, serbest

radikallerin biomembranlarda oluşturabileceği hasarı önlediğine dair çalışmalar vardır (47,61,63,64).

Çalışmamızda, E vitamini verilen diyabetik grupta, tedavi edilmeyen diyabetik gruba göre, Glomeruloskleroz indeksinde (GSI) istatistiksel anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.01$). Diyabetik grupların histolojik kesitleri incelendiğinde, E vitamini alan diyabetik grupta belirgin bir düzelme gözlenmiştir. E vitamininin damar duvarını koruyucu etkisi yönündeki bu bulgularımız, önceki çalışmalarla uygunluk göstermektedir (47,61,63,64).



9. SONUÇ VE ÖNERİLER

Streptozotocinle diyabet oluşturulan sıçanlar sekiz hafta gözlendi. Sekiz hafta sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde kontrol grubuna ait böbrekler normal görünümdeydi.

Diyabetik gruba ait kesitlerde, diffüz ve ciddi glomeruloskleroz gözlendi. Tüm mezangiyal alanlar belirgin biçimde genişlemişti. Glomeruler kapillerin lümeninde daralma, bazal membran ve mezangiyumda PAS (+) materyel depolanması gözlendi. Mezangiyumdaki hücreler artmıştı, yer yer mikroanevrizmalar mevcuttu. Tubulus hücrelerinde bazal membran kalınlaşması ve sitoplazmalarında glikojen depolanması izlendi (Armanni-Ebstein lezyonları).

E vitamini verilen diyabetik grupta, nadiren glomeruloskleroz gözlenirse de, genel olarak glomerüler yapılar normaldi. Glomerul yumağında glikoprotein depolanması, tübül epitelinde glikojen depolanması gözlenmedi. Glomerüloskleroz indeksi, tedavi edilmeyen diyabetik gruba göre istatistiksel anlamda düşük bulundu ($p<0.01$).

Bu sonuçlar bize, E vitamininin diyabetik nefropati oluşumunu yavaşlatabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız E vitamininin, serbest radikallerin biyomembranlarda oluşturabileceği hasarı önlediğine dair çalışmaları desteklemektedir. Fakat, bu konuda daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

10. KAYNAKÇA

- 1- Wolf SP. Diabetes Mellitus and Free Radicals, British Medical Bulltein 1993; 49 (3): 642-652.
- 2- Feingold KR, Funk JL. Disorders of the Endocrine Pancreas. sec.edition, Appleton and Lange, USA 1997: 423-448.
- 3- Beler B. Diabetik Nefropatinin Patogenezinde Yeni Görüşler ve Tedaviye Getirdikleri. Türk Diabet Yıllığı, 1988-1989: 30-46.
- 4- Ülker S. Diabetin Vasküler Komplikasyonları ve Endotel. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları: 81-91.
- 5- Giugliano D, Cereiello A, Paolisso G. Oxidative Stress and Diabetic Vascular Complications. Diabetes Care 1996; 19 (3): 257-267.
- 6- Gedik O, Akalın S. Diabetes Mellitus. Modern Tıp Seminerleri 1989.
- 7- Volkova K, Chorvathova M, Bobek P, et all. Antioxidative State of Myocardium and Kidneys in Acute Diabetic Rats. Physiol. Res.1993; 42: 251-255.
- 8- Seven A, Candan G. Antioksidan Savunma Sistemleri. Cerahpasa Tıp Dergisi. Ocak-Mart 1996: 41-49.
- 9- Bieri JG, Corash L, Hubbard VS. Medical Uses of Vitamin E. The New England Jour of Medicine 1983; May: 1063-1069.
- 10-Halliwell B. Drug Antioxidant Effects. Drug 1991; 42 (4): 570-596.
- 11-King GL, Kunisaki M, Nishio Y, et all. Biochemical and Molecular Mechanisms in the Development of Diabetic Vascular Complications. Diabetes 1996-July; 45: 105-108.
- 12-Paolisso G, Giugliano D. Oxidative Stress and Insülin Action: Is There a Relationship? Diabetologia 1996; 39: 357-363.
- 13-Rubino A, Loesch A, et all. Effects of Vitamin E Deficiency on Vasomotor Activity and Ultrastructural Organisation of Rat Thoracic Aorta. British Jour of phar. 1995; 115: 415-420.
- 14-Canda Ş, Canda T. Temel Patoloji. DEÜTF Yayınları 1982: 259-269.
- 15-Drash AL, Rudert WA, Borquaye S, et all. Effect of Probucol on Development of Diabetes Mellitus in BB Rats. Am.J.Cardiol 1988; 62: 27B-30B.
- 16-Açıklın İ. İç Hastalıkları. Hacettepe Yayın Birliği 1988: 222-248.
- 17-Carpenter MA, Bodansky HJ. Drug Treatment of Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus. Diabet Med. 1990; 7: 99-104.

- 18-Zheng F, Striker GE, Esposito C, et al. Strain Differences Rather Than Hyperglycemia Determine the Severity of Glomerulosclerosis in Mice. *Kidney Int.* 1998; 54: 1999-2007.
- 19-Brownlee M. *Diabetes Mellitus and Obesity* 1985: 165-171.
- 20-James M, Crabbe C. *Diabetic Complications Scientific and Clinical Aspects* 1987: 94-139.
- 21-Hatemi H. *Diabetes Mellitus. Dergah Tıp Yayınları* 1983: 28-40.
- 22-Öztürk Y, Altan VM, Yıldızoğlu N, et al. Effects of Experimental Diabetes and Insulin on Smooth Muscle Functions. *Pharmacological Reviews* 1996; 48: 69-112.
- 23-Nuhad İ, Bryan B, Piotr S. Renal Disease and Hypertension in NIDDM. *Kidney Int.* 1999; 55: 1-28.
- 24-Bloodworth JMB. *Endocrine Pathology General and Surgical* 1982: 643-649.
- 25-Kenneth B, Beckman KB, Ames BN, et al. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol.Rev.* 1998; 78 (2): 547-581.
- 26-Halliwel B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am.J.of Med.* 1991; Suppl.3C: 145-225.
- 27-Yu BP. Cellular Defences Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiol. Rev.* 1994; 74: 139-162.
- 28-Gutteridge JMC, Halliwel B. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease.* First edition, Oxford University Press, New York 1994.
- 29-Halliwel B. Oxidants and The Central Nervous System: Some Fundamental Questions. *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126: 23-33.
- 30-Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. *Mayo Clin.Proc.* 1988; 63: 381-389.
- 31-DiMascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant Defense Systems: The Role of Carotenoids, Tocopherols, and Thiols. *Am.J.Clin.Nutr.* 1991; 53: 194-200.
- 32-Palmer AM, Thomas CR, Gopaul N, et al. Dietary Antioxidant Supplementation Reduces Lipid Peroxidation but Impairs Vascular Function in Small Mesenteric Arteries of the Streptozotocin Diabetic Rat. *Diabetologia* 1998; 41 (2): 148-156.
- 33-Vega P, Gaule C, Mancilla J, et al. Comparison of Alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes in Rats: Differential Effects on Microsomal Drug Metabolism. *Gen. Pharmacol.* 1993; 24 (2): 489-495.

- 34-Yamamoto H, Uchigato Y, Okamoto H. DNA Standbreaks in Pankreatic Islets by in vivo Administration of Alloxan or Streptozotocin. *Biochem. Biophys.* 1981; 103: 1014-1020.
- 35-Yonemura Y, Takoshima T, Miwa K. Amelioration of Diabetes Mellitus in Partially Depancreatized Rats by Poly Synthetase Inhibitors: Evidence of Islet B-cell Regeneration. *Diabetes* 1984; 33: 401-404.
- 36-Mandrup Poulsen T. Nicotinamide Treatment in the Prevention of IDDM. *Diabetes Metab. Reviews* 1993; 9 (4): 295-309.
- 37-Papacci G, Frascatore S, Pisanti FA, et all. An Increase in SOD Counteracts Islet Vascular Alteractions in Low Dose Streptozotocin Treated Mice. *Histochem.* 1994; 101: 215-224.
- 38-Portha B, Blondel O, Serradas P, et all. The Rat Models of NIDDM Induced by Neonatal Streptozotocin. *Diabet Metab.* 1989; 15: 61-75.
- 39-Mordes JP, Rossini AA. Animal Models of Diabetes. *Am.J.Med.*1981; 70: 353-360.
- 40-Gottlieb PA, Rossini AA, Mordes JP. Approaches to Prevention and Treatment of IDDM in Animal Models. *Diabetes Care* 1988; 11 (Suppl.1): 29-36.
- 41-Malder H, Ahren B, Sundler F. Islet Amyloid Polypeptide (Amylin) and Insulin are Differentially Expressed in Chronic Diabetes Induced by Streptozotocin in Rats, *Diabetologia* 1996; 39: 649-657.
- 42-Mogensen CE, Schmithz O. The Diabetic Kidney, *Medical Clinics of North America* 1988; 72: 1465-1472.
- 43-Wolfgang JS, Ferber S, Johnson JH. Streptozotocin Transport and Cytotoxicity. *Diabetes* 1994; 43: 1326-1333.
- 44-Paker Ş. *Histoloji.* Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1993: 448-464.
- 45-Junquria CL. *Temel Histoloji.* Barış Kitabevi; 1993: 437-461.
- 46-Güzel C, Kurt D, Şermet A, et all. The Effects of Vitamin E on Gastric Ulcers and Gastric Mucosal Barrier in Stress Induced Rats. *Tr.J.Of Medical Sciences* 1998; 28: 19-21.
- 47-Lee HS, Jeong JY, Kim BC, et all. Dietary Antioxidant Inhibit Lipoprotein Oxidation and Renal Injury in Experimental Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney int.* 1997; 51: 1151-1159.
- 48-Kakkar R, Mantha SV, Kalia J, et all. Time Course Study of Oxidative Stress in Aorta and Heart of Diabetic Rats. *Clinical Science* 1996; 91: 441-448.

- 49-Paulson DJ, Gupta M, Zak R, et al. Effects of Exercise Training and Diabetes on Cardiac Myosin Heavy Chain Composition. *Mol.Cell Biochem.* 1992; 117: 175-179.
- 50-Kaya A, Akgüzel M, Akpınar V, Tavlı L. Diabetik Ratlarda Silazapril ve Amladipinin Böbrekler Üzerine Toksik Etkisinin Histopatolojik İncelenmesi. *Ulusal Endokrinoloji Dergisi* 1994; 4: 61-70.
- 51-Yang J, Cherian MG. Protective Effects of Metallothionein on Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Life Science* 1994; 55 (1): 43-51.
- 52-Sjöstrand FS. *Electron Microscopy of Cell and Tissues. Vol.1*, Akademic Press, New York; 1967: 162.
- 53-Drury RAB, Wallington EA, Cameron R. *Carletonn's Histological Technique, Fourth Edition*. Oxford University Press 1967: 145, 152-153.
- 54-Smith A, Bruton J. *A Colour Atlas of Histological Staining Techniques, Second Edition*, London 1978: 145, 152-153.
- 55-Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC. The Enhancement of Aminonucleoside Nephrosis by the Co-administration of Protamine. *Kidney int.*1987; 32: 691-699.
- 56-Yoshida Y, Fogo Agnes, Ickikawa İ. Glomerular Hemodynamic Changes vs. Hypertrophy in Experimental Glomerular Sclerosis. *Kidney Int.* 1989; 35: 654-660.
- 57-Kelly DJ, Wilkinson JL, Allen TJ, et al. A New Model of Diabetic Nephropathy With Progressive Renal Impairment in the Transgenic (mRen-2) 27 Rat (TGR), *Kidney int.* 1998; 54: 343-352.
- 58-Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular Dysfunction in Diabetic Rats. *J.Clin.Invest.* 1995; 96 (2): 1159-1163.
- 59-Cameron NE, Cotter MA. Interaction Between Oxidative Stress and α -linolenic Acid in Impaired Neurovascular Function of Diabetic Rats. *Am.J.Physiology* 1996; 271: E 471-E 476.
- 60-Tanguay KE, Amona K, Hart DA, et al. A Cytotoxic Monoclonal Atoantibody From the BB Rat Which Binds on Islet Cell Surface Protein. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 1990; 8: 23-28.
- 61-Rösen P, Ballhousen T, Bloch W, Addicks K. Endothelial Relaxation is Dusterbed by Oxidative Stress in the Diabetic Rat Heart: Influence of Tocopherol as Antioxidant. *Diabetologia* 1995; 38: 1157-1168.

- 62-Cortes P, Zhao X, Riser BL, Narins RG. Role of Glomerular Mechanical Strain in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Kidney Int.* 1997; 51: 57-68.
- 63-Morel D.W, Chisolm GM. Antioxidant Treatment of Diabetic Rats Inhibits Lipoprotein Oxidation and Cytotoxicity. *Jour.of Lipid Research* 1989; 30: 1827-1834.
- 64-Karasu C, Ozansoy G, Bozkurt O, et all. Antioxidant and Triglyceride-Lowering Effects of Vitamin E Associated With the Prevention of Abnormalities in the Reactivity and Morphology of Aorta From Stz. Diabetic Rats. *Metabolism* 1997; 46 (8): 872-879.
- 65-Karasu Ç, Dewhurst M, Stevens EJ, Tomlinson DR. Effects of Anti-oxidant Treatment on Sciatic Nerve Dysfunction in Streptozotocin-Diabetic Rats; Comparison With Essential Fatty Acids. *Diabetologia* 1995; 38: 129-134.
- 66-Ertürk E, Özbilgin S, İmamoğlu Ş, et all. Diabetik Sıçanlarda Silazaprilin Diabetik Nefropati Üzerine Etkisi. *Ulusal Endokrinoloji Dergisi* 1994; 4 (2): 143-153.