



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RESVERATROL'ÜN DİYABETİK SIÇAN
BÖBREK DOKUSUNDA LEPTİN VE SİRTUİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ASLI YAYLALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN 2012

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RESVERATROL'ÜN DİYABETİK SIÇAN
BÖBREK DOKUSUNDA LEPTİN VE SİRTUİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ASLI YAYLALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kemal ERGİN

AYDIN 2012

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-10006** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgilerinden yararlandığım, eğitime devam etmemi sağlayan ve hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Alpaslan Gökçimen hocama en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezimin proje aşamasında ve çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm tez danışmanım Doç. Dr. Kemal Ergin'e, tez çalışmamda fotoğraflama kısmında yardımcı olan ve her zaman destek olan Yrd. Doç. Dr. Tülin Boylu'ya ve diğer anabilim dalı hocalarımız Yrd. Doç. Dr. Kübra Başaloğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Semra Erpek'e teşekkür ederim.

Tezimin hayvan deneyi aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Fizyoloji uzmanı Dr. Serpil Çeçen'e, histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Patoloji laboratuvarı çalışanlarından Şirin Adıgüzel ve Şengül Barutça'ya ve Patoloji anabilim dalından Doç. Dr. İbrahim Meteoğlu'na, doku homojenizasyonu çalışmalarında yardımcı olan Biyokimya anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Mukadder Serter'e, Western blot çalışmalarında laboratuvarlarını kullanmama izin veren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Parazitoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Sema Ertuğ'a ve bu çalışmalarda başından sonuna desteğini gördüğüm, her zaman sabırla birlikte çalıştığımız Biyofizik doktora öğrencisi Serçin Özlem'e, tez yazım aşamasında yardımını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm yaşamım boyunca her zaman arkamda olan, eğitimimde en büyük pay sahibi, hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen canım annem ve babama, tezimin oluşturulmasında yardımcı olan kardeşim Elif Eryılmaz'a ve biricik eşim Kerem Yaylalı'ya içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO ve ŞEKİL DİZİNİ	IV
RESİM DİZİNİ	V
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	2
2.1 Diabetes Mellitus	2
<i>2.1.1 Tanımı ve sınıflandırılması</i>	2
<i>2.1.2 Diyabetin Patogenezi ve Komplikasyonları</i>	3
<i>2.1.3 Deneysel diyabet oluşturmada Streptozotosin</i>	4
2.2 Diyabetik Nefropati	4
<i>2.2.1 Diyabetik Nefropatide Patolojik Değişiklikler</i>	6
2.3 Böbrek	7
<i>2.3.1 Böbrek Anatomisi</i>	7
<i>2.3.2 Böbrek Embriyolojisi</i>	8
<i>2.3.3 Böbrek Histolojisi</i>	11
2.3.3.1 Böbrek cisimcikleri	12
2.3.3.2 Proksimal tübül	14
2.3.3.3 Henle kulpu	15
2.3.3.4 Distal tübüller	16
2.3.3.5 Toplayıcı tübül ve kanallar	18
2.3.3.6 Böbreğin kan dolaşımı	19
2.3.3.7 Böbreğin lenfatik damar ve sinirleri	20
2.3.3.8 Böbrek ara dokusu	20
2.4 Resveratrol	20
<i>2.4.1 Resveratrolün Etkileri</i>	22
2.4.1.1 Antioksidan Etkileri	22
2.4.1.2 Kardiyovasküler Sisteme Etkileri	23
2.4.1.3 Antitrombosit Etkileri	23

2.4.1.4 Antiinflamatuvar Etkileri	23
2.4.1.5 Antikanserojen Etkileri	24
2.4.1.6 Antidiyabetik Etkileri	24
2.5 Leptin ve Sirtuin	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1 Deney hayvanları	33
3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar	33
3.3 Deneyin sonlandırılması	34
3.4 Histolojik yöntemler	35
3.5 İmmünohistokimyasal yöntemler	36
3.5.1 Kullanılan gereçler	36
3.5.2 Analiz aşaması	37
3.6. Western blot yöntemiyle Leptin ve Sirtuin proteinlerinin belirlenmesi	38
3.6.1 Kullanılan gereçler	38
3.6.2. Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin hazırlanışı	39
3.6.3 Dokuların homojenizasyonu ve Lowry yöntemi ile dokuda protein miktarı tayini	41
3.6.4 SDS Page Elektroforez	42
3.6.5 Western Blot analizi	44
3.6.6 İstatiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1 Kan şekeri ve Ağırlık Bulguları	46
4.2 Histolojik Bulgular	47
4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular	63
4.4 Western Blot Bulguları	78
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ	86
7. ÖZET	87
8. SUMMARY	88
9. KAYNAKLAR	89

TABLO ve ŞEKİL DİZİNİ

Tablo I: Ayırma jeli hazırlanışı (%12'lik)	43
Tablo II: Yoğunlaştırma jeli hazırlanışı (%5'lik)	43
Tablo III: Kilo düzeylerinin deney süresince değişimi	47
Tablo IV: Şeker düzeylerinin deney süresince değişimi	47
Tablo V: H-E değerlendirilmesi	48
Tablo VI: PAS değerlendirilmesi	57
Tablo VII: Leptin ile immünohistokimyasal boyanma yapılmış böbrek dokularının değerlendirilmesi	63
Tablo VIII: SIRT-2 ile immünohistokimyasal boyanma yapılmış böbrek dokularının değerlendirilmesi	64
Şekil 1: Gelişimin farklı evrelerindeki embriyolara ait nefrik tübüllerin oluşumunu gösteren transvers kesitler	9
Şekil 2: A. İntermediate mezodermin pronefrik, mezonefrik ve metanefrik sistemler arasındaki ilişki. B. 5 haftalık embriyoda pronefrik ve mezonefrik sistemlerin boşaltım tübülleri	10
Şekil 3: Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi	11
Şekil 4: Resveratrol'ün yapısal formülü ve yaygın analog ve eşlenikleri	21
Şekil 5: Resveratrolün kan glukoz seviyelerini ve lipid birikimini azaltmasının şematik resmi	25
Şekil 6: Normal β hücrelerinde resveratrolün azalmış insülin sekresyonuna neden olmasının şematik çizimi	27
Şekil 7: Glukozun periferik organlardaki metabolizmasının leptin ve insülin ile düzenlenmesi	29
Şekil 8: Resveratrolün SIRT1 üzerinden adipogenez etkisinin şematik çizimi	31
Şekil 9: İnflamasyon, mitokondriogenez ve metabolizma üzerine SIRT1 etkileri	31
Şekil 10: SIRT1' in dokulardaki etkileri	32

RESİM DİZİNİ

Resim 1: İnsanda sağ böbreğin önden ve arkadan görünümü	8
Resim 2: Sıçanların böbrek dokularının alınması işlemi esnasında çekilen fotoğraf	35
Resim 3: Diyabetik böbreğin sıçandan alındıktan sonraki görünümü	36
Resim 4: Elektroforez düzeneğine ayırma jelinin konulması	42
Resim 5: Proteinlerin 100 V'da sabit akımla ayrıştırılması	44
Resim 6: Normal yapıda glomerül ve tübül yapıları (H-E x 10)	50
Resim 7: Kontrol grubu. Proksimal tübül ve Distal tübül (H-E x 20)	50
Resim 8: Kontrol grubu böbrek medullası (H-E x 20)	51
Resim 9: KRSV grubunda medullada konjesyon bulguları (H-E x 10)	51
Resim 10: KRSV grubunda normal yapıda glomerül (H-E x 40)	52
Resim 11: Diyabet grubunda glomerülde küçülme, bowman kapsül aralığında genişleme, glomerülde dejenerasyon, tübülde dilatasyon bulguları (H-E x 10)	52
Resim 12: Diyabette işaretli glomerülde küçülme, glomerülde konjesyon, ile işaretli tübülde dilatasyon, dejenerasyon (H-E x 10)	53
Resim 13: Diyabet grubunda tübüllerde konjesyon (H-E x 10)	53
Resim 14: Diyabet+ DMSO grubunda glomerülde konjesyon ve büyüme, bowman mesafesinde genişleme (H-E x 10)	54
Resim 15: DM+ DMSO grubunda böbrek medullasında dejenerasyon (H-E x 20)	54
Resim 16: DM+ DMSO grubunda glomerül içi kapillerde dilatasyon (H-E x 10)	55
Resim 17: DM+RSV grubunda glomerüllerin ve tübüllerin diyabete göre bulguların biraz düzelmiş görünümü (H-E x 10)	55
Resim 18: DM+ RSV grubundaki görünüm. Glomerül yapısında düzelme (H-E x 20)	56
Resim 19: DM+RSV grubunda medullanın görünümü (H-E x 10)	56
Resim 20: Kontrol grubu tübül görünümü (PAS x 20)	58
Resim 21: Kontrol grubu glomerül ve bazal membran görünümü (PAS x 40)	58
Resim 22: K+ RSV grubunda tübül görünümü (PAS x 20)	59
Resim 23: K+RSV grubunda glomerül, bazal membran görünümü (PAS x 20)	59
Resim 24: Diyabet grubunda PAS ile yoğun boyanmış glomerüller (PAS x 20)	60
Resim 25: Diyabet grubunda PAS ile yoğun boyanmış tübüller (PAS x 20)	60

Resim 26: DM+DMSO grubunda glomerülde ve bazal membranda PAS yoğunluğu (PAS x 40)	61
Resim 27: DM+DMSO grubunda PAS yoğunluğu (PAS x 20)	61
Resim 28: DM+RSV grubunda glomerül görünümü (PAS x 20)	62
Resim 29: DM+RSV grubunda tübüllerin görünümü (PAS x 20)	62
Resim 30: Kontrol grubunun leptin ile boyanması (Ob x 10)	64
Resim 31: Leptin antikoru ile boyanmış kontrol grubundaki görünüm. Tübüllerin yoğun olarak boyanması (Ob x 20)	65
Resim 32: Kontrol grubunda glomerülde boyanma görülmemesi (Ob x 40)	65
Resim 33: K+ RSV grubunda Leptin tutulumu (Ob x 10)	66
Resim 34: K+RSV grubunda tübüllerde Leptin tutulumu (Ob x 20)	66
Resim 35: K+RSV grubunda glomerülde boyanmanın olmadığı görülmesi (Ob x 40)	67
Resim 36: Diyabet grubunda yoğun glomerül tutulumu (Ob x 20)	67
Resim 37: Diyabet grubunda Leptin boyanması (Ob x 40)	68
Resim 38: DM+ DMSO grubunda leptin tutulumu (Ob x 10)	68
Resim 39: DM+ DMSO grubunda glomerüllerin boyanması (Ob x 40)	69
Resim 40: DM+ DMSO grubunda medullada leptin tutulumu (Ob x 20)	69
Resim 41: DM+RSV grubunda tübüllerde leptin tutulumu (Ob x 20)	70
Resim 42: Leptin ile boyanmış DM+RSV grubunda glomerül görünümü (Ob x 40)	70
Resim 43: Kontrol grubunun SIRT-2 ile boyanmış tübüllerin görünümü (SIRT2 x 20)	71
Resim 44: Kontrol grubunda glomerül görünümü (SIRT2 x 40)	71
Resim 45: Kontrol grubunda medulla görünümü (SIRT2 x 20)	72
Resim 46: K+ RSV grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 20)	72
Resim 47: K+RSV grubunda tübüllerin görünümü (SIRT2 x 20)	73
Resim 48: K+RSV grubunda glomerül SIRT-2 boyanması negatifliği (SIRT2 x 40)	73
Resim 49: Diyabet grubunda tübüllerde SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 10)	74
Resim 50: Diyabet grubunda SIRT-2' nin tübüllerde görünümü (SIRT2 x 20)	74
Resim 51: Diyabet grubunda glomerülde negatif SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 40)	75
Resim 52: DM+ DMSO grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 20)	75

Resim 53: DM+ DMSO grubunda tübül boyanması (SIRT2 x 20)	76
Resim 54: DM+DMSO grubunda SIRT-2 negatif glomerüller (SIRT2 x 40)	76
Resim 55: DM+ RSV grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 10)	77
Resim 56: DM+RSV grubunda tübüllerin boyanması (SIRT2 x 20)	77
Resim 57: DM+RSV grubunda glomerülde SIRT-2 negatifliği (SIRT2 x 40)	78
Resim 58: Beta-aktin'in Western blot yöntemiyle gösterilmesi	79
Resim 59: Leptin'in Western blot yöntemiyle gösterilmesi	79
Resim 60: Sirtuin-1' in Western blot yöntemiyle gösterilmesi	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- ACE:** Anjiotensin dönüştürücü enzim
ADH: Antidiüretik hormon
ADP: Adenozin di fosfat
ALS: Amiyotrofik lateral skleroz
AMP: Adenozin mono fosfat
AMPK: AMP aktive protein kinaz
cAMP: Siklik AMP
DM: Diabetes Mellitus
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNp: Diyabetik nefropati
ERK: Ekstraselüler sinyal regüle edilmiş kinaz
GBM: Glomeruler bazal membran
GFH: Glomeruler filtrasyon hızı
GLP1: Glukagon benzeri peptid 1
GLUT4: Glukoz taşıyıcı 4
IHC: İmmünohistokimya
IL: İnterlökin
i.m: İntramuskuler
i.p: İntraperitoneal
LDL: Küçük dansiteli lipoprotein
LPS: Lipopolisakkarit
NaCl: Sodyum klorür
NAD: Nikotin adenin dinükleotid
NFκB: Nükleer faktör kappa B
NO: Nitrik oksit
PAS: Periodik Asit Schiff
PGC-1α: PPARγ koaktivatörü
PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinaz
PPAR: Peroksizom proliferatör aktive olmuş reseptör
RAAS: Renin anjiotensin aldesteron sistemi
RSV: Resveratrol

ROR: Reaktif oksijen radikalleri

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliği

SF: Serum fizyolojik

STZ: Streptozotosin

TNF: Tümör nekrozis faktör

YA: Yağ asidi

1-GİRİŞ VE AMAC

Diabetes Mellitus yaşam boyu süren, sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan, morbiditesi, mortalitesi ve topluma ekonomik yükü yüksek kronik metabolik bir hastalıktır. Bu nedenle patogenezinin aydınlatılması önem taşımaktadır (1). En sık karşılaşılan endokrin metabolik bozukluklardan biridir ve gelişmiş ülkelerdeki çoğu popülasyonda %5-10 oranında görülür (2). Genellikle hiperglisemi başladıktan uzun süre sonra komplikasyonlar ortaya çıkar (3). Günümüzde hastaların yaklaşık %30-40'ında izlenen nefropati diyabetin en önemli komplikasyonları arasında gösterilmektedir (4). Hipergliseminin glukoz otooksidasyonu ve protein glikozilasyonu ile serbest oksijen radikallerinin oluşma hızını arttırması ve bu nedenle koruyucu antioksidan kapasitesinin düşmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin diğer diyabetik komplikasyonlar gibi böbrek üzerinde de etkisi olabileceği bildirilmektedir (5).

Doğal antioksidanların böbrekte hastalık önleyici olası etkileri tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan Resveratrol (RSV) üzümde ve bundan üretilen kırmızı şarapta bol miktarda bulunan, doğal bir hidrokisistilbendir. RSV güçlü serbest radikal süpürücü, antidiyabetik ve antioksidan özelliğe sahip olması nedeniyle bu hasarın önlenmesinde yararlı olabilir (6). RSV, SIRT 1 proteinini aktive etmektedir. SIRT 1 metabolizmada, yaşlanmada, kanserde muhtemelen uzun yaşamda önemli bir düzenleyicidir ve strese bağlı sinyal transdüksiyon yollarında kritik bir bağlantıya sahiptir. SIRT-1'in glukagon salgılayan alfa hücrelerinde olmak üzere pankreatik beta hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında yerleşimi saptanmıştır. SIRT-1'in insülin direncini azalttığı ortaya konmuştur (7).

16 kDA ağırlığında bir molekül olan Leptin yağ depo miktarı ile ilişkili olarak yağ dokusundan sentezlenen ve salgılanan bir proteindir (8). Bunun dışında beyin dahil birçok kaynağın leptin üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (9).

Hem leptin hem sirtuinler diyabetle ilişkili oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10,11). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların böbrek dokularında RSV'nin yapısal etkilerini ve bunların leptin ve sirtuin protein dağılımları üzerindeki etkisini göstermeyi amaçladık.

2- GENEL BİLGİLER

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Tanımı ve sınıflandırılması

Diabetes Mellitus (DM) toplumda sık görülen ve her geçen gün giderek artan bir sağlık sorunudur. Bu yüzden hastalık önemli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 170 milyon DM hastası bulunmaktadır. Diyabetiklerin sayısının, 2030 yılına kadar 370 milyona yükseleceği ön görülmektedir (12). Diabetes mellitus kronik hiperglisemi ile seyreden, etyolojisi değişik bir dizi metabolik bozukluğu ifade eder. İnsülin salınımında azalma ya da insülin etkisinin yetersiz olması ve bazen de her ikisinin kusurlarından kaynaklanan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozuklukları kronik hiperglisemiye yol açar (13).

Son yıllardaki gelişmeler DM'nin sınıflandırılmasında yeni düzenlemelerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Bundan dolayı 1995 yılında Amerikan Diyabet Cemiyeti'nin desteğiyle kurulan ve çalışmaya başlayan International Expert Committee, 1980'li yıllardan beri yapılan bütün çalışmaları incelemiş ve yeniden değerlendirerek DM'nin sınıflamasını gözden geçirmiştir. International Expert Committee'nin önerdiği DM'nin etyolojik sınıflaması şu şekildedir (14);

1. Tip 1 Diabetes Mellitus
 - 1.1. Otoimmün diabetes Mellitus
 - 1.2. İdiyopatik Tip 1 Diabetes Mellitus
2. Tip 2 Diabetes Mellitus
 - 2.1. Şişman olmayan (metabolik kontrol için insülin gerektiren diabetes mellitus)
 - 2.2. Şişman (insülin gerektirmeyen diabetes mellitus)
3. Diğer özgün diyabet tipleri
 - 3.1. Beta hücre işlevlerinde genetik kusurlar
 - 3.2. İnsülin işlevlerinde genetik kusurlar
 - 3.3. Ekzokrin pankreasın hastalıkları
 - 3.4. Endokrinopatiler
 - 3.5. İlaç ya da kimyasalların neden olduğu diyabet
 - 3.6. Enfeksiyonlar

- 3.7. İmmün mekanizmaların neden olduğu diyabetin sık görülmeyen, özel tipleri
- 3.8. Diyabetin nadir olarak eşlik ettiği genetik sendromlar (14).

2.1.2 Diyabetin Patogenezi ve Komplikasyonları

Diyabetin ortaya çıkmasında değişik patogenetik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Tip 1 diyabetin oluşmasında primer olay otoimmün mekanizma ile veya bilinmeyen bir şekilde pankreasdaki beta hücrelerinin harabiyeti ile insülin eksikliğinin ortaya çıkması; tip 2 diyabette ise beta (β) hücre yetersizliğine bağlı insülin salınımında bozulma ve hedef dokulardaki insülin direnci nedeniyle insülin etkisindeki azalmadır (13,14).

Diyabetik hastalarda morbidite ve mortaliteye yol açabilecek çok sayıda kronik komplikasyon görülebilir. Bunlar genellikle hiperglisemi başladıktan uzun süre sonra ortaya çıkarlar (3). Diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının neden olduğu morbidite ve mortalite; kapiller bazal membran kalınlaşmasıyla birlikte olan mikrovasküler hastalık, hızlanmış arteriol sklerozu ile birlikte görülen makrovasküler hastalık, somatik ve otonom sinir sisteminin her ikisini de içeren nöropati, kas zayıflığı ile birlikte görülen nöromuskuler disfonksiyon ve enfeksiyonlara direncin azalması ile karakterizedir. Böyle kronik komplikasyonlar göz, böbrek, kalp, sinir ve kan damarlarını etkiler (13-15).

Diabetes Mellitus'un akut komplikasyonları:

- 1- Diyabetik ketoasidoz
- 2- Hiperozmolar nonketotik koma
- 3- Hipoglisemi
- 4- Laktik asidoz

Diabetes Mellitus'un kronik komplikasyonları:

- 1- Diyabetik mikroanjyopati ve makroanjyopati
- 2- Diyabetes mellitusun gastrointestinal, ürolojik, reproduktif, kardiyak komplikasyonları
- 3- Diyabetik retinopati
- 4- Diyabetik nöropati
- 5- Diyabetik nefropati
- 6- Diyabetik ayak

DM sıklığındaki artış ve diyabetiklerin yaşam süresindeki uzamaya bağlı olarak diyabetik nefropati (DNp) sıklığı da giderek artmaktadır (14,16).

2.1.3. Deneysel diyabet oluşturmada Streptozotosin

Streptozotosin (STZ), kimyasal yolla Tip I diyabet oluşturmak için kullanılan bir ajandır. Bunun dışında alloksan, çinko şelatörleri (dithizone, 8-hidroksikinolin), rodentisid-vacor, diet nitrozaminleri vb. kimyasallar kullanılmaktadır. Diğer ajanlara göre avantajı daha fazla olması nedeniyle genellikle STZ kullanılmaktadır (1). STZ' nin kimyasal yapısı '2 deoksiglukozun N- metil- nitrozüre' türevidir. 'Streptomyces achromogenes' kültürlerinden elde edilen STZ antineoplastik ve diyabetojenik dar spektrumlu bir antibiyotiktir.

STZ' nin diyabetojenik etkisi pankreas beta hücrelerini harabiyetine dayanır. Hem pankreatik insülin salınımının hem de tirozin kinaz aktivitesinin baskılanmasına neden olan hedef doku hücrelerindeki insülin reseptörlerinde azalma ile etkisini göstermektedir.

Hipergliseminin derecesi ve süresi, ilacın dozuna ve deney hayvanına bağımlıdır. Kedi, köpek, fare ve sıçanda kilo başına 50 mg/kg' lık doz, diyabet oluşturulması açısından yeterli iken tavşanda 300 mg/kg, pilide 130 mg/kg gereklidir. Subdiyabetojenik tekrarlayan dozlarda (40 mg/kg) uygulandığında ise otoimmün diyabete benzeyen bir model geliştirmektedir (17).

Diyabetojenik ajan uygulanması sonrasında kan glukozunda 3 fazlı bir yanıt oluşmaktadır:

1. Geçici hiperglisemi fazı: İlk 2 saatte oluşur; karaciğerde glikojenin ani yıkılımina bağlı olarak kan şekeri yükselir. Bu dönemde plazma insülin düzeyleri düşüktür.

2. şiddetli hipoglisemi fazı: Uygulamadan yaklaşık 6 saat sonra başlar. Diyabetojenik ilaç uygulamasını izleyen ilk 24 saat içindeki ölümlerden bu hipoglisemi sorumludur, bu nedenle diyabet indüksiyonundan sonraki ilk 24 saatlik dönemde hayvana şekerli su verilmesi tavsiye edilir. Hipoglisemi, beta hücrelerinin ölümüyle birlikte aşırı miktarda insülinin kana salınımına bağlıdır ve plazma insülin düzeyleri çok yüksektir.

3. Kalıcı hiperglisemi fazı: Diyabetojenik ajan uygulanmasından 10-12 saat sonra başlar. Bu fazda plazma insülin düzeyleri düşer ve aylarca düşük düzeylerde seyreder.

Kimyasal diyabette böbrekte oluşan değişiklikler insandaki nefropatinin çok benzeridir (1).

2.2 Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, süreklilik gösteren mikroalbüminüri, erken kan basıncı yükselmesi, glomerüler filtrasyon hızı (GFH)'nda düşme ile karakterizedir. Tip 1 diyabetiklerde, diyabet süresiyle ilişkili olarak artan mikroalbüminüri ve proteinürinin, 25- 30 yıllık toplam insidansı

%35- 40 olarak bildirilmiştir. Mikroalbuminürik hastaların 1/3'ünde albümin atılımı normal sınırlar içindeyken, 1/3'ünde aşikar proteinüriye ilerler (16). Proteinürik hastaların %10- 50'sinde son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişirken, %40- 50'si ise kardiyovasküler komplikasyonlarla erken dönemde kaybedilir. Birçok çalışma mikroalbuminüri proteinüri gelişme insidansının tip 1 ve 2 diyabetiklerde birbirine yakın değerlerde olduğunu ortaya koymuştur (19). Gelişmiş ülkelerde, yeni tanı almış SDBY nedenleri içindeki DNp oranı %30- 40 civarındadır. Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DNp gelişimini etkileyen risk faktörleridir. Glisemik kontrol bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyetdeki yüksek protein, albuminüri varlığı, sigara kullanımı prognozu kötüleştirir. Genetik yatkınlık varlığında, hemodinamik ve metabolik faktörler arasındaki karmaşık etkileşim DNp gelişimini kolaylaştırmaktadır (20).

Diyabetik nefropati patogeneğinde, glukozun doğrudan toksik etkileri, poliöl yolu aktivasyonu, protein, lipid, lipoprotein, aminoasitlerin glikasyonu ve ileri glikasyon ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, çeşitli büyüme faktörlerinin artmış aktivitesi ve renin-anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS) rol oynamaktadır. DNp gelişimi için hiperglisemi gerekli olsa da yeterli değildir; bazı hastalarda kötü glisemik kontrol olmasına rağmen nefropati gelişmez. Bu durum patogeneğinde diğer faktörlerin de rolünü ortaya koymaktadır. DNp gelişiminde hipertansiyon (HT) da kritik öneme sahiptir. Glomerüler kapillerlere geçen basınç, destek hücrelerinde mekanik strese neden olur ve kollajen gibi matriks elemanlarının sentezini uyarır (19).

Hipergliseminin ortaya çıkmasıyla başlayan DNp gelişim süreci ilk aşamalarında klinik bulgu vermeyebilir. Uygun şekilde tedavi edilemeyen hastalarda zaman içerisinde böbrek işlevi bozulur. Hipertansiyon genellikle bu sendroma eşlik eder. Diyabetik nefropatiyi semptomların görülmediği prelinik dönem ve klinik belirtilerin ortaya çıktığı klinik dönem olmak üzere iki evreye ayırabiliriz.

Diyabetik nefropati; aşağıda belirtilen 5 evreden oluşmaktadır.

1- Hipertrofi ve hiperfiltrasyon dönemi: Devamlı hiperfiltrasyonun ve böbrek hipertrofinin ön plana çıktığı, fakat henüz albuminürinin normal sınırlarda olduğu zaman dilimidir. Hayvan modellerinde diyabetin daha başlangıç döneminde böbrekte protein sentezinin arttığı ve böbrek hacminin arttığı bildirilmiştir.

2- Sessiz dönem: Klinik belirti vermeyen kalıcı böbrek hipertrofisi ve hiperfiltrasyonun gözlemlendiği devredir. Glomerül bazal membranda kalınlaşma, mezangiyum hacminde artma gözlenir.

3- Mikroalbuminüri dönemi: İdrarla atılan günlük albumin miktarı 30- 300 mg'a yükselmiştir. Böbrekte glomerüler bazal membran kalınlaşması, mezangiyumda artış, filtrasyon yüzeylerinde kalınlaşma gibi histolojik değişiklikler gözlenir.

4- Aşkar nefropati dönemi: Hastaların hemen hepsinde hipertansiyon ve idrarlarında 300 mg/gün üzerinde albumin vardır. Diabetik nefropatide rastlanılan histopatolojik değişiklikler saptanır.

5- Son dönem böbrek yetmezliği: Giderek şiddetini arttıran ağır böbrek yetmezliği, üremi ve aşkar proteinüri gözlenir. Genel replasman tedavisi başlanmalıdır (17).

Hemodinamik değişiklikler ve glomerül hipertrofisi sıçanlarda streptozotosinle oluşturulan deneysel diyabette de gösterilmiştir. İleri glikolizasyon son ürünlerinin artışı ile ilişkili metabolik kusura bağlı olarak GBM'de kalınlaşma ve mezangiyal matriks artışı meydana gelir. Glomerül hipertrofisi ile ilişkili hemodinamik etki de glomerül sklerozunun gelişiminde rol oynar (20).

2.2.1 Diyabetik Nefropatide Patolojik Değişiklikler

Diyabetik nefropati, özellikle tip 1 DM' de oldukça sık rastlanan bir komplikasyondur. Tip 1 ya da Tip 2 diyabette aynı histolojik değişikliklere rastlanır. Diyabetik nefropatide böbrek boyutları artmıştır (19). DM' deki böbrekdeki patolojik değişiklikler, intrarenal ve ekstrarenal arterlerde arterioskleroz ve glomerül kapiller yumağındaki mikroanjyopatik değişiklikler sonucunda ortaya çıkar. Dört tip lezyon tanımlanmıştır:

1- Afferent ve efferent arteriyollerin arteriyosklerozu

2- Böbrek arteri ve dallarının arteriyosklerozu

3- Glomerüloskleroz

4- Peritübüler glikojen (Armani- Ebstein lezyonu), yağ ve mukopolisakkarit birikimi (17).

Ayrıca bu bulguların dışında afferent ve efferent arteriollerde tüm damar duvarını tutan ve zamanla duvarın yerini alan hyalinizasyon izlenir.

Diyabetteki glomerüler lezyonlar başlıca 3 çeşit olarak tanımlanmıştır:

1-Diffüz glomerüloskleroz: En sık görülen lezyon tipi budur. Birçok glomerülü tutar. Kapiller yumağın bazal membranında kalınlaşma ve mezangiyumda bazal membrana benzer madde artışı vardır. Bu bölgeler homojen pembe, PAS (+) boyanır. Zamanla glomerül kapiller lümeninde kalınlaşma ve daralma, mezangiyum matriksinde genişleme ve bu nedenle tüm glomerülde fibröz dokuya dönüşüm sonucu işlev kusuru gelişir ve böbrek yetmezliğine neden olur.

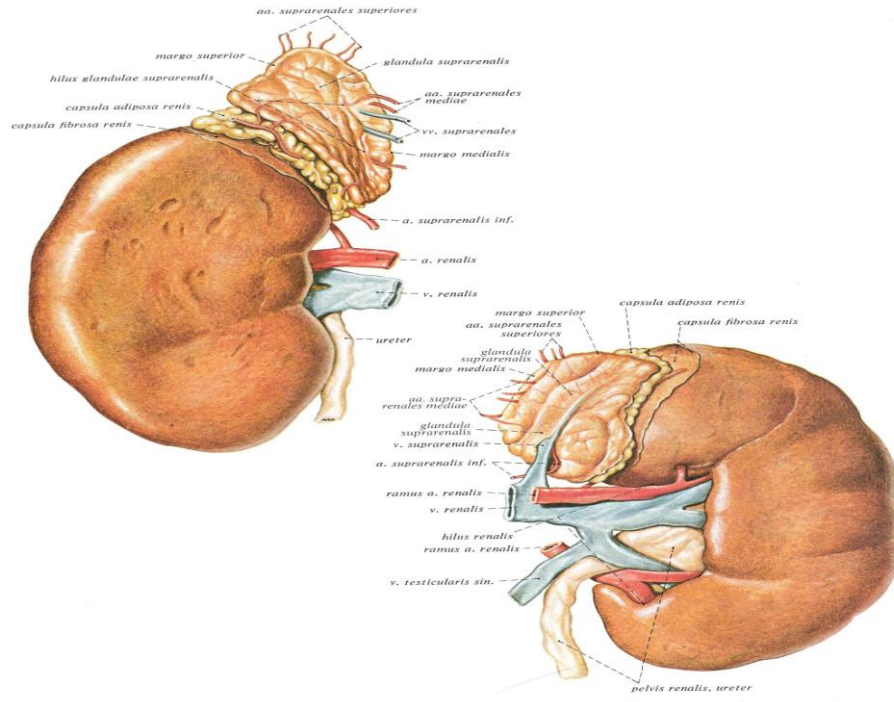
2- Nodüler glomerüloskleroz: Çevresel glomerül lobunun merkezinde, yuvarlak, PAS (+) hyalin bir kitle vardır. Bu hyalin nodülde mezangiyal hücre nükleusları yer alır. Bu nodüllere “Kimmelstiel- Wilson nodülü” denir. Büyüyen nodül, kapillerleri Bowman kapsülüne doğru sıkıştırır. Sonunda glomerül iskemiye bağlı tahrip olur. Bu histolojik görünüm ağır proteinüri, hipertansiyon, böbrek yetmezliği gibi bulgularla beraber olur.

3- Eksüdatif lezyon: Diyabete özgü olmayan ve en az rastlanan lezyondur. Bowman kapsülü boşluğunda yer alan, glomerüller yumağın kapsüler yüzeyine bağlı, yuvarlak, homojen, eozinofilik yapılar olup bazen kapiller kıvrımları çepeçevre sarmıştır (20,21).

2.3 Böbrek

2.3.1 Böbrek Anatomisi

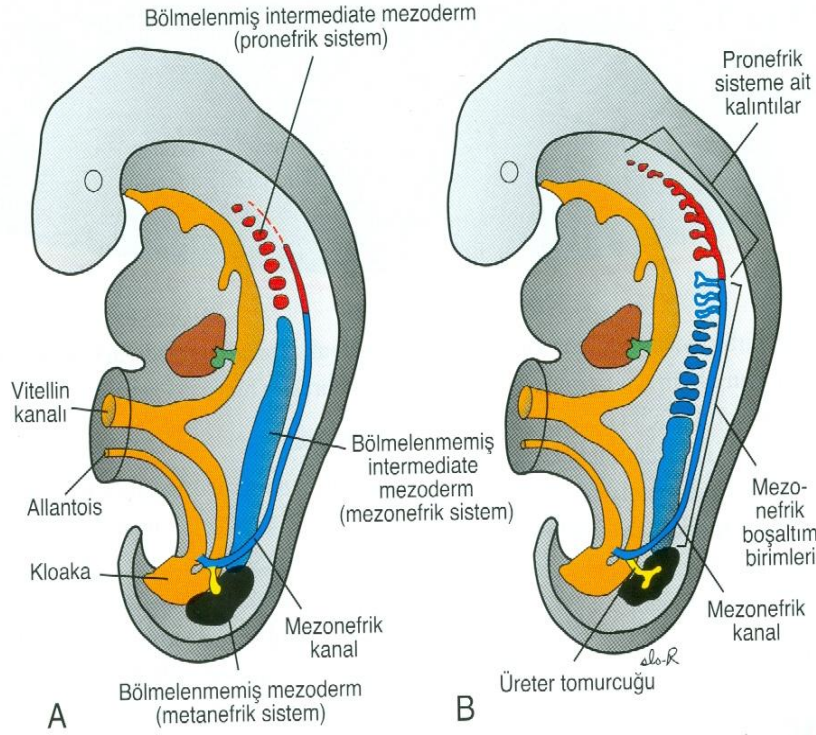
Karın arka duvarının en üst kısmında ve kolumna vertebalisin her iki yanında bulunurlar. Sağ böbrek sola nazaran biraz daha aşağıda lokalizedir (22,23). Böbrekler yaklaşık 11 cm uzunluğunda, 6 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığında olup, ortalama ağırlıkları yetişkin erkeklerde 150 gr, kadınlarda ise 135 gr kadardır. Sağ böbrek ön yüzde karaciğerin sağ lobu, duodenumun 2. kısmı ve fleksura coli dekstra ve sağ böbreküstü bezi ile komşudur. Sol böbrek ön yüzde mide, dalak, pankreas, fleksura coli sinistra, jejunum kıvrımları ve sol böbreküstü bezi ile komşudur. Her iki böbrek arka yüzde ise musculus diyafragma ve altta içten dışa doğru musculus psoas major, musculus quadratus lumborum ve musculus transversus abdominis ile komşudur (22).



Resim1: İnsanda sağ böbreğin önden ve arkadan görünümü (24).

2.3.2 Böbrek Embriyolojisi

Dördüncü haftanın başında embriyonun horizontal planda katlanması sırasında ara mezoderm ventrale doğru çöker ve somitlerle olan bağlantısını kaybeder. Dorsal aort'un her iki yanında bulunan ürogenital kabartı adı verilen yapı oluşur. Bu yapı daha sonra üriner ve genital sistemleri oluşturacaktır. Üriner sistemi oluşturacak olan ürogenital kabartı kısmı nefrojenik kordon adını alırken, genital sistemi oluşturacak kısım, genital kabartı olarak adlandırılır (25). Nefrojenik kordonun servikal ve yukarı torasik bölgeleri segmentli düzenlenmiş hücre topluluklarından ibaret olup, bu segmentlere nefrotom denir. Nefrojenik kordonun alt torasik, lumbal ve sakral yöreleri ise segmentsizdir. Bu segmentli ve segmentsiz yörelerde birbirini izleyen üç üriner sistem gelişir. Sırasıyla segmentli yörede pronefroz, segmentsiz yörelerde mezonefroz ve metanefroz gelişir (26).



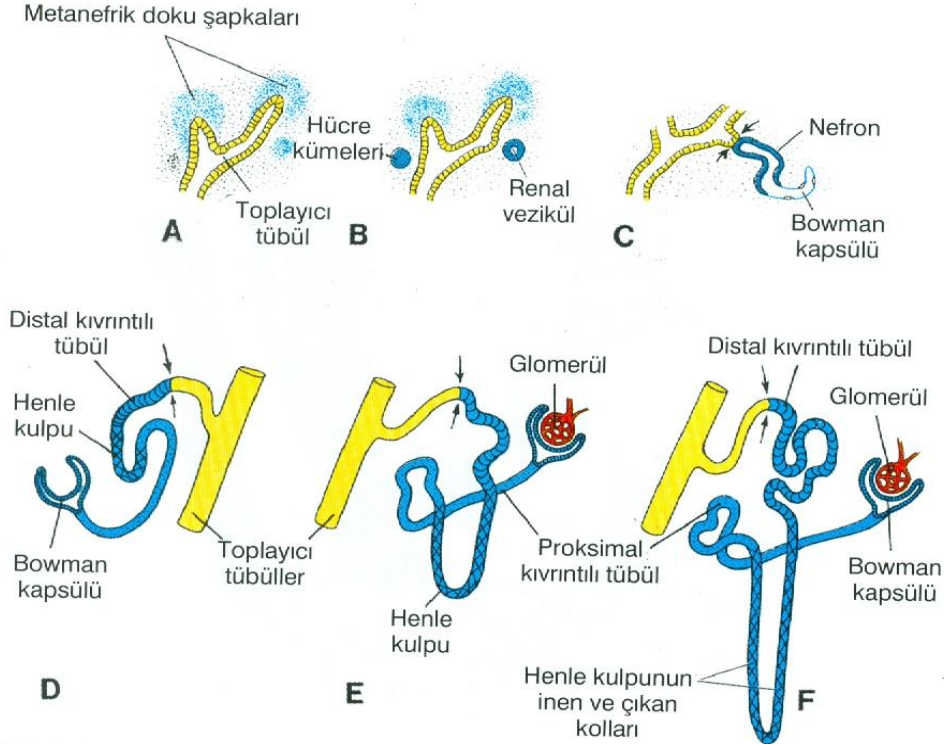
Şekil 2: A. İntermediate mezodermin pronefrik, mezonefrik ve metanefrik sistemler arasındaki ilişki. B. 5 haftalık embriyoda pronefrik ve mezonefrik sistemlerin boşaltım tübüleri (27).

Metanefroz ya da kalıcı böbrekler beşinci haftanın başında gelişimine başlarlar ve yaklaşık dört hafta sonra da fonksiyonel hale gelirler. Kalıcı böbrekler iki farklı kökene sahiptir:

- 1- Metanefrik divertikül (üreter tomurcuğu)
- 2- Metanefrik blastem ya da metanefrik mezoderm (25).

Metanefrik blastem dokusundan, kalıcı böbreğin işlev gören birimi nefron gelişirken üreter tomurcuğundan ise kalıcı böbreğin toplama boruları gelişmektedir. Metanefrozun bu her iki taslağı da mezodermal kökenlidir (26). İlk dört toplayıcı tübül jenerasyonları genişler ve birleşerek major kaliksları oluşturur. İkinci oluşan dört jenerasyon birleşir ve minör kalikslar oluşur (25). Metanefrik blastem dokusu içinde dallanarak yayılan yeni oluşmuş toplama borularının distal son kısımları, metanefrik blastem dokusu tarafından bir kep şeklinde örtülür. Kavis yapmış her bir toplama borusunun son kısmı, metanefrik blastem dokusundaki bu kep yapmış mezoderm hücrelerini indükleyerek renal ya da metanefrik vezikülleri oluştururlar. Bu veziküller nefronların kökenidirler. Önce uzayan bu veziküller ilkel

nefronları meydana getirirler. Proksimal ucu kapiller yumağı tarafından invajine olur ve böbrek cisimciğini yapar. Distal ucu toplama borularına açılır. Böylece, böbrek cisimciğiyle toplama boruları arasında bağlantı kurulmuş olur. Nefronun daha sonra uzaması tübüllerin kıvrılmasıyla ergindeki yapısını kazanır (26).



Şekil 3: Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi (27).

Nefronlar doğuma kadar oluşmaya devam ederler. Böbrekler glomerüler kapillerlerin diferansiyasyonundan kısa bir süre sonra, gestasyonun 10. haftasından itibaren, idrar üretmeye başlarlar (27).

2.3.3 Böbrek Histolojisi

Böbrekler dış kısımdan ‘Capsula fibrosa’ adı verilen ince ve sıkı bir bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Kapsülün dış kısmı, travmadan korunmayı sağlayan kalın bir yağ dokusuyla kuşatılmıştır (28). Böbreğin dış kenarı konvektir. Her böbreğin medial yüzü ise konkavdır ve fibröz kapsül burada kesintiye uğrar. Medial kenarın orta kısmında organın hilumu yer alır. Hilum sinirlerin girdiği, kan ve lenf damarlarının girip çıktığı ve üreterin çıktığı yerdir (29). Üreterin üst ucu hilumu dolduran bir genişleme yaparak pelvis renalis oluşturur. Böbrek pelvisi, böbrek dokusu içine kaliks major denilen 2–3 tane kese şeklinde uzantı gönderir. Her

kaliks majorden ise sayıları toplam 8–12 tane olan kaliks minorler dallanır. Tüm böbrek parankimi hilumdan içeriye doğru uzanan ve sinus renalis denilen bir boşluğu kuşatır (28). Böbrek uzunlamasına ortadan kesilip, iki eşit kısma ayrıldığında çıplak gözle iki ayrı bölge gözlenir. Bunlar kırmızımsı kahve renkteki daha koyu dış kısım olan korteks ve daha soluk iç kısım olan medulladır (23). Medullada sayıları 10–18 kadar olan ve medullar piramitler olarak bilinen konik ya da piramidal şekilli yapılar bulunur. Medullar piramitlerin tabanı kortekse bakar ve buradan kortekse doğru birbirine paralel olarak uzanan tübül demetleri veya medullar ışınlar (stria medullaris) çıkar. Her medullar ışın, böbreğin fonksiyonel birimleri olan birkaç nefronun düz parçası ile birlikte bir ya da çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur. Bir medullar piramid ve etrafını saran kortikal doku böbrek lobu adını alır (29). Her böbrek lobunun tepesi, bir minor kaliksle çevrelenen bir papillada sonlanır. Her minor kaliks, bir papilladan gelen idrarı toplar. Minor kaliksler, major kaliksleri, ardından pelvisi oluşturmak üzere birleşirler (30). Komşu medulla piramitleri korteks dokusunun medullaya yaptığı uzantılar olan Bertin sütunlarıyla birbirinden ayrılmışlardır (31). Aslında Bertin sütunları metanefrik blastemdeki primitif lobların kaynaşma bölgelerinin kalıntılarıdır (30). Böbreğin işlevsel birimi olarak kabul edilen ürinifer tübüller, böbrek parankimi içerisinde yer alır. Ürinifer tübüller; nefron ve toplayıcı kanal olarak farklı iki kısımdan oluşurlar (30,31). Böbreğin işlevsel birimi nefrondur. Her böbrek bir ile dört milyon nefron içerir (29). Nefron iki bileşenden oluşmaktadır. Bunlar böbrek cisimciği (Bowman kapsülü ve glomerül) ve uzunca bir böbrek tübülüdür. Böbrek tübülleri; proksimal kıvrımlı tübül, henle kulpunun ince ve kalın uzantıları ve distal kıvrımlı tübül ile toplayıcı tübül ve kanallardan oluşmaktadır (29,30). Toplayıcı kanallar ise nefronlarda üretilen idrarı toplayarak böbrek pelvisine iletirler. Böbrek cisimciklerin dağılımına bağlı olarak nefronlar; kortikal veya jukstamedullar olabilirler. Kortikal nefronların böbrek tübülleri kısa bir Henle kulpuna sahiptir. Jukstamedullar nefronların böbrek tübülleri, medulla derinliklerine uzanan uzun bir Henle kulpuna sahiptir (30). Her jukstamedullar nefron yaklaşık 40 mm uzunluğundadır (31). Bütün nefronların ancak yaklaşık yedide biri jukstamedullar nefronlardır (29).

2.3.3.1 Böbrek cisimcikleri

Böbrek cisimciği (Malpighi cisimciği); glomerül ve onu saran Bowman kapsülünden oluşur. Glomerül üç yapıdan oluşmaktadır;

1. Pencereci endotel hücreleri ile döşenen glomerüler kapillerler

2. Mezangial matrikse gömülmüş mezangiyal hücrelerce oluşturulan mezangium
3. Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan podositler (29,30).

Bowman kapsülünün visseral (iç) tabakası glomerülün kapillerlerini sarar. Dış tabaka böbrek cisimciğinin en dıştaki sınırını oluşturur ve bu yapı Bowman kapsülünün pariyetal tabakasıdır. Bowman kapsülünün iki tabakası arasında, kapiller duvarından ve visseral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunur. Her böbrek cisimciğinde, getirici afferent arteriyollerin girdiği ve götürücü efferent arteriyollerin çıktığı bir damar kutbu, proksimal tübüllerin başladığı bir idrar kutbu bulunur.

Embriyonik gelişim sırasında Bowman kapsülünün pariyetal tabakasının epiteli nispeten değişmeksizin kalırken, visseral tabaka büyük ölçüde modifiye olur. Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan podositler; yassı, ayakcıklı ve çekirdeklerinin olduğu kısımları kabarık olarak gözlenen hücrelerdir. Sitoplazmalarında çok sayıda serbest ribozom, belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyonlar, kasılabilmeyi sağlayan aktin mikrofilament demetleri içermektedir (29,32). Bu iç tabakada bulunan ve podosit adı verilen hücrelerin gövdelerinden birkaç primer uzantı şekillenir. Her bir primer uzantı pedisel denen çok sayıda sekonder uzantı oluşturur. Pediseller çok az organel içermelerine ya da hiç içermemelerine rağmen, çok sayıda mikrotübül ve mikrofilament bulundurlar (29). Pedisellerin bütün yüzeyi podokaliksin adı verilen negatif yüklü siyaloprotein yapısındaki glikokaliksle kaplıdır (31).

Podositlerin hücre gövdeleri ve primer uzantıları bazal laminaya değmez fakat pediseller glomerül kapillerlerine sarılmış durumda olup 25 nm' lik sabit bir mesafe olacak şekilde bazal lamina ile temas halindedirler. Bu aralıklar filtrasyon (süzme) yarıklarını oluştururlar. Filtrasyon yarıkları arasında adeta bir köprü gibi uzanan 6 nm kalınlığında bir diyafram bulunmaktadır (29). Filtrasyon yarıkları, membranöz materyal olan filtrasyon yarığı diyaframı ile birbirlerine bağlanırlar. Filtrasyon yarığı diyaframı, aktin filamentlerine pedisel içinden CD2AP proteini ile tutunan nefrin proteininden oluşur. Nefrinin endotel pencerelerinden ve bazal laminadan moleküllerin geçişini geciktirdiği sanılmaktadır (30).

Glomerüler filtratın süzüldüğü ilk bariyer olan glomerüler kapillerlerin endotel hücreleri ince bir sitoplazmaya sahiptir. Organellerin çoğu sitoplazmanın çekirdek çevresinde kalınlaştığı kısımda yoğunlaşmıştır. Pencere kapillerlerin bulunduğu diğer organlarla kıyaslandığında, pencereleri daha büyük ve endotel hücreleri daha fazla sayıdadır. Ayrıca bu endotel hücreleri arasında, diğer pencere kapillerlerde gözlenen kapiller açıklıklarını birbirine bağlayan ince diyafram yapısı bulunmaz (29). Böylelikle endotel hücreleri, su, üre,

glikoz ve küçük proteinlere geçirgendir. Endotel hücrelerinin yüzeyi büyük anyonik proteinlerin geçişini engelleyen negatif yüklü glikoproteinlerle kaplıdır. Glomerül kapillerlerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın bir bazal membran (240–340 nm) bulunmaktadır. Bu kalın bazal membran, kapiller ve podositin oluşturduğu bazal laminaların birleşmesinden meydana gelmiştir. Bazal lamina; tip IV kollajen, fibronektin, laminin ve heparan sülfattan zengindir (30). Elektron mikroskobu ile incelendiğinde glomerül bazal membranında üç tabakalı bir yapı gözlenir. Ortada elektron yoğun koyu bir tabaka (lamina densa) ve her iki yanda elektron geçirgen açık iki tabaka (endotel tarafında lamina rara interna ve podosit tarafında lamina rara eksterna) yer almaktadır. Podositlerin ayakçıkları (pedisel), ortak bazal membran ve glomerül kapillerlerinin pencereci endotel hücreleri hepsi böbreğin süzücü membranını oluştururlar. Bu yapı kapillerlerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran böbreğin süzücü duvarını oluşturan bir filtrasyon bariyeridir (29,32). Normalde filtrasyon bariyeri hücreler ve büyük molekülü proteinlerin geçişine izin vermemektedir (33). Glomerüler süzme bariyerinin bileşenlerine ek olarak, plazma ultrafiltratındaki moleküllerin geçişini kontrol eden diğer sınırlayıcı faktörler ise boyut ve elektrik yüküdür (30).

Glomerül kapillerlerinde, podositler ve endotel hücrelerinin yanı sıra iki ya da daha fazla sayıdaki kapillerlerin duvarına tutunan mezangiyal hücreler yer alır (29). Glomerüler kapillerler arasında bulunan mezangiyum, mezangiyum hücreleri ve mezangiyal matriksten oluşan intraglomerüler bir yapıdır. İntraglomerüler mezangiyal hücreler, ekstraglomerüler mezangiyal hücrelerle devam edebilirler. Ekstraglomerüler mezangiyal hücreler makula densa, afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin sınırlandırdığı boşlukta bulunurlar. Mezangiyal hücreler düz kas hücreleri ve makrofajların özelliklerine sahip özelleşmiş perisitlerdir. Bu hücreler; kasılabilen, fagositoz yapabilen, çoğalabilme yeteneğine sahip, matriks ve kollajen sentezleyen, prostoglandin ve endotelin salgılayan hücrelerdir. Endotelinler afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin kasılmasını uyarır. Süzme bariyerini geçemeyen immunglobulinler ve kompleman molekülleri mezangiyal matrikse girebilirler. Matrikste immunglobulinlerin birikimi, glomerülün tıkanmasına yol açan immun yanıtın tetikleyicisi olan sitokinlerin mezangial hücrelerce üretimini artırır (30,31).

2.3.3.2 Proksimal tübül

Böbrek cisimciğinin idrar kutbundan başlayan proksimal tübül, nefronun en uzun ve geniş kısmıdır. Yaklaşık olarak 14 mm uzunluğunda ve 60 µm çapında olup korteksin önemli bir

kısmını proksimal tübül kesitleri oluşturur. Proksimal tübülün kıvrıntılı (Pars kontortus) ve düz parça (Pars rekta) olmak üzere iki bölümü vardır. Kıvrıntılı parça korteksde yer alırken kıvrıntılı parçanın devamı olan düz parça medullada seyrederek Bowman kapsülünün paryetal yaprağının tek katlı yassı epitel proksimal kıvrıntılı tübüllerin tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitel şeklinde devam eder. Bu epitel hücrelerinin yüksekliği fonksiyonel duruma bağlı olarak kübikten prizmatığe kadar değişebilir. Işık mikroskobu düzeyinde incelendiğinde proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinin eozinofilik ve granüllü bir sitoplazmaya sahip oldukları gözlenmektedir (31). Bu eozinofilik boyanma, epitel hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun mitokondriyonlar içermelerinden kaynaklanmaktadır (28). Epitel hücrelerinin apeksinde fırçamsı kenarı oluşturan, yaklaşık 1µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillus bulunur. Hücrelerin büyüklüğü nedeniyle her enine kesitte, üç ile beş adet küre biçiminde çekirdek bulunur. Bu hücrelerin apikal sitoplazmalarında, mikrovillusların tabanları arasında makromolekülleri emme kapasitesinde etkin rol oynayan çok sayıda kanalcık bulunmaktadır. Apikal membranların içe doğru yaptığı girintiler pinositotik vezikülleri oluşturur. Makromoleküllerin parçalandığı yer olan lizozomlarla pinositotik veziküller kaynaşır ve oluşan monomerler dolaşıma geri dönerler (29). Proksimal kıvrıntılı tübül hücreleri geri emilim için uygun yapısal özelliklere sahip, apikal sıkı bağlantılarla bir arada tutulan hücrelerdir. Yoğun hücre zarı kıvrımları ve interdijitasyonları içeren bir bazolateral bölgeye sahiptirler. Hücre zarı kıvrımları daha geniş bir yüzey oluşturarak iyon geçişini kolaylaştırmaktadır. İyonların, Mg^{+2} , a bağımlı Na^+ , K^+ aktive olmuş pompa ile aktif transportu için adenosin trifosfatı (ATP) sağlayan, hücre zarı kıvrımları arasına ve hücre zarı kıvrımları arasına yerleşik olan uzun mitokondriyonlar bulunmaktadır (30). Komşu hücreler arasındaki lateral membran kenetlenmesinin çok sıkı olması yüzünden ışık mikroskobunda incelenen proksimal tübül hücreleri arasındaki hücre sınırları belirgin olarak seçilemez (29).

2.3.3.3 Henle kulpu

Henle kulpu, proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller arasındaki kısımdır. Proksimal tübülün düz kısmı, ince (ara) parça ve distal tübülün düz parçasından meydana gelmiş U şeklinde bir yapıdır. Başlıca dört kısımdan oluşur; Proksimal tübülün düz kısmı, ince inen kol, ince çıkan kol ve kalın çıkan kol (32). Medullanın dış kısmında, dış çapı 60 µm olan kalın inen kol birdenbire 12 µm'ye doğru daralarak inen kolun ince bölümü olarak devam eder. Nefronun bu bölümünün lümeni, duvar epitelinin çekirdeklerinin çok hafif şekilde lümene doğru çıkıntı

yapan tek katlı yassı epitel olması nedeniyle geniştir. Henle kulpu çok uzun olup medullanın derinliklerine dek inen jukstamedullar nefronların, medullar interstisyumunda hipertonic gradyanı sağlama konusunda özel bir önemi vardır. Medulla interstisyumundaki hipertonic ortam böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluşturmaktadır (29).

Henle kulpu idrarın konsantrasyon dilusyon işleminin oluşumunda etkili olan nefron segmentidir. İdrar maksimum 1200 miliosmol/litre (mosm/lt)'ye kadar konsantre edilebilirken, 50–100 mosm/lt'ye dek dilue edilebilmektedir. Vücutta fizyolojik koşullarda sıvı ve solüt birikmemesi için çıkarılması gereken minimum idrar miktarı yaklaşık 0,5 lt'dir (31). İdrarın konsantre edilmesini sağlayan zıt akımlar, zıt akımlar arasındaki permeabilite farkı ve enerji kaynağı henle kulpunda mevcuttur. Girişte izotonik olan filtrat Henle kulpunu terk ederken hipotonik olur. Henle kulpunun inen kolu suya geçirgen olup, sodyuma geçirgen değildir. Bunun sonucunda su interstisyel aralığa emilir ve Henle kulpunun tepesine kadar lümen içerisindeki filtrat giderek hipertonic olur. Susuzluk durumunda bu 1200 mosm/lt'ye kadar çıkmaktadır. Bu arada serbest su emilimi nedeniyle medulla ozmolalitesi azalır. Henle kulpunun çıkan kolu ise tam tersine sodyuma geçirgen olup, suya geçirgen değildir. Çıkan ince kolda NaCl interstisyel aralığa, medulla-tübül ozmolalite farkı nedeniyle pasif olarak emilirken, lümene üre salgılanır. Bu bölüm suya geçirgen olmadığından lümendeki sıvı gittikçe dilue olur. NaCl emilimi henlenin kortikal çıkan kalın kolunda ise Na/K/Cl pompası ile devam eder. Henlenin çıkan kalın kısmı antidiüretik hormon (ADH) varlığında bile suya geçirgen değildir. Sonuç olarak; lümendeki sıvı distal tübüle ulaştığında hipotoniktir (yaklaşık 150 mosm/lt). Henle kulpunun inen kolundan suyun % 40'ı, çıkan kolundan da glomerüler filtrata geçen sodyumun % 40–45'i geri emilir. Henle kulpunun inen koluna potasyum ve üre salgısı olurken, Henle kulpunun çıkan kolunda potasyum geri emilimi olur. Magnezyumda en çok Henle kulpundan geri emilir (33,34).

2.3.3.4 Distal tübüller

Henle kulpunun çıkan kalın kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korur, ancak büklümlenerek nefronun son kısmı olan distal kıvrıntılı tübüllerini oluşturur. Bu tübüller tek katlı kübik epitelle döşelidir. Distal kıvrıntılı tübüllerin, uzunluğu ve çapı ile proksimal tübüller ile kıyaslandığında daha kısa ve dar lümenli olduğu görülmektedir. Distal tübül epitel hücreleri proksimal tübül epitel hücrelerinden daha küçüktürler ve fırçamsı kenarları bulunmaz. Histolojik kesitlerde proksimal tübüllerle karşılaştırıldığında ise, distal tübüller

daha soluk ve geniş lümenli olarak gözlenmektedirler. Ayrıca proksimal tübüllerden daha kısa olduklarından, histoloji preparasyonlarında kortekste daha az sayıda distal tübül kesidi gözlenmektedir. Kesitlerde distal tübül duvarlarında daha fazla sayıda hücre çekirdeği izlenmektedir. Proksimal tübüllere özgü olan apikal kanalcık ve veziküller de distal tübül hücrelerinde görülmez. Distal kıvrıntılı tübül hücrelerinin bazal membranlarındaki yoğun invajinasyonlar ve bunlarla ilişkili mitokondriyonlar, bu hücrelerin iyon taşınmasında rol oynadıklarını göstermektedir (29,31).

Nefronun idrarın dilue edilmesinden birinci derecede sorumlu olan kısmı, distal kıvrıntılı tübüldür. NaCl ve suyun % 3-5'i burada geri emilir. Distal tübül son kısmı ve kortikal toplayıcı kanallar aldosteronun etki gösterdiği nefron kısımlarıdır. Aldosteron konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda distal tübüllerde sodyumun geri emildiği, potasyum iyonlarının dışarı verildiği bir iyon değişim bölgesi bulunur. Distal tübül aynı zamanda tübüldeki idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını salar. Bu etkinlik kandaki asit baz dengesinin korunmasında çok önemlidir. Distal tübülün ilk kısımları suya geçirgen değilken (ADH'ya cevapsız), son kısım ve kortikal toplayıcı kanallarda ADH'nın etkisi görülür ve ADH duyarlı su emilimi gerçekleşir. Bu segmentte ayrıca bikarbonat, kalsiyum ve magnezyum geri emilimi de gerçekleşmektedir (29).

Distal kıvrıntılı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait böbrek cisimciğinin damar kutbu ile temas halindedir. Bu temas noktasında distal tübül afferent arteriyol gibi farklılaşır (29). Distal kıvrıntılı tübül hücreleri bu bölgede prizmatik hale dönüşerek genellikle diğer distal tübül hücrelerinden daha dar ve uzun olarak gözlenirler. Hücrelerin çekirdekleri de bir araya toplanarak adeta biri diğerinin üzerine yerleşmiş gibi bir görünüm almıştır. Mikroskopik preparatlarda hücre çekirdeklerinin yakın yerleşimi yüzünden daha koyu görünen bu distal tübül segmentine makula densa adı verilir (29-33).

Elektron mikroskobu düzeyinde makula densa hücrelerinde organellerin daha az olduğu ve diğer distal tübül hücrelerinden farklı olarak golgi kompleksinin bazale yakın yerleştiği gözlenmiştir. Ayrıca mitokondriyonlar da bazal yerleşimli değil, sitoplazmaya dağılmış bir halde bulunmaktadır (30,32). Makula densa nefron fonksiyonunun kontrolünde önemli rol oynar (34). Aynı bölgede afferent (nadiren efferent) arteriyolün tunika mediasındaki düz kas hücreleri de modifiye olmuştur.

Normal düz kas hücrelerinin çekirdeklerinden farklı olarak yuvarlak çekirdeklere ve sitoplazmalarında Periodik Asit-Schiff (PAS) tekniği ile boyanabilen özel granüllere

sahiptirler. Bu hücelere jukstaglomerüler hüceler adı verilmektedir (29,30-33). Jukstaglomerüler hüceler renin sentezler, depolar ve serbest bırakırlar. Makula densa Henle kulpunun kalın çıkan kolundan gelen idrardaki NaCl içeriğini algıladıktan sonra renin salınımını gerçekleştirir. NaCl' nin makula densa'ya aktarımı azaldığında renin salınımı artar. Makula densa, jukstaglomerüler hüceler ve ekstraglomerüler mezangiyal hüceler (lacis hüceleri ya da polkissen) birlikte küçük bir endokrin yapı görevine sahip olan jukstaglomerüler aygıtı oluştururlar. Ekstraglomerüler mezangiyal hüceler birbirlerine ve jukstaglomerüler hücelere gap junctionlarla bağlanmışlardır (30).

Her iki böbreğin tüm nefronlarından birim zamanda geçen plazmadan üretilen glomerüler filtrat miktarı glomerüler filtrasyon değeri (GFD) olarak bilinir. Bu değeri normalde yaklaşık olarak 120–125 ml/dk'dır (29). Arteriyel kan basıncında belirgin değışikliklere karşın böbrek içi feedback mekanizmalar normalde böbrek kan akımını ve GFD'yi oldukça sabit tutarlar (34). Jukstaglomeruler aygıt, böbrek kan akımı ve glomerüler süzmenin otheregölasyonu ile ilgili tübüloglomerüler feedback mekanizmasının bileşenlerinden biridir. Diğer bileşen ise jukstaglomerüler hüceleri uyaran sempatik (adrenerjik) sinir lifleridir. Renin salınımı adrenerjik sinir liflerinden salınan norepinefrin ve dopaminle artırılır (30).

2.3.3.5 Toplayıcı tübül ve kanallar

Distal kıvrıntılı tübüllerden geçen idrar, birbirlerine bağlanarak daha büyük düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübüllere boşalır. Bu kanallar medullar piramidlerin uçlarına yaklaştıkça genişler. Küçük toplayıcı tübüller kübik epitelle döşelidir ve çapı ortalama 40 µm'dir. Bu tübüller medullanın derinliklerine doğru indikçe hücelerinin boyu uzar ve prizmatik olurlar. Işık mikroskobu ile bakıldığında toplayıcı tübül ve kanal hücelerinin hücelerarası sınırları net olarak seçilebilir (29).

Toplayıcı tübüller esas hüceler ve interkalat hüceler olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşurlar. Esas hüceler soluk, açık renkli boyanan, interkalat hüceler ise koyu boyanan hücelerdir. Esas hüceler, az sayıda mitokondriyon içerirler ve bazolateral yüzeyleri az sayıda katlantılara sahiptir. Sodyum ve suyu geri emerler, Na/K–ATPaz pompasına bağımlı durumdaki potasyumu salgırlar. İnterkalat hücelerin mitokondriyonları çok sayıdadır ve asit baz dengesinin önemli düzenleyicileridir. Aynı zamanda potasyumu da geri emer ve hidrojen salgırlar. Medullada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynamaktadır (30).

2.3.3.6 Böbreğin kan dolaşımı

İnen aortadan dallanan böbrek arterlerinden sağlanan kanı süzmek, böbreğin temel görevidir. Böbrekler dakikada kalp debisinin %20'sini alır ve dakikada kanın 1,25 litresini süzer. Vücudun tüm kanı her beş dakikada bir böbreklerden geçer. Dakikada yaklaşık olarak 125 ml filtrat üretilir fakat bu miktarın 124 ml' si geri emilir. 24 saatte 180 litre ultrafiltrat sıvısı üretilir ve idrar taşıyıcı tübüllerin içerisinde nakledilir. Bu miktarın 178,5 litresi tübüler hücrelerce tekrar alınarak kan dolaşımına geri dönerken sadece 1,5 litre kadarı idrar olarak atılır (30,34).

Her böbrek kanı aorta abdominalisin dalı olan renal arterden alır. Renal arter organa girmeden önce genellikle iki dala ayrılır. Bu dalların biri böbreğin ön bölümüne giderken diğeri ise arkasından geçerek tekrar dallanır. Bu büyük segmental arterler arasında anastomozlar yoktur. Bu arterler tekrar dallanırlar, bu dallardan böbrek piramitlerin kenarları boyunca medullayı geçen birçok interlobar arterleri oluştururlar. Korteks medulla bileşkesinde, interlobar arterler arkuat arterleri meydana getirmek için sağ tarafından birçok dal verirler ve dikey yollarını yatay yönde değiştirerek kortikomeduller sınır boyunca akarlar. Arkuat arterlerden dik açılarla dallanan interlobuler arterler ise böbrek kapsülüne dik şekilde korteks içinde ilerlerler. İnterlobuler arterler arasında hiç anastomoz bulunmaz. İnterlobuler arterlerden, glomerül kapillerlerine kan taşıyan çok küçük dallar ayrılır. Her bir dal bir glomerülusa girerek afferent arteriyolü oluşturur. Afferent arteriyol, glomerül içinde dallanarak kapillerlere ayrılır. Bu kapillerler sonra tekrar birleşerek efferent arteriyolü oluşturur ve glomerülden çıkar (31-33).

Böbrek cisimciğinin yerleşimine bağlı olarak efferent glomerüler arteriyol iki farklı kapiller ağ oluşturur. Bunlardan birincisi yüzeysel ürinifer (idrar taşıyan) tübüllerin korteksdeki parçalarını çevreleyen ve yıldızsı (stellat) vene boşalan peritübüler kapiller ağıdır. İkincisi ise vaza rekta'dır. Korteks medulla kavşağına yakın olarak yerleşik efferent arteriyollerin çok sayıda dallanması ile şekillenen vaza rektanın inen (arteriyal) bileşenleri, ürinifer tübüllerin medulla kısımlarına paralel olarak, geriye doğru dönerek medullaya doğru uzanır ve korteks medulla kavşağına çıkan (venöz) damarlar olarak geri döner (30). Glomerülden süzülen kanı taşıyan bu damarlar medullanın beslenmesini ve oksijenlenmesini sağlarlar. Kangal biçiminde yapılanmışlardır. Dış kortekste ve böbrek kapsülündeki kapillerler, yıldızsı venleri oluşturmak üzere birleşirler. Venler de arterlerle aynı yolu izler ve aynı isimleri alırlar (29). Kan, interlobuler venlerden arkuat venlere, oradan da interlobar

venlere akar. İnterlobar venler birleşerek renal veni oluştururlar. Renal ven ise vena cava inferiora açılır (28).

2.3.3.7 Böbreğin lenfatik damar ve sinirleri

Böbreğin lenfatik damarlanması tam olarak anlaşılamamıştır. Böbreklerin iki ana lenf damar ağı içerdiği bilinmektedir. Bu lenfatik damar ağları rutin histolojik kesitlerde gözlenemeyen ancak deneysel metodlarla gösterilebilen yapılardır. Birçok araştırmacıya göre böbreğin lenfatikleri sırasıyla subkapsüler bölgede ve medullada olmak üzere yüzeysel ve derin olarak lokalize olmuşlardır. Lenfatik damarların çoğu böbrek damarlarına eşlik ederler ve hilusdaki lenf pleksuslarına drene olarak böbreği terk ederler. Böbrek lenf sıvısını vena cava ve abdominal aorta çevresindeki lenf düğümleri toplar.

Başlıca çölyak ve aort gangliyonlarından kaynaklanan çoğu sempatik birçok otonom sinir lifleri böbrek arterlerine eşlik eden böbrek pleksusunu oluştururlar. Böbrekte muhtemelen nervus vagus'dan gelen duysal ve parasempatik lifler de tanımlanmıştır (31,33).

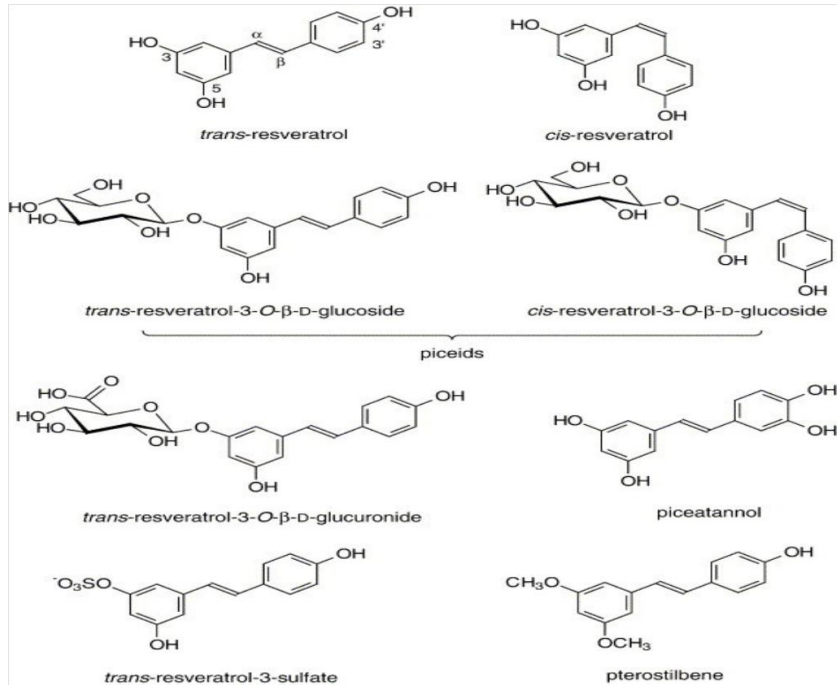
2.3.3.8 Böbrek ara dokusu

İdrar tübülleri ile kan ve lenf damarları arasındaki boşluk böbrek interstisyumu adını alır. Kortekste küçük bir alan tutarken, medullada büyüktür. İnterstisyum fibroblastlar, kollajen lifleri ve esasen medullada proteoglikandan zengin yüksek düzeyde su tutan ara madde içeren az miktarda bağ dokusu içerir. Medullada lipid damlacıkları içeren, salgı yapan ara hücreler bulunur. Bu hücreler prostaglandin ve prostasiklin sentezinde görev alırlar (29).

2.4. Resveratrol

Resveratrol (RSV), üzüm, yer fıstığı, çay, yaban mersini ve dut gibi çeşitli bitki türlerinin büyüme ve gelişme aşamalarının herhangi bir döneminde, stres olarak tanımlanan soğuk hava koşulları, ultraviyole (UV) ışınım, yaralanma, bakteri ve mantar enfeksiyonları gibi bazı dış etkiler ile karşılaştıklarında, dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amacıyla kendilerini korumak için doğal olarak ürettikleri ve genel olarak antibiyotik bileşiklerinden bir sınıf olan polifenolik fitoaleksinin sınıfına ait bir bileşiktir. RSV, mol ağırlığı 228.25 g/mol olup kimyasal olarak flavonoid yapıda, polifenolik, steroid olmayan bir bileşiktir (35,36). Resveratrolün cis ve trans izomerleri mevcuttur. UV-spektral özelliklerine göre ayrılmışlardır. Üzüm

ekstrelerinde cis formu bulunmamaktadır. Trans- resveratrol ışıktan korunduğu sürece sabit kalır.



Şekil 4 : Resveratrol'ün yapısal formülü ve yaygın analog ve eşlenikleri (35).

Resveratrolün ortaya çıkışı ve bununla ilgili ilk çalışmalar 1976'da Langcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından asmada (*Vitis Vinifera*) keşfi ile başlamıştır (37). Resveratrolün şarapta bulunduğunu ilk kez 1992 yılında Siemann ve Creasy adlı araştırmacılar göstermişlerdir. Japonya'da "Kojoto" olarak bilinen doğal ilacın *Poligonum Cuspidatum* köklerinde de resveratrol tespit edilmiştir (38). Üzümdeki resveratrolün oda sıcaklığı, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole radyasyon, ozona maruziyet gibi çevresel koşullardan etkilendiği ve oranının değiştiği gösterilmiştir (36).

Fransa'da halkın bol miktarda kırmızı et tüketmesi, yağlı bir diyetle beslenmesine rağmen kardiyovasküler rahatsızlıklardan kaynaklanan ölüm oranının düşük olmasının en önemli nedeninin, düzenli şarap tüketimi olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum "Fransız Paradoksu" olarak adlandırılmıştır. Bu tespitten sonra kırmızı şarap üzerinde yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Üzüm kabuklarında yaklaşık olarak 50–100 µg/g resveratrol bulunmaktadır. Üzümün etli kısmından çok kabuk kısmında bulunur ve kırmızı üzüm ile kıyaslandığında diğer üzümlerde çok az miktarda bulunur. Kırmızı şarabın kalp üzerine olan koruyucu etkisinde ise içerdiği 0.2–7 mg/L resveratrolün sorumlu olduğu düşünülmektedir (39).

2.4.1 Resveratrolün Etkileri

Resveratrolün etkileri birçok dokuda araştırıldığında:

Serbest radikallerin detoksifikasyonu (anti oksidan etkisi)

Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu

Lipid metabolizmasını düzenlenmesi

Trombosit agregasyonu inhibisyonu

Damar gevşetici etkisi

Anti-inflamatuar etkisi

Anti-kanserojen etkisi

Anti-diyabetik etkisi

Bakır şelasyonunu sağlaması

Östrojenik aktivitesi

Anti-mikrobiyal etkisi

İmmünmodülatör etkisi

Antiaging etkisi gibi etkileri olmasına rağmen mekanizmaları tam aydınlatılamamıştır (38,40-42).

2.4.1.1 Antioksidan Etkileri

Resveratrol, makromoleküllerin metabolizması sırasında oluşan, serbest radikal içeren reaktif oksijen radikalleri (ROR)'nin zararlı etkilerini geciktirme, önleme, sitotoksik etkilerini azaltma ve ROR nedeniyle oluşabilecek hücre zarı harabiyetini koruma özelliğine sahiptir (40).

Koroner oklüzyonla iskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturulan bir çalışmada, resveratrol koroner perfüzyonda lipid peroksidasyonu göstergesi kabul edilen Malondialdehit düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (41).

Resveratrol, LDL' nin CHO-K1 hücrelerindeki reseptörlerine bağlanması sonucu, okside LDL'nin damar düz kas ve endotel hücrelerinde oluşturduğu fonksiyon bozukluğunu önler. Böylece atherosklerotik hastalıklara karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (43).

Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir. Bir çalışmada resveratrolün güçlü hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (44).

Resveratrolün bakırı bağlamaya ilişkin yüksek kapasitesi, LDL'nin yüksek bakır bağlama özelliği olmasından dolayı önemlidir (41). Chanvitagaporgs ve arkadaşlarının yaptığı bir

çalışmada resveratrolün, LDL oksidasyonunun önlenmesinde E ve C vitamininden daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür (45).

2.4.1.2 Kardiyovasküler Sisteme Etkileri

Resveratrolün etkili bir vasküler düz kas gevşetici olduğu düşünülmektedir. Endoteli sağlam sıçan aortasında yapılan bir çalışmada resveratrolün noradrenalin ve fenilefrin ile oluşan kasılmaları inhibe ettiği gösterilmiştir (46).

Başka bir çalışmada ise, resveratrolün, damardaki kalsiyuma duyarlı potasyum kanallarına uyarıcı etkisi olduğu ve bunun endotelden bağımsız olarak ortaya çıkan gevşetici bir etki olduğu saptanmıştır (47). Endotelden salgılanan nitrik oksit (NO), iskemi reperfüzyon üzerinde koruyucu etkilere sahiptir. NO konsantrasyonu, iskemi reperfüzyondan 60 dakika önce resveratrol verilmesiyle belirgin olarak artmıştır. Buna bağlı olarak, infarkte alan boyutunda azalma görülmüştür (48).

Resveratrolün kardiyak kas fibroblast aktivitesini proliferasyon ve diferansiasyon basamaklarında engelleyerek kardiyak fibrozis ve kardiyak kas hipertrofisini engellediği gösterilmiştir (49).

2.4.1.3 Antitrombosit etkileri

Resveratrolün, agregasyon aşamasında artmış olan hücre içi kalsiyum miktarını azaltarak trombin ve ADP ile aktive edilmiş olan trombosit adezyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca kollajen, trombin ve ADP ile uyarılmış olan insan trombosit agregasyonunun resveratrol ile baskılandığı ve oluşan Tromboksan A₂ miktarının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (50).

2.4.1.4. Antiinflamatuvar etkileri

Resveratrol; prostoglandinler, kompleman sistemi, proteazlar, NO, bradikininler, adezyon molekülleri ve sitokinler gibi inflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu baskılayarak inflamasyonu engellediği düşünülmektedir (45).

Ateroskleroz, sepsis, artrit ve diyabet patogeneğinde fazlaca oluşan NO'nun peroksinitritlere dönüşerek sitotoksik etki gösterdiği ve DNA'da hasarlanma oluşturarak mutajenik ve kanserojenik etkilere yol açabildiği ortaya çıkarılmıştır. Resveratrolün LPS ve

tümör nekrozis faktör (TNF α) ile uyarılan NF- κ B aktivitesini ve de NO salınımını baskıladığı gösterilmiştir.

İnvitro bir çalışmada trans-resveratrolün doğal öldürücü hücrelerin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T lenfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü ve hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit proliferasyonunu baskıladığı, lenfosit kaynaklı interlökinlerin ve TNF- α 'nın üretimini azalttığı gösterilmiştir (51).

2.4.1.5 Antikanserojen Etkileri

Apoptozisin hücre çoğalması ile ölümü arasındaki dengede kritik bir rolü vardır; birçok sitotoksik ve sitostatik kanser ilacının kanser hücreleri için apoptozisi etkilediği bilinmektedir. İnsan promyleositik lösemi hücrelerinde resveratrolün hücrelerin çoğalmasını baskıladığı, apoptozisi etkin kıldığı, antiapoptotik onkoprotein Bcl-2 artışını engellediği ve DNA'da kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir (42).

Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin baskılanması, karsinogenezin baskılanması, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (40).

Tümör süpresör proteinlerden p53, kanser hücrelerinin apoptozisinde, hücre döngüsünü, hücre çoğalmasını baskılar. Bu yolda RSV ile uyarılmış p53'ün aktivasyonu ve apoptozis ile ERK'lerin ve p38 kinaz aktivasyonu p53'ün fosforilasyonuna bağlıdır (52).

2.4.1.6 Antidiyabetik Etkileri

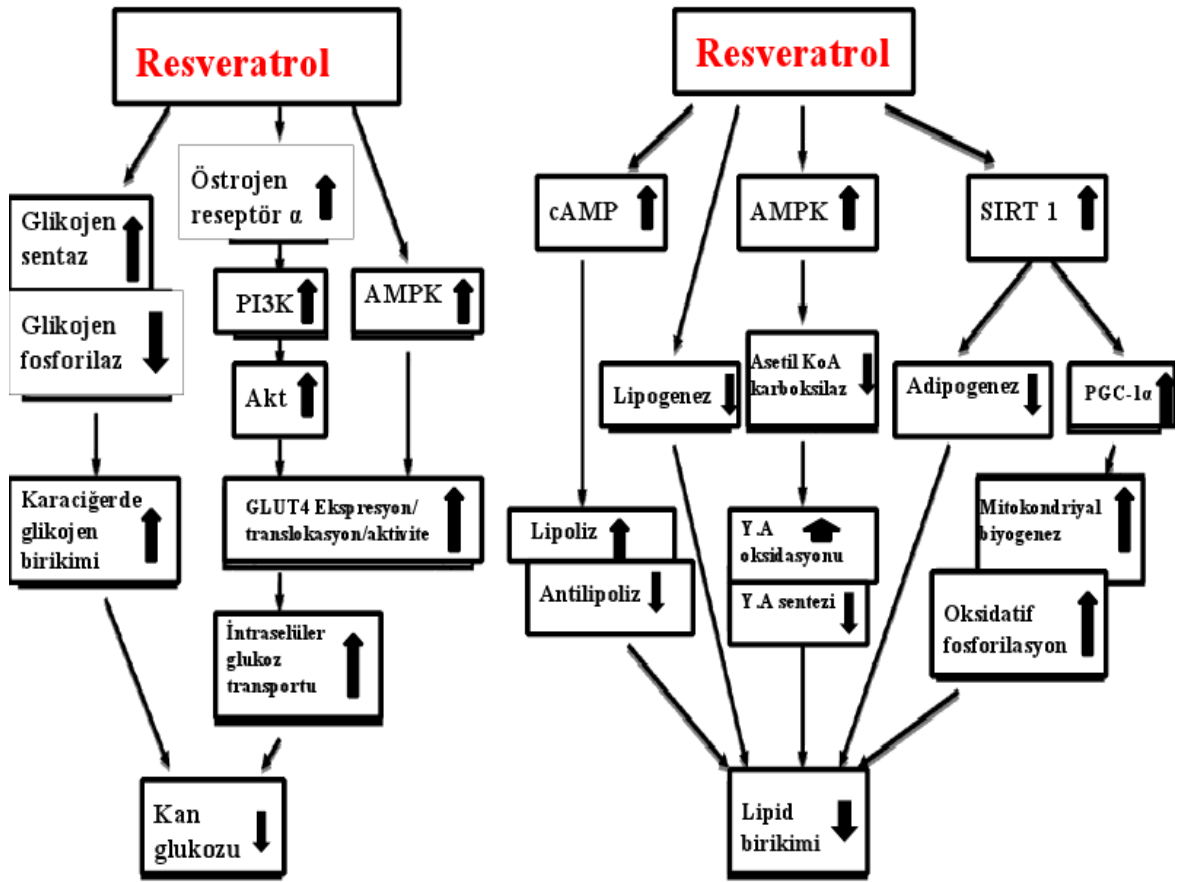
Diyabetten korunmada ve bazı diyabetik komplikasyonları hafifletmede RSV'nin önemli rolü olduğu ortaya konmuştur. Artmış glisemi birçok diyabetik komplikasyona neden olduğu için tedavide kan glukozunun fizyolojik sınırlarda tutulması esastır. Bu bağlamda RSV'nin uzun bir süre uygulandığında bile herhangi bir yan etkiye rastlanmadan kan glukozunu azaltarak tip 1 ve tip 2 diyabette yararlı olabildiği açıklanmıştır (53).

RSV'nin insülin üzerine etkileri ile ilgili ilk çalışma 2004 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından yapıldı. INS-1 hücrelerinde (insülinoma hücre hattı) yapılan deneylerde RSV'nin etkisiz olduğu gösterilmiştir. Buna karşın diğer çalışmalarda insülin salgılayan hücrelerin anlamlı olarak etkilendiği ortaya konmuştur (54).

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda yapılan çalışmalarda resveratrolün metabolik parametreleri iyileştirdiği, kısmen de olsa plazma glukozu, total kolesterol,

trigliserit konsantrasyonlarını azalttığı, bunlara paralel olarak da hiperinsülineminin etkisini azalttığı ileri sürülmüştür (53).

Genel olarak diyabet yönetimi üç ana öğeden oluşur: kan glukozunun düşürülmesi, pankreas β hücrelerinin korunması ve tip 2 diyabette insülin aktivitesinin düzeltilmesi. RSV'nin bunları düzenlediği çeşitli çalışmalarda ortaya atılmıştır (53, 55).



Şekil 5: Resveratrolün kan glukoz seviyelerini ve lipid birikimini azaltmasının şematik resmi (55).

Obezleştirilmiş diyabetik farelerde yapılan deneyde, resveratrolün portal vende glukagon like peptid ve insülin seviyesini arttırarak glisemiye düzelttiği gösterilmiştir. Bunlar kolonik proglukagon mRNA transkripsiyonu seviyesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (56).

Diyabetik hayvanlardaki resveratrolün antihiperglisemik etkisinin glukozun intraselüler transportunu arttırmasından kaynaklandığını ortaya çıkaran çalışmalar vardır, insülin bağımlı glukoz transportunu sağlayan GLUT₄ ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (57,58).

İntravenöz (i.v) streptozosin enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılmış bir çalışmada, RSV' nin doz bağımlı olarak diyabetin genel belirtileri olan vücut ağırlığında azalma, polifaji ve polidipsi gibi yan etkilerinde de iyileşme sağlanmıştır (57).

Streptozosin (60 mg/kg) i.v verilmesi ile insülin bağımlı diyabet oluşturulmuş ve diğer gruba nikotinamidin (200 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu sonrası insülin bağımsız diyabet oluşturmak üzere streptozosin (60 mg/kg) erkek Wistar sıçanlarında (250- 300g) kuyruk veninden enjekte edilerek yapılan bir çalışmada, RSV'nin doz bağımlı hipoglisemik etkisi olduğu gösterilmiştir. Resveratrol hem kontrol hem de diyabetik gruplarda insülin düzeyini artırmıştır. Ayrıca, insülin bağımsız diyabet oluşturulan grupta, RSV uygulamasını takiben 90 dakika sonra, plazma glukoz düzeyi anlamlı oranda düşmüştür (59).

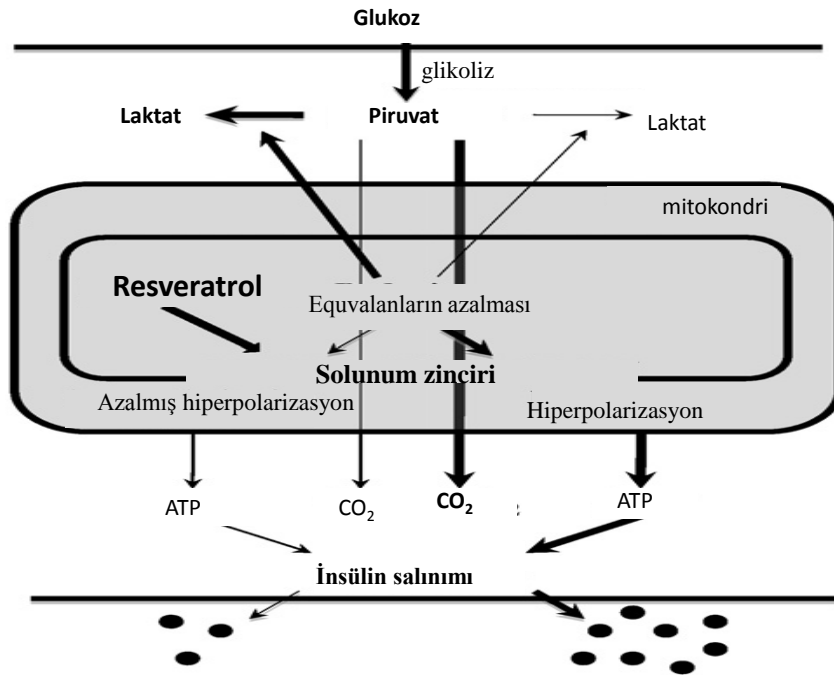
Aribal-Kocatürk ve arkadaşları, diyabetik hale getirilmeden 10 gün önce sıçanlara günlük 0.5 ml resveratrol uygulaması yapıldıktan sonra STZ ile diyabetik hale getirilen sıçanlarda, eritrositlerde lipid peroksidasyon ürünleri ve bakır oranlarının azaldığını, çinko yoğunluğu, nitrik oksid düzeyi ve katalaz aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (60).

Pankreatik beta hücrelerinin yıkımı, immünolojik hücre aracılı bir yıkım süreci sonunda oluşmaktadır. Doğal öldürücü hücreler, aktif sitotoksik T lenfositleri ve makrofajlar, beta hücre harabiyetinde önemli role sahiptir. Hücre yıkımında aktif makrofajlardan ve polimorfonükleer lökositlerden, sitokinlerin (örneğin IL-1 ve TNF- α 'nın salınımı) salınımı, reaktif oksijen metabolitlerinin ve NO' nun salınımına neden olmaktadır (57). Yapılan bir çalışmada Resveratrolün böbrek hücrelerinde koruyucu etkisini NO miktarını arttırarak oluşturduğu belirlenmiştir (61). RSV ise ortama salınan ROR' un etkilerini baskılayarak antioksidan görevini de yerine getirmektedir (57).

RSV etkisi ile ilgili başka çalışmalar MIN6 hücrelerinde doğrudan ATP duyarlı K⁺ kanallarını ve voltaj bağımlı K⁺ kanallarını bloke ettiği, dolayısıyla plazma membranını depolarize ettiği ortaya çıkarılmıştır. Glibenklamid (Sülfonilüre grubu antidiyabetik ilaç) ATP duyarlı K⁺ kanallarının potent blokörü olduğu deneylerde ortaya çıkarılmıştır. 30 μ m RSV ile 20 μ m glibenklamidin etkisi kıyaslanabilmiştir. Bu sonuçlara göre RSV farede, hamsterda ve ratta β hücre insülinoma hatlarında (MIN6, Hit-T15 ve RIN-m5F) insülin salınımını uyarır. Bununla birlikte bu insülinotropik etki, hücreler medyumlarda glukozsuz inkübe edildiğinde bu durum insülin salınımının asıl fizyolojik uyararı olmuştur. Bu çalışmalarda kullanılan hücrelerin normal pankreatik β hücrelerinden farklılaştığı belirtilmiş olmalıdır (62).

Pankreatik adacık hücre çalışmalarında, insülin salgılayan hücrelerde RSV aktivitesi ile ilgili yeni veriler elde edildi. İnsülinoma hücrelerindeki aksine yeni izole edilen sıçan pankreatik adacık hücrelerinde RSV' nin (1- 100µm) insülini baskılayıcı etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bu etki RSV' nin belirli glukoz konsantrasyonlarının uyarılmasında geniş spektrumlu olduğunu göstermektedir. Fakat bunun dışındaki glukoz konsantrasyonlarını uyarmaz (63,64).

Diyabetik farelerde uzun dönem intraserebroventriküler RSV infüzyonunun hiperglisemiye normalleştirebileceğini ve hiperinsülinemiye önemli oranda düzeltebileceği Ramadori ve arkadaşlarının çalışmasında gösterilmiştir (65).



Şekil 6: Normal β hücrelerinde resveratrolün azalmış insülin salınımına neden olmasının şematik çizimi (55).

Diyabetik nefropati diyabette kronik böbrek hasar gelişiminin ana nedenidir. Yüksek glukoz düzeyleri diyabetik nefropatideki glomerüler hipertrofi gelişiminde merkezi bir rol oynar. Diyabet hastalarında bu değişiklikler yoğun insülin tedavisi, ACE inhibitörleri, anjiyotensin II reseptör antagonistleri ile tedavi edilmeye çalışılmakla birlikte bu tedavilerin klinik yararları genellikle yetersizdir. Yeni tedavi stratejileri oluşturmak için yapılan araştırmalarda resveratrol de denenmektedir (40).

Streptozosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarla yapılan bir çalışmada RSV' nin erken evre diyabetteki böbrek hipertrofiye etkilerine bakılmış. Diyabet oluşturulduktan 10 hafta sonra 4 hafta süreyle 10mg/kg düzeyinde oral olarak verilmiş. Resveratrolün antiproliferatif ve antihipertrofik etkileri ile AMPK' yı aktive ederek böbrek hipertrofiyi azalttığı, yüksek glukoz düzeyinin uyardığı mezangial hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (66). Ayrıca RSV'nin diyabetik böbrekte bazı sitokinleri (örn: TNF- α , IL-6) arttırarak inflamatuvar cevabı düzenlediği ortaya konmuştur (67).

Resveratrol ile diyabetin böbrekte oluşturduğu oksidatif stresin düzeldiği, glomerüler fibronektin ve tip IV kollajen ekspresyonunun azaldığı, mezangial matriks genişlemesinin hafiflediği böylece böbrek işlevlerinde bir düzelme olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (66,67-69).

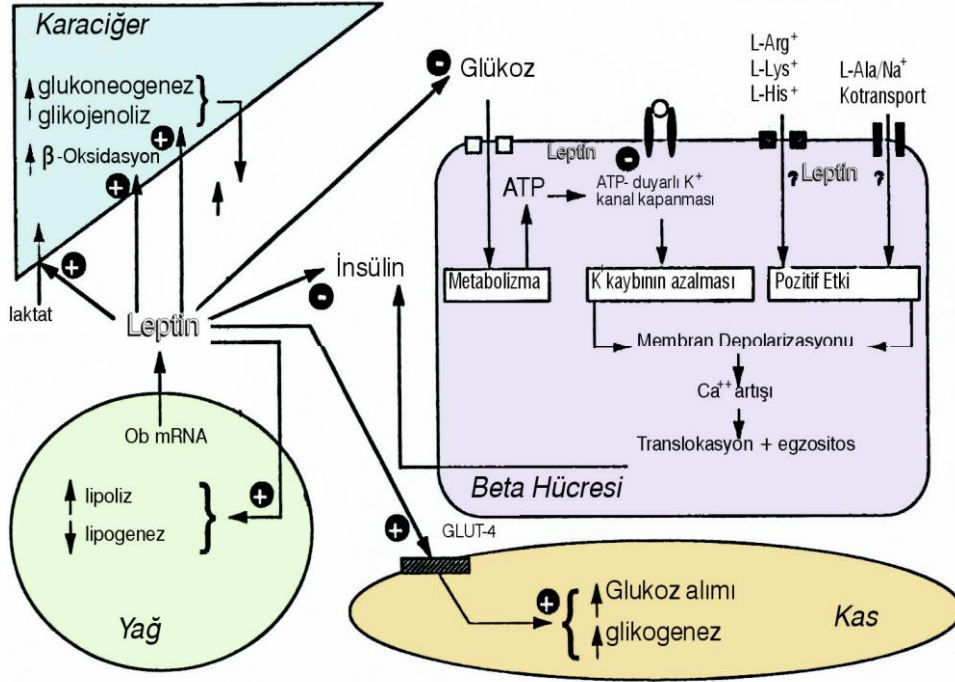
Bazı çalışmalar; RSV' nin diyabetik nefropati gelişiminden doğrudan yada dolaylı olarak hücre ölüm yolağını baskılayarak koruduğunu göstermektedir. Ayrıca RSV' nin, DNp ilerlemesi sırasında hücrelerin mitotik duraklamaya geçişini engellediği ortaya konmuştur (10).

2.5. LEPTİN ve SIRTUİN

Adipoz dokunun sadece lipidlerin depo edildiği yer olmadığı aynı zamanda bir faktör salgılayarak vücut ağırlığını kontrol edebileceği fikri ilk kez 1953 yılında lipostatik teori ile ortaya atılmıştır. Leptin, Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedildikten sonra üzerinde geniş incelemeler yapılan obezite geninin 167 aminoasitli hormonal protein ürünüdür (70).

Başlangıçta leptinin, hipotalamusa etki ederek iştahı düzenlemesi ve enerji harcanmasını artırması nedeniyle anti-obezite hormonu olduğu düşünülmüştür (71,72). Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar, leptinin insanlarda sadece bir anti-obezite ve doyumluk hormonu olmadığını göstermiştir. Leptinin gıda alımı ve enerji kullanımı üzerine olan etkilerinden başka, birçok fizyolojik olayda (üreme sistemi, anjiogenez, hematopoez, immün sistem, lipid metabolizması, insülin etkisi, sempatik aktivasyon, mide-barsak işlevi ve kemik metabolizması) rol oynadığı gösterilmiştir. Leptin tüm fizyolojik etkilerini reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (71). Leptin reseptör izoformları çok çeşitli dokularda gösterilmiştir. Kalp, plasenta, akciğer, karaciğer, kas, böbrek, pankreas, dalak, timus, prostat, testis, over, ince barsak ve kalın barsak, leptin reseptörlerinin varlığının bulunduğu dokulardır (73).

İnsülin anabolizmayı uyarıcı ve vücut kütleini artırıcı adipogenik bir hormondur. Adipogenik insülin, leptin anlatımını artırırken; leptinin pankreatik β hücrelerinde insülin üretimini baskılaması bu düşünceyi desteklemektedir (70).



Şekil 7: Glukozun periferik organlardaki metabolizmasının leptin ve insülin ile düzenlenmesi (74).

Leptinin insülin salgısına etkileri olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Leptinin, β hücrelerinde ATP duyarlı K^+ kanallarını aktive ederek insülin salınımını baskıladığı gösterilmiştir. Böylece, β hücreleri insülin salınımı için depolarize olamadan hiperpolarize olurlar. Birçok çalışmada elde edilen veriler leptinin bazal ve glukoz uyarılı insülin salgısını azalttığını göstermiştir, bu durum leptinin insülin salgısı üzerine negatif feedback oluşturduğunu düşündürmektedir (73). Leptin ayrıca proinsülin gen ekspresyonunu da azaltır. Bunu glikoprotein (GLP-1) uyardığı proinsülin mRNA düzeylerini antagonize ederek yapar. GLP-1 normalde leptinin insülin sentezine olan baskısını önler (11).

Sirtuin; Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD^+) bağımlı sınıf 3 histon deasetilaz bir proteindir (75). Günümüzde 7 adet sirtuin proteini ortaya çıkarılmıştır. Memelilerde son

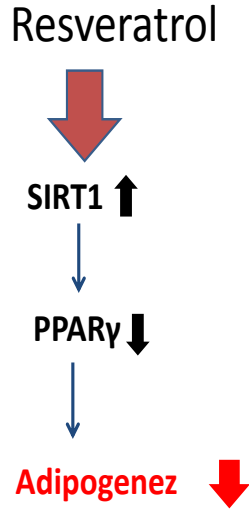
zamanlarda yapılan çalışmalarda, SIRT1' in hücre ölümü ya da yaşamasında ve hücrenin stress cevabında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. SIRT-1 apoptozisi baskılayarak hücre yaşlanmasını destekler ya da DNA hasarı ve oksidatif stress durumunda hücre yaşlanmasını uyarmaktadır. P53 deasetilasyonunu sağlayarak hücrelerin hayatta kalmasını artırır (75-78).

Sirtuin proteinlerinin hatalı düzenlenmesi sonucu oluşan hastalıklar; Bowen hastalığı, Tip 1 DNp, Alzheimer hastalığı, ALS ve non-alkolik steatohepatit olarak bildirilmiştir. SIRT1 aktivitesinin kaybı tip 2 DM gibi metabolik hastalıklar ve atheroskleroz ile ilişkili olabildiği ileri sürülmektedir. SIRT1' in deneysel kolit ve obstruktif akciğer hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda da baskılayıcı etkileri gösterilmiştir (10,79,80).

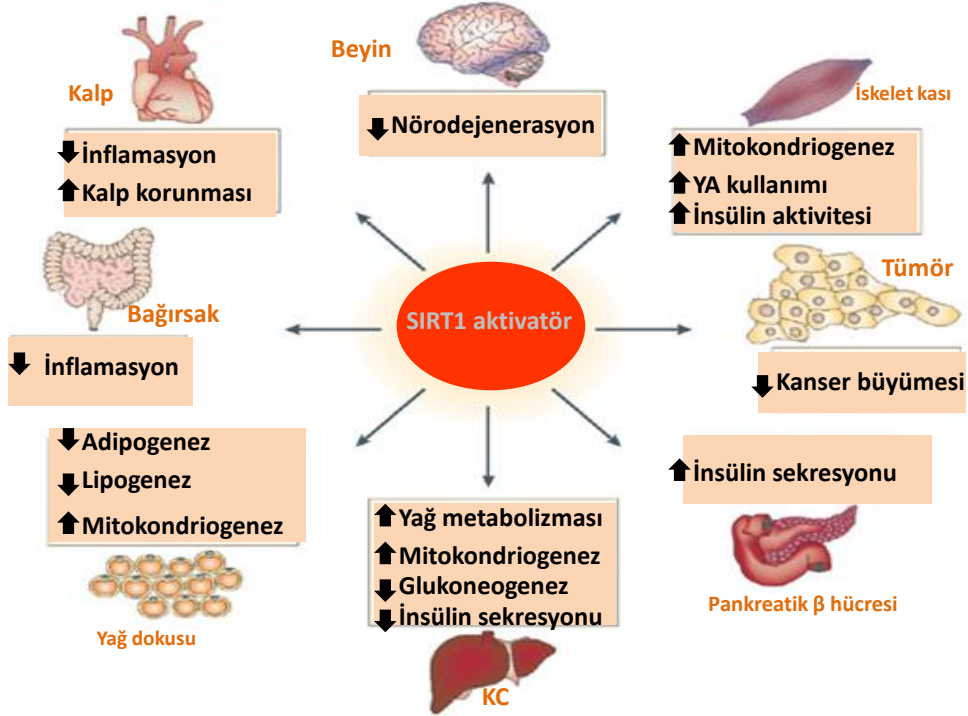
Çeşitli çalışmalarda SIRT1' in strese bağlı hücrel cevabı FOXO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek ve/veya doğrudan bağlanarak kontrol ettiği ortaya çıkarılmıştır (76,80).

Sirtuin aktive eden önemli bileşiklerden biri resveratroidir. Farelerde RSV' nin SIRT1' i aktive ederek enerji dengesini düzelttiği, glukoz işlevlerini düşürdüğü, insulin duyarlılığını ve mitokondrial fonksiyonları arttırdığı, yağlanmayı azalttığı ve egzersiz toleransını arttırdığı gösterilmiştir. RSV 28 gün boyunca diyabetik farelere verildiğinde adiponektin ve serbest yağ asidi düzeylerinde azalma sağlamıştır (80,81).

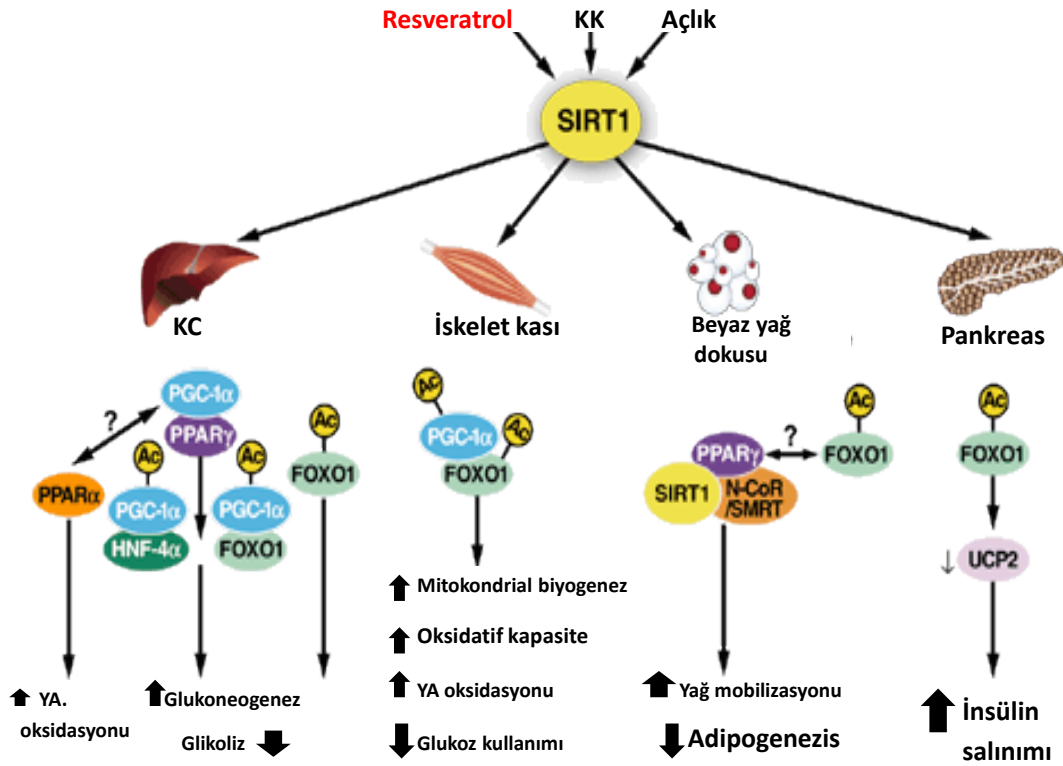
SIRT1 birçok proteinin aktivitesini düzenler (Örneğin: PPAR ve PPAR γ). Ayrıca SIRT1' in in vivo ve invitro etkilerine PGC-1 α aracılığıyla yardım eder (81). SIRT1 transkripsiyonel koaktivatör PGC-1 α vasıtasıyla glukoneogenetik genleri ve hepatik glukoz çıkışını uyarır. Glukoneogeneze SIRT1 uyarımı insülinin hepatik cevap yolağına karşı çalışır, glukoz depolarını ve glukoneogenezi baskılar. SIRT1, PPAR γ ' yı baskılar, beyaz yağ dokusunda lipolizi ve pankreas β hücrelerinde insülin salınımını artırır (82).



Şekil 8: Resveratrolün SIRT1 üzerinden adipogenez etkisinin şematik çizimi (83).



Şekil 9: İnflamasyon, mitokondriogenez ve metabolizma üzerine SIRT1 etkileri (84).



Şekil 10: SIRT1' in transkripsiyon faktörleriyle birlikte dokulardaki etkileri (85).

SIRT1 çeşitli stress etkenlerini aktive eder. Birçok anahtar transkripsiyon faktörünü hedefler: p53, NF κ B, HSF $_1$, FOXO1, 3 ve 4 PGC-1 α . Bu faktörlerle birlikte dokulardaki etkileri görülmektedir (şekil 10). SIRT1 aktivitesi ve ekspresyonu kalori kısıtlaması ve RSV tarafından uyarılır (85).

Sirtuin ailesinin ekspresyonu böbrekte de gözlenmiştir. Böbrek yaşlanmasının progresyonunda SIRT1 aracılığıyla kalori kısıtlamasının koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir (86). Kume ve arkadaşları yaptıkları çalışmada %40 kalori kısıtlaması yapılan farelerde SIRT1 aktivasyonu nedeniyle mitokondrial biyogenez arttırdığını ve buna bağlı olarak yaşlı fare böbreklerinde glomerüler sklerozis gelişiminden koruduğunu açıklamışlardır (87).

STZ ile diyabetik nefropati oluşturulmuş sıçanlarla yapılan bir çalışmada RSV tedavisi ile diyabetik böbrekte SIR2 ekspresyonunun azalması engellenmiştir. Diğer ilaç verilmeyen diyabetli grupta ise SIR2 ekspresyonu azalmıştır. Son zamanlarda SIRT-1' in mezengiyal hücrelerde p53 deasetilasyonu yoluyla oksidatif stresi önleyebileceği ve bu SIRT-1' in artışı

ile bbrekde glomerüler hastalıkların önlenmesinde yeni bir strateji sağlayabileceği bildirilmiştir (88,89).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 Deney hayvanları

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen TPF-10006 numaralı bu çalışma, deney öncesinde Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'na başvurularak etik kurul onayı alınmıştır. Çalışma Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 38 adet genç sağlıklı dişi Wistar-Albino cinsi sıçan ile gerçekleştirmiştir. Sıçanlar, deney öncesi tel kafeslerde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sirkadiyen ritimde ve sıcaklığı 20° ile 25° arasında olacak şekilde kontrollü odada tutuldular. Hergün temizliği yapılan kafeslerde beslendi. Yemler; elik kaplarda, su; plastik biberonlarda (normal esme suyu) verildi. Deneyler Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji, Biyokimya ve Parazitoloji laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması ve DeneySEL Uygulamalar

Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi. Deney grupları her grupta altı sıçan resveratrol diyabet grubunda 9 sıçan olmak üzere beş gruptan oluşmaktaydı.

Her bir kafese (28x28x16 cm boyutunda polikarbon kafes) diyabet grubu sıçanları bir kafeste  sıçan, kontrol grubu sıçanları bir kafeste altı sıçan olmak üzere yerleştirildi. Tüm sıçanlar aynı ortamda gözetim altında tutuldu. Tüm sıçanlar 12 saat a bırakıldıktan sonra kuyruk venlerinden kan örnekleri alındı ve glukometre (IME- DC) ile bazal kan glukoz düzeyleri tesbit edildi. Kan şekeri düzeyi 130 mg/dl'nin üzerinde çıkan sıçanlar deneye dahil edilmedi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi.

İki haftalık alışma sresinden sonra 26 sıçana tek doz olarak 50 mg/kg streptozotosin (Sigma) (0.1 ml serum fizyolojik içinde çözündürülerek) ile diyabet oluşturulmak üzere i.m. enjeksiyon yapıldı. Bu enjeksiyondan sonraki üçüncü günde ölçülen kan şekeri düzeyi 170 mg/kg' nin üzerinde olan sıçanlar diyabet kabul edildi. Deney devam ederken diyabetik sıçanların üç tanesi kaybedildi, iki tanesi de istenen diyabetik kan şekeri düzeyi

oluşturulamadığı için deneyden çıkarıldı. Diyabet bulgularının oturması için bir ay süre ile beklendi. Bu sürenin sonunda, 15 gün sürecek olan RSV (Sigma) enjeksiyonuna başlandı. 15 gün süre ile her gün sıçanlara i.p olarak 10 mg/kg RSV enjeksiyonu uygulandı. Diyabetik sıçanların genel durumu değerlendirilerek bir buçuk ayın sonunda deney sonlandırıldı.

Kontrol (K) grubu (Grup I, n=6): Bu gruba deney süresince, resveratrolün uygulandığı 15 gün boyunca serum fizyolojik (i.p) uygulandı.

Kontrol- Resveratrol (K+RSV) grubu (Grup II, n=6): Bu gruba deney süresince, diğer diyabetik gruplarla birlikte 15 gün boyunca RSV i.p uygulandı.

Diyabet- RSV (DM+RSV) grubu (Grup III, n=9): STZ ile diyabet oluşturulduktan sonraki birinci ayın bitiminde başlanarak, 15 gün boyunca 10 mg/kg olmak üzere %30 luk DMSO içinde çözüldürülerek i.p olarak enjekte edildi.

Diyabet (DM+SF) grubu (Grup IV, n=6): Deney başlangıcında tek doz i.p olarak STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan bu gruptaki sıçanlara 1 ay boyunca başka hiçbir madde verilmedi. Birinci ayın sonunda, 15 gün boyunca hergün i.p olarak SF verildi.

Diyabet- DMSO (DM+DMSO) grubu (Grup V, n=6, Sham grubu): Tek doz i.p. olarak yapılan STZ ile diyabet oluşturulan bu gruba; deneyin son 15 günü boyunca i.p. olarak % 30 luk DMSO verildi.

Deneye başlamadan önce, STZ ile diyabet oluşturulduktan 3 gün sonra, 1 ay sonra ve kesilmeden önce olmak üzere toplam dört kez sıçanların ağırlıkları ve kuyruk venlerinden alınan kan ile glukometreyle şeker düzeyleri ölçüldü. Veriler uygun analizler yapılmak üzere kaydedildi.

3.3 Deneyin sonlandırılması

Son enjeksiyon uygulamasından 24 saat sonra sıçanların kan şekerleri ve ağırlıkları ölçülerek bunlar kaydedildi. Tüm gruplardaki sıçanlara kas içine (i.m) enjeksiyon ile 45 mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamine) ve 2,5 mg/kg ksilasin hidroklorid (Alfazyne) ile genel anestezi altında kesilme işlemi yapıldı. Hızlı bir şekilde sağ böbrek dokusu çıkarılıp ependorf tüplerine konularak, western blot yöntemi yapılana kadar -80° de muhafaza edildi. Daha sonra kalp içi %10'luk formalin infüzyonu 5 dk boyunca yapılarak, sol böbrek dokusu alındı ve histokimyasal işlemler için %10'luk formalinle doldurulmuş kavanozların içine yerleştirildi.



Resim 2: Sıçanların böbrek dokularının alınması işlemi esnasında çekilen fotoğraf.

3.4 Histolojik yöntemler

Her gruptan alınan böbrek dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildi. Sonra musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi. Daha sonra basemoldların içerisine konan dokular parafine gömüldü ve soğumaya bırakıldı. Parafine gömülen dokulardan lam üzerine 3.5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histolojik inceleme amaçlı hematoksilin- eozin ve PAS boyalarıyla boyandı. Değerlendirme yapılırken mikroskopta bakılan kısma göre sıfırdan üçe kadar derecelendirme yapılarak veriler kaydedildi. Etkilenme yok (0), hafif etkilenme (1), orta düzeyde etkilenme (2), şiddetli etkilenme (3) olmak üzere değerlendirildi ve ışık mikroskopunda incelendi. Değerlendirilen dokuların ışık mikroskopunda (Olympus BX 20) fotoğrafları çekildi.



Resim 3: Diyabetik böbreğin sıçandan alındıktan sonraki görünümü

3.5. İmmünohistokimyasal yöntemler

Parafine gömülen dokular 3.5 µm kalınlığında kesitler yapılarak polilizinli lamlara alındı.

3.5.1 Kullanılan gereçler

- 1- Poly-L-lysin lam (Mikroslides Snovvcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA)
- 2- Mikrodalga fırın (Beko)
- 3- Methanol (Merck)
- 4- Pap Pen (hidrofibik kalem PEN01)
- 5- DAB Substrat kit (DAKO K4065)
- 6- Peroksidaz Mouse & Rabbit Kit, Background blocker (DBS, KP-500, K023)
- 7- Goat serumu (ZYMED 16210064)
- 8- Hidrojen peroksit (Sigma 31642)
- 9- Leptin primer antikoru (Santa Cruz OB-20: sc- 842)
- 10- SIRT 2 Primer antikoru (Santa Cruz: sc- 28298)
- 11- Mayer's Hematoksilen boya (PL-1000-MAY)
- 12- Olympus BX20 Mikroskop

13- HRP histostatin plus kiti (invitrogen 85-9073)

İçeriği:

a) Bloking solüsyonu

b) Geniş spektrumlu Linker solüsyonu, biyotinlenmiş anti mouse ve anti rabbit antikoları içerir. Konjuge sekonder antikor olarak kullanılır.

c) Tracer solüsyonu horse radish peroksidase ile konjuge streptavidin içerir.

14-PBS (fosfat tamponlu salin) (PL-0125)

15- Otomatik pipetlet (Ependorf)

3.5.2 Analiz aşaması

Leptin ve sirtuin proteinlerinin immünohistokimyasal olarak tesbiti biyotin- streptavidin-peroksidaz yöntemiyle yapıldı. Hazırlanmış olan parafin bloklardan 3.5 µm kalınlığında, poly-L-lysin (Mikroslides Snovvcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) lamlara seri kesitler alındı. Seri alınan kesitler bir gece etüvde 37° de bekletildi. Ertesi gün parafin giderme işlemini tamamlamak üzere iki kez 15 dakika olmak üzere ksilole bırakıldılar. Daha sonra sırasıyla % 100, % 96, % 80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek dehidrate edildiler. Dokuları alkolden kurtarmak amacıyla iki kez beş dakika distile sudan geçirildiler, bu işlem 37° de etüv içerisinde yapıldı. Nemlendirilmiş 37° C' lik etüvde proteazda 15 dakika inkübe edildi. Ardından 10 dk oda ısısında tutuldu. Kesitler iki dakika ikişer kez PBS ile yıkandı. Daha sonra metanolde hazırlanmış % 3 'lük hidrojen peroksitde 15 dk bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve PBS ile lamlar üç kez üç dakika yıkandı. Lamlar yıkandıktan sonra Histostain Plus immünohistokimya kitindeki Bloking solüsyonu (A-Blocking solution, HRP histostatin plus kiti invitrogen 85-9073) 10 dakika uygulandı. Bloking aşamasından sonra camlar yıkanmadan Ob (leptin) ve SIRT-2 antikoları PBS ile 1/500 oranında seyreltilerek dokunun üzerini kapatacak şekilde uygulandı ve 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda lamlar PBS ile yıkandılar ve 20 dakika süreyle biyotinli sekonder antikor (B – Broad Spectrum Second Antibody, Histostain Plus kiti invitrogen 85-9073) uygulandı. Sonrasında lamlar PBS ile yıkandıktan sonra yine 20 dakika streptavidinli peroksidaz enzim kompleksi (C-HRP Streptavidin, Histostain Plus kiti invitrogen 85-9073) uygulandı. Lamlar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra DAB (3.3 diamino benzidin) (DAB-Plus Substrate Kit, DAKO K4065) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun ortaya çıkması beklendi. Zemin boyaması olarak Mayer 'in Hematoksileni kullanıldı ve camlar entellan (Merck) ile

lamelle kapatıldı. Işık mikroskopta incelenen materyallerdeki değişiklikler etkilenme yok (0), az etkilenme (1), orta düzeyde etkilenme (2), şiddetli etkilenme (3) olmak üzere skorlama yapılmıştır. Daha sonra mikroskopta (Olympus BX 20) fotoğraflanarak görüntülenmesi sağlanmıştır.

3.6. Western blot yöntemiyle Leptin ve Sirtuin proteinlerinin belirlenmesi

3.6.1 Kullanılan gereçler

- 1- Leptin primer antikor (Santa Cruz OB-20: sc- 842)
- 2- Sirtuin-1 primer antikor (Santa Cruz Sirt-1, sc-74465)
- 3- Beta actin antikor (Santa Cruz C₄: sc-47778)
- 4- Acrylamide (SİGMA A9099)
- 5- N,N'- Methylene bis-Acrylamide (SİGMA M-7279)
- 6- N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED, SİGMA T7D24)
- 7- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (SİGMA L4390)
- 8- Bromophenol Blue sodium salt (SİGMA B8026)
- 9- Pepstatin (SİGMA P5318)
- 10- Leupeptin (SİGMA L2884)
- 11- Aprotinin (SİGMA A4529)
- 12- Tween 20 (SİGMA P1379)
- 13- DAB Substrat kit (DAKO K4065)
- 14- Glycine (SİGMA G8898)
- 15- Trizma Base (SİGMA T8404)
- 16- Ammonium Persulfate (SİGMA A3678)
- 17- Triton X-100 (SİGMA T8532)
- 18- Sodium Chloride (Riedel 13423)
- 19- Sekonder Antikor (HRP histostatin plus kiti invitrogen 85-9073)
- 20- Nitroselülöz membran (BİO- RAD)
- 21- Low Range Markers (Santa cruz sc-2360)
- 22- PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, SİGMA P7626)
- 23- HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine- 1-ethanesulfonic acid sodium salt, SİGMA H7006)

- 24- 2 Propanol (SİGMA 19516)
- 25- Mini elektroforez sistemi (Bio-Rad, Mini Protean III, US)
- 26- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, Power Pac, US)
- 27- Trichloroacetic acid (TCA, SİGMA T9156)
- 28- Glycerol (SİGMA 5516)
- 29- Sodium carbonate (FLUKA 71347)
- 30- Sodium hydroxide (SİGMA 8045)
- 31- Potassium sodium tartarate tetrahydrat (SİGMA S6570)
- 32- Copper II sulfate pentahydrat (SİGMA C8072)
- 33- Folin-Ciocalteu's phenol (SİGMA F9252)
- 34- Hassas Terazı (Sartarius CP 3245)
- 35- Yatay çalkalayıcı (Yellow RS10BASC)
- 36- Otomatik pipetler (Ependorf)
- 37- Kaynamış su banyosu (Memmert)
- 38- pH metre (HANNA H1221)
- 39- Spektrofotometre (Shimadzu)
- 40- Tarayıcı (Vilber lourma)

3.6.2. Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin hazırlanışı

%30 luk Akrilamid/ Bis :

Akrilamid : 30.0 gr

Bisakrilamid: 0.8 gr

Distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

1M Trizma Base:

Trizma Base : 12.11 gr

Distile su ile 100ml'ye tamamlandıktan sonra pH' sı 6.8'e ayarlanmıştır.

Amonyum persülfat (%10):

Distile Su 1ml

Amonyum persülfat 0.1 gr

1.5 M Ayırıcı Jel (Tris baz stok çözeltisi):

Tris 18,16 gr

100 ml distile su içinde çözüldü. pH ayarlaması HCl ile 8.8'e ayarlandı.

%10 SDS:

SDS 10 gr

Distile Su 100ml

Elektrot Solüsyonu:

Trizma Base 3 gr

SDS 1 gr

Glisin 14.4 gr

Distile su ile 1000 ml' ye tamamlanarak çözündürüldü.

Yükleme tamponu (Sample Buffer)

1M Trisma base (pH:6.8) 12.5 ml

%10'luk SDS'den 40 ml

Glycerol 20 ml

% 2 Bromphenol blue 2 ml

Yürütme tamponu (Transfer Buffer)

Tris base 6 gr

Glisin 28.8 gr

Methanol 200 ml

Distile su ile 1000 ml' ye tamamlanarak çözündürüldü.

TBS (Tris- tuz) çözeltisi (10x TBS)

Trisma base 121.14 gr

NaCl 99.35 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak pH 8'e ayarlandı.

TBST (Tris- tuz-tween 20) çözeltisi (1xTBS)

TBS 100 ml

Tween 20 500 µl

Distile su 900 ml

Bloklama solüsyonu

Yağsız süt tozu 5 gr

TBST 100 ml

Doku homojenizasyonunda kullanılmak üzere Lizis tamponu hazırlanışı

Lizis tampon, içerisinde 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH:8.0), %1'lik Triton X-100, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF olacak şekilde hazırlandı.

Lizis tamponu için stok solüsyonlarının hazırlanması

Leupeptin: Distile su ile 10 mg/ml'lik stok hazırlanarak alikatlara paylaştırıldı.

Pepstatin: Etanol %70 ile 1 mg/ml'lik stok hazırlandı.

Aprotinin ile 1 ml HEPES (0.01 M, pH:8) içinde 10 mg Aprotinin olacak şekilde stok hazırlandı.

PMSF: İsoopropanol içinde 10 mM'lik stok hazırlandı. Alikatlara paylaştırıldı.

NaCl 17.532 g, Tris 1.211 g, Triton-X-100 2 ml, Leupeptin 20 µl (stok), Aprotinin 20 µl (stok), Pepstatin 20 µl (stok), PMSF 20 µl (stok) alınarak az miktarda distile su içinde çözdürüldüler, pH: 8.0' e ayarlandı ve volüm 200 ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.6.3 Dokuların homojenizasyonu ve Lowry yöntemi ile dokuda protein miktarı tayini

Na₂CO₃ 2 gr ve 0.05 gr Na-K-Tartarat, 0.1 N NaOH içinde çözümlenerek hacim 100 ml' ye tamamlandı.

100 mg CuSO₄. 5H₂O 100 ml distile suda çözümlenerek hazırlandı.

Alkali bakır çalışma çözeltisi: CuSO₄. 5H₂O/ Na₂CO₃ 0.1 M NaOH, 0.7 M Na-K-Tartarat 1/9 oranında karıştırılarak hazırlandı.

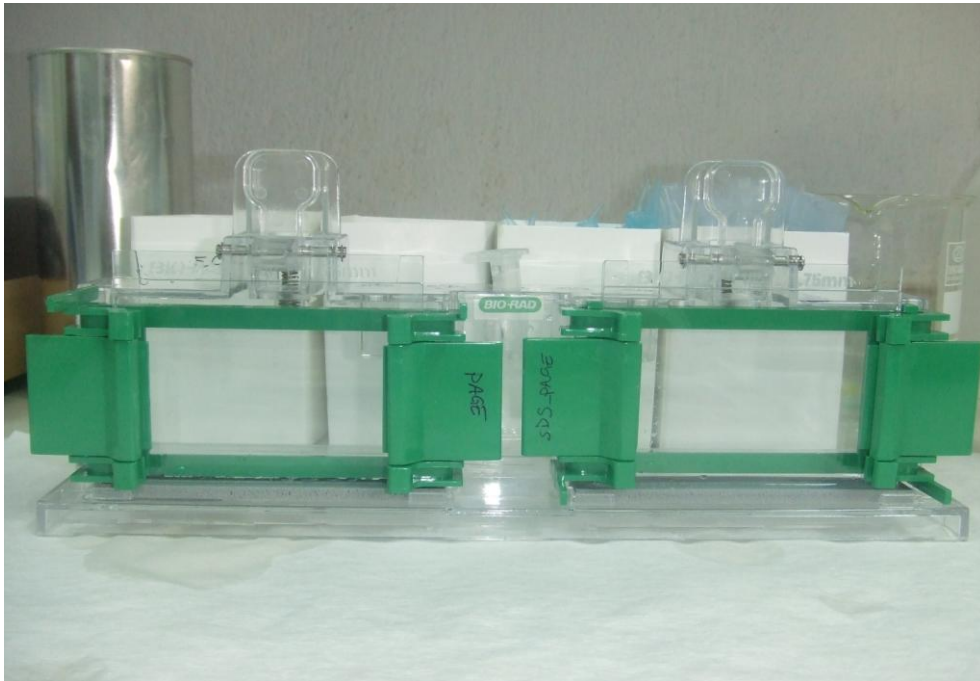
Seyreltik folin: Folin 1/2 su ile seyreltilti.

Sıçanlardan alınan böbrek dokuları – 80° deki derin dondurucudan alınarak her biri hassas terazide tartıldı. Daha sonra donmuş doku kuru buzun üstünde soğutulmuş havda ezildi. Bu materyal üzerine lizis tamponu eklenerek doku homojenatı hazırlandı. Homojenatlar mikrosantrifüj tüplerine konarak +4° de 10000 g' de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Örnekler Western Blot işlemi için -20° de saklandı. Bu örneklerin bir kısmı ile Lowry yöntemine (90) göre protein tayini yapılmak üzere ayrıldı.

Deney tüplerine 2.5 ml Alkali bakır çözeltisi ve 50 µl numune konularak 15 dk oda ısısında bekletildi. Üzerine 250 µl seyreltik fenol çözeltisinden eklendi ve 45 dk oda ısısında bekletildi. Numuneler spektrofotometrede 750 nanometre dalga boyunda köre (cihazın optik ayarlarının yapılması amacıyla kullanılan çözelti) karşı okundu.

3.6.4 SDS Page Elektroforez

Protein elektroforezi Laemmli yöntemine (91) göre SDS- PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel) kullanılarak yapıldı. Testte kullanılacak cam ve diğer malzemeler test öncesinde alkolle iyice temizlenmiştir. Biri küçük diğeri büyük iki cam levha bir arada tutularak düzeneğe yerleştirildi. Cam levhalardan sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra %12' lik ayırma jeli (tablo I), hava kabarcığı kalmayacak şekilde otomatik pipet yardımıyla mini elektroforez (Bio- Rad, Mini Protean III, US) camları arasına döküldü (Resim 4).



Resim 4: Elektroforez düzeneğine ayırma jelinin konulması

Tablo I: Ayırma jeli hazırlanışı (% 12'lik)

Distile su	3300 µl
Akrilamid/Bis % 30	4000 µl
1.5M Tris solüsyonu (pH: 8.8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 Amonyum Persülfat	100 µl
TEMED	4 µl

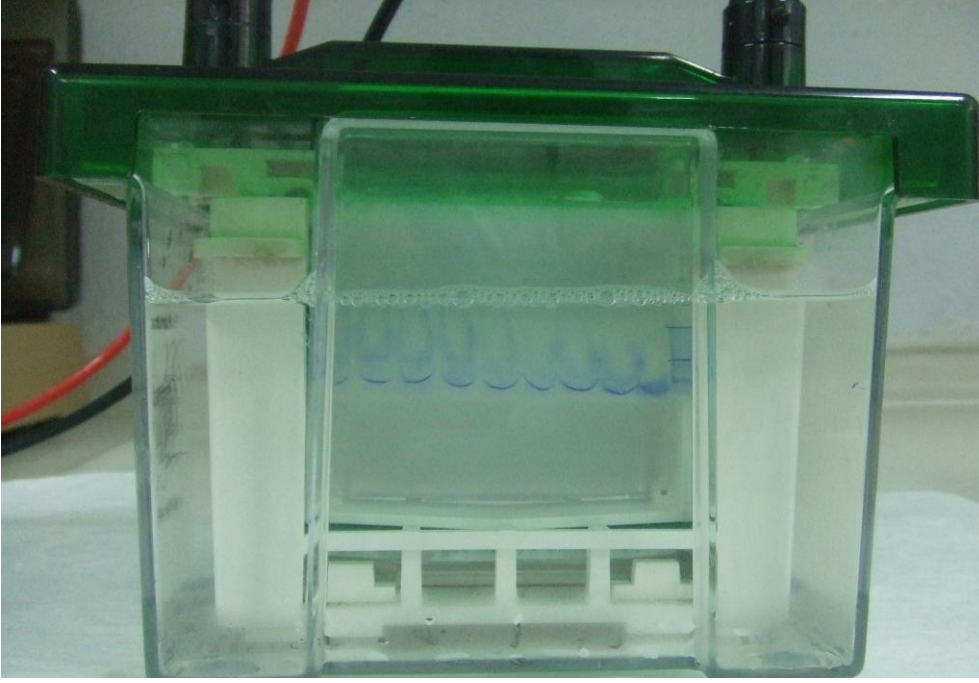
Jelin hava ile temasını kesmek için üzeri % 70' lik alkolle kapatılmıştır. Polimerizasyon için bir saat süre ile beklendi. Polimerizasyondan sonra jelin üzerine verilen alkol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Ayırma jelinin üzerine % 5' lik yoğunlaştırma jeli yine otomatik pipetle döküldü (tablo II). Bu işlemden sonra çok fazla beklemeden taraklar jel ile arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline temas etmemesine dikkat edilerek yerleştirildi. Jelin polimerizasyonu için 30 dk süre ile beklenmiştir. Sürenin sonunda taraklar jele zarar vermeden çekildi.

Tablo II: Yoğunlaştırma jeli hazırlanışı (% 5'lik)

Distile su	3400 µl
Akrilamid/Bis % 30	830 µl
1M Tris solüsyonu (pH: 6.8)	630 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 Amonyum Persülfat	50 µl
TEMED	5 µl

Tarak çıkarıldıktan sonra burada meydana gelen kuyucuklara elektrot tamponu eklendi. Uygun seyreltilmeleri yapılan örneklerden 20 µl, yükleme tamponundan 2 µl kapağı iğne yardımıyla delinmiş ependorf tüplerine alındı. Bu tüpler kaynar su banyosunda 100° de beş dakika bekletildi. Daha sonra örnekler dışarıda bir müddet soğutuldu. -20° den çıkarılan Low Range Marker (sc-2360) kaynar suya daldırılıp çıkarılarak ısıtılmıştır. İlk kuyucuğa 8 µl Marker, diğer kuyucuklara 24 µl yükleme tamponu ile muamele edilmiş örnek yüklendi.

Örnekler jele yüklendikten sonra düzenden dikkatlice çıkarılarak başka bir düzenek yardımıyla elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Tankın içerisine +4° den çıkarılan elektrot tamponu, jelin üzerinden taşmayacak şekilde doldurulmuştur. Elektroforez aletinin kapağı anod ve katot uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatılmış ve 100 V sabit akımla yaklaşık iki saat süreyle proteinlerin ayrışması işlemi gerçekleştirilmiştir (Resim 5).



Resim 5: Proteinlerin 100 V’da sabit akımla ayrıştırılması

3.6.5 Western Blot analizi

Elektroforez işleminden sonra jel elektroforez camları arasından çıkartıldı. Jel membrana aktarım kısmına geçmeye uygun hale getirildi.

Nitroselülöz membran (BIO- RAD) uygun miktarda kesilerek, spançlar, filtre kağıtları ile birlikte 20 dakika boyunca transfer tamponu içerisinde ıslatıldı.

Transfer işleminin yapılacağı Sandwich dediğimiz sistemde, kasetin siyah kısmı altta olacak şekilde düz bir zemine yerleştirilmiştir. Üzerine ıslak spanç, bunun üzerine 3 tane ıslak filtre kağıdı konmuştur. Bu arada sürekli olarak transfer tamponu ile ıslatılmıştır.

Filtre kağıtları üzerine Nitroselülöz membran, jel ve tekrar 3 adet filtre kağıdı ve spançla kapatılıp sandwich düzeneği sıkıştırılmıştır. Bu işlem esnasında jeli membran üzerine koyarken ikisinin arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Sandwich ve buz aküsü blotlama tankına yerleştirildi. Tank içerisine sandwichlerin üzerini örtecek seviyeye kadar

+ 4°deki transfer tamponu ilave edildi. Aletin kapağı anot ve katot uçları kontrol edildikten sonra kapatıldı ve 2 saat 300 mA akım uygulanarak membrana transfer sağlandı. Sürenin sonunda akım kesilerek membran çıkarılmıştır. Önceden boyanmış Low Range Marker'ın membranda görülmesi ile aktarımın yapıldığı kanıtlanmış oldu.

Membran non-spesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla hazırlanan bloklama solüsyonu içinde bir gece +4° de inkübe edilmiştir. Bunun yapılmasının amacı protein bağlanmamış membran bölgelerinin süt tozuyla kapatılarak antikorların yanlış bağlanmasını önlemektir.

Ertesi gün membran, üzerindeki bloklama solüsyonu dökülerek, fazla olan kısmını da üç kez 4 ml TBST solüsyonu ile 10' ar dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi karıştırıcı üzerinde yapılmıştır.

Membranlar daha sonra dokuz örnek için 90 µl Leptin primer antikor (Santa Cruz OB-20: sc- 842) ve diğer dokuz örnek için 90 µl Sirtuin-1 primer antikor (Santa Cruz Sirt-1, sc- 74465) 1/200 oranında TBST ile seyreltme yapılarak çalkalayıcı üzerinde gece boyunca bekletildi.

Bu işlemden sonra primer antikor boşaltılarak üç kez 10' ar dakika 4 ml TBST solüsyonu ile karıştırıcının üzerinde yıkanmıştır. HRP histostatin plus kitinin B solüsyonu (invitrogen 85-9073) geniş spektrumlu Linker solüsyonu, biyotinlenmiş anti mouse ve anti rabbit antikorları içeren konjuge sekonder antikor olarak kullanılan solüsyon her bir örneğe beş damla olacak şekilde eklendi. Yarım saat boyunca karıştırıcıda bekletildi. Sürenin sonunda sekonder antikor döküldü. Kalan antikor uzaklaştırmak için üç kez 10'ar dakika 4 ml TBST solüsyonu ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardından HRP histostatin plus kitinin Tracer solüsyonu olarak bilinen horse radish peroksidase ile konjuge streptavidin içeren solüsyon ile 20 dakika karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Sonra 4 ml TBST solüsyonu ile üç kez aynı işlem tekrarlanmıştır. Boyama işlemi için DAB substrat kiti (DAKO K4065) kullanılmıştır. Beş dakika boyunca bu solüsyonda bantlar kahverengi renk alana kadar bekletilmiştir. Bu işlem distile su ile stoplanmıştır. Membran oda sıcaklığında iyice kurutulduktan sonra bilgisayar ortamına aktarmak için Vilber lourma marka tarayıcı kullanıldı. Oluşan protein bantlarının siyah beyaz görüntüleri alınmıştır

3.6.6 İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatiksel değerlendirmesi için Kruskal Wallis ve Mann Whitney U Testi kullanıldı. Veriler SPSS istatistik programı kullanılarak değerlendiril-

miştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Western blot sonuçları ise Image J programı kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Kan şekeri ve ağırlık bulguları

Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda RSV' nin böbrekteki Leptin ve Sirtuin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Deneye başlamadan önce sıçanların ölçülen kan şekeri değerleri birbirine yakındı (70-130 mg/dl). Deney süresince toplam dört kez ölçülen ağırlık ve kan şekeri düzeyleri kaydedildi. Daha sonra her bir grubun deney başlangıcı ve sonundaki ağırlık farkları ve kan şekeri düzeyi farkları hesaplandı. Hayvan gruplarının deney sürecindeki ağırlık değerleri tablo III ve kan glukoz düzeyleri tablo IV'de gösterilmiştir.

Başlangıçta tüm sıçanların ağırlıkları birbirine yakındı. Kontrol gruplarında ve diyabet grubunda deney sonunda başlangıca göre ağırlık artışı gözlenirken, DM+RSV ile DM+DMSO gruplarında ağırlığın azaldığını görmekteyiz. Deneyin sonunda diyabet ve DM+RSV gruplarının ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Takip eden ölçümlerde ağırlık kazanımı açısından bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Aynı şekilde ağırlık azalması açısından da anlamlı fark yoktu. DM+RSV grubunda kontrole göre azaldığını görmekteyiz (tablo III).

Kontrol, K+ RSV gruplarındaki sıçanların kan glukoz düzeylerinde beklenildiği şekilde ölçümlerde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Normal sınırlar içinde seyreden kan glukoz değerleri bulunmuştur. STZ verilmesinden sonraki süreçte diyabet grubunda (DM+SF), DM+RSV grubunda ve DM+DMSO grubunda beklenildiği şekilde hiperglisemi izlendi ($p < 0.05$). Takip eden ölçümlerde RSV sonrasında diyabet+RSV grubundaki ratların kan glukoz seviyelerinde ilaç öncesine göre bir azalma görülmesine rağmen, diyabet ile DM+RSV grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Tablo IV'de deney başlangıcı ve sonu arasındaki farka bakıldığında, diyabet grupları arasında RSV alan diyabetik grupta bu farkın daha düşük olduğu görülmektedir.

Tablo III: Kilo düzeylerinin deney süresince değişimi.

Kilo (gr)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Başlangıç	183,3±14,4	194,2±14,7	202,9±8,6	195,2±9,3	196,3±7,0
STZ sonrası 3.gün	196,7±10,9	197,3±9,6	185, 8±8,4	188,0±11,3	180,7±5,9
Resveratrol öncesi	233,0±21,9	216,8±11,2	185, 9±13,0	203,5±4,9	190,7±13,0
Deney sonu	237,0±16,0	230,0±7,8	186,7±22,8	197,3±20,0	186,0±18,6
Deney başlangıcı ve sonu arası fark	53,7±24,4	35,8±16,1	-16,2±21,3	2,2±20,2	-10,3±21,6

Tablo IV: Şeker düzeylerinin deney süresince değişimi.

Şeker (mg/dl)	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Başlangıç	188,7±17,0	110,5±22,3	90,4±12,5	100,5±17,2	99,2±13,6
STZ sonrası 3.gün	101,3±13,2	96,3±7,2	289,3±74,6	295,5±71,8	311,8±76,4
Resveratrol öncesi	98,2±23,3	105,8±13,7	502,4±101,0	501,7±72,7	561,8±47,6
Deney sonu	126,3±18,6	117,3±9,0	452, 7±95,5	548,0±64,0	541,3±63,0
Deney başlangıcı ve sonu arası fark	37,7±18,1	6,8±24,3	362,2±100,0	442,2±65,0	442,2±65,0

4.2 Histolojik Bulgular

Hematoksilen Eozin boyama sonuçları

Şıçanların hematoksilen- eozinle boyanan böbrek dokuları histolojik olarak; bowman kapsül aralığında genişleme, glomerülde küçülme, glomerülde büyüme, glomerül dejenerasyonu, glomerüler konjesyon, glomerülde kapil dilatasyonu, tübül dilatasyonu, tübül konjesyonu, tübül dejenerasyonu, medullada konjesyon, medulla dejenerasyonu açısından incelendi. Tablo V' de H-E skorlaması görülmektedir.

Tablo V: H-E değerlendirilmesi

H-E Skoru	Grup I Kontrol	GrupII K+RSV	GrupIII DM+RSV	GrupIV DM+SF	GrupV DM+DMSO
Bowman boşluğu genişlemesi	0,3±0,5	0,8±0,4	1,3±0,7	1,8±0,8	1,7±0,5
Glomerüler küçülme	0,5±0,5	1,0±0,6	1,1±0,7	1,5±0,8	1,7±1,2
Glomerüler büyüme	0,7±0,8	0,3±0,5	0,9±0,8	0,8±1,0	1,0±0,9
Glomerüler dejenerasyon	0,5±0,8	0,5±0,6	1,3±0,5	2,2±0,8	1,8±0,8
Glomerüler konjesyon	0,3±0,5	1,0±0,9	1,4±0,7	1,5±0,8	1,5±0,8
Kapil dilatasyonu	0,3±0,5	0,3±0,5	0,4±0,5	1,7±0,5	1,2±0,4
Tübül dilatasyonu	0,7±0,5	0,8333±0,8	1,6±0,5	1,5±0,8	1,3±0,5
Tübül konjesyonu	0,3±0,5	1,2±0,8	1,2±0,7	1,5±0,6	1,3±0,8
Tübül dejenerasyonu	0,7±0,5	0,5±0,6	1,2±0,4	2,2±0,4	2,0±0,6
Medulla konjesyon	0,5±0,6	1,5±0,6	1,3±0,7	1,8±0,4	1,7±0,5
Medulla dejenerasyonu	0,7±0,5	1,3±0,8	1,4±0,5	2,2±0,8	1,7±0,5
İnflamatuar hücre artışı	0,7±0,8	0,2±0,4	1,3±0,7	1,2±1,0	1,2±1,0

Kruskal wallis yöntemi ile değerlendirme yapıldığında; tüm gruplar arasında, bowman genişlemesi açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.005). Glomerül dejenerasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.002). Kapil dilatasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.002). Tübül dejenerasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.000). Medulla konjesyonu açısından gruplar arası anlamlı fark vardı (p=0.015). Medulla dejenerasyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0.018).

Mann whitney U yöntemi ile değerlendirme yapıldığında ise;

Kontrol ve K+RSV grupları arasında; medulla konjesyonu açısından anlamlı fark vardı ($p=0,019$). Kontrol+ RSV grubunda medulla konjesyonu daha yüksek görülmektedir (Resim 9).

Kontrol ve DM grupları arasında; bowman genişlemesi ($p=0,007$), glomerül küçülmesi ($p=0,042$), glomerül dejenerasyonu ($p=0,012$), glomerülde konjesyon ($p=0,027$), kapil dilatasyonu ($p=0,007$), tübül dejenerasyonu ($p=0,002$), medulla konjesyonu ($p=0,005$) ve medulla dejenrasyonu ($p=0,007$) açısından anlamlı fark vardı. Diyabetik böbrekte bu bulgular karşımıza çıkmaktaydı.

Kontrol ve DM+DMSO grupları arasında; bowman genişlemesi ($p=0,007$), glomerül küçülmesi ($p=0,075$), glomerül dejenerasyonu ($p=0,024$), glomerülde konjesyon ($p=0,027$), kapil dilatasyonu ($p=0,018$), tübül konjesyonu ($p=0,041$), tübül dejenerasyonu ($p=0,007$), medulla konjesyonu ($p=0,011$), medulla dejenerasyonu ($p=0,014$) açısından anlamlı fark vardı.

Kontrol ve DM+RSV grupları arasında; bowman genişlemesi ($p=0,017$), glomerül dejenerasyonu ($p=0,036$), glomerülde konjesyon ($p=0,007$), tübül dilatasyonu ($p=0,013$), tübül konjesyonu ($p=0,022$), tübül dejenerasyonu ($p=0,049$), medulla konjesyonu ($p=0,036$), medulla dejenerasyonu ($p=0,022$) açısından anlamlı fark vardı.

K+RSV ve DM grupları arasında; bowman genişlemesi ($p=0,019$), glomerül dejenerasyonu ($p=0,006$), kapil dilatasyonu ($p=0,007$), tübül dejenerasyonu ($p=0,002$) açısından anlamlı fark vardı.

K+RSV ve DM+DMSO grupları arasında; bowman genişlemesi ($p=0,018$), glomerül dejenerasyonu ($p=0,011$), kapil dilatasyonu ($p=0,018$), tübül dejenerasyonu ($p=0,006$) açısından anlamlı fark vardı.

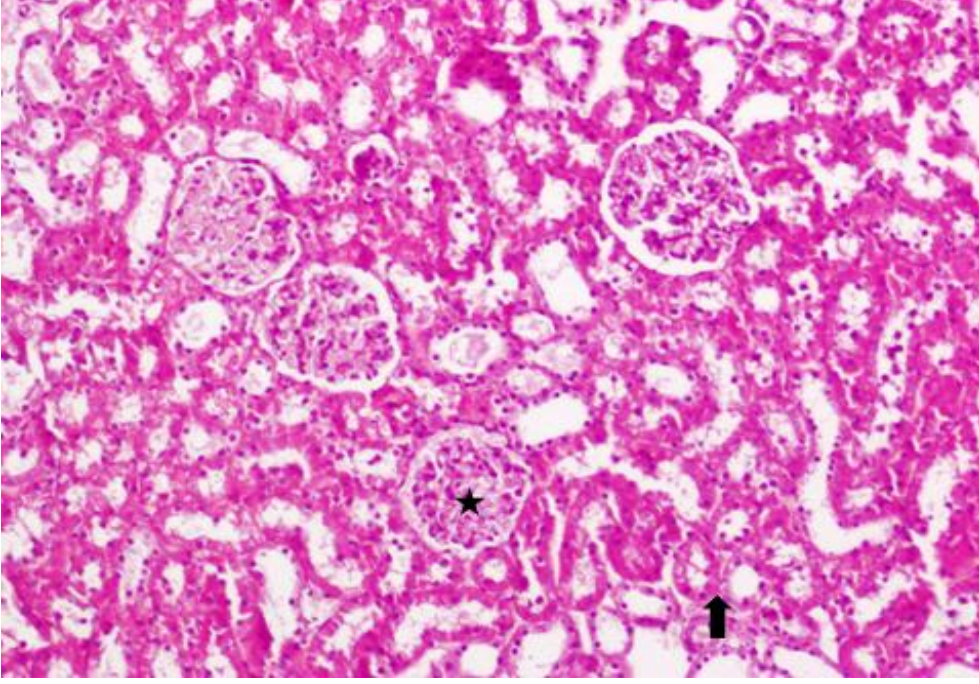
K+RSV ve DM+RSV grupları arasında; glomerül dejenerasyonu ($p=0,016$), tübül dejenerasyonu ($p=0,02$) açısından anlamlı fark vardı.

DM ve DM+DMSO grupları arasında; değerlendirilen bu parametrelerin hiçbirinde anlamlı fark yoktu.

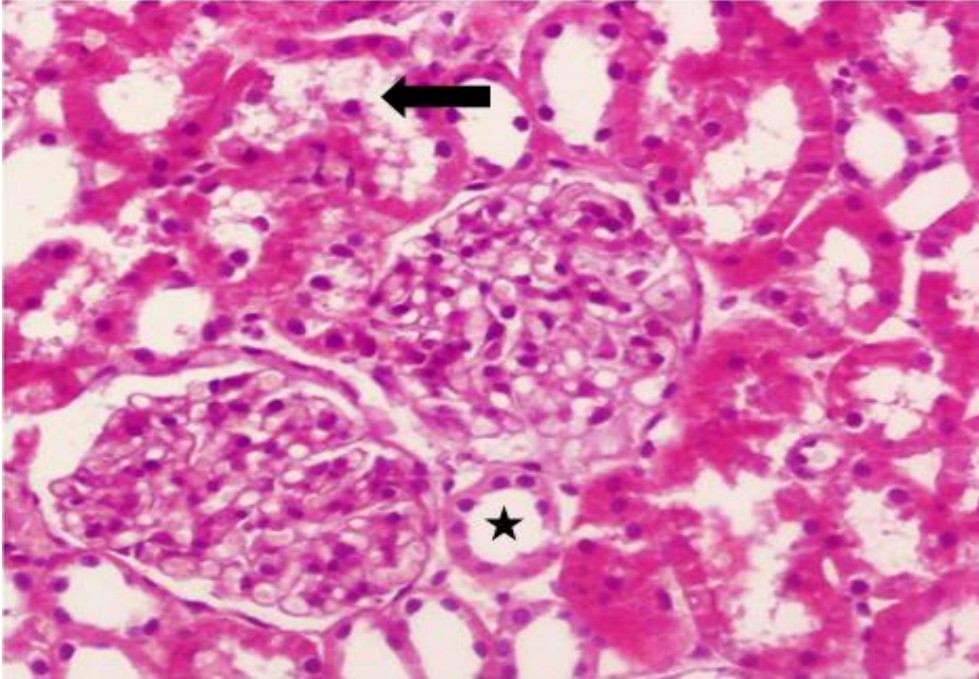
DM ve DM+RSV grupları arasında; glomerül dejenerasyonu ($p=0,033$), kapil dilatasyonu ($p=0,004$), tübül dejenerasyonu ($p=0,004$) açısından anlamlı fark vardı. Bu bulgularda RSV alan diyabetik grupta düzelme görülmüştür.

DM+DMSO ve DM+RSV grupları arasında; kapil dilatasyonu ($p=0,021$), tübül dejenerasyonu ($p=0,020$) açısından anlamlı fark vardı.

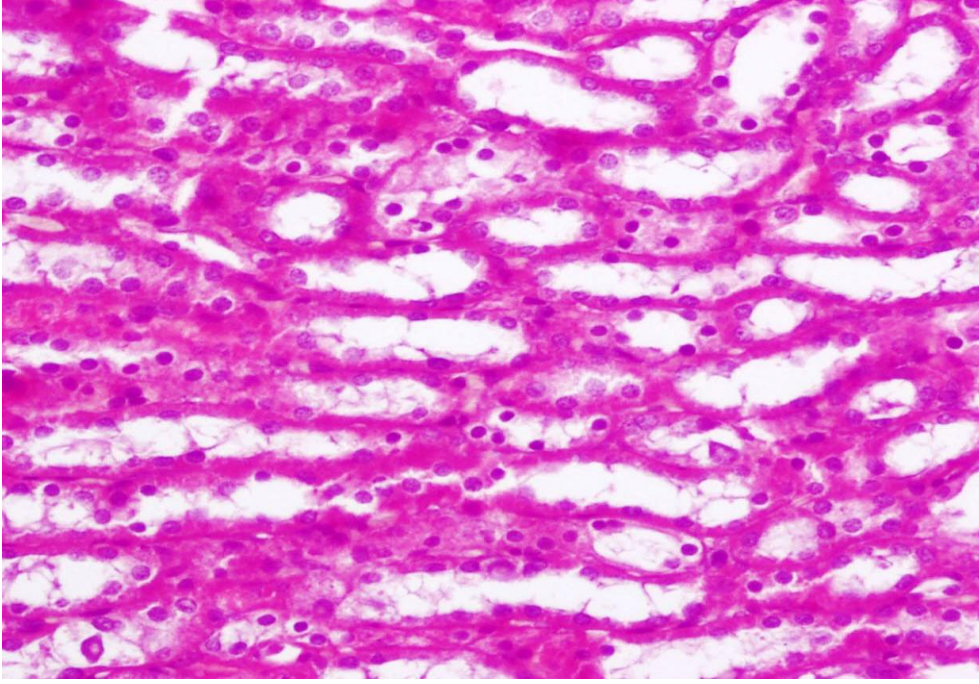
Hematoksilen Eozin Resimleri



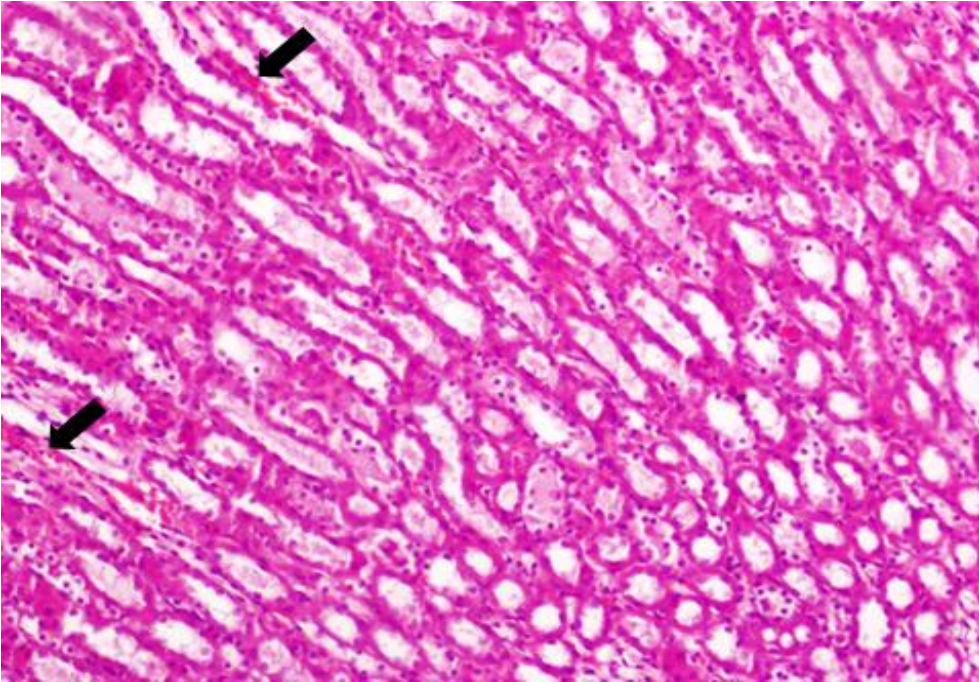
Resim 6: Normal yapıda glomerül (★) ve tübül (↑) yapıları (H-E x 10)



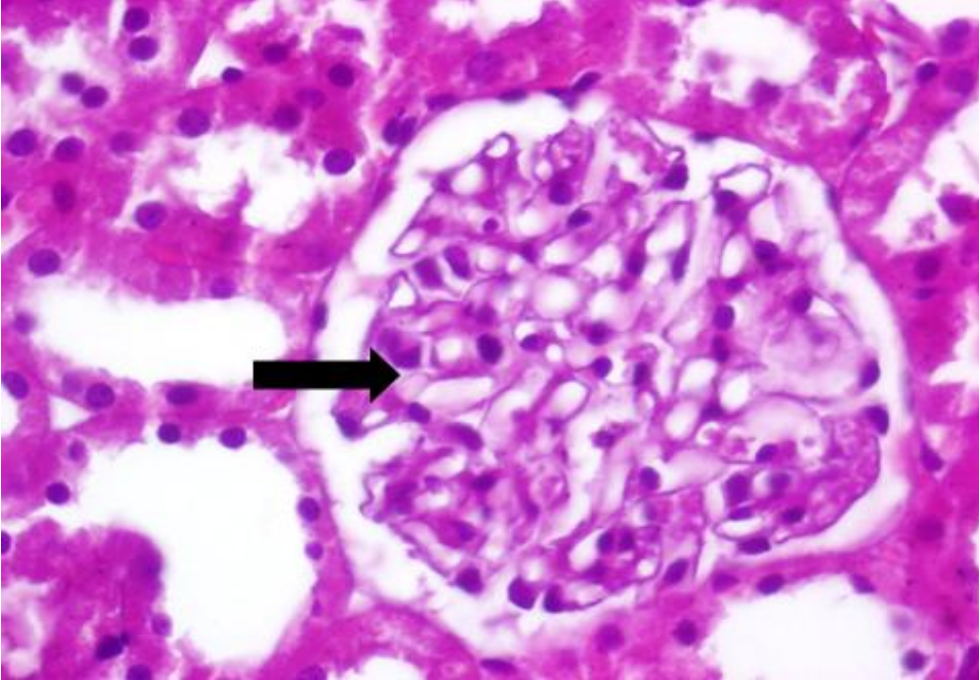
Resim 7: Kontrol grubu. (↑) Proksimal tübül ve (★) Distal tübül (H-E x 20)



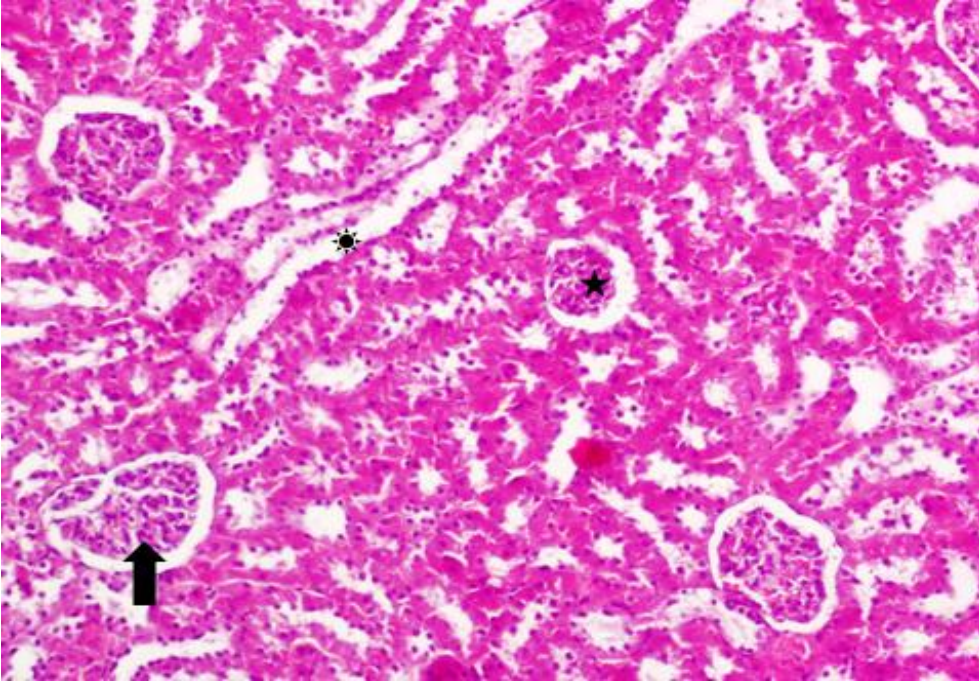
Resim 8: Kontrol grubu böbrek medullası (H-E x 20)



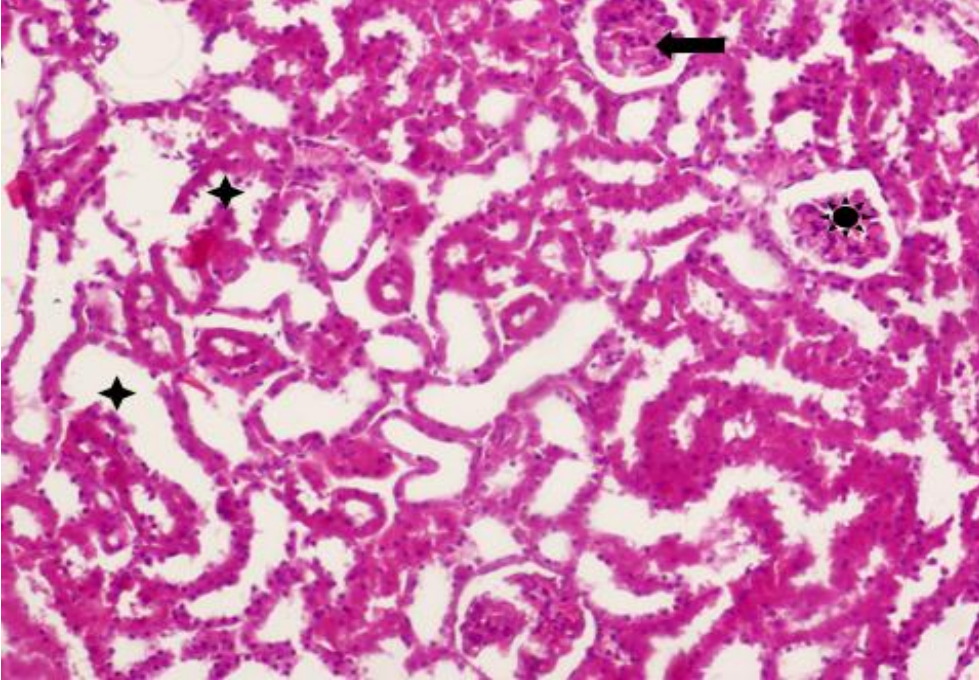
Resim 9: KRSV grubunda medullada konjesyon bulguları (↑) (H-E x 10)



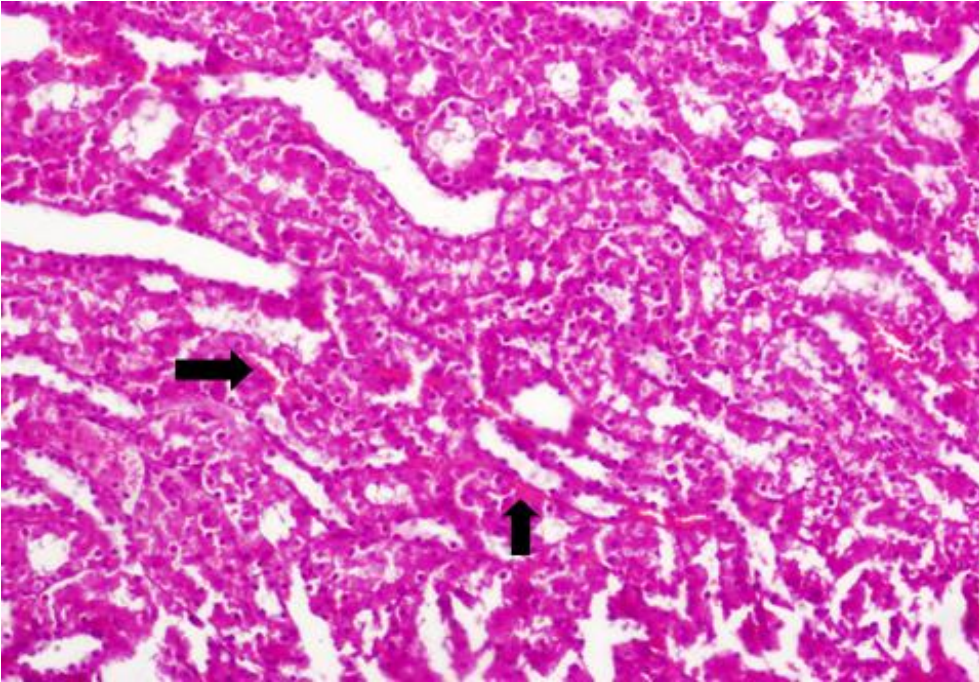
Resim 10: KRSV grubunda normal yapıda glomerül (↑) (H-E x 40)



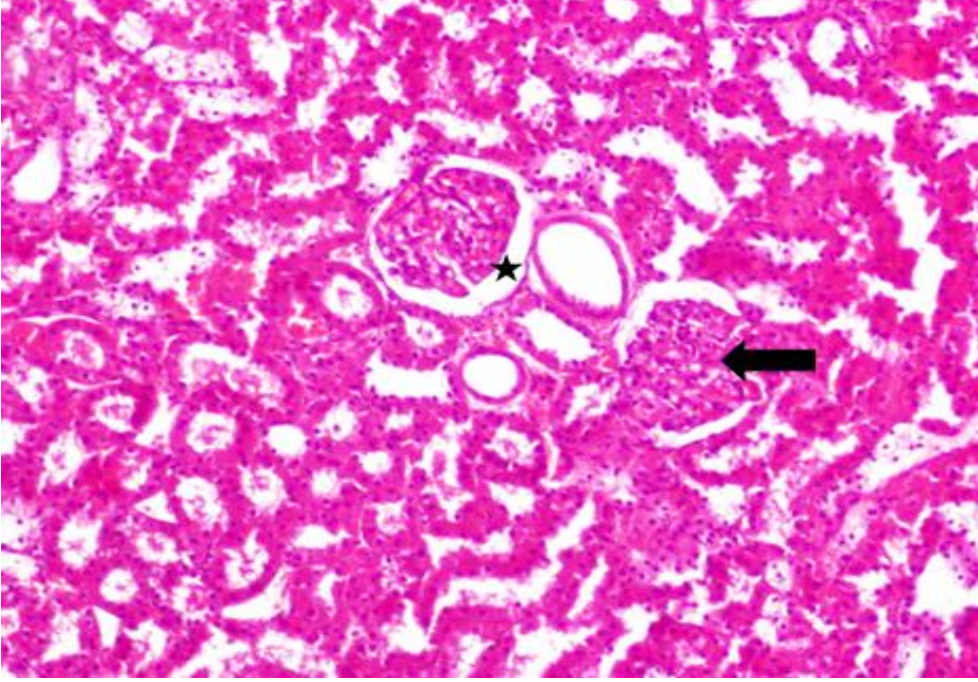
Resim 11: Diyabet grubunda (★) işaretli glomerülde küçülme, bowman kapsül aralığında genişleme, (↑) işaretli glomerülde dejenerasyon, (★) işaretli tübülde dilatasyon bulguları (H-E x 10)



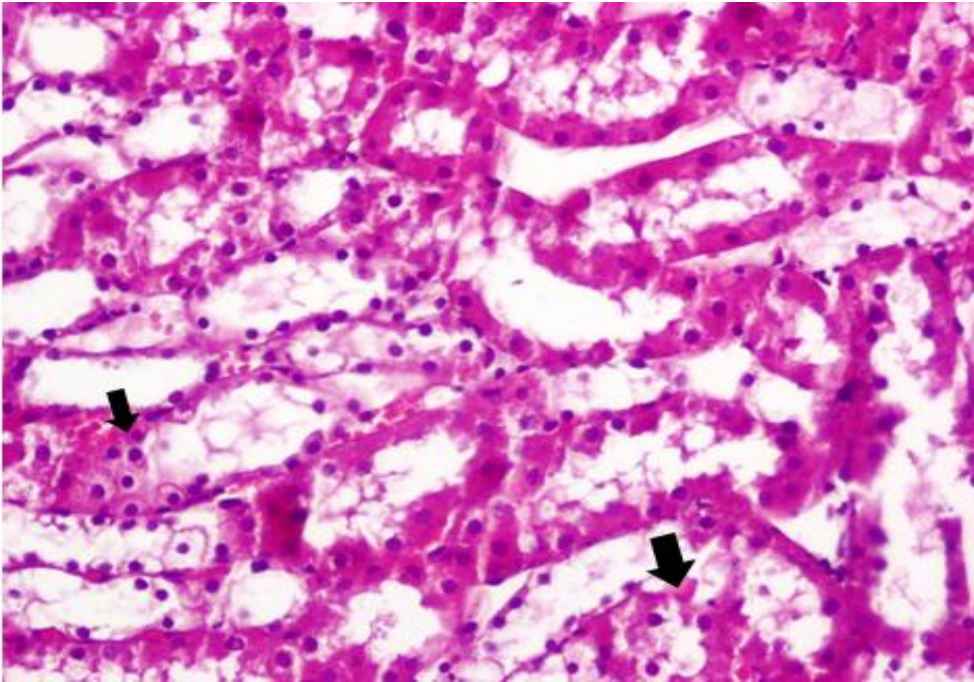
Resim 12: Diyabette (✱) işaretli glomerülde küçülme, (↑) işaretli glomerülde konjesyon, (◆) ile işaretli tübülde dilatasyon, dejenerasyon (H-E x 10)



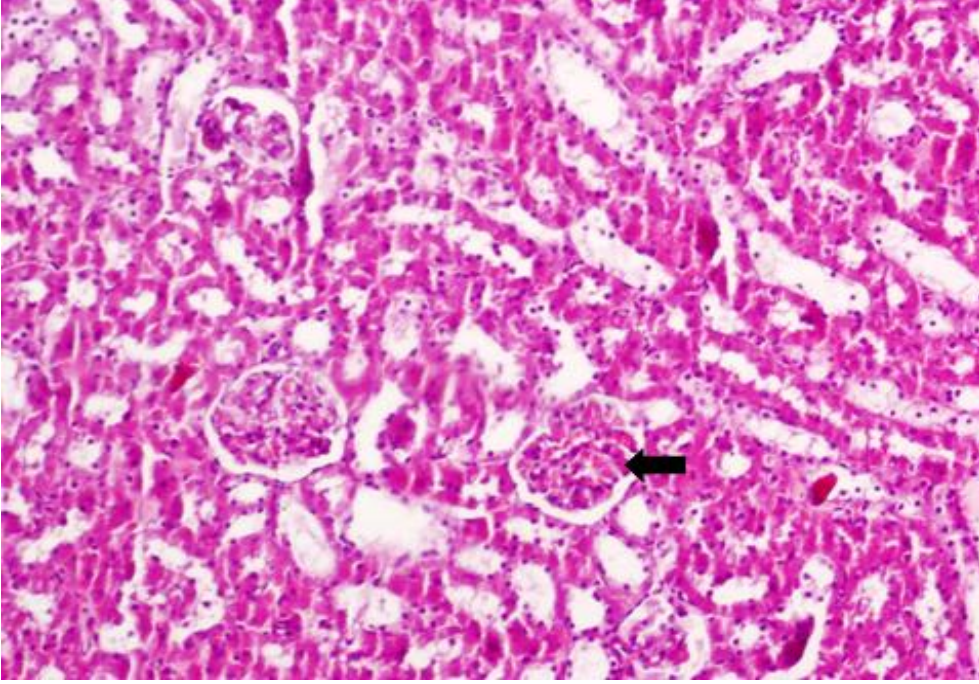
Resim 13: Diyabet grubunda tübüllerde konjesyon(↑) (H-E x 10)



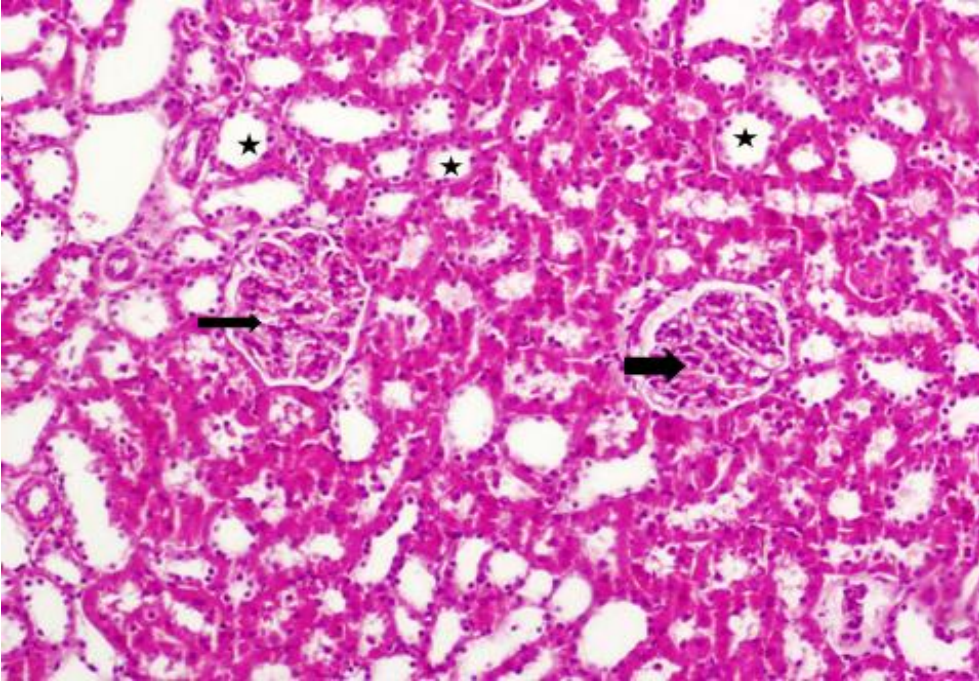
Resim 14: Diyabet+ DMSO grubunda (➡) glomerülde konjesyon ve büyüme, (★) bowman mesafesinde genişleme (H-E x 10)



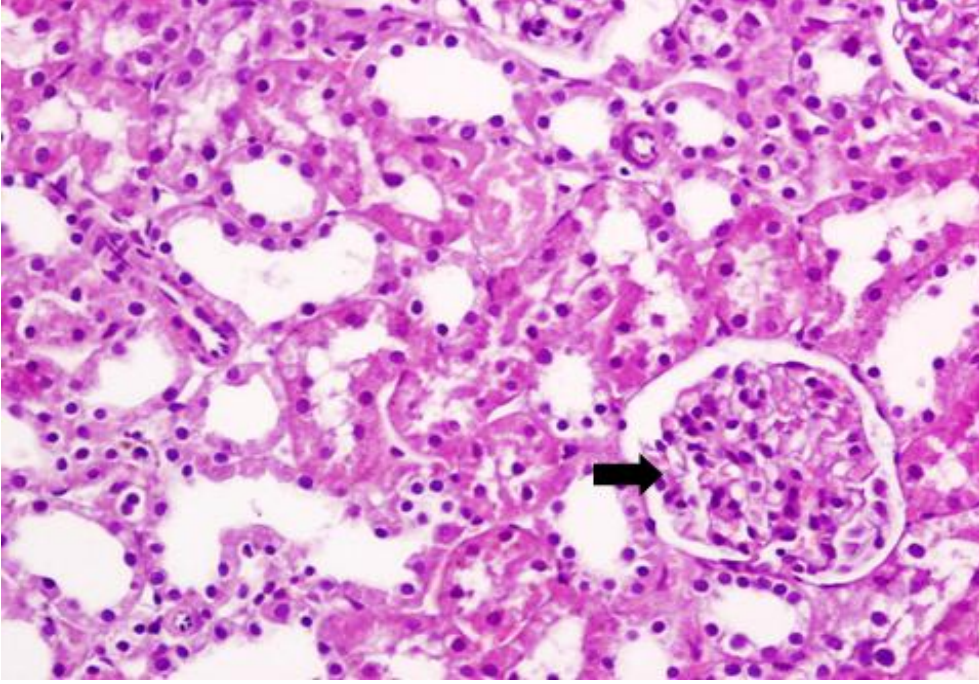
Resim 15: DM+ DMSO grubunda böbrek medullasında dejenerasyon(➡) (H-E x 20)



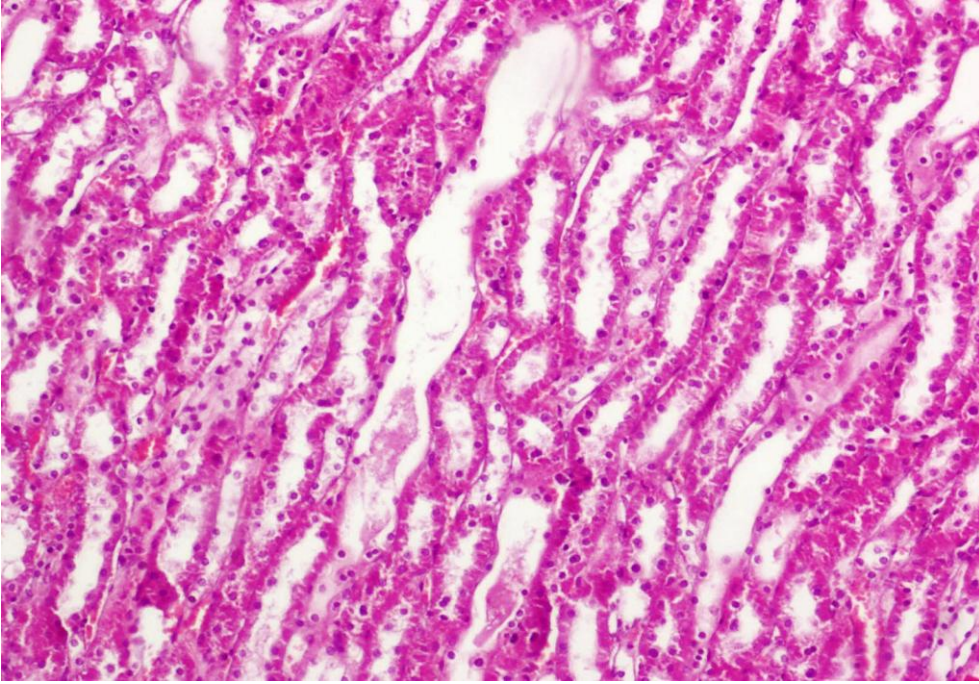
Resim 16: DM+ DMSO grubunda glomerül içi kapillerde dilatasyon (↑)(H-E x 10)



Resim 17: DM+RSV grubunda glomerüllerin(↑) ve tübüllerin (★) diyabete göre bulguların biraz düzelmiş görünümü (H-E x 10)



Resim 18: DM+ RSV grubundaki görünüm. Glomerül (➡) yapısında düzelme (H-E x 20)



Resim 19: DM+RSV grubunda medullanın görünümü (H-E x 10)

PAS Boyaması sonuçları

PAS boyaması yapıldığında preparatlar histolojik olarak incelendiğinde glomerül, bazal membran ve tübüllerdeki boya tutulum miktarlarına göre skorlama yapılmıştır. Etkilenme miktarına göre sıfırdan üçe kadar derecelendirme yapılarak değerlendirilmiştir. (tablo 6).

Tablo VI: PAS boyamasının değerlendirilmesi.

PAS skoru	Grup I (n=6) K	GrupII(n=6) K+RSV	GrupIII(n=9) DM+RSV	GrupIV(n=6) DM+SF	GrupV(n=6) DM+DMSO
Glomerül	0,8±0,4	1,0±0,0	1,0±0,0	1,2±0,4	1,2 ±0,4
Bazal membran (Glomerül- Bowman kapsülü)	0,3±0,5	0,8±1,0	0,8±0,7	0,8±0,8	1,7±0,5
Tübüller	2,0±0,6	2,0±0,6	1,2±0,7	1,5±0,6	1,8±1,0

Kruskal wallis analizi ile böbreğin incelenen bölgelerinden (glomerül, bazal membran, tübüller) hiçbirinde gruplar arası anlamlı fark yoktu. (sırasıyla p=0,283, p=0,061 ve p=0,189).

Mann whitney U analizi yapıldığında ise;

K ve DM+DMSO grupları arasında; bazal membran (p=0,007) değerlendirilmesinde anlamlı fark görülmüştür. DM+ DMSO grubunda bazal membranda daha yoğun bir PAS boyanması görülmektedir (Resim 26).

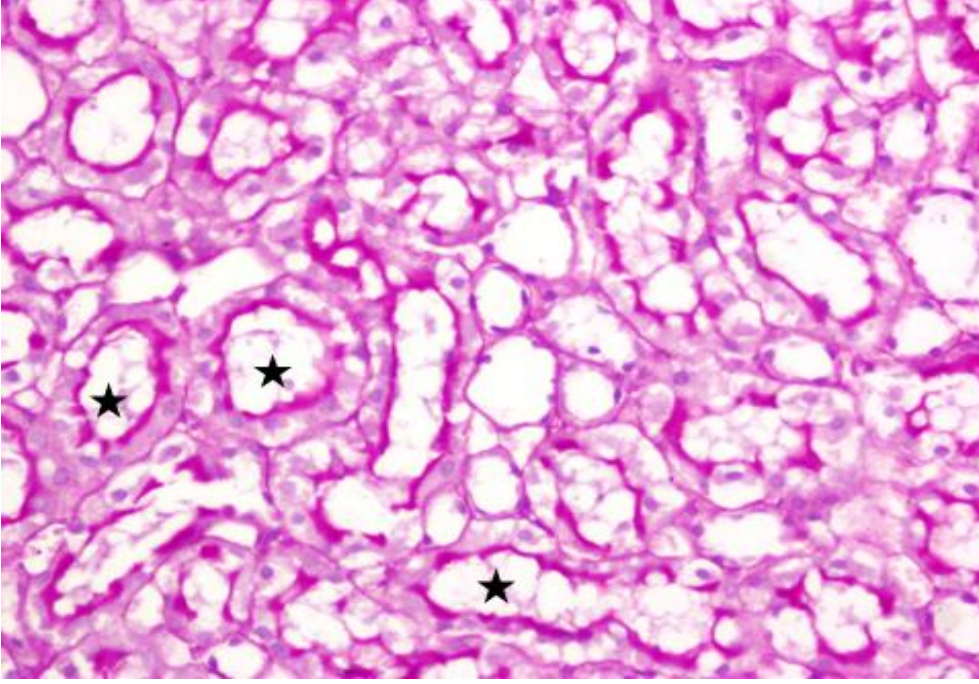
K ve DM+RSV grupları arasında; tübül (p=0,046) açısından anlamlı fark görülmüştür.

K+RSV ve Diyabet grupları arasında; tübül (p=0,043) değerlendirilmesinde anlamlı fark görülmüştür.

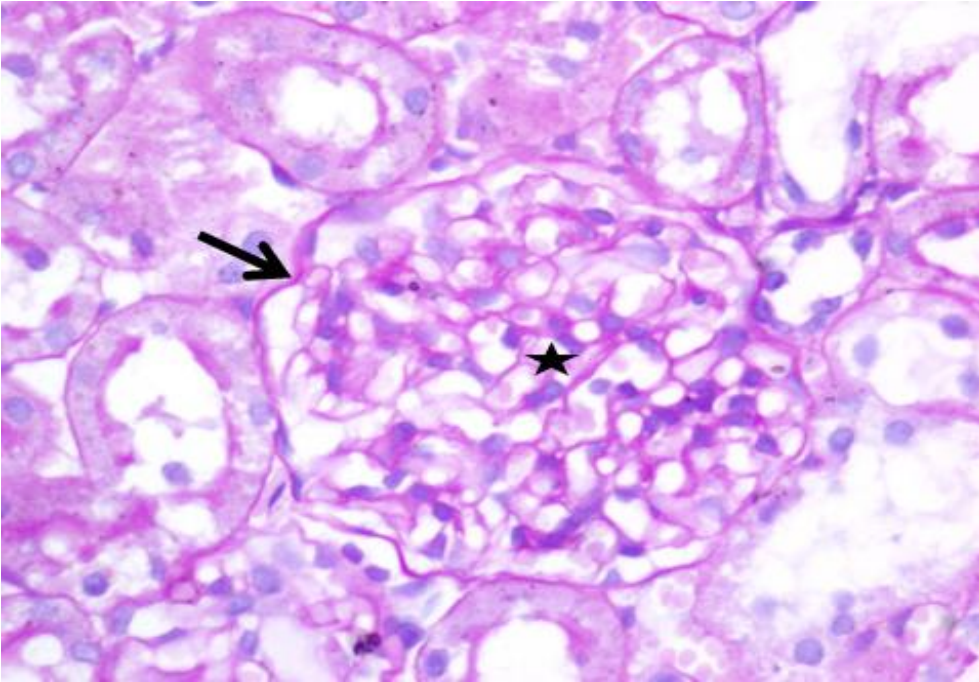
K+RSV ve DM+RSV grupları arasında; tübül (p=0,046) değerlendirilmesinde anlamlı fark bulunmuştur.

DM+DMSO ve DM+RSV grupları arasında; bazal membran (p=0,022) değerlendirilmesinde anlamlı fark bulunmuştur. DM+DMSO grubunda bazal membranda PAS yoğunluğu daha fazla görülmektedir (Resim 26).

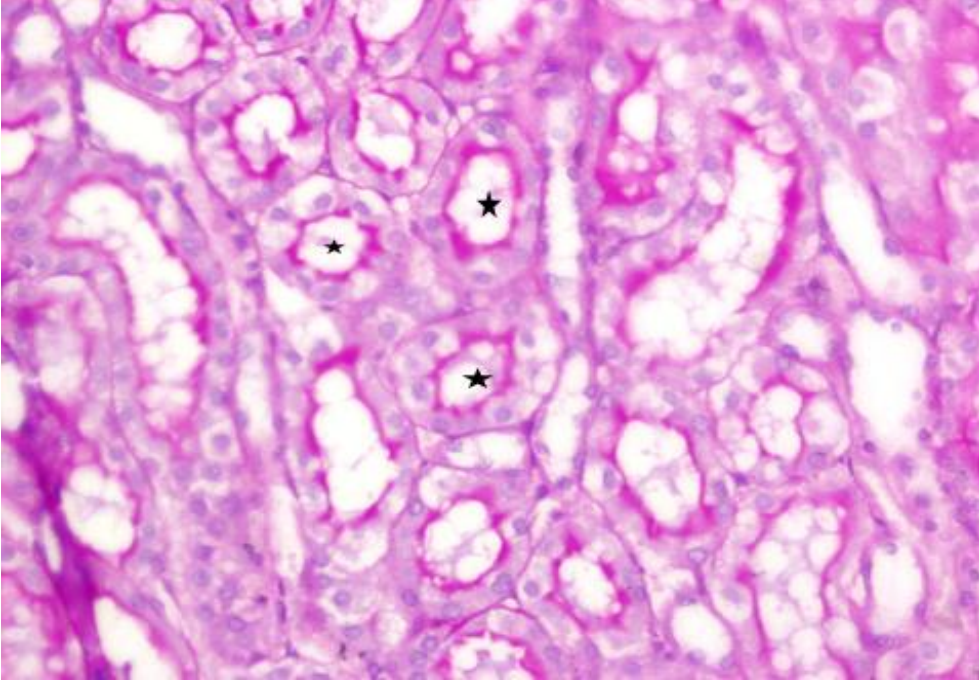
PAS Resimleri



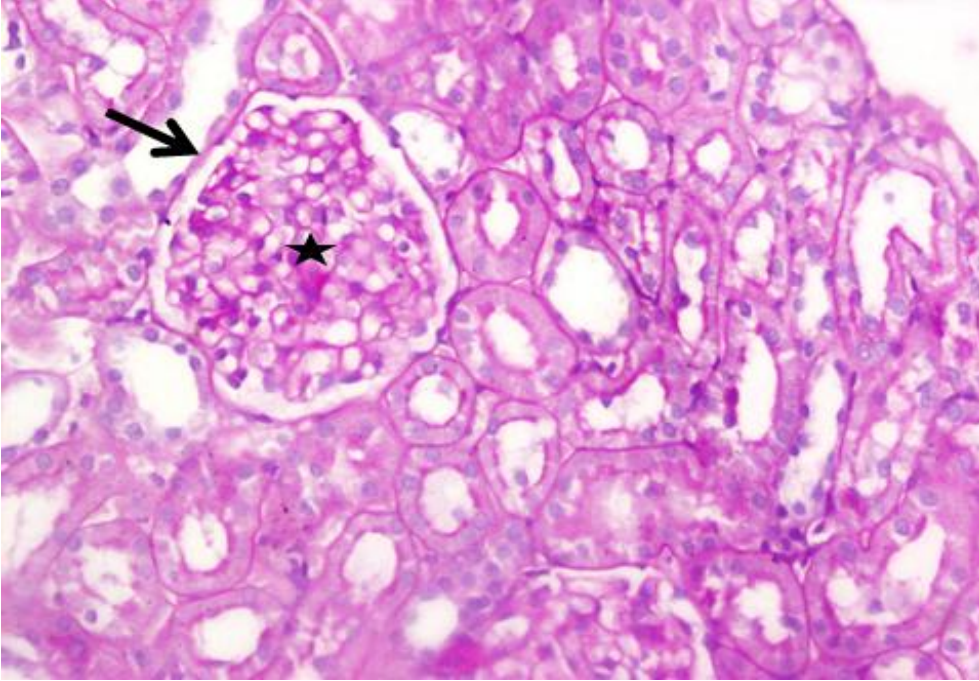
Resim 20: Böbrek kontrol grubu tübül (★) görünümü (PAS x 20)



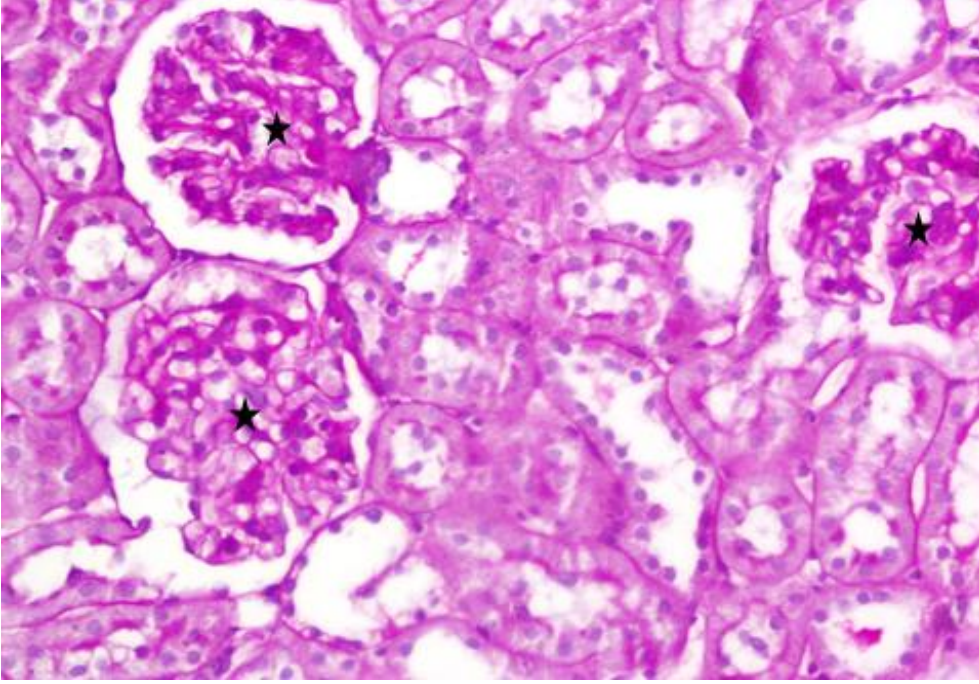
Resim 21: Böbrek kontrol grubu glomerül (★) ve bazal membran (▲) görünümü (PAS x 40)



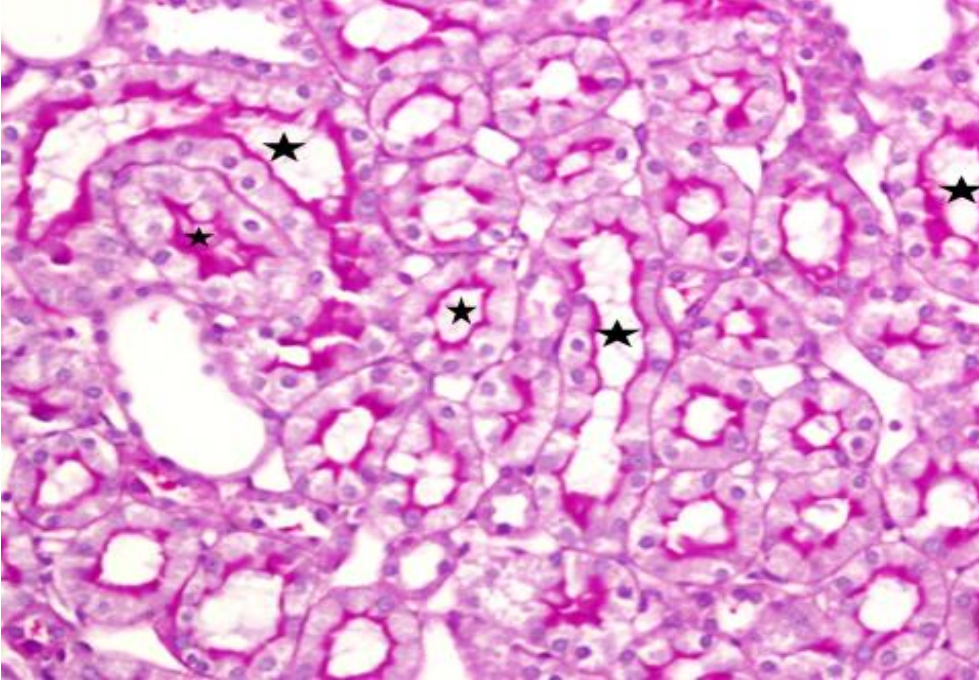
Resim 22: Böbrek K+ RSV grubunda tübül (★) görünümü (PAS x 20)



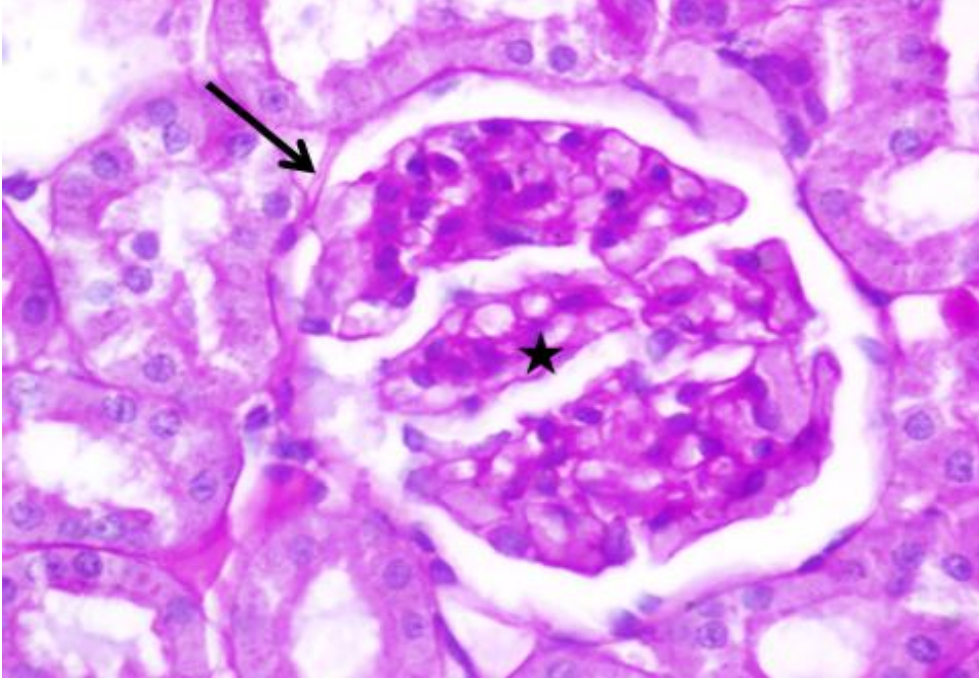
Resim 23: Böbrek K+RSV grubunda glomerül (★), bazal membran (➔) görünümü (PAS x 20)



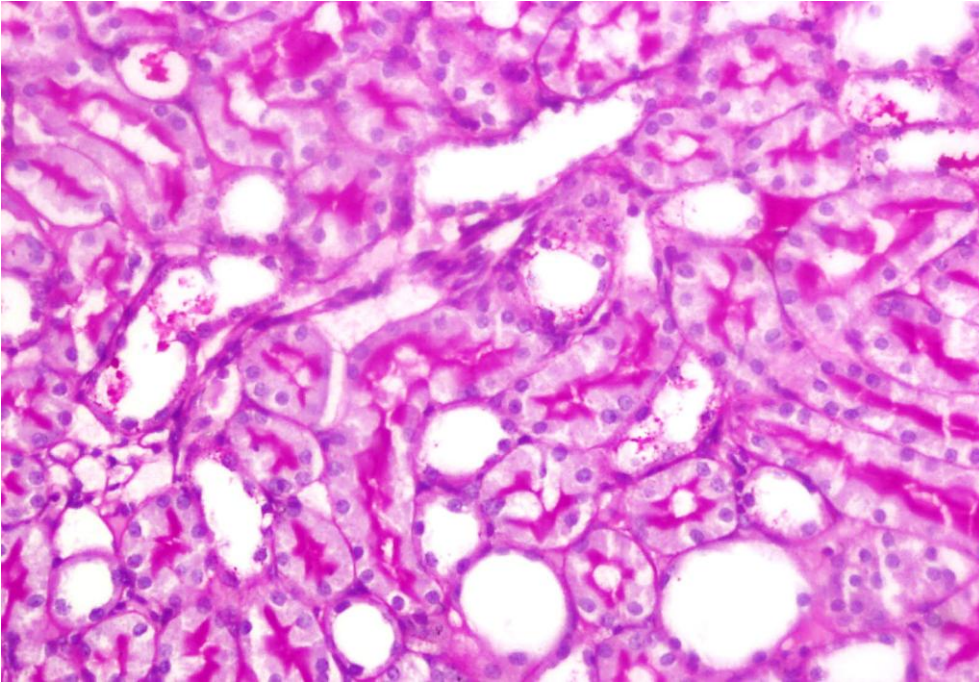
Resim 24: Diyabet grubunda PAS ile yoğun boyanmış glomerüller (★) (PAS x 20)



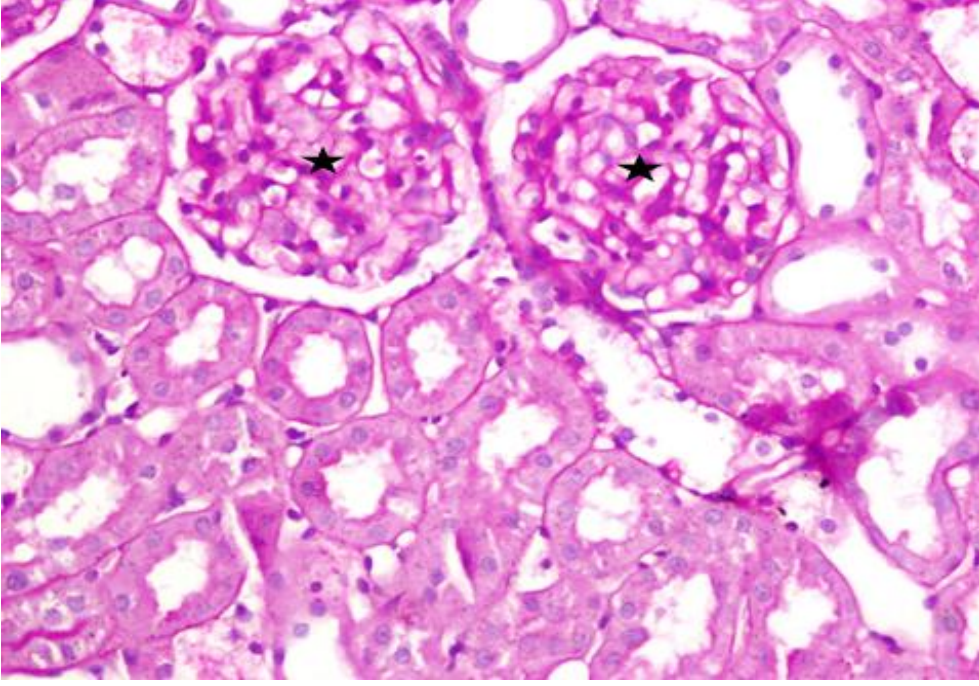
Resim 25: Diyabet grubunda PAS ile yoğun boyanmış tübüller (★) (PAS x 20)



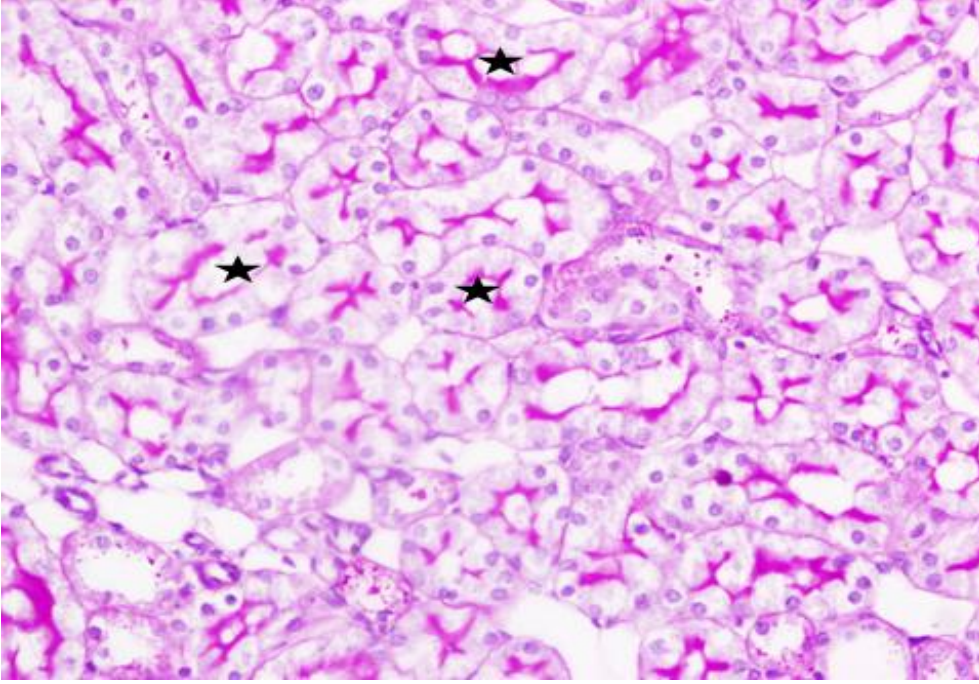
Resim 26: DM+DMSO grubunda glomerülde (★) ve bazal membranda (↑) PAS yoğunluğu (PAS x 40)



Resim 27: DM+DMSO grubunda PAS yoğunluğu (PAS x 20)



Resim 28: DM+RSV grubunda glomerül (★) görünümü (PAS x 20)



Resim 29: DM+RSV grubunda tübüllerin (★) görünümü (PAS x 20)

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Leptin bulguları

Leptin antikoruna ile boyanmış böbrek dokularında immünohistokimyasal değerlendirme için glomerül, tübül ve medulla bölgesi incelenmiştir. Değerlendirme tablo VII' de gösterilmiştir.

Tablo VII: Leptin ile immünohistokimyasal boyanma yapılmış böbrek dokularının değerlendirilmesi.

LEPTİN IHC	Grup I (n=6) K	GrupII(n=6) K+RSV	GrupIII(n=9) DM+RSV	GrupIV(n=6) DM+SF	GrupV(n=6) DM+DMSO
Glomerül	0,2±0,4	1,2±0,4	0,7±0,5	1,2±0,4	0,2±0,4
Tübüller	2,7±0,5	2,7±0,8	2,7±0,5	3,0±0,0	3,0±0,0
Medulla	1,0±1,1	2,7±0,5	2,1±0,6	2,3±0,8	2,2±1,0

Bulgularımız Kruskal wallis analizi ile değerlendirildiğinde; gruplar arasında glomerül tutulumu açısından anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,001$). Tübül ve medulla tutulumunda anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,34$ ve $p=0,063$).

Mann Whitney U testi ile leptin tutulumu incelendiğinde ise;

K ve K+RSV grupları arasında; glomerülde ($p=0,006$) ve medullada ($p=0,019$) leptin boyanma oranı açısından anlamlı fark görülmüştür. K+ RSV grubunda kontrole göre glomerüllerde ve medullada leptin yoğunluğunun fazla olduğunu tesbit ettik.

K ve Diyabet grupları arasında; glomerül ($p=0,006$) ve medulla ($p=0,046$) değerlendirilmesinde anlamlı fark görülmüştür. Diyabet grubunda bu kısımların boyanma oranı daha yüksekti.

K ve DM+RSV grupları arasında; medullanın ($p=0,031$) boyanma oranı açısından anlamlı fark görülmüştür.

K ve DM+DMSO grupları arasında; glomerüllerde ($p=0,006$) leptin tutulumu açısından anlamlı fark görülmüştür.

DM ve DM+DMSO grupları arasında glomerüllerde ($p=0,006$) leptin boyanma oranı açısından anlamlı fark bulunmuştur. Diyabet grubunda leptin boyanması daha yoğun görülmektedir.

SIRTUİN-2 bulguları

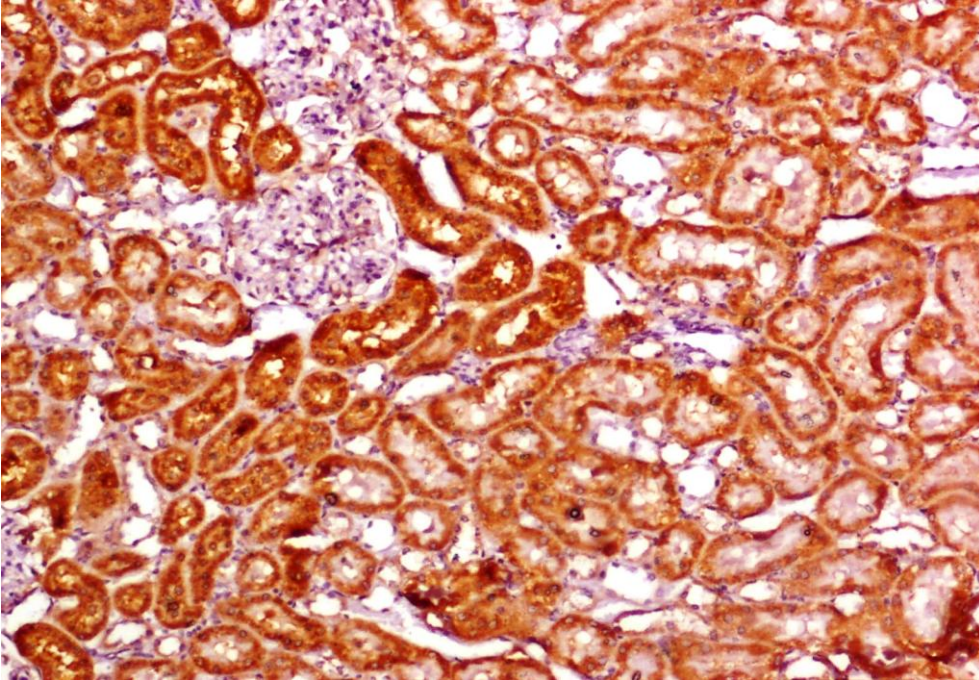
SIRT-2 antikoruna ile boyanmış böbrek dokularında immünohistokimyasal değerlendirme için Leptin için kullanılan skorlama sistemi kullanılarak değerlendirme yapılmıştır (tablo VIII). Kruskal wallis analizi yapıldığında böbreğin bakılan bölgelerinden hiçbirinde (glomerül, tübüller, medulla) gruplar arası anlamlı fark yoktu (sırasıyla $p=0,416$, $p=0,523$ ve $p=0,839$).

Mann Whitney U analizi ile de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

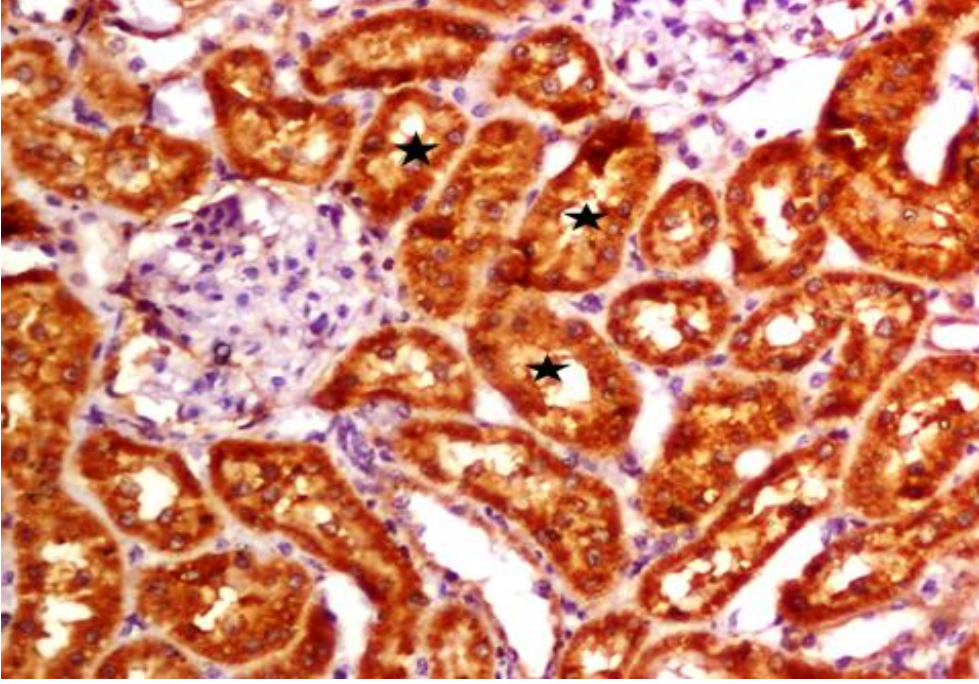
Tablo VIII: SIRT-2 ile immünohistokimyasal boyanma yapılmış böbrek dokularının değerlendirilmesi.

SIRT2 IHC	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Glomerül	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,4	0,2±0,4	0,3±0,5
Tübüller	2,5±0,8	2,2±0,4	2,6±0,5	2,5±0,6	2,7±0,5
Medulla	1,8±1,0	2,0±0,9	2,1±0,3	2,3±0,5	2,0±0,6

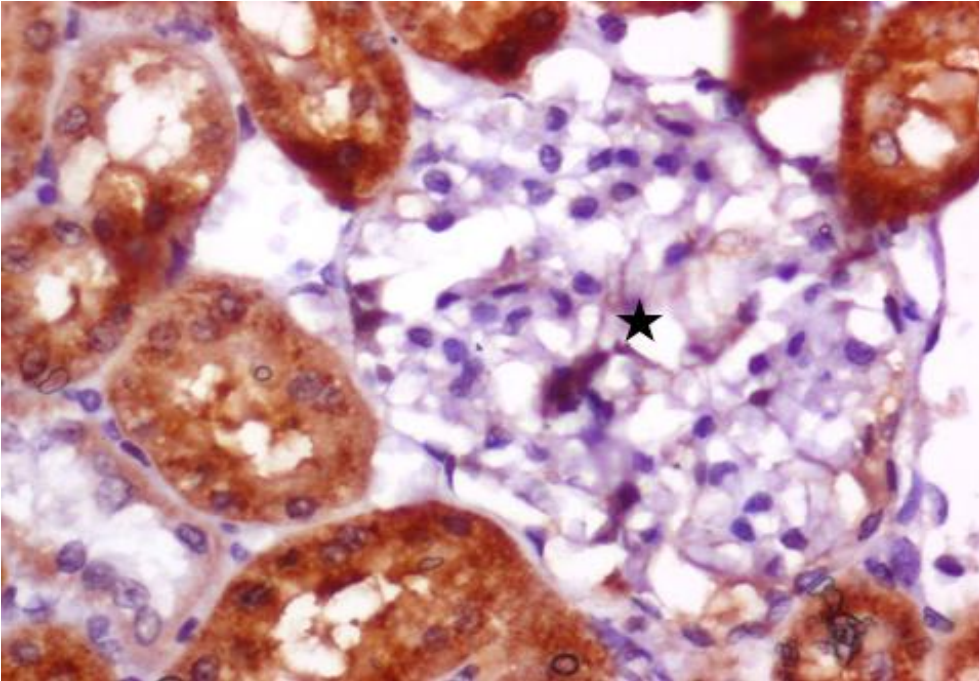
Leptin (Ob) Resimleri



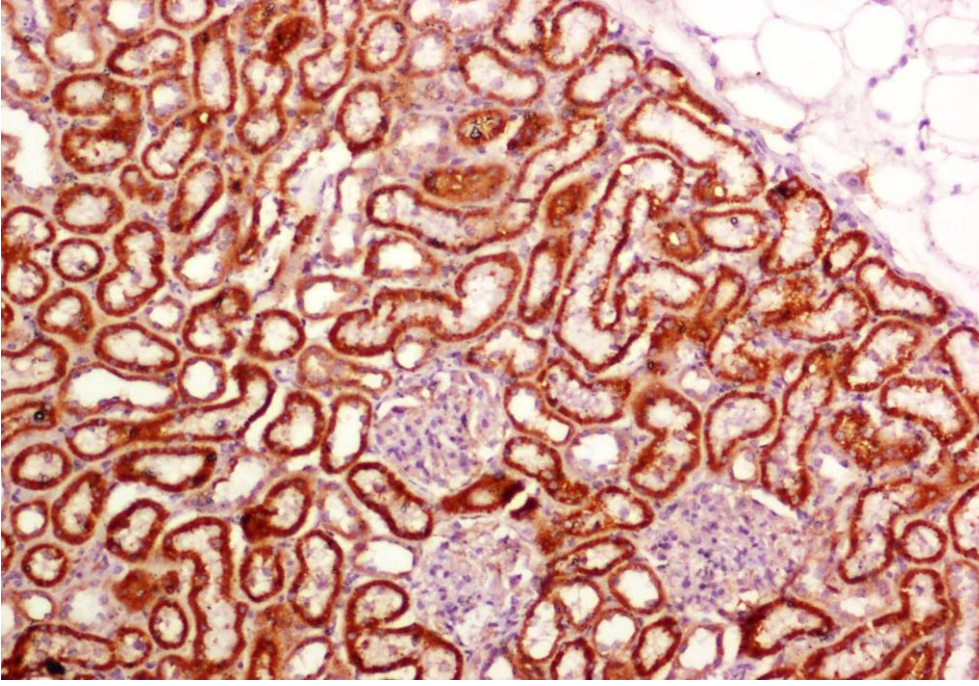
Resim 30: Böbrek kontrol grubunun leptin ile boyanması (Ob x 10)



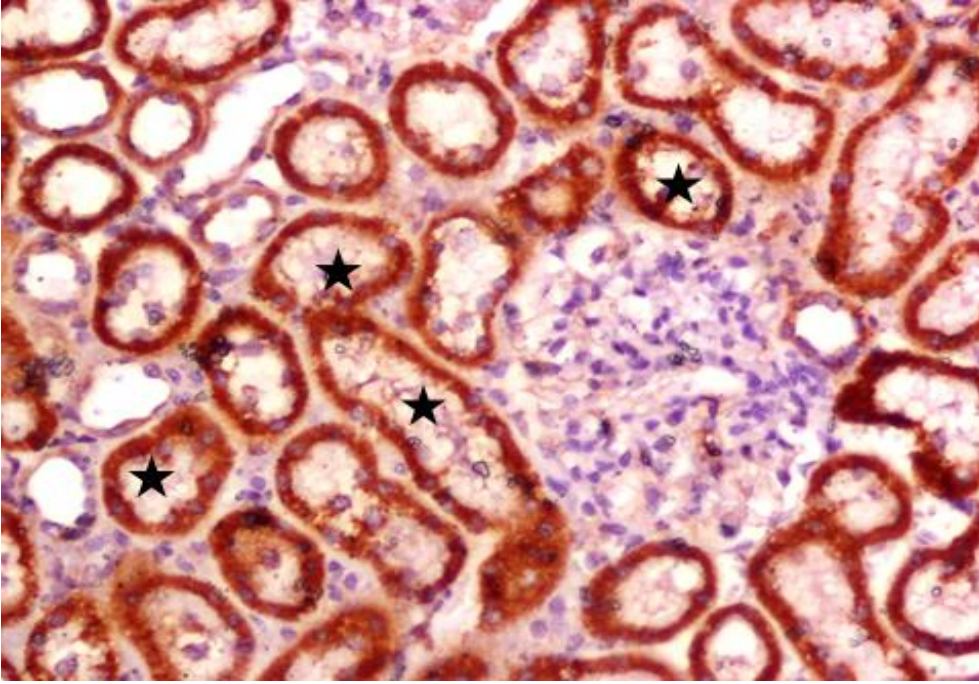
Resim 31: Leptin antikoru ile boyanmış kontrol grubundaki görünüm. Tübüllerin(★) yoğun olarak boyanması (Ob x 20)



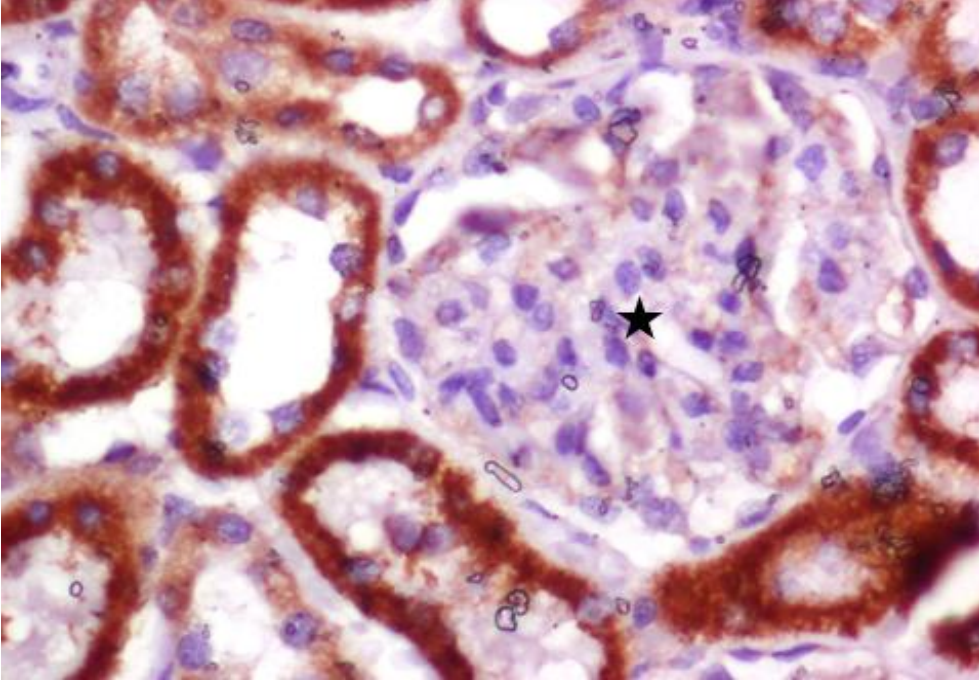
Resim 32: Kontrol grubunda glomerülde (★) boyanma görülmemesi (Ob x 40)



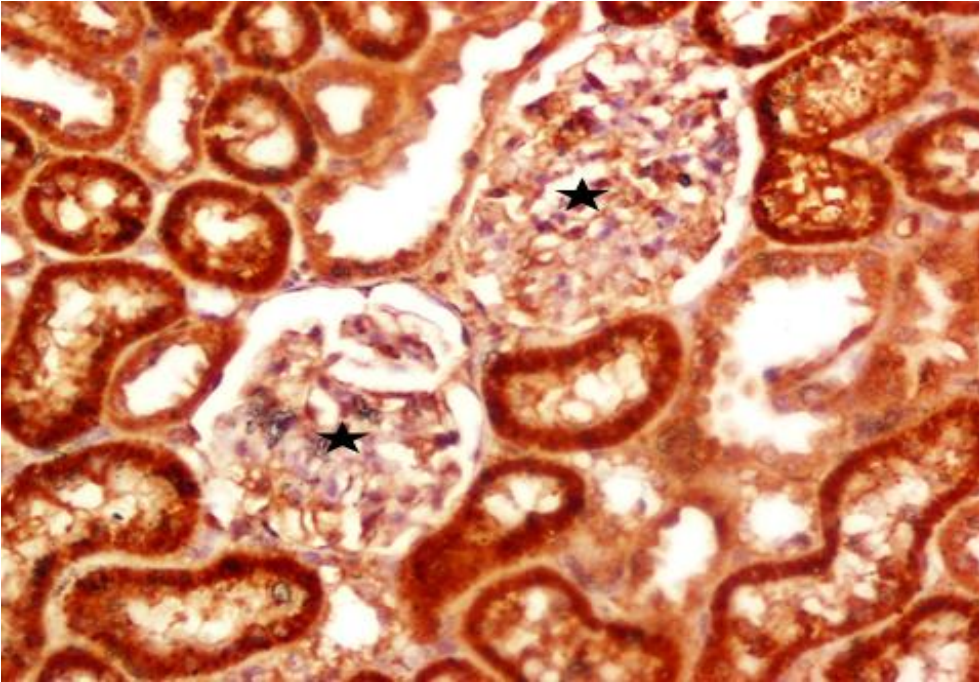
Resim 33: K+ RSV grubunda Leptin tutulumu (Ob x 10)



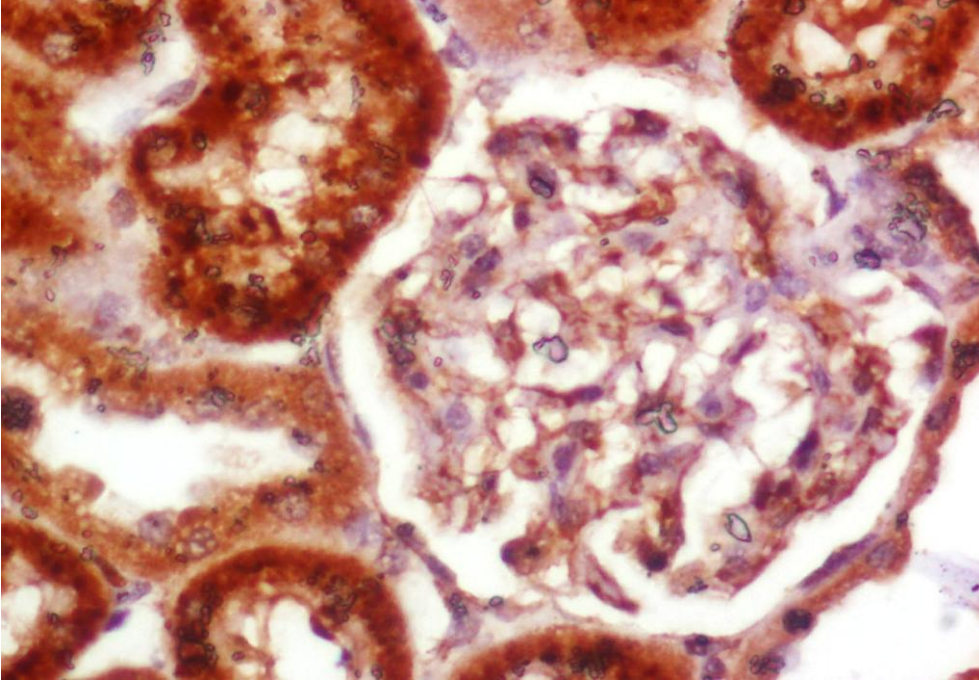
Resim 34: K+RSV grubunda tübüllerde (★) Leptin tutulumu (Ob x 20)



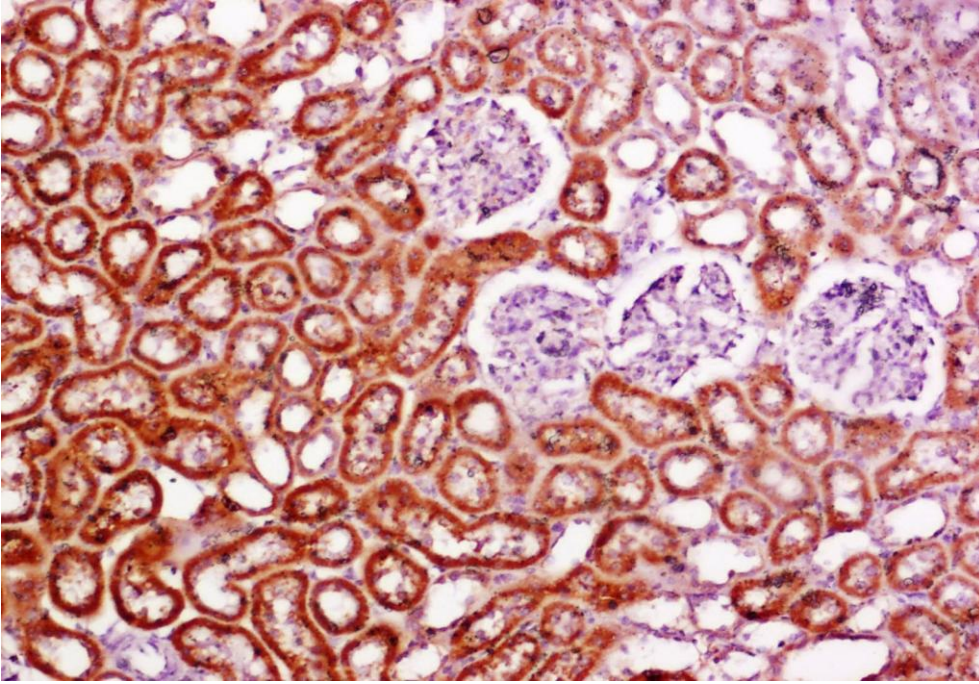
Resim 35: K+RSV grubunda glomerülde (★) boyanmanın olmadığını görmesi
(Ob x 40)



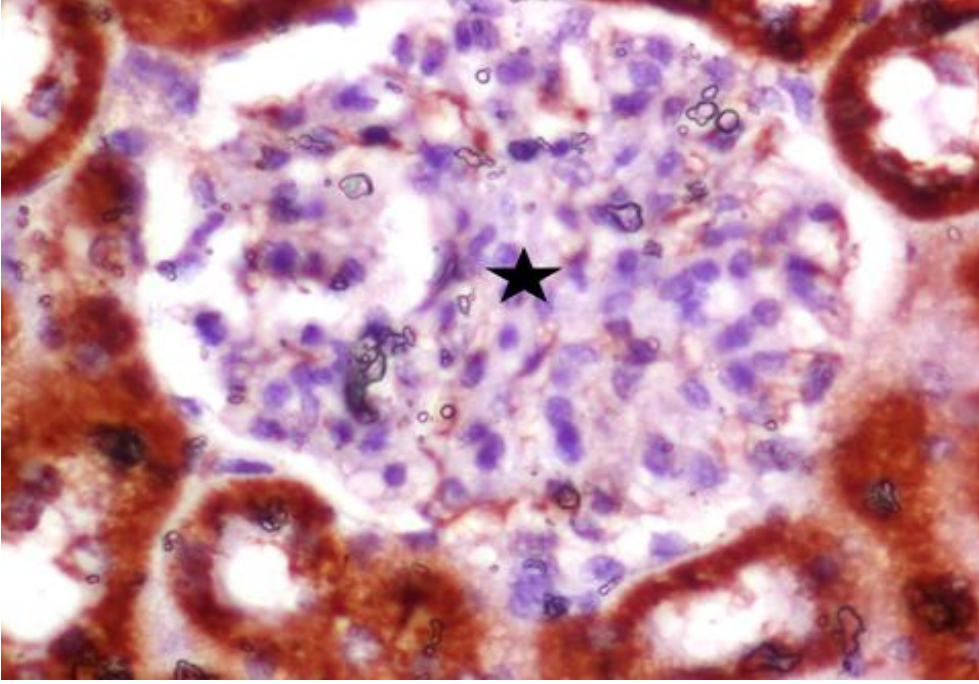
Resim 36: Diyabet grubunda yoğun glomerül (★) tutulumu (Ob x 20)



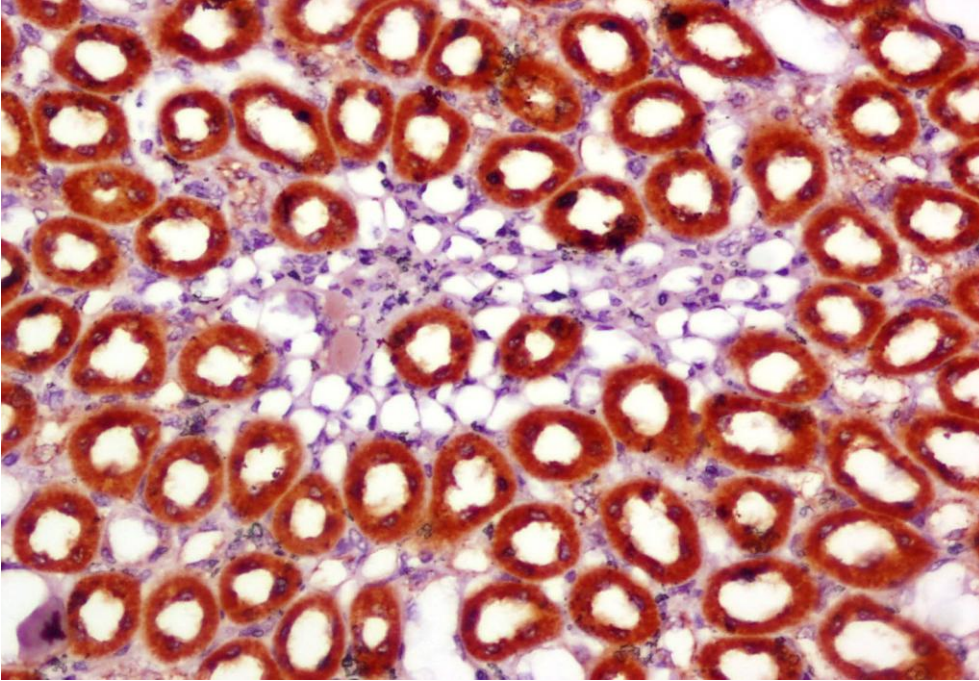
Resim 37: Diyabet grubunda Leptin boyanması (Ob x 40)



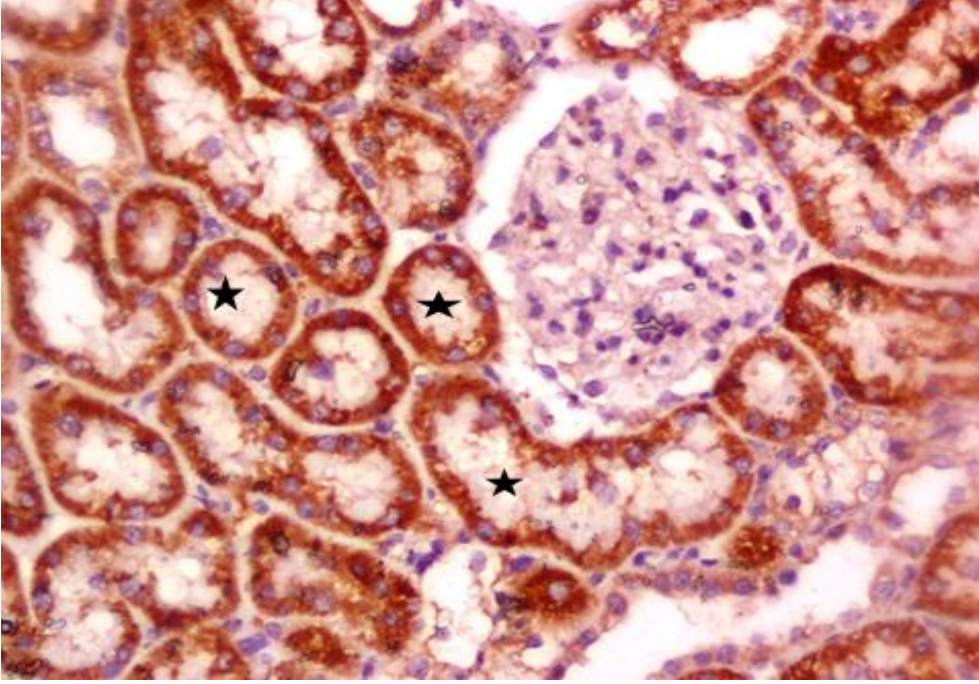
Resim 38: DM+ DMSO grubunda leptin tutulumu (Ob x 10)



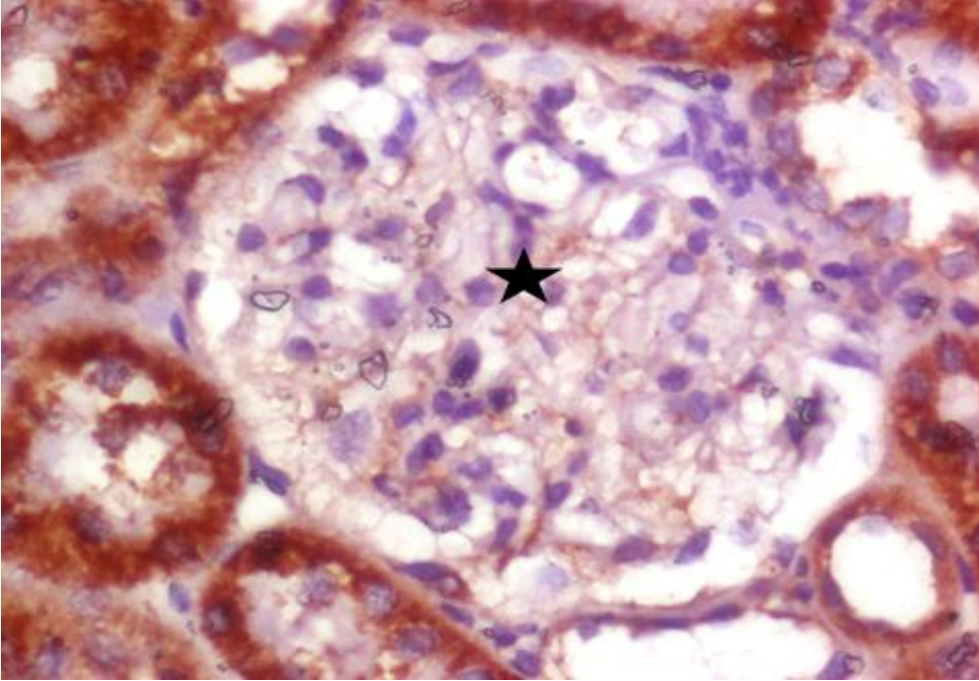
Resim 39: DM+ DMSO grubunda glomerüllerin(★) boyanması (Ob x 40)



Resim 40: DM+ DMSO grubunda medullada leptin tutulumu (Ob x 20)

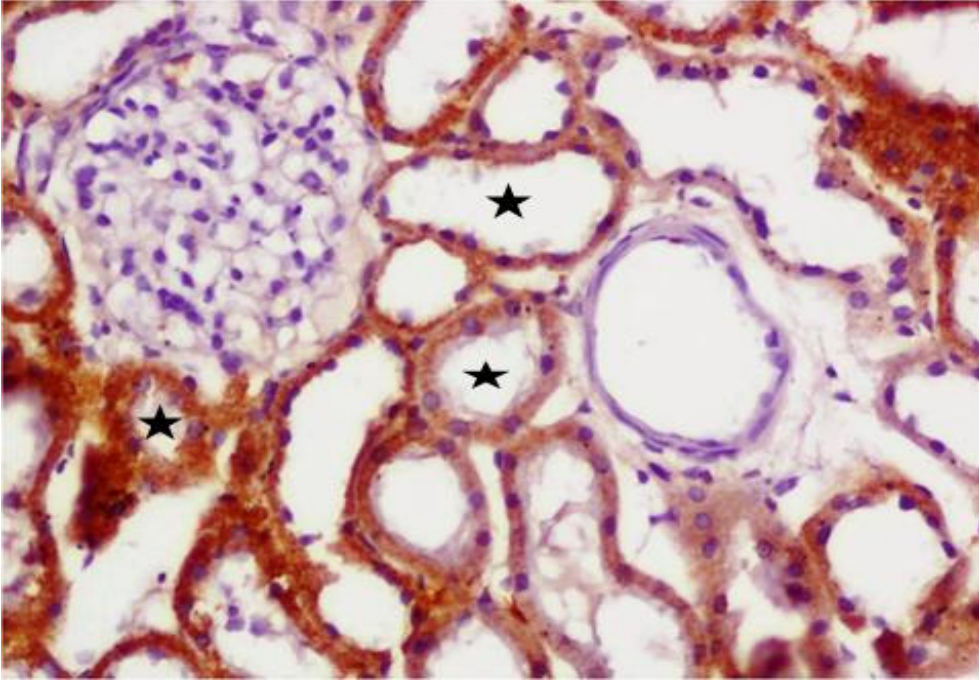


Resim 41: DM+RSV grubunda tübüllerde (★) leptin tutulumu (Ob x 20)

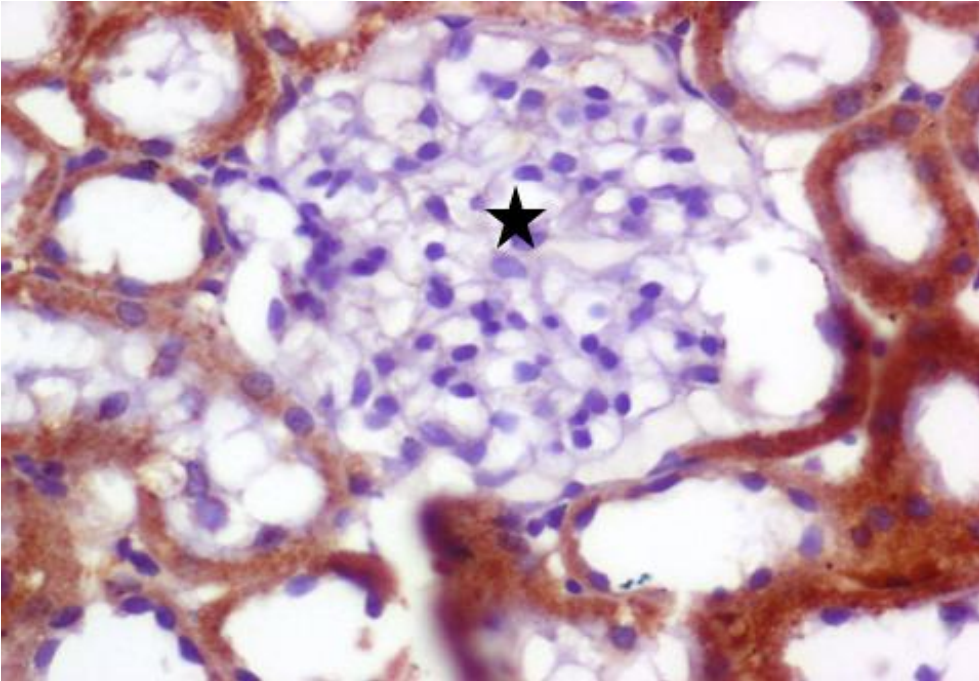


Resim 42: Leptin ile boyanmış DM+RSV grubunda glomerül (★) görünümü (Ob x 40).

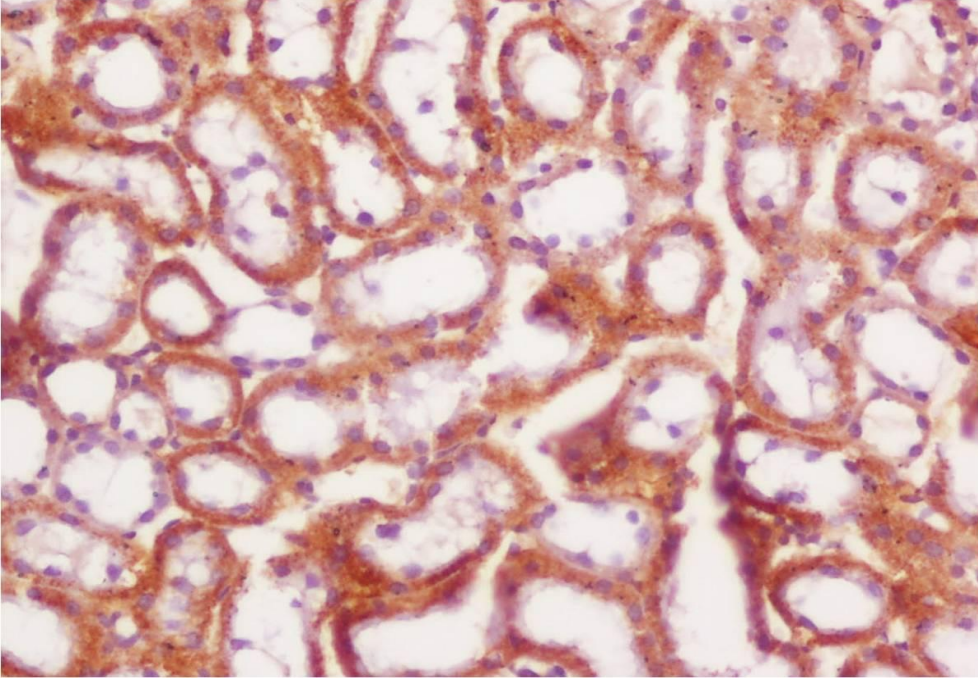
Sirtuin-2 Resimleri



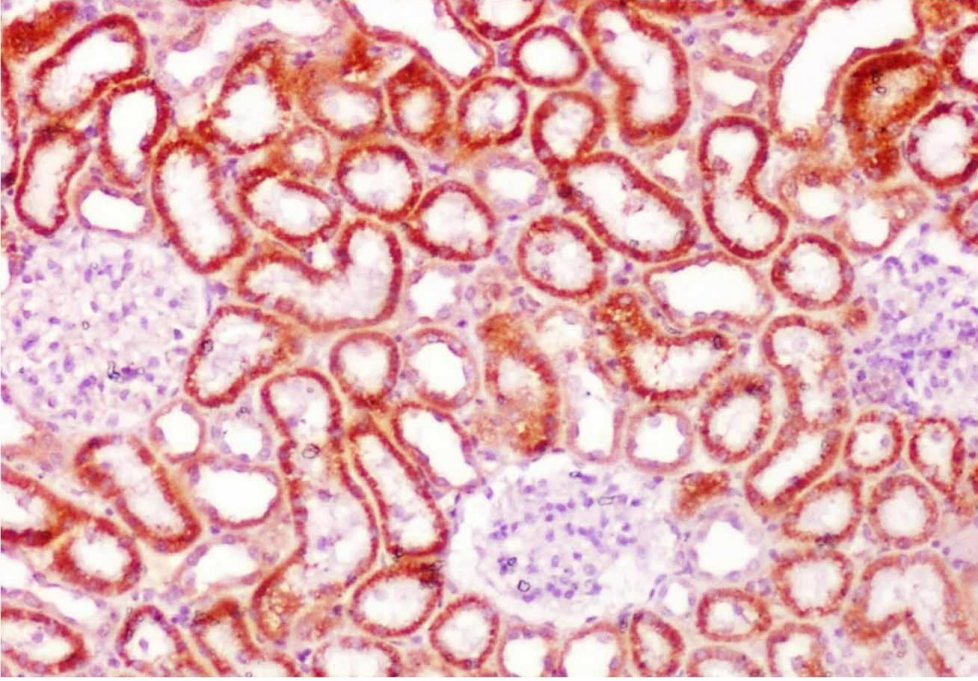
Resim 43: Kontrol grubunun SIRT-2 ile boyanmış tübüllerin (★) görünümü (SIRT2 x 20)



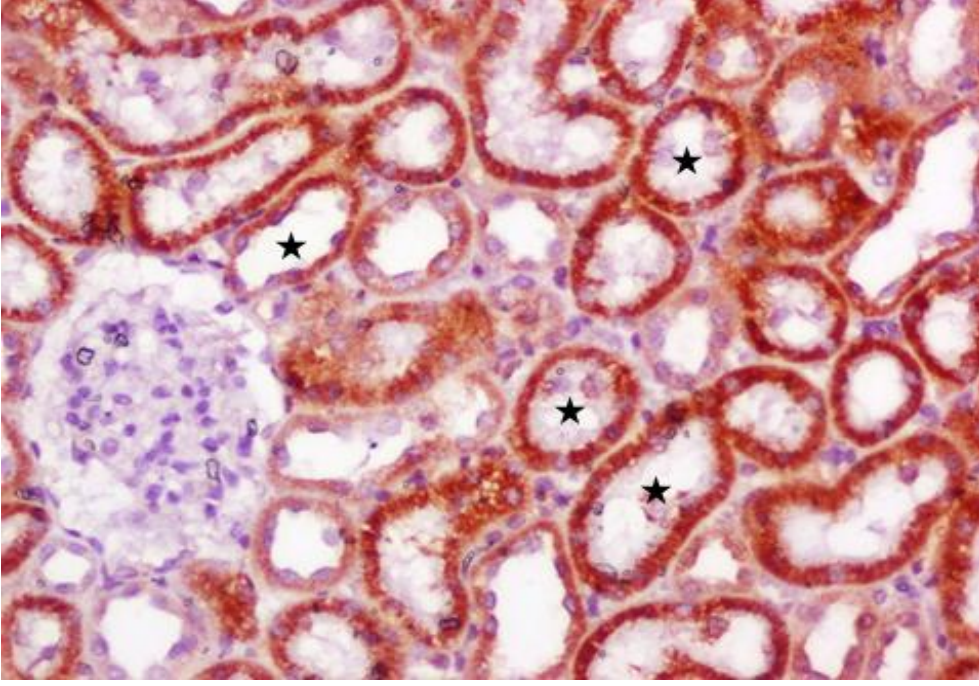
Resim 44: Kontrol grubunda glomerül (★) görünümü (SIRT2 x 40)



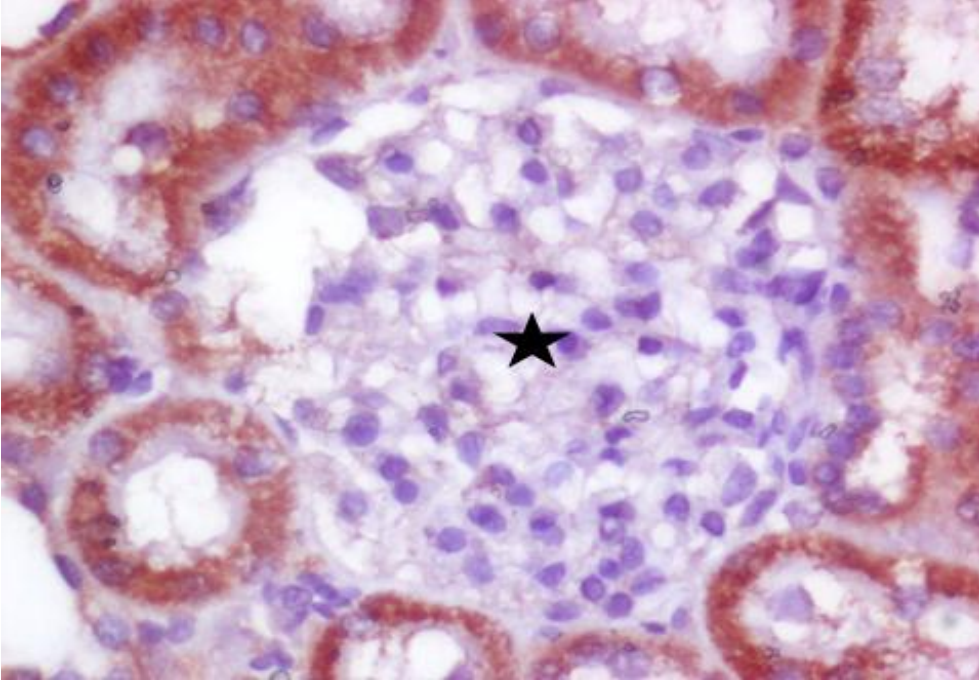
Resim 45: Kontrol grubunda medulla görünümü (SIRT2 x 20)



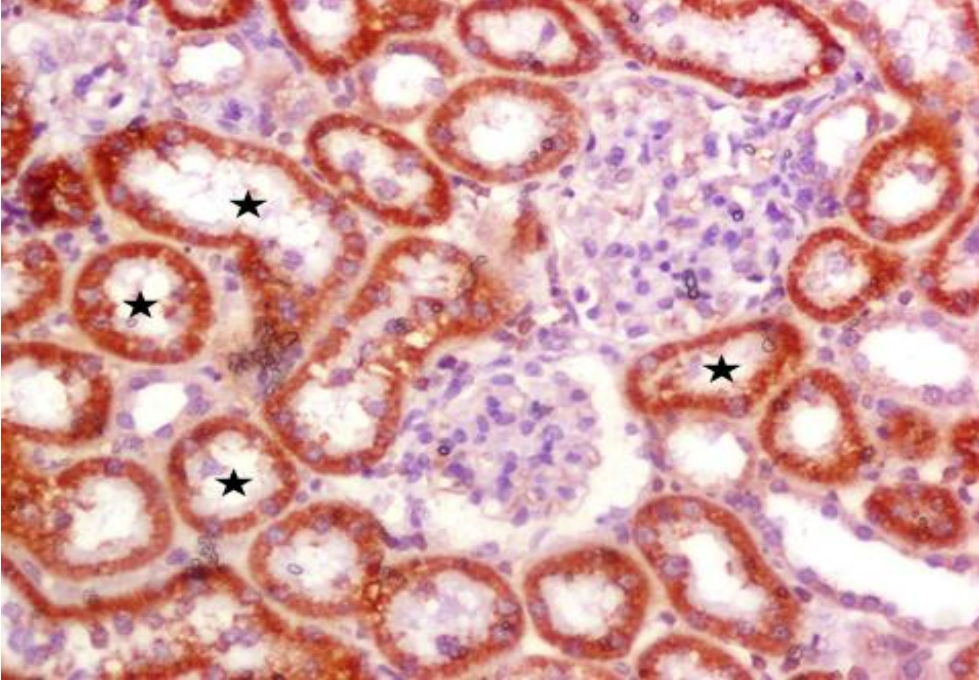
Resim 46: K+ RSV grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 20)



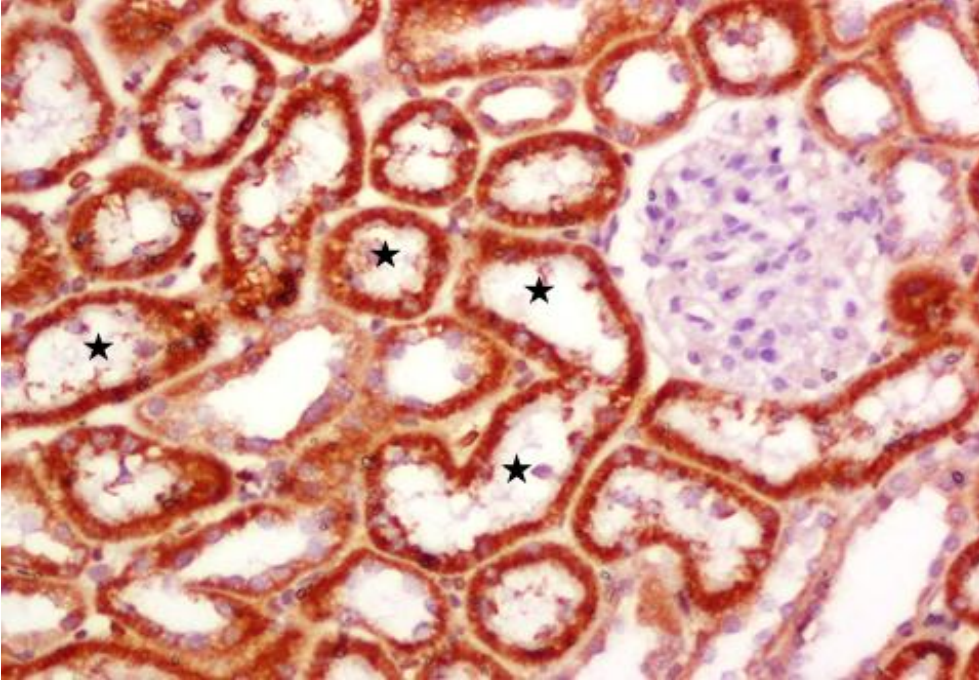
Resim 47: K+RSV grubunda tübüllerin (★) görünümü (SIRT2 x 20)



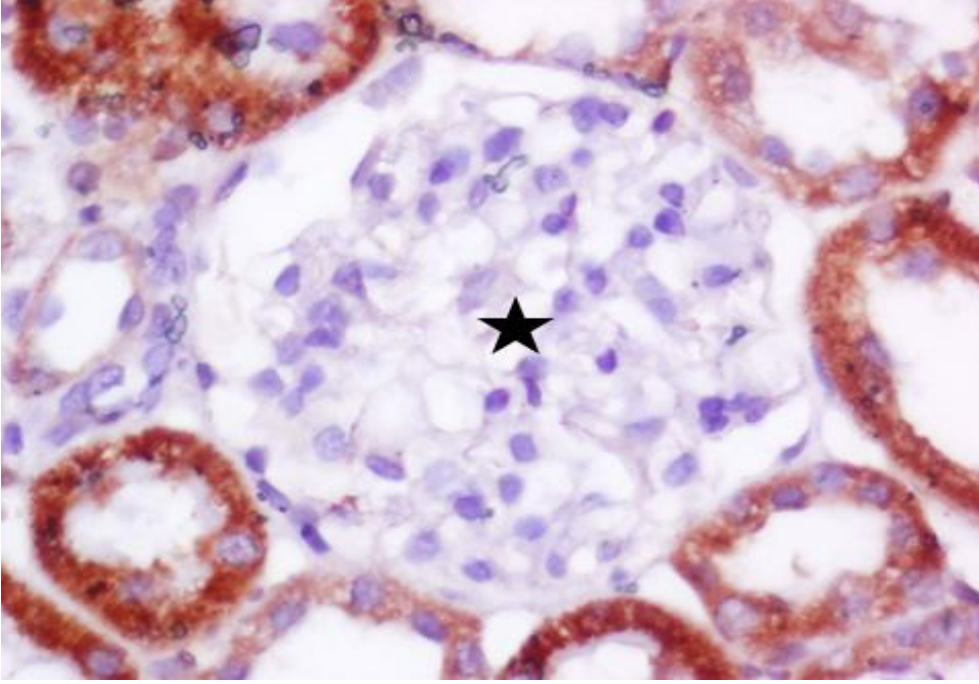
Resim 48: K+RSV grubunda glomerül (★) SIRT-2 boyanması negatifliği (SIRT2 x 40)



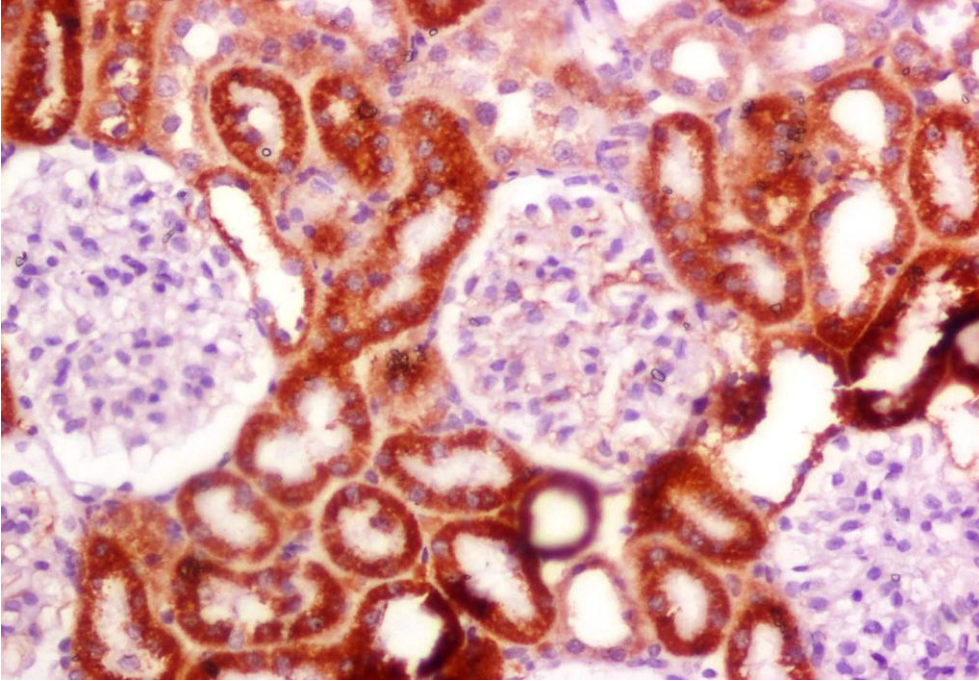
Resim 49: Diyabet grubunda tübüllerde (★) SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 10)



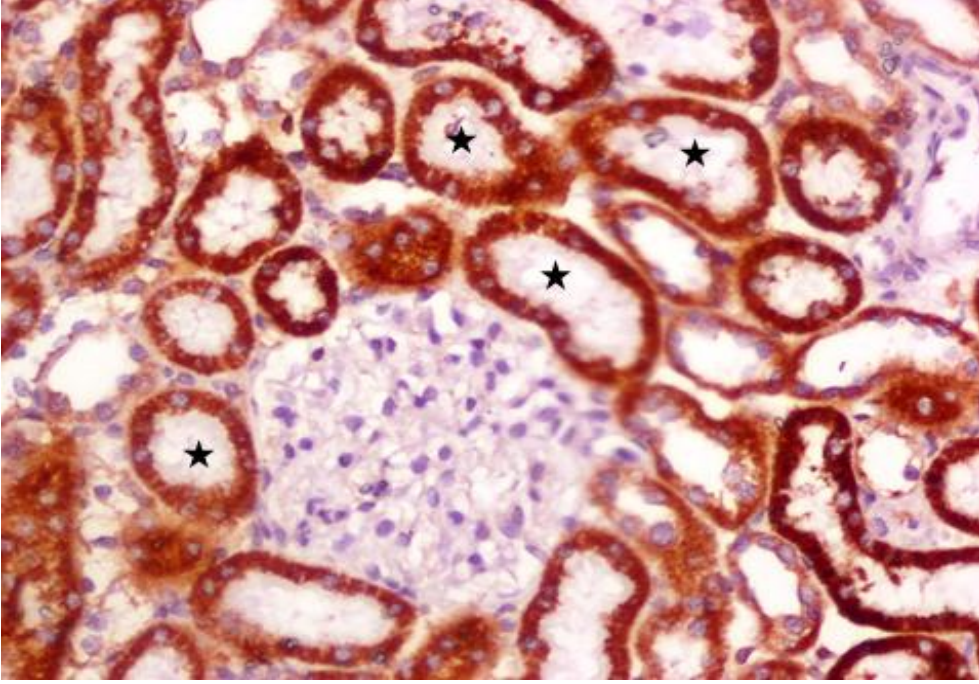
Resim 50: Diyabet grubunda SIRT-2' nin tübüllerde (★) görünümü (SIRT2 x 20)



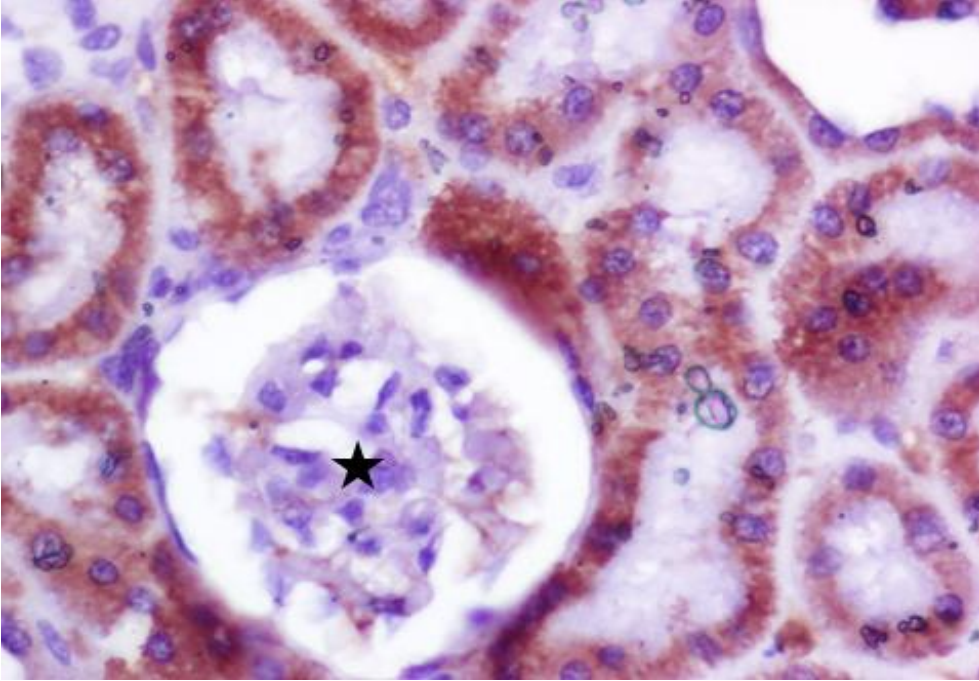
Resim 51: Diyabet grubunda glomerülde (★) negatif SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 40)



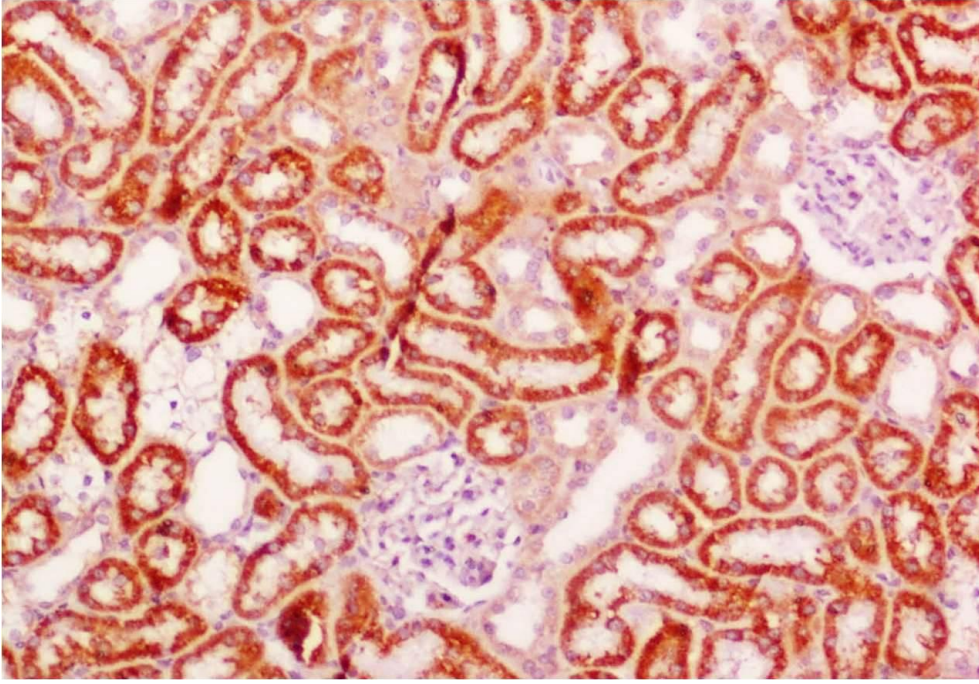
Resim 52: DM+ DMSO grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 20)



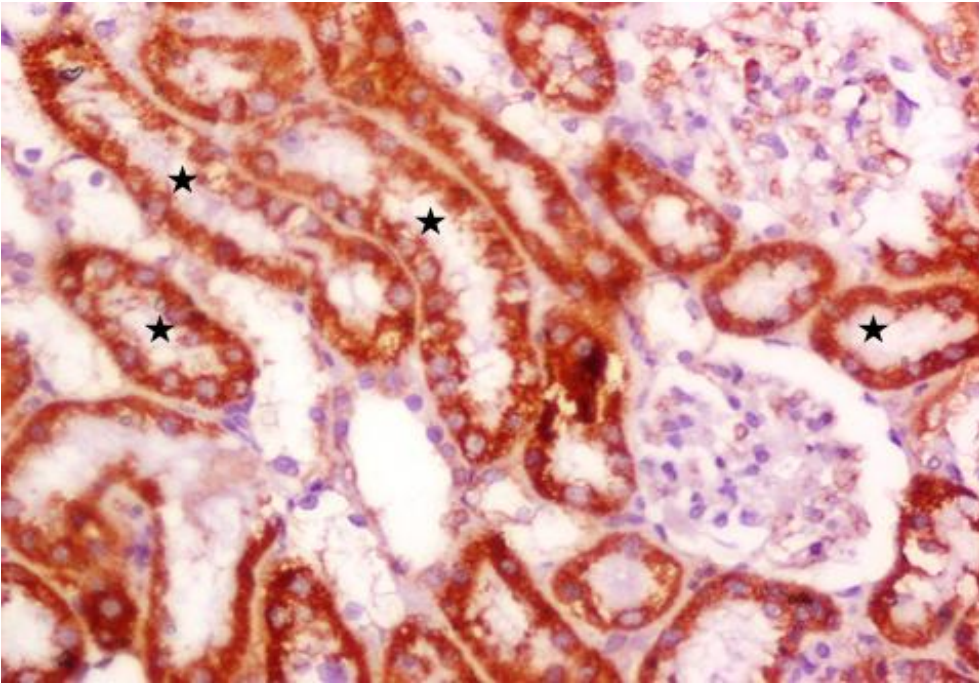
Resim 53: DM+ DMSO grubunda tübül (★) boyanması (SIRT2 x 20)



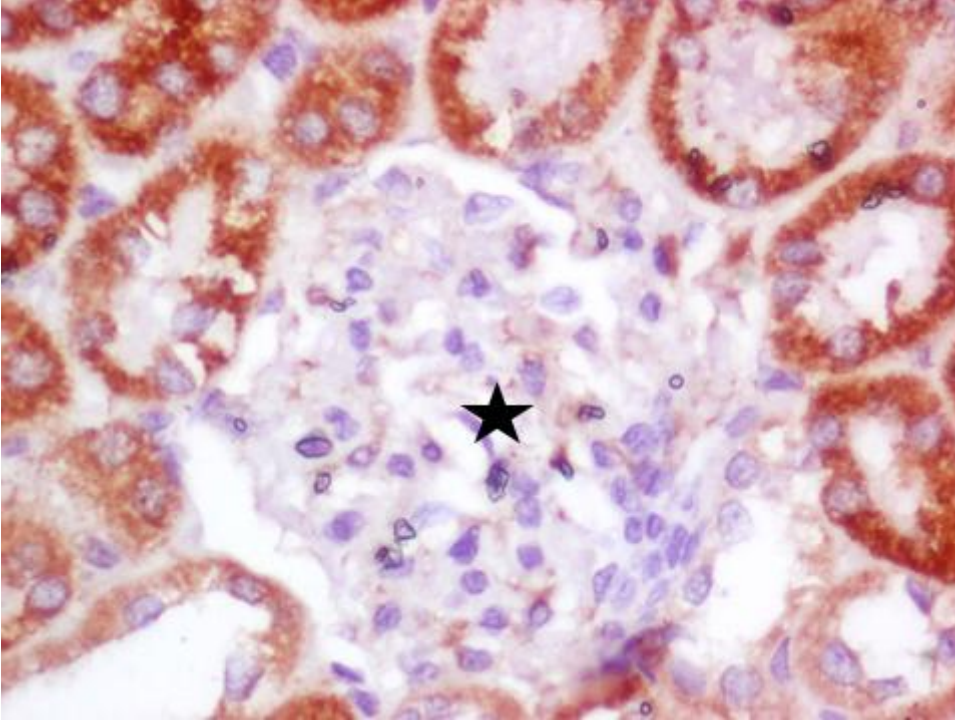
Resim 54: DM+DMSO grubunda SIRT-2 negatif glomerüller (★) (SIRT2 x 40)



Resim 55: DM+ RSV grubunda SIRT-2 tutulumu (SIRT2 x 10)



Resim 56: DM+RSV grubunda tübüllerin (★) boyanması (SIRT2 x 20)



Resim 57: DM+RSV grubunda glomerülde SIRT-2 negatifliği (SIRT2 x 40)

4.3 Western Blot bulguları

Western blot bant yoğunluk analizi

Western blot yöntemiyle belirlenen proteinlerden leptin, sirtuin-1 ve beta aktin bantlarının değişimi aşağıda (Resim 57,58,59) görülmektedir. Bantlardaki gruplar sırasıyla K, K+RSV, DM, DM+DMSO, DM+RSV grubu olarak görülmektedir. Bu bantların karşılaştırılması için Image J programı kullanılarak yoğunlukları ölçülmüştür.

Beta-AKTİN:

Kontrol grubu:	% 16.721
K+RSV grubu:	% 15.966
DM grubu:	% 21.151
DM+DMSO grubu:	% 26.371
DM+RSV grubu:	% 19.79

LEPTİN

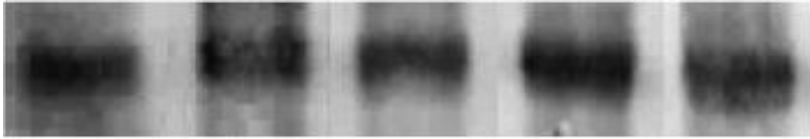
Kontrol grubu:	% 9.324
K+RSV grubu:	% 20.112
DM grubu:	% 44.095
DM+DMSO grubu:	% 17.144
DM+RSV grubu:	% 9.325

SİRTUİN

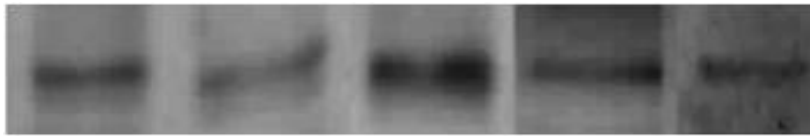
Kontrol grubu:	% 19.339
K+RSV grubu:	% 4.692
DM grubu:	% 0.526
DM+DMSO grubu:	% 13.007
DM+RSV grubu:	% 62.435

Tüm gruplara bakıldığında beta aktin yönünden birbirine yakın bir yüzde değerinde olduklarını görmekteyiz. Bu da bize dilüsyon miktarlarının uygun bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

Leptin dağılımına baktığımızda ise diyabet grubunda diğer gruplara kıyasla, leptin miktarı anlamlı olarak artmıştır. SIRT-1 dağılımı ise en düşük oranda diyabet grubunda görülürken, diğer gruplara kıyasla en yüksek miktarda DM+RSV grubunda karşımıza çıkmaktadır.



Resim 58: Beta-aktin'in Western blot yöntemiyle gösterilmesi



Resim 59: Leptin'in Western blot yöntemiyle gösterilmesi



Resim 60: Sirtuin-1' in Western blot yöntemiyle gösterilmesi

5. TARTIŞMA

Günümüzün önemli metabolik hastalıklarından biri olan diyabet ve tedavisi üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün hızla artmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı arttıkça deneysel modellerde yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Bu amaçla birçok doğal ve yapay kimyasal maddeler tedavi amaçlı kullanılmak üzere bu modellerde denenmektedir. Antioksidanlar literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada RSV'nin diyabetik komplikasyonları azaltmada faydalı bir role sahip olduğu ve bazı diyabetik komplikasyonları azalttığı ileri sürülmüştür (40,53,55,56,66-68,89,92-94).

Resveratrolün toksisitesi ile ilgili olarak hayvanlarda yapılan çeşitli ve çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Resveratrolün bu deneylerde mutajenik, karsinojenik, hücresele toksisite ve alerjik reaksiyon gibi yan etkileri görülmemiştir (38). Literatürde tedavi amaçlı RSV ile yapılan çalışmalarda verilen doz 10-20 mg/kg arasında değişmektedir. Bu dozlar arasında RSV'nin in vivo ve in vitro etkileri gözlenmiştir (40). Çalışmamızda da RSV dozu 10 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Bu doz RSV'nin biyolojik etkilerini inceleyen diğer çalışmalardaki gibidir (40,55,66,89,92,94).

Çalışmamızda RSV'nin, diyabetik sıçanların ağırlıkları üzerindeki etkisine bakılmıştır. RSV tedavisi sonunda diyabet ve diyabet+ RSV grupları karşılaştırıldığında RSV alan grupta hafif bir yükselme olmasına rağmen bu iki grubun ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Dolayısıyla RSV'nin diyabetin neden olduğu kilo kaybını önleyici bir etkisi gözlenmemiştir. Değişik çalışmalara bakıldığında da RSV'nin kilo kaybını önleyici belirgin bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur (40,67,68,89,94).

Bunun yanı sıra 15 gün süre ile uygulanan RSV tedavisi, diyabetik sıçanların kan glukoz değerlerinde bir azalmaya neden olmasına rağmen diyabet ile diyabet+ RSV grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dolayısıyla RSV'nin STZ'nin neden olduğu β hücre harabiyetini geri dönüştürücü etkisi üzerinde etkili bir bulgu görülmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda (40,55,66,92,95) da bizim şeker düzeyleri bulgularımızla örtüşen bulgular görülmektedir.

Su ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada; STZ ile ve STZ+ nikotinamid ile oluşturulmuş diyabet sonrasında öncelikle RSV'nin akut etkilerine bakılmış, 0.5 mg/kg intragastrik olarak verilen ilacın 0,30,60,90 ve 120. dakika sonunda kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. 30. dakikadan itibaren RSV verilen diyabetik ratlarda kan glukozunda hafif de

olsa düşmeler saptanmıştır. Hipoglisemik etkinin 90. dakikadan sonra azalmaya başladığı ve 5. saatin sonunda plazma glukozunun eski düzeyine döndüğü görülmüştür (57).

Diyabette uzun süreli hiperglisemi sonucunda organlar hasara uğramakta ve işlev bozuklukları meydana gelmektedir (14). Diyabette en çok etkilenen organlardan biri de böbreklerdir. Böbrek hasarının sıklığı diyabet süresi uzadıkça artış göstermektedir (17). DM' de en belirgin tübüler lezyon proksimal tübüllerin distal bölümünde ve henle kulpunun çıkan kısmındaki epitel hücrelerinin glikojen depolamasıdır. Glikojen tutulumunu göstermek için histolojik incelemede PAS boyası ile muamele edildikten sonra değerlendirilmelidir (15). Vardı ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı diyabetik böbrek çalışmasında diyabet grubunda özellikle tübüllerde PAS yoğunluğunun daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (15). Bizim çalışmamızda ise diyabet ve DM+RSV grupları arasında ise tübüllerde PAS pozitifliği açısından anlamlı fark görülmemiştir. Fakat diyabet gruplarında kontrol gruplarına kıyasla PAS boyanma yoğunluğu artmıştır.

Sharma ve arkadaşları tarafından STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda RSV' nin oksidatif stres ve böbrek işlevleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. STZ sonrasında dört hafta beklendikten sonra sıçanlara 15 gün boyunca 10 ila 20 mg/kg dozunda oral RSV verilmiş. Altı haftanın sonunda diyabetik sıçanlarda kreatinin ve üre klirensinin azaldığı, proteinürinin ve oksidatif markerların arttığı ortaya konmuştur. RSV verilen grupta ise anlamlı olarak böbrek işlev bozukluğu ve oksidatif stres markerları azalmıştır. Aynı çalışmada deney sonunda böbrek dokularında apikal kabarcıklar, intertütisyal fibrozis, hyalin birikimi, arteriyolopati ve glomerüler değişiklikler açısından histopatolojik inceleme yapılmış, diyabetik RSV grubunda diyabetik gruba kıyasla bu yapısal bulgularda düzelme görülmüştür (94). Literatürde diyabetik böbrekte RSV ile yapılmış birçok araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların hepsindeki ortak bulgu RSV' nin diyabetik böbrekte oluşan bozuklukları hafiflettiği yönündedir (40,66-68,89,93). Bizim diyabetik böbrekteki bulgularımız çalışmalarla uyumludur ve diyabet sonucu oluşan böbrek hasar böbrek preparatlarında oldukça açık şekilde gözlenmiştir (Resim 11-16). Glomerüler, tübüler ve tübülointerstisyel yapı değişikliklerini içeren diyabetik böbrek hasarının gelişim mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ancak hipergliseminin, glukoz otooksidasyonu ve protein glikozilasyonu ile serbest oksijen radikallerinin otooksidasyonu ve protein glikozilasyonu ile serbest oksijen radikallerinin hızını arttırması ve koruyucu antioksidan kapasiteyi düşürmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin diyabetik komplikasyonlardan sorumlu olduğu bildirilmektedir (2).

Çalışmamızda diyabetik böbrekte glomerülde dejenerasyon, Bowman kapsülünde genişleme, tübüllerde dejenerasyon, medullada dejenerasyon ve kapiller dilatasyon bulguları görülürken RSV alan diyabetik sıçan böbrekleri yapısal olarak incelendiğinde anlamlı olarak glomerüllerin ve tübül dejenerasyonunda, kapiller dilatasyonda azalma görülmüştür. Buna karşın RSV verilen normal sıçanların böbrek dokularında kontrol grup ile kıyaslandığında medullada konjesyon bulguları ortaya çıkmıştır.

Birçok çalışmada RSV' nin etkilediği çok sayıda molekülün diyabetik böbrekteki değişimleri incelenmiştir (66-68,89,93,96,97). Bu bilgiler ışığında RSV' nin diyabette antioksidan, antiinflamatuvar ve antidiyabetik etkileri sayesinde nefropatide düzelmeye sebep olduğu açıklanmıştır.

RSV'nin insülin aktivitesinde düzelmeye neden olması bu saydığımız özellikleri dışında farklı bazı etkilerinden dolayı olmaktadır. Bunlardan biri adipoziteyi azaltmasıdır. RSV'nin hiperkalorik sıçan ve farelerde vücut yağını azalttığı ortaya konmuştur (53). İzole sıçan yağ hücrelerinde yapılan bir çalışmada; RSV'nin epinefrinin uyardığı lipolitik cevabı ve laktat yapımını arttırdığı, bazal ve insülinle uyarılmış glukozun lipidlere dönüşümünü, glukoz oksidasyonunu ve trigliseritleri azalttığı ortaya konmuştur (97). RSV'nin yağ hücre farklılaşmasını *invivo* olarak azalttığı bunları çeşitli adiposit spesifik genleri (PPAR γ , FAS, EBP α) azaltarak yaptığı ve hormon duyarlı lipazı ve lipoprotein lipazı baskıladığı Kim ve arkadaşlarının (98) obez ratlarda yaptıkları çalışmada gösterilmiştir. Aynı çalışmada adipositlerin bir ürünü olan leptin düzeyi RSV alan obez sıçanlarda yüksek yağla beslenen sıçanlara göre anlamlı olarak düşmüştür (98). Adiposit kütlesi arttığı zaman leptin seviyesi de artmaktadır. RSV'nin sıçan adipositlerinden leptin salgısına etkisinin incelendiği bir çalışmada (99) doz bağımlı olarak RSV' nin tüm deneysel modellerde leptin salgısını baskıladığı ve adipositlerde ATP miktarını azalttığını göstermişlerdir.

Önceki çalışmalarda leptinin varlığı birçok dokuda gösterilmiştir (73). Leptinin varlığının gösterildiği dokulardan biri de böbreklerdir. Biz de çalışmamızda diyabetik böbrek dokusunda RSV' nin leptin üzerine etkilerine baktığımızda immünohistokimyasal ve western blot değerlendirmelerinde; diyabet grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek oranda leptin tutulumu olduğunu bulduk. İmmünohistokimyasal analizlerde, diyabet grubunda leptin yoğunluğunun glomerüllerde daha yüksek olduğunu gördük. Bu durumun resveratrolün leptin miktarını azaltmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde leptin ile ilgili DNp' deki etkisi üzerine yapılmış immünohistokimyasal ve western blot çalışmalarının

birarada olduğu yayınlara rastlayamadık. Bunun dışında Schultes ve ark.'nın yaptığı mikroalbuminürlü ve makroalbuminürlü diyabetik hastalarda böbrekte oluşan hasardan dolayı leptin miktarının arttığını, makroalbuminürlü hastalarda bu değerlerin daha da yükseldiğini göstermişlerdir (100). Üriner adiponektin ekskresyonunun diyabetik nefropatili hastalarda incelendiği bir çalışmada (101), diyabetik nefropatinin farklı evrelerindeki hastalarda böbrek hasar miktarı attıkça üriner ve serum adiponektin miktarının arttığını biyokimyasal olarak ve western blot yöntemiyle göstermişlerdir. Bu değerler serum kreatinin değerleriyle ilişkili bulunmuştur. Yaptığımız western blot yönteminde de leptin miktarı IHC bulgularımızla benzer şekilde diyabet grubunda leptin miktarı artmaktadır.

RSV'nin etkilediği önemli histon proteinlerinden biri olan sirtuin'in birçok dokuda etkisi vardır. SIRT' in lipid salınımı, insülin salgısı, glukoz dengesini kapsayan metabolik durumlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (82). RSV'nin SIRT1' i aktive ederek diyabette selüler oksidatif stresi baskıladığı Yun ve ark.'nın (80) yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada western blot yöntemiyle diyabetik monositlerde SIRT1 ekspresyonu azalırken, RSV verilen diyabetik grupta bu bulgu tersine dönmüştür (80). Tip I DNp'de RSV etkisi ile SIR2 değişiminin incelendiği başka bir çalışmada; STZ ile oluşturulmuş diyabetik nefropatili sıçanlara 10 mg/kg dozunda dört hafta boyunca RSV tedavisi verilmiş ve bunların H3 fosforilasyonu, MAP kinaz p38, SIR2 ve p53 ekspresyonlarının değişimi üzerine etkilerine bakılmıştır. Western blot yöntemi ile incelenen SIR2 ekspresyonu diyabetik böbrekte azalmasına karşın, bu etkinin RSV verilen diyabetik sıçanlarda görülmediği ortaya konmuştur (89). RSV tedavisi ile SIR2 ekspresyonunun diyabetik böbrekte azalması engellenmiştir. Hücrel hasar yanıtında SIR2 p53 bağımlı apoptozisi baskılar. Bu durumda RSV'nin apoptozise giden hücreleri doğrudan ya da dolaylı olarak koruyabileceği sonucuna varılabilir. Diyabetik nefropatiden korunmada RSV'nin antiapoptotik işlevlerinin de rolü olduğu söylenebilir (119). Çalışmamızda literatürden farklı olarak immünohistokimyasal olarak SIRT2 ekspresyonuna baktığımızda gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Fakat western blot yönteminde ise diğer çalışmalarla uyumlu olarak; SIRT-1 düzeyi diyabet gruplarında azalırken, DM+RSV grubunda artmaktadır. Bu durum RSV'nin aktivasyonu sonucu SIRT-1 düzeyinin yükseldiğini göstermektedir.

Sonuç olarak RSV diyabetik böbrekte leptin ve sirtuin düzeyinde değişikliklere neden olmaktadır. Fakat bu etkinin mekanizması net değildir. Diyabette artan oksidatif stresin, uzun süreli hipergliseminin böbrekte oluşturduğu hasardan korunmada RSV' nin antioksidatif ve

antidiyabetik işlevinin önemi aşikardır. RSV bu etkilerini leptin ve sirtuin üzerinden gösteriyor olabilir ve bu durum yeni tanısal ve tedavisel stratejiler geliştirme potansiyelini içermektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara 2 hafta süreyle RSV verilerek, tedavi sonunda diyabetin neden olduğu komplikasyonlardan diyabetik nefropati üzerinde RSV'un etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda diyabetik sıçanların böbrek dokularındaki leptin ve sirtuin proteinlerinin değişimleri araştırılmış ve RSV' nin leptin ve sirtuin üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışma sonucunda, diyabet+RSV grubundaki sıçanların kan glukoz düzeylerinde belirgin bir azalma görülmüş olmasına rağmen diyabet grubu ile karşılaştırıldığında bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Aynı şekilde diyabet ve diyabet+RSV grupları karşılaştırıldığında bu iki grubun ağırlıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlara dayanarak RSV'un STZ'nin neden olduğu hiperglisemi ve kilo kaybı üzerinde önleyici bir etkisinin belirgin olmadığı görülmüştür.

İmmohistokimyasal (IHC) inceleme sonucunda, leptin tutulumunun kontrole kıyasla diyabetik böbrekte glomerüllerde arttığı ortaya konmuştur. Western blot incelemesinde ise leptin düzeyinin diyabetik grupta IHC bulgularıyla benzer olarak yükseldiğini saptadık. Literatürde DNp' de leptin ekspresyonu ile ilgili immünohistokimyasal ve western blot ile yapılmış bir bulguya rastlanmadığı için sonuçlarımızın yeni araştırmalara yol göstereceğini düşünmekteyiz. SIRT düzeylerinde ise immünohistokimyasal olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını gördük. RSV' nin SIRT'i aktive etmesi bizim IHC bulgularımızla örtüşmemektedir. Fakat Western blot bulgularımızda diğer çalışmalarla uyumlu olarak SIRT düzeyi diyabetik gruplarda düşük olmasına rağmen DM+RSV grubunda bu oran yüksek çıkmaktadır.

Yaptığımız histolojik incelemede ise RSV tedavisi alan diyabetik sıçanlarda, diğer diyabet gruplarına göre böbrekte glomerül dejenerasyonu, kapil dilatasyonu ve tübül dejenerasyonu bulguları açısından anlamlı olarak düzelme görülmüştür. Bu etkinin yeni tedavi stratejilerine yol göstereceğini düşünmekteyiz. Ancak RSV'nin doza ve zamana bağımlı olarak etkisinin değişebileceğini tahmin etmekteyiz. Daha yüksek dozlarda veya aynı dozda daha uzun sürede RSV tedavisi uygulandığı zaman, diyabetin neden olduğu semptomların daha da düzelebileceğini düşünmekteyiz. Bu yüzden kesin bir sonuca varabilmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların böbrek dokularında RSV'nin yapısal etkilerini ve leptin ve sirtuin protein dağılımları üzerindeki etkisini göstermeyi amaçladık.

Yöntem: Araştırma, 33 adet genç, sağlıklı Wistar Albino cinsi dişi sıçan üzerinde yapıldı. 50 mg/kg dozunda STZ verilerek diyabet oluşturulan sıçanlara kronik diyabet oluştuktan sonra, birinci ayın sonunda 10 mg/kg miktarında 15 gün boyunca RSV verildi. Altıncı haftanın sonunda tüm sıçanlar anestezi altında kesildi. Sıçanların her birinden alınan sol böbrek dokusu histolojik (H-E ve PAS) ve immünohistokimyasal (leptin ve sirtuin-2) çalışma için, alınan sağ böbrek dokusu da western blot çalışması için (leptin ve sirtuin-1) kullanılmak üzere çeşitli işlemlerden geçirildi. Western blot sonuçları Image J programı ile diğer sonuçlar ise SPSS programında Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleriyle analiz edildi.

Bulgular: Diyabet oluşturulan sıçanlarda kan şekeri yükselirken, kilo düzeyi azalmıştır. RSV verilen diyabetik grupta kan şekeri düzeyinde hafif bir azalma görülürken bu bulgu diyabet grubuna kıyasla anlamlı değildi. Yapısal inceleme sonucunda diyabetik böbrekte RSV tedavisi ile böbrek hasarı bulgularının azaldığını gördük. İmmünohistokimyasal incelemede ise leptin düzeyinin diyabetik böbrekte arttığını bulduk. RSV tedavisinin SIRT-2 düzeyleri üzerine etkisinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Western blotta leptin bulgularına bakıldığında ise sonuçlar IHC bulguları ile örtüşmekteydi. Leptin miktarı diğer gruplara kıyasla diyabetik böbrekte artmış olarak bulundu. SIRT-1' in immünohistokimyasal olarak incelenmesinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. SIRT-1' in Western blot ile gösterilmesinde ise IHC bulgularından farklı olarak DM+RSV grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde arttığını bulduk.

Sonuçlar: Sonuç olarak RSV diyabetik böbrekte leptin ve sirtuin düzeyinde değişikliklere neden olmaktadır. Fakat bu etkinin mekanizması net değildir. Diyabette artan oksidatif stresin, uzun süreli hipergliseminin böbrekte oluşturduğu hasardan korunmada RSV' nin antioksidatif ve antidiyabetik işlevinin önemi aşikardır. RSV bu etkilerini doz ve zaman bağımlı olarak leptin ve sirtuin üzerinden gösteriyor olabilir. Bu durum yeni tanısallık ve tedavisel stratejiler geliştirme potansiyeli içermektedir ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Resveratrol, diyabet, diyabetik nefropati, leptin, sirtuin.

İletişim adresi: asli_erylmz@yahoo.com

8. SUMMARY

Aim: In this study, our aim was to show the changes of histopathological effects of RSV and its impact on distributions of leptin and sirtuin proteins in kidney tissues of the rats made diabetic by using streptozotocin.

Method: This study was carried 33 young, healthy, Wistar Albino female rats. The rats induced diabetic by giving STZ with a dose of 50 mg/kg were given RSV with the amount of 10 mg/kg for 15 days after chronic diabetes occurred. At the end of the six weeks, all rats were sacrificed under anesthesia. Left kidney tissues was used for histologic (H-E and PAS) and immunohistochemical (leptin and sirtuin-2) studies and the other one was used for the western blot study (leptin and sirtuin-1) for every rat and both of them were passed through various processes. The results obtained from western blot study was analyzed with Image J program and the other results were analyzed by SPSS program with Mann Whitney U and Kruskal-Wallis tests.

Results: Blood glucose levels increased and weight levels decreased in the rats which were made diabetic. It is observed a slight decrease in blood glucose level in the RSV given diabetic group compared to the other diabetic group; however, this finding was not statistically significant. It was seen from the histopathological findings that renal damage in diabetic kidney decreased with RSV treatment. It was found from the immunohistochemical findings that leptin levels in diabetic kidney increased. The effect of RSV treatment on the levels of SIRT-2 did not differ between the groups. Findings of the leptin was similar with the findings of the IHC based on the results of Western blot. It was found that the amount of Leptin in the diabetic kidney increased compared to the other groups. It was found that SIRT1 significantly increased in DM + RSV group compared to other groups based on the western blot analysis different than IHC findings.

Conclusions: In conclusion, RSV causes changes of leptin and sirtuin levels in diabetic kidney. However, the mechanism of this effect is not clear. It is obvious that RSV has an important antioxidative and antidiabetic functionalities on prevention from kidney damage caused by increased oxidative stress in diabetes involving prolonged hyperglycemia. This may indicate that the effects of RSV may appear on leptin and sirtuin and this situation has a potential to develop new diagnostic and therapeutic strategies.

Key words: Resveratrol, diabet, diabetic nephropathy, leptin, sirtuin.

Address for correspondence: asli_erylmz@yahoo.com

9. KAYNAKLAR

- 1- Ürer S, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2004; 2(3): 127- 136.
- 2- Goldman L, Ausiello D, Cecil textbook of medicine. Ünal S. (çeviri editörü) 22. Baskı, Ankara, Güneş kitabevleri. 2006: 1424- 1452.
- 3- Unger RH, Foster DW. Diabetes mellitus-complications of diabetes. In: Williams RH, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, Wilson JD (Eds.). Williams Textbook of Endocrinology. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 1998; 1013-1022.
- 4- Catalano C, Marshall SM. Epidemiology of end-stage renal disease in patients with diabetes mellitus: from three dark ages to the middle ages. Nephrol Dial Transplant 1992; 7(3):181-90.
- 5- Vural S, Sabuncu T, Arslan SO et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. J Pineal Res. 2001; 31: 193-198.
- 6- Sato M, Ray PS, Maulik G, Maulik N, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK. Myocardial protection with red wine extract. J Cardiovasc Pharmacol. 2000; 35(2):263-8.
- 7- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. Cell Metab. 2005; 2(2):105-17.
- 8- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994; 372 (6505):425-32.
- 9- Hatemi H. Leptin ve vücut ağırlığının kontrolü. Endokrinolojiye yönelişler. 1997;6:169.
- 10- Tikoo K, Tripathi DN, Kabra DG, Sharma V, Gaikwad AB. Intermittent fasting prevents the progression of type I diabetic nephropathy in rats and changes the expression of Sir2 and p53. FEBS Lett. 2007;581:1071-8.
- 11- Gültürk S, Demirkazık A. Leptin ve Diyabet. C. Ü. Tıp F Dergisi. 2007;29 (1): 35-40.
- 12- World Health Organization. The Diabetes Program. 2004 (Accessed September 21,2004, at <http://www.who.int/diabetes/en/>)
- 13- Satman İ. Diabetes Mellitus'un tanı ve sınıflaması. Türkiye Klinikleri Endokrinoloji. 2003;1:157-68.
- 14- Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. Diyabetes Mellitus Tanı, Epidemiyoloji ve Sınıflandırma, Cerrahpaşa İç Hastalıkları, 1. Baskı İstanbul: Elma Basım. 2005: 1086-1089.

- 15- Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Uçar M, Gül M ve ark. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkisi. İnönü Üni TF derg. 2005; 12: 145-152.
- 16- Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 1996; 7: 2509-2517.
- 17- Büyükdevrim SA, Büyükmeşe MA, Davutoğlu M., Diyabetik Nefropati, Klinik, Moleküler Patogenez, Klasik ve Moleküler Tedavi. 1. baskı, Turgut Yayıncılık, İstanbul. 2005: 84-89, 114-128, 481-485.
- 18- Bell RH Jr, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res. 1983;35(5):433-60.
- 19- Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. BMJ. 1997; 314: 783-788.
- 20- Altıparmak MR, Apaydın S. Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). Her yönüyle diabetes mellitus. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 383-399.
- 21- Farquar A, MacDonald MK, Ireland JT. The role of fibrin deposition in diabetic glomerulosclerosis: A light, electron and immunofluorescence microscopy study: J Clin Pathol. 1972; 25: 657- 667.
- 22- Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 2. Baskı, Ankara, Günes Kitabevi Ltd. Şti. 1997; 392-399.
- 23- Snell R. S. Klinik Anatomi, Yıldırım M. (çeviri editörü). 6. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şt. 2000; 232- 236.
- 24- Putz R, Pabst R. Sabotta İnsan anatomisi atlası Cilt 2. 5. baskı. 2001; 180.
- 25- Moore KL, Persaud TVN, Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Dalçık H, Yıldırım M. (çeviri editörleri). 8. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 2008; 243- 284.
- 26- Şeftalioğlu A. Genel&Özel İnsan Embriyolojisi. 3.Baskı, Ankara, Tıp-Teknik Yayıncılık. 1998; 328-334.
- 27- Sadler TW. Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (çeviri editörü). 11. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 2011; 235-244.
- 28- Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, (çeviri editörleri) Ankara, Güneş Kitabevleri. 2009; 353- 373.

- 29- Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S, (çeviri editörleri) İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. 2006; 383- 399.
- 30- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (çeviri editörü). 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006; 365–390.
- 31- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Second Edition, United States of America, W.B. Saunders Company. 2001; 435– 458.
- 32-Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology A Text And Colour Atlas. Fourth Edition, Sydney, Australia. 2000; 286–307.
- 33- Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas. Fourth Edition, United States of America. 2003: 602- 625.
- 34- Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (çeviri editörü). 9. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 1996: 315–319.
- 35- Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2005; 16(8):449- 466.
- 36- Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene and piceatannol in vaccinium berries. J Agric Food Chem. 2004; 52(15):4713-4719.
- 37- Langcake P, Pryce RJ A new class of phytoalexins from grapevines. Experientia. 1977;33(2):151-2.
- 38- Fremont L. Biological effects of resveratrol. Life Sci. 2000;14;66(8): 663- 73.
- 39- Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. Free Radic Biol Med. 2002 Feb 15;32(4):314- 318.
- 40- Yar AS, Menevşe S, Alp E, Helvacioğlu F, Take G. The effects of resveratrol on COX-1 and COX-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. Mol Biol Rep. 2010; 37: 2323–2331.
- 41- Fremont L, Belguendouz L, Delpal S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. Life Sci. 1999; 64(26):2511-21.
- 42- Correia-da-Silva M, Sousa E, Duarte B, Marques F, Cunha-Ribeiro LM, Pinto MM. Dual anticoagulant/antiplatelet persulfated small molecules. Eur J Med Chem. 2011; 46(6):2347-58.

- 43- Azorin-Ortuno M, Yanez-Gascon MJ, Gonzalez SA et al. Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: a transcriptomic approach to disease prevention. *J Nutr Biochem.* 2011; xx.
- 44- Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 381(2):253-63.
- 45- Chanvitagapongs S, Draesynska-Lwiak B, Sun A.Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuro Report.* 1997; 8: 1499–502.
- 46- Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 1996; 27: 363-366.
- 47- Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for The Stimulatory Effect of Resveratrol On Ca^{+2} Activated K- Current in Vascular Endothelial Cells. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 1035-1045.
- 48- Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol Protects Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through both NO-Dependent and NO⁵⁷ Independent Mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 774- 781.
- 49- Haider UG, Sorescu D, Griendling KK et al. Resveratrol suppresses Angiotensin II-induced Akt/ Protein kinase B and p70 S6 Kinase Phosphorylation and Subsequent Hypertrophy in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Mol Pharmacology.* 2002; 4: 772- 7.
- 50- Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2000; 26(2):144-50.
- 51- Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cell mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol.* 2001;2: 1299-1308.
- 52- Corre LL, Chalabi N, Delort L, Bingon YJ, Bernard-Gallon DJ. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res.* 2005; 49: 462-471.
- 53- Szkudelski T, Szkudelska K. Anti- diabetic effects of resveratrol. *NY Acad. Sci.* 2011; 1215: 34- 39.
- 54- Zhang Y, Jayaprakasam B, Seeram NP, Olson LK, DeWitt D, Nair MG. Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by cabernet sauvignon grape skin compounds. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 228–233.

- 55- Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 635: 1-8.
- 56- Dao T, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C. Resveratrol increases glucose induced GLP- 1 secretion in mice: A mechanism which contributes to the glycemic control. *Plos one* 2011; 6(6): e20700.
- 57- Su HC, Hung LM, Cheng JK. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 290: 1339–1346.
- 58- Penumathsa SV, Thirunavakkarasu M, Zhan L et al. Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium. *J Cell Mol Med*. 2008; 12: 2350-2361.
- 59- Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 2007; 80: 1713–1720.
- 60- Aribal-Kocaturk P, Kavas GO, Büyükkacı DI. Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biological Trace Element Research*. 2007;118(3): 244-249.
- 61- Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001; 37: 262– 270.
- 62- Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking KATP and KV channels of beta cells. *Eur J Pharmacol*.2007; 568: 269–277.
- 63- Szkudelski T. Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. *Eur J Pharmacol*. 2006; 55: 176–181.
- 64- Szkudelski T. Resveratrol-induced inhibition of insulin secretion from rat pancreatic islets: evidence for pivotal role of metabolic disturbances. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293: 901–907.
- 65- Ramodori G, Gautron L, Fujikawa T, Vianna CR, Elmquist JK, Coppari R. Central administration of resveratrol improves diet induced diabetes. *Endocrinology*. 2009; 150:5326-5333.
- 66- Ding DF, You N, Wu XM, Xu JR et al. Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early- stage diabetes by activating AMPK. *American J of Nephrology*. 2010; 31: 363- 374.

- 67- Chang CC, Chang CY, Wu YT et al. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J of Biom Science*. 2011; 18: 47- 57.
- 68- Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812:719–31.
- 69- Kitada M, Kume S, Imaizumi N, Koya D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dys-function in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes*. 2011; 60:634–43.
- 70- Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin; its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 1997; 40: 1371-1379.
- 71- Moran O, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes, and other peripheral effects- a review. *Pediatric Diabetes*. 2003; 4: 101-109.
- 72- Sone M, Osamura RY. Leptin and the pituitary. *Pituitary*. 2001; Jan-Apr;4(1-2):15-23
- 73- Moran O, Philip M. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects- a review. *Pediatric Diabetes*. 2003;4:101-109.
- 74- Frühbeck G, Salvador J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia* 2000; 43:3-12.
- 75- Noshu K, Shima K, Irahara N, Kure S et al. SIRT1 histone deacetylase expression is associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Modern Pathology*. 2009; 22: 922- 932.
- 76- Longo VD, Kennedy BK. Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell*. 2006; 126:257–68.
- 77- Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007; 404:1–13.
- 78- Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75:435–65.
- 79- Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*. 2006; 20:2913–21.
- 80- Yun JM, Chien A, Jialal I, Deveraj S. Resveratrol up- regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. *Jour of Nutritional Biochem*. 2011.

- 81- Sharma S, Misra CS, Arumugam S, Roy S et al. Antidiabetic Activity of Resveratrol, a known SIRT1 activator in a Genetic Model for Type-2 Diabetes. *Phytother. Res.* 2011; 25:67-73
- 82- Jiang WJ. Sirtuins: Novel Targets for metabolic disease in drug development. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2008; 373: 341-344.
- 83- Baile CA, Yang JY, Rayalam S, Hartzell DL, Lai CY, Andersen C, Della-Fera MA. Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1215:40-7.
- 84- http://www.nature.com/nrd/journal/v7/n10/fig_tab/nrd2665_F5.html.
- 85- <http://www.gladstone.ucsf.edu/wp/wp-content/uploads/GladstoneSirtuins.pdf>.
- 86- Maeda S, Koya D, Araki S, Babazona T, Umezono T et al. Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol.* 2011; 10157-011-0418.
- 87- Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki S et al. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1043-55.
- 88- Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T et al. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2175-2182.
- 89- Tikoo K, Singh K, Kabra D, Sharma V, Gaikwad A. Change in histone H3 phosphorylation, MAP kinase p38, SIR 2 and p53 expression by resveratrol in preventing streptozotocin induced type I diabetic nephropathy. *Free Radic Research.* 2008; 42(4): 397-404.
- 90- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- 91-Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–685.
- 92- Ates O, Caylı SR, Yucel N, Altinoz E et al. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin- induced diabetic rats. *Jou of clin neuroscience.* 2007;14:256-260.
- 93- Chen KH, Hung CC, Hsu HH, Jing YH et al. Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with suppression of augmented TGF- β / smad and ERK1/2 signaling in streptozotocin- induced diabetic rats. *Chemico- Bio Interactions.* 2011;190: 45-53.

- 94- Sharma S, Anjaneyulu M, Kulkarni SK, Chopra K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology*. 2006;76:69-75.
- 95- Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2009;84:345-350.
- 96- Zhang L, Pang S, Deng B, Qian L, Chen J et al. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- κ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol. *The Int J of Biochem & Cell Biology*. 2012.
- 97- Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;113(1-2):17-24.
- 98- Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81(11):1343-51.
- 99- Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(10):899-905.
- 100- Fruehwald-Schultes B, Kern W, Beyer J, Forst T, Pfützner A, Peters A. Elevated serum leptin concentrations in type 2 diabetic patients with microalbuminuria and macroalbuminuria. *Metabolism*. 1999;48(10):1290-3.
- 101- Koshimura J, Fujita H, Narita T, Shimotomai T, Hosoba M, Yoshioka N, Kakei M, Fujishima H, Ito S. Urinary adiponectin excretion is increased in patients with overt diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):165-9.