T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Emine Ceyda SÖZÜER

EDİRNE – 2018

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Emine Ceyda SÖZÜER

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2017/15

Tez No :

EDİRNE – 2018

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Emine Ceyda SÖZÜER tarafından tez başlığı "Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçan Böbrek Dokusunda Quercetinin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18/05/2018 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yetişmemde çok büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen değerli aileme minnettarım. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana yardımcı olan başta danışmanım Sayın Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Bölümünün tüm çalışanlarına katkılarından dolayı, istatistiksel analizlerin yapılmasında Sayın Prof. Dr. Necdet SÜT'e ve projenin gerçekleştirilmesinde mali destek sağlayan TÜBAP birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGE VE KISALTMALAR

AGE : Advanced Glycation End Product

DM : Diabetes mellitus

DN : Diyabetik Nefropati

DNA **:** Deoksiribonükleik Asit

ECM : Ekstraselüler Matriks

GBM : Glomerüler Bazal Membran

H+E : Hematoksilen-Eosin

H-SCORE : Histolojik Skor

PAS : Periyodik Asit Shiff

PCNA : Prolifere Nükleer antijen

RAGE : Receptor For Advanced Glycation End Products

RAS : Renin-Anjiyotensin Sistemi

ROS : Reactive Oxygen Species

STZ : Streptozotosin

TUNEL : Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **DİABETES MELLİTUS** 3
- **DİYABETİK NEFROPATİ** 6
- **QUERCETİN** 9

GEREÇ VE YÖNTEMLER 11

BULGULAR 17

TARTIŞMA 41

SONUÇLAR 49

ÖZET 52

SUMMARY 54

KAYNAKLAR 56

ŞEKİLLER LİSTESİ 65

ÖZGEÇMİŞ 67

EKLER

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM); dünya nüfusunun ortalama % 8.3'ünü etkileyen, pankreatik beta (β) hücrelerinden salınan insülin hormonunun yetersizliği, yokluğu veya insülin reseptörlerinin cevapsızlığı sonucu gelişen, hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (1,2). Retinopati, nefropati, nöropati ve kardiyomyopati, DM ile birlikte gözlenen önemli komplikasyonlardandır (2). Günümüzde diyabet, sıklığı ve komplikasyonları nedeniyle dünyada önemi her geçen gün artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

Diyabetik hastaların %30-40'ında gözlenen nefropati, diyabetin önemli yan etkileri arasında gösterilmektedir (3). Diyabetik nefropati (DN), erken aşamasında glomerüllerin etkilendiği kronik ve kompleks bir süreç olup, glomerüler bazal membran (GBM) kalınlaşması, hipertrofi, mikroalbuminüri ve bunları takiben glomerüloskleroz gelişimi ile birlikte renal fonksiyonda kademeli azalmaya neden olan, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozisle karakterizedir (4).

Diyabetik nefropatinin patogenezinde; hiperglisemi, insülin direnci, inflamasyon, oksidatif stres, apoptozis ve renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktivasyonu rol oynamaktadır (5). Hipergliseminin; reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarını artırarak ve koruyucu antioksidan kapasiteyi düşürmek suretiyle oksidatif stresi tetiklediği ve doku hasarını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (6,7). Yüksek glukoz konsantrasyonunun, hem podosit hem de renal tübül hücre apoptozisine neden olarak, DN'nin başlangıcında kritik olan glomerüler hasar ile hastalığın ilerlemesine katkı sağlayan tübüler atrofi gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (8-10). Artmış kan glukoz düzeyi diyabetik böbrekte; apoptozisi kontrol eden

Bcl-2 ailesinden, anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesinde azalmaya ve pro-apoptotik Bax'ın ifadesinde artışa neden olmaktadır (11). Bu moleküller, apoptozisin son aşamasında efektörler olarak hizmet eden kaspazların (kaspaz-3) aktivitesini düzenler (12). Bununla birlikte DN'nin erken veya geç evlerinde böbreğin; endotelyal, mezengiyal ve interstisyel hücrelerinde proliferatif değişikliklerin meydana geldiği ve bunların farklı fibrotik süreçleri etkilediği gösterilmiştir (13).

Flavonoidler, güçlü antioksidan özelliklere sahip fenolik bileşikler olup, pek çok bitki türünde bulunurlar ve bu nedenle tedavi edici seçenek olarak görülürler (14). Quercetin, çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan bir flavonoid olup, antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir (15-17).

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, quercetinin deneysel olarak diyabet oluşturulmuş hayvanlarda oksidatif hasarı inhibe etmek suretiyle, DN'de koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (18-20). Bununla birlikte yaptığımız taramalar, quercetinin, DN'de önemli bir etken olan apoptozis ile ilişkisini değerlendiren çalışmaların oldukça sınırlı sayıda olduğunu ortaya koymuştur (19,20). Bu nedenle çalışmamızda; güçlü bir antioksidan olarak bilinen quercetinin, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş şıçanların böbrek fonksiyon parametreleri (serum üre ve kreatinin düzeyleri), in situ DNA uç işaretleme metodu (TUNEL) ve aktif kaspaz-3 immunreaktivitesi ile renal hücre apoptozisi, prolifere nükleer antijen (PCNA) immunoreaktivitesi ile hücre proliferasyonu, ve ayrıca renal histopatoloji üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edeceğimiz sonuçların; DN'nin önlenmesinde, quercetin kulanımına dair veri sağlamada ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

GENEL BİLGİLER

DİABETES MELLİTUS

Tanımı

Diabetes mellitus (DM); insülin hormonunun sekresyonundaki yetersizlik ve hedef dokularda insülinin metabolik etkisine karşı direnç hali ile karakterize edilen, genetik kökenli metabolik bir hastalıktır. Glikozüri, hiperglisemi ayrıca bunlara eşlik eden birçok klinik ve biyokimyasal bulgu ile seyreden sistemik bir metabolizma hastalığıdır. DM, kan glukoz seviyesinin normalden yüksek olmasıyla karakterize edilir. Kandaki yüksek glukoz seviyesi, pankreastan insülin hormonunun salınmasını tetikler. İnsülin, kan glukoz seviyesini düşürmek için yağ ve kas hücrelerini uyararak, glukozun kandan karaciğere gidip metabolize olmasını sağlar. DM'un karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını olumsuz etkileyerek, doku ve organlarda istenmeyen biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Uzun süreli hiperglisemi; nöropati, nefropati, retinopati, kardiyovasküler ve serebrovasküler komplikasyonların gelişimi ve nihayetinde organ yetmezliği ile birlikte ölüme sebep olmaktadır (1-4).

Tarihçesi

Diabetes mellitus ile ilgili bilgiler Milattan Önce (M.Ö.) ki yıllara dayanmaktadır. DM ilk kez, M.Ö. 1500 yılında Mısır papirüslerinde bahsedilen aşırı idrarla seyreden bir hastalık olarak tanımlanmıştır. M.Ö. 5. yüzyılda Hintli hekim Sushruta "Sushruta-Samhita" isimli eserinde aşırı susama, ağır bir ağız kokusu, yorgunlukla birlikte ballı idrar şeklinde ifade edilen bir hastalıktan söz etmiştir. Bu ilk tarif edilen vakanın Tip 1 diyabet olduğuna inanılmaktadır.

Sushruta ve Charak ilk defa Tip 1 diyabeti yaşla, Tip 2 diyabeti ise obezite ile ilişkilendiren ve onları iki ayrı tip olarak tanımlayan hekimlerdir (21).

Diabetes mellitus yunanca 'akıp gitmek' (diabetes) ve 'bal kadar tatlı' (mellitus) anlamında iki kelimeden oluşmaktadır (21). Hastalığa Diyabet ismini ilk kez M.S. 130-200 yılları arasında yaşayan Kapadokyalı Aretheaus vermiştir. Tip 1 ve Tip 2 diyabetin şu anki bilinen farkı ise ilk olarak Harold Percival (Harry) Himsworth tarafından 1936 yılında ortaya konulmuştur (22).

Sınıflandırması

Diabetes Mellitusun sınıflandırılması; ilk olarak 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılmış olup zaman içerisinde bazı değişikliklere uğrayarak ideal sınıflama 1997 yılında Amerikan Diyabet Cemiyeti tarafından yayınlanmıştır. Aynı cemiyet diyabet sınıflandırma kriterlerin de bazı düzeltmeler yaparak 2003 yılında DM'un başlıca dört tipi olduğunu bildirmiştir (23).

Tip 1 diyabet (İnsüline bağımlı diyabet, Genç tipi): Pankreas β hücrelerinin ağır bir otoimmun atak nedeniyle hasarlanması (T lenfositlerin aktivasyonu ile) ve insülinin tamamen eksikliği ya da yokluğu ile karakterizedir (1). Tip 1 diyabetli hastalar, tüm diyabetik hastaların yaklaşık %5-10'unu oluşturmakta olup çoğunlukla ergenlik dönemlerinde görülürken nadiren erişkinlerde de ortaya çıkabilmektedir (2). Hastalığın semptomları; hiperglisemi, glukozüri, susuzluk hissi, beklenmedik kilo kaybı ve halsizliktir (24). Tip 1 diyabetin şekillenmesinde otoimmunite, genetik faktörler ve viral enfeksiyonlar rol oynamaktadır. Virüsler, toksinler, otoimmun antikorlar β hücrelerini tahrip eder ve ardından lenfositlerden salınan TNF-α ve interlökinler ile nitrik oksit sentetaz aracılığıyla L-arjinin- nitrik oksit yolunun uyarılmasına neden olur ve sonuçta hücre içinde nitrik oksit yapımını hızlandırır (25). Aşırı ve kontrolsüz nitrik oksit sentezi, oksidatif fosforilasyonu ve glikolizi arttırmakta ayrıca trikarboksilik asit siklüsunun bazı enzimlerini inhibe etmekte ve DNA kırılmalarına neden olarak hücre ölümüne ve otoimmun diyabete neden olmaktadır (26).

Tip 2 diyabet (İnsüline bağımlı olmayan diyabet, Erişkin tipi): Tip 2 diyabet; insüline karşı gelişen direnç sonucunda hiperglisemi ile karakterize edilen, metabolik bir hastalıktır. Sayıca normal olan β hücrelerinde insülin sentez, salgı ve depolanmasında bir bozukluk olmamasına karşın, periferik dokularda insüline karşı direnç gelişimi söz konusudur. Hiperglisemi gelişiminden sorumlu olarak, reseptör bozukluğuna bağlı glikoza karşı cevap oluşturmadaki yetersizlik gösterilmektedir. Tip 2 diyabete, orta yaş ve erişkinlerde daha sık

rastlanır ve genellikle bireyler şişmandır. Tüm diyabet vakalarının %80'ini oluşturan Tip 2 diyabet'in, toplumdaki sıklığı %2-5 arasındadır (2). Genç yaşta başlayan hiperglisemi, ketozisin yokluğu ve insülin kullanılmadan hipergliseminin düzeltilememesi, erken başlangıçlı Tip 2 diyabetin göstergesidir (1). Bu hastaların, insülin seviyeleri genellikle normal veya normalden biraz fazladır. Fakat kas, yağ ve karaciğer gibi dokularında insülinin etkilerine karşı gelişen direnç, normal veya daha yüksek seviyede üretilen insülin hormonunun efektif bir şekilde kullanılamamasına neden olur (2).

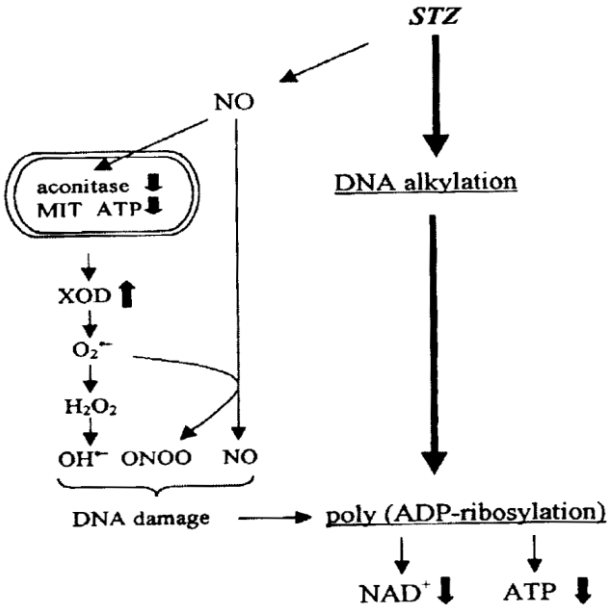
Gestasyonel diyabet: Gestasyonel diyabet, hamilelik durumunda ortaya çıkan glikoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Normalde glikoza karşı duyarlılığın azalmasından kaynaklanan geçici bir durum olup, glikoz toleransının bozulması ile birlikte gebelik sonrasında kalıcı olarak Tip 2 DM'ye dönüşebilmektedir. Gestasyonel diyabet tüm anne adaylarının yaklaşık olarak %5-6'sında ortaya çıkar. Hastalığın klinik olarak tanınması çok önemlidir, çünkü diyet ve gerektiğinde insülin tedavisi, gestasyonel diyabete bağlı perinatal mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır. Tarama testleri için en uygun dönem, diyabetojenik etkilerin açığa çıktığı gebeliğin 24-28. haftalarıdır (27).

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri: Diğer DM tiplerine oranla daha az rastlanan pankreatit, akromegali, Cushing hastalığı ve bazı genetik sendromlara (Klinefelter, Dowm ve Porfiria) veya atrojenik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan diyabet tipleridir (2).

Streptozotosin ile Diabetes Mellitus İndüksiyonu

Deneysel diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılan diyabetojenik özellikli geniş spektrumlu bir antibiyotik olan Streptozotosin (2-Deoksi-2-([(metilnitrozamin)karbonil]amino)-D-glukopiranoz, STZ), *Streptomyces achromogenes* tarafından sentezlenmektedir (28,29). STZ, Tip 1 ve Tip 2 diyabet modelleri oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tip 1 diyabet oluşturmak için yetişkin sıçanlarda intraperitoneal (i.p.) yoldan 40-60 mg/kg tek doz kullanımı tercih edilmekle birlikte (28), daha geniş aralıkta ki (35-80 mg/kg) dozlarda da kullanıldığı bilinmektedir (30). STZ; yapısında glukoz molekülü içermesi nedeniyle β hücrelerinde bulunan glukoreseptör (GLUT-2) lere bağlanmak suretiyle, bu hücrelerin glukoza yanıtını ortadan kaldırır (31). Bununla birlikte ilacın esas etkisi; hücre içine alındıktan sonra, oluşan reaktif nitrojen radikallerinin neden olduğu DNA hasarı ve ilacın alkilleyici etkisi aracılığıyla hücrede ortaya çıkan kalıcı hasar ile gerçekleşir (Şekil 1) (28,32). Kalıcı β hücre hasarı ve kaybını izleyen kan glukoz düzeyinde

artış ve insülin düzeyindeki azalmaya bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile STZ, insülinin biyosentezi ve sekresyonununa engel olmaktadır (33).



Şekil 1. Sıçan pankreas β hücrelerinde STZ-aracılı toksisite mekanizması (28).

Streptozotosin aracılı diyabet indüksiyonunda 3 aşama görülür; STZ ejeksiyonunu takiben 1. saatte başlayan, insülin sekresyonunun durması ile birlikte, glikojenin karaciğerde yıkımı nedeniyle geçici hipergliseminin ortaya çıktığı, yaklaşık 2-4 saat süren faz; geçici hiperglisemik fazdır. Bu fazın ardından 4.-8. saatler arasında, pankreastaki insülin salgılayan β hücrelerinin nekrozu nedeniyle, kandaki insülin seviyesinin yükseldiği, en fazla denek kayıplarının olduğu hipoglisemik faz ve son olarak STZ enjeksiyonundan 12-48 saat sonra gözlenen, kandaki yüksek düzeydeki insülinin hızla tüketilmesi sonucunda, insülindeki ani düşmeye bağlı olarak ortaya çıkan kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu fazı takip eden günlerde deneysel diyabetin semptom ve komplikasyonları ortaya çıkmaktadır (34).

DİYABETİK NEFROPATİ

Diyabetik nefropati, diyabetli hastalarda ortaya çıkan önemli bir komplikasyondur. DN; Tip 1 ve Tip 2 diyabet hastalarının % 40'nı etkilemektedir (3). Diyabetin uzun dönem mikrovasküler yan etkileri arasında yer alır. DN'nin erken dönemlerinde, glomerül ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, podositlerde hipertrofi, glomerüler mezengiyal matrikste artış ve bunlara bağlı fonksiyon bozulması nedeniyle de mikroalbuminüri görülür (4,35).

Tip 1 ve Tip 2 DM'de böbrek lezyonlarının patolojisi benzer olmakla birlikte; Tip 1 DM'de nefropatinin gelişmesinde ve ilerlemesinde, hiperglisemin payı büyüktür. Genellikle hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar, nefropati geliştikten sonra oluşur (36,37).

Diyabetik nefropatinin gelişim süreci Mogensen ve Christensen tarafından 5 evre olarak tanımlanmıştır (38).

Evre 1 (Hipertrofi-hiperfiltrasyon dönemi): Diyabet tanısının konduğu an olan baslangıç evresinde, renal hiperfiltrasyon ve hipertrofi mevcuttur. İdrar protein atılımı glomerüler filtrasyon hızına paralel olarak artmıştır ve aynı yaştaki kontrollerle karşılaştırıldığında %20–40 daha fazladır. Glomerüler kapiller basınç artışıyla ilişkili olarak glomerüler hacim ve kapiller yüzey alanı artar. Serum kreatinin düzeylerinin 60-100 μmol/l olduğu bu evre, 2 yıl sürer.

Evre 2 (Sessiz dönem): Glomerül filtrasyon hızındaki artış devam eder ve idrar albümin değeri normal sınırlardadır. Buna karşın GBM de nonspesifik bir kalınlaşma ve mezangiyumda sınırlı bir genişleme ile birlikte kapiler filtrasyon yüzey alanı azalır ve glomerüloskleroz başlar. Serum kreatininin 60-120 μmol/l olduğu bu evre 5-15 yıl sürer.

Evre 3 (Mikroalbuminüri başlangıç dönemi): Üriner albümin atılımı 30-300 mg/gün veya 20–200 g/dk arasındadır. Mikroalbüminüri kan basıncında hafif ama fark edilebilir bir yükselme ile birliktedir. Bu evrede bazal membran kalınlaşması, mezengiyum hacminde artış, filtrasyon yüzeyinde kalınlaşma gözlenir. Yaklaşık 10-20 yıl kadar süren bu evrede, serum kreatinini 80-120 μmol/l'dir.

Evre 4 (Klinik diyabetik nefropati dönemi): Bu evrede >300mg/gün albuminüri ve kalıcı proteinüri bulunmaktadır. Devamında gelişen hipertansiyon eğer tedavi edilmez ise, renal fonksiyon kaybı hızla artmaktadır. Histolojik değişiklikler oldukça belirgin olup, yaygın glomerüloskleroz bulunmaktadır. Serum kreatinini 120-400 μmol/l'dir.

Evre 5 (Son dönem böbrek yetmezliği): Üremi gelişmesi ile birlikte, ödem gibi diğer komplikasyonlarda görülmeye başlamaktadır. Ağır hipertansiyon, hipoalbuminemi, üre ve kreatinin yüksekliği bulunan bu hastaların, son dönem böbrek yetmezliğinde olduğu kabul edilmektedir.

Diyabetik Nefropatide Yapısal Değişiklikler

Tip 1 ve 2 diyabette DN'nin gelişimi benzer şekilde olmakla birlikte; Tip 1 diyabette, semptomların belirginliği nedeniyle erken dönemde nefropati tanısı koyulabilirken, Tip 2 diyabet hastaları yıllarca tanı konulamadan ilerlemiş DN ile karşımıza çıkabilmektedir. Tip 1 ve Tip 2 DM'da podositte oluşan değişiklikler DN'nin anahtar özelliğidir (35-37). Podosit ayaksı çıkıntıların genişlemesi ve sayısında azalma ile birlikte glomerüllerde ve tübüler interstisyumda bir dizi değişikliklerin gelişmesi DN'de görülen erken belirtilerdir (36,39).

Diyabetik nefropati bulguları; mikroalbuminüri gelişimi, glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler hipertrofi, mezengial matriks birikimi, GBM kalınlaşması, glomerülosklerozu, proteinüri ve son dönem böbrek yetmezliğidir. Jukstaglomerüler aparatın hipertrofisi ve sklerozu DN'de görülen diğer bir bulgudur. Glomerüler hipertansiyon ve hiperfiltrasyon DN gelişimini tetiklemektedir (4,37).

Diyabetik böbrekte ana patolojik değişiklikler glomerüllerde ortaya çıkmaktadır. Tanı konulduğunda böbreğin ve özellikle glomerüllerin hacmi artmıştır ve glomerüllerin genişlemesi geç dönemde de devam etmektedir. Erken dönemde bu genişleme bazal membran kalınlaşması şeklinde iken daha sonra mezengiyal genişlemeye neden olmaktadır (35,37)

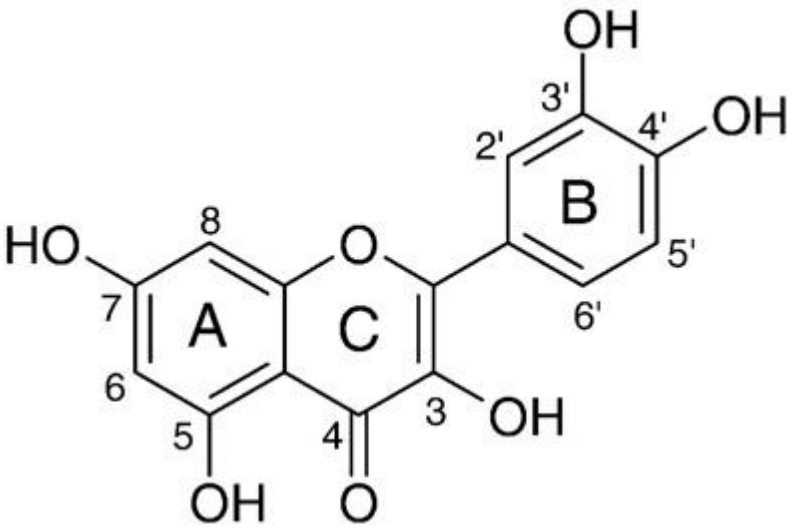
Diyabetik nefropati ile bağlantılı olarak tarif edilen patolojik değişiklikler arasında tübüler bazal membranın (TBM) kalınlaşması, tübülointerstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulunmaktadır. Tübüler atrofiye bağlı olarak ilerleyici interstisyel fibrozis; peritübüler kılcal damar kaybı ve işlevsiz nefronların tahrip edilmesine yol açan patojenik mekanizmalar ile karakterizedir (35,39). Yapılan çalışmalarda; tübüler epitelde hidropik değişikler, vakuolizasyon, proksimal tübül sitoplazmasında yer yer glikojen birikimleri ve fırçamsı kenarında bozulma ile birlikte tübüler atrofi tespit edilmiştir (40,41).

Böbrekte ekstrasellüler matriks (ECM) birikiminin; interstisyel fibrozis ve tübüler atrofiye eşlik ettiği, glomerüler bazal membran (GBM) kalınlığında ve mezengiyal matrikste artışa neden olduğu bilinmektedir (42). DN'de mezengiyal matriksin genişlemesi ve GBM kalınlaşması, normalde bu yapılarda bulunan proteinlerin aşırı birikimine bağlı olabilir. Mezengiyal matriks değişiklikleri arasında; kollajen tip IV, V ve VI, laminin ve fibronektinin artmış ekspresyonu, buna karşın heparan sülfat proteoglikanların azalmış ifadesi bulunmaktadır (43,44). Ek olarak, tübülo-interstisyel ve glomerüler fibröz hasarında ECM proteoglikanları olarak bilinen decorin ve biglikanların da ekspresyonlarında artış olduğu bilinmektedir (45). Mezengiyal değişiklikler, DN'de renal fonksiyon kaybının başlıca nedeni olarak görülmektedir.

Mezengiyal matriksteki genişleme, glomerüler kılcal damar lümenini daraltarak veya tıkayarak, filtrasyon için mevcut alanı düşürmektedir (42).

QUERCETİN

İlk kez 1857 yılında meşe (*Quercus*) ağacı reçinesinden elde edilen quercetin (3,3’,4’,5,7-pentahidroksiflavon); yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında –OH grubu bağlı olan flavanoid grubu bir antioksidandır (Şekil 2). Bütün bioflavonoidler içinde doğada en fazla bulunan quercetin; özellikle meşe ve çam gibi uzun ömürlü ağaçların reçinesi dışında sebze, meyve ve tahıl gibi farklı bitki materyallerinde (elma, kızılcık, fındık, kırmızı şarap, greyfurt, yeşil çay, ahududu, yaban mersini, kiraz ve brokolide) sarı renkli bir pigment maddesi olarak bulunur (46). Ağızdan alınan quercetinin %5-20’si, büyük oranda ince barsaklardan emilmektedir. Quercetin ve metabolitleri pek çok dokuya yayılır ve büyük oranda albumine bağlanır. Alındıktan 30 dakika ve 8 saat sonra bifazik olarak plazmada en yüksek seviyeye ulaştığı ve yarılanma ömrünün yaklaşık 25 saat olduğu bilinmektedir (47). Otoradyografik yöntemlerle quercetinle beslenen ratlarda, verilen dozun büyük kısmının sindirim sisteminde kaldığı, bunun yanı sıra karaciğer, böbrek ve akciğerde de tespit edildiği gösterilmiştir. Verilen dozun %34’nün ilk 24 saatte, başlıca karbondioksitle olmak üzere, %12’si safra, %9’nun ise idrarla atıldığı tespit edilmiştir (47,48).



Şekil 2. Quercetinin yapısal formülü (46).

1970’li yıllara kadar vitamin P adı ile bilinen ve tıbbi faydaları ortaya konulmuş olan quecetin; 2000’li yıllarda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından güvenli madde olarak kabul edilmiştir (49).

Quercetin; antioksidan, antialerjik, antiviral, antiinflamatuar, antiapoptotik, kardiyoprotektif ve antibakteriyel etkinlikler gibi geniş biyolojik aktiviteye sahip bioflavonoiddir (15,17,50). Ayrıca son çalışmalarda, kanser tedavisinde yardımcı ajan olarak kullanılabileceği gösterilerek antikanserojenik etkisi ortaya konulmuştur (51).

Quercetinin antioksidan potansiyeli üzerine birçok in vivo ve in vitro çalışma yapılmıştır. Vücudu reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı koruyan en güçlü flavonoidlerden birisi olarak görülmektedir (50,52,53). Quercetin, antioksidan etkisini ROS'u ortamdan uzaklaştırmak suretiyle göstermektedir. Quercetinin, ROS üzerine olan etkileri arasında farklılık olduğu; hidroksil radikali, peroksil ve süperoksit anyonuna karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal özellik sergilediği ortaya konulmuştur (53). Ayrıca quercetinin; Nuklear faktör-kappa B (NF-kB) gen transkripsiyonunu inhibe etmek suretiyle siklooksijenaz-2 (COX-2) indüksiyonunu engelleyerek ve makrofajlarda, lipopolisakkarid-aracılı sitokin (TNF-α) üretimini inhibe ederek güçlü bir antiinflamatuar etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (54). Ayrıca quercetinin, farklı organlar üzerinde yapılan çalışmalarda, çeşitli ajanların etkisi ile indüklenmiş hücre ölümü üzerine antiapoptotik etkisi gösterilmiştir (17,19). Yapılan çalışmalarda, quercetinin diyabetin indüklediği oksidatif stresi inhibe etmek suretiyle, diyabetin çeşitli dokularda meydana getirdiği hasarlara karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (20,55,56). Diyabet oluşumu sonrası verilen quercetin tedavisi ile kan glukoz düzeylerinde azalma ile birlikte insulin düzeylerinde artış olduğu görülmüşür. Quercetin tüketimi ile pankreatik β hücrelerinin oksidatif stresten korunduğu ve diyabet komplikasyonlarının azaldığı bildirilmiştir (55). Quercetinin, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, böbrekteki oksidan hasarını önlemek suretiyle böbrek fonksiyon bozukluğunu azalttığı (56). DN'nin ilerlemesini yavaşlattığı, proteinüriyi önlediği, mezengiyal matriks genişlemesini azalttığı ve böbrek hücrelerinin apoptozunu engellendiği gösterilmiştir (20).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın deneysel prosedürü için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra (31.05.2017 tarih ve TÜHADYEK-2017/15 protokol nolu), Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 8-10 haftalık, ağırlıkları 300-370 gr arasında değişen 24 adet *Wistar albino* erkek sıçan temin edildi. Deney süresince stabil laboratuvar koşulları altında (22 ± 1^0C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, günlük içme suyu ile birlikte ham %21 protein içeren pelet yemlerle (Purina, Bursa, Türkiye) beslenen deneklerimizden rastgele 3 grup oluşturuldu;

1. Grup I (Kontrol grubu): Plasebo olarak 15 gün boyunca i.p yoldan Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck Millipore, USA) verilen grup (n=8).

2. Grup II (Diyabet grubu): Tek doz 50 mg/kg STZ (Sigma Aldrich, Almanya) i.p olarak verilen grup (n=8).

3. Grup III (Diyabet+Quercetin grubu): Tek doz STZ (50 mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan 48 saat sonra başlayıp 15 gün boyunca günde bir kez, i.p. 30 mg/kg Quercetin (Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA) (DMSO içinde çözülerek) verilen grup (n=8).

Çalışmada kullanılan deneysel diyabet oluşturma prosedürü ile quercetin dozu, daha önceki çalışmalar baz alınarak seçilmiştir (57,58). Deneye başlamadan önce deneklerin vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Diyabet oluşturmak için, bir gece öncesinden aç bırakılan Grup II ve III deki hayvanlara, pH'sı 4,2 olan, 0,1M'lık sitrat tamponunda taze olarak hazırlanan 50 mg/kg STZ i.p. olarak, tek doz uygulandı. Diyabetin kontrolü için, STZ uygulamasından 48 saat sonra ve deney sonuna kadar her hafta, kuyruk veninden alınan kan

örneklerinde, glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile deneklerin kan glukoz düzeyleri kayıt altına alındı. Kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler "diyabetik" olarak kabul edilerek deneye alındı. Quercetin tedavisinin bitiminde (STZ ile diyabet indüksiyonundan 17 gün sonra), tüm deneklerin vücut ağırlıkları ve final kan glukoz düzeyleri kayıt edildikten sonra, ketasol (Ricterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, kardiyak kan örnekleri ile sağ ve sol böbrek dokuları alındı. Böbrek ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal çalışmalar için işlemlendirildi.

IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEMELER

Işık mikroskobik incelemeler için; böbrek doku örnekleri, %10'luk formaldehitle (SigmaAldrich) fikse edildikten sonra, dokular bir gece akarsuda yıkandı. Ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96'lık alkollerden, 1'er saat; 2 tekrar ve 1,5 saat olmak kaydı ile mutlak alkolden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 45 dakika (dk.) toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edildikten sonra, 45 dk. boyunca 42-44 ^{0}C sıcaklıktaki yumuşak parafinde (Merck Millipore) bekletildi. Bu sürenin sonunda dokular yumuşak parafinden, sıvı sert parafine (Merck Millipore) alındı. Elde edilen parafin bloklardan, histolojik ve morfometrik analizler için Leica RM-2245 silindirli mikrotom kullanılarak 4 μm kalınlığındaki kesitler alındı. Histopatolojik değerlendirmeler için Hematoksilen+eozin (H+E) ve histokimyasal Periodik asit Schiff (PAS) ve Sirius Red boyamaları uygulandı.

Hematoksilen-Eosin Boyama

Parafinin giderilmesi amacıyla, 30 dk. boyunca toluol ile muamele edilen kesitler sırasıyla %100, %96, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek, suya indirildi. Kesitler 5 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (MerckMillipore) ile muamele edildi. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dk. bekletilen kesitlere, 3 dk. Eosin (Merck Millipore) uygulandı. Dehidratasyon için; sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirildikten sonra, kesitler toluol ile muamele edildi ve entellan (Merck Millipore) ile kapatıldı.

Periodik asit Schiff (PAS) Boyama

Parafin kesitler, suya indirilme işlemi ardından, 15 dk. %1'lik periyodik asit (Merck Millipore) solüsyonu içerisinde bekletildi. Shiff solüsyonu (15 dk.) ile muamele edilen kesitler 3 kez 5 dk. yıkama solüsyonlarından geçirilerek, nukleusların boyanması amacıyla hemalen ile

muamele edildi. Akan çeşme suyu altında 10 dk. morartma işlemi gerçekleştirildikten sonra yükselen alkol serileri ve toluolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

Sirius Red Boyama

Suya indirilen parafin kesitler, 10 dk. Weigert's Hematoksilen (Merck Millipore) solüsyonu içerisinde bekletildikten sonra 10 dk. boyunca morartma işlemine tabi tutuldu. Morartma işleminin ardından, 1 saat boyunca Sirius red boyası ile muamele edilerek, 2 defa %5'lik Asetik asit solüsyonunda yıkandı. Sonrasında %100'lük alkol ile 3 defa çalkalandı ve toluolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

Histopatolojik Değerlendirme

Streptozotosin ile diyabet indüksiyonu sonucunda, böbreklerde meydana gelen renal hasar, tübülointerstisyel ve glomerüler değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Kesitler histolojik olarak tübüler hasar (hücre şişmesi ve vakuolizasyon, glikojen birikimi, deskuamasyon, mikrovillus kaybı), interstisyel fibrozis ve Bowman mesafesi darlığı açısından değerlendirildi. Histopatolojik değişiklikler; her deneğe ait böbrekte, 20 farklı alanda (10 kortikal, 10 dış medulla) X200 büyütmede ve hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum skor 9 olarak belirlendi ve her grup için ortalama değer hesaplandı. Ayrıca; glomerül büzüşmesi ve PAS (+) materyalin artmasıyla karakterize glomerülosklerotik değişiklikler, X400 büyütmede 100 glomerül üzerinde değerlendirildi. Her glomerül, skleroz derecesine göre; 0-4 arasında skorlandı. 0: normal glomerül, 1: glomerülün ≤ %25'ini kaplayan skleroz, 2: glomerülün %25-%50'ini kaplayan skleroz, 3: glomerülün ≥ % 50'ini kaplayan skleroz, 4:glomerülün tümünü kaplayan skleroz olarak derecelendirildi. Aşağıdaki formüle göre skleroz indeksi (S.İ.) hesaplandı (59):

$$S.İ = \frac{(1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{N0+N1+N2+N3+N4}$$

N= Glomerül sayısı

Glomerül çap ölçümleri; ışık mikroskobu (Olympus CX31) aracılığı ile PAS boyalı böbrek kesitlerinde, X400 büyütmede rastgele alanlarda seçilen 30 adet düzgün şekilli glomerüller üzerinde, oküler mikrometre (Olympus 20.4 OCM-10/100XY) kullanılarak yapıldı (60).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Bir gece 56 ^{0}C'de bekletilen 5 μm parafin böbrek kesitleri, deparafinizasyon işleminden sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (10 mM; pH 6.0) mikrodalga fırında (Vestel, 1550) kaynatılıp, 20–25^{0}C oda ısısında soğutulduktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamanın ardından, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler %3'lük H_2O_2 içerisinde 15 dakika bekletildi. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (İnvitrogen Histostain Plus Kit) 10 dk. inkübe edilen kesitler, antikoru dilüe etme solüsyonuyla (İnvitrogen) hazırlanan tavşan poliklonal aktif kaspaz-3 (Millipore, Darmstadt, Germany, 1/200) primer antikorunda +4 ^{0}C de bir gece ve tavşan monoklonal PCNA (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, ABD, 1/2000) primer antikorunda oda ısısında 1 saat inkübe edilmişlerdir. Primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (İnvitrogen) 10 dk. oda ısısında inkübe edildi ve son olarak HRP-streptavidin (İnvitrogen) ile 10 dk muamele edildi. 3,3-diaminobenzidine (DAB; İnvitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve entellanla kapatıldı. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskobunda incelenerek, fotoğrafları çekildi.

Böbrek dokusunda, PCNA immunoreaktivitesi, ışık mikroskobu aracılığı ile her bir hayvana ait böbrek kesiti üzerinde yüksek büyütmede (X200), rastgele seçilmiş 20 alanda (10 kortikal, 10 dış medulla) nukleusu güçlü pozitif boyanmış renal tübüler hücreler sayıldı. Glomerüler hücre proliferasyonu ise aynı kesitler kullanılarak 30 glomerül üzerinde değerlendirildi. Her bir grup için ortalama tübül ve glomerüler PCNA pozitif hücre sayısı hesaplandı.

Aktif kaspaz-3 immünoreaktivite yoğunluğu, ışık mikroskobunda, X200 büyütmede her bir hayvana ait bir kesit üzerinde, rastgele seçilen 20 alanda (10 kortikal, 10 dış medulla) histolojik skor (H-SCORE) ile değerlendirildi. Skorlama, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (*Pi*) ve boyanma derecesi (*i*) dikkate alınarak gerçekleştirildi. Boyanmanın şiddeti; 0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+,orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma şeklinde skorlandı. Ortalama H-SCORE değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımı ile hesaplandı (H-SCORE = $\sum i \times P_i$). İstatistiksel analizler için her grubun ortalama skorları kullanıldı.

IN SITU DNA UÇ İŞARETLEME METODU (TUNEL) ANALİZİ

Böbrekte hücre apoptozisi, TUNEL analizi aracılığıyla, 37 ºC de bir gece bekletilmiş 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler üzerinde ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (S7101, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) kullanılarak değerlendirildi. Deparafinizasyon işlemi için toluolden ve rehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra PBS (pH: 7.4, İnvitrogen, Kaliforniya, ABD) ile yıkandı. Proteinlerin sindirilmesi için, 15 dk oda ısısında proteinaz K solüsyonu (Merck Millipore) ile muamele edilen kesitler, distile sudan geçirildi. Endojen peroksidazın bloke edilmesi için kesitler 5 dk, %3'lük H_2O_2'e alındı. Daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk bekletildi ve ardından terminal deoksinükleotidiltransferaz (Tdt) enzim solüsyonu ile 37°C'de 1 saat muamele edilip, ardından kesitler oda ısısında 10 dk. durdurma/yıkama tamponunda yıkandı. Oda ısısında 30 dk. antidigoksigenin peroksidaz antikor ile inkübe edilen kesitler peroksidaz substrat için DAB kullanılarak işaretlendikten sonra hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve nukleusu koyu kahverengi boyanmış hücreler TUNEL pozitif olarak değerlendirildi. Böbrek dokusunda, apoptozis değerlendirmeleri, ışık mikroskobu aracılığı ile her bir hayvana ait böbrek kesiti üzerinde yüksek büyütmede (X200), rastgele seçilmiş 20 alanda (10 kortikal, 10 dış medulla) renal tübüllerde TUNEL pozitif boyanmış hücreler sayılarak yapıldı. Glomerüler apoptozis ise aynı kesitler kullanılarak 30 glomerül üzerinde değerlendirildi (61). Her bir grup için ortalama tübül ve glomerüler apoptotik hücre sayısı hesaplandı.

FONKSİYONEL ANALİZLER

Sakrifikasyon esnasında deneklerin kardiyak kan örneklerinden elde edilen serumlarda, böbrek fonksiyon parametreleri olarak, kreatinin ve üre düzeyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Otoanalizör Ünitesi'nde (Berckman Coulter AU5800, Luton, İngiltere) ölçüldü.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

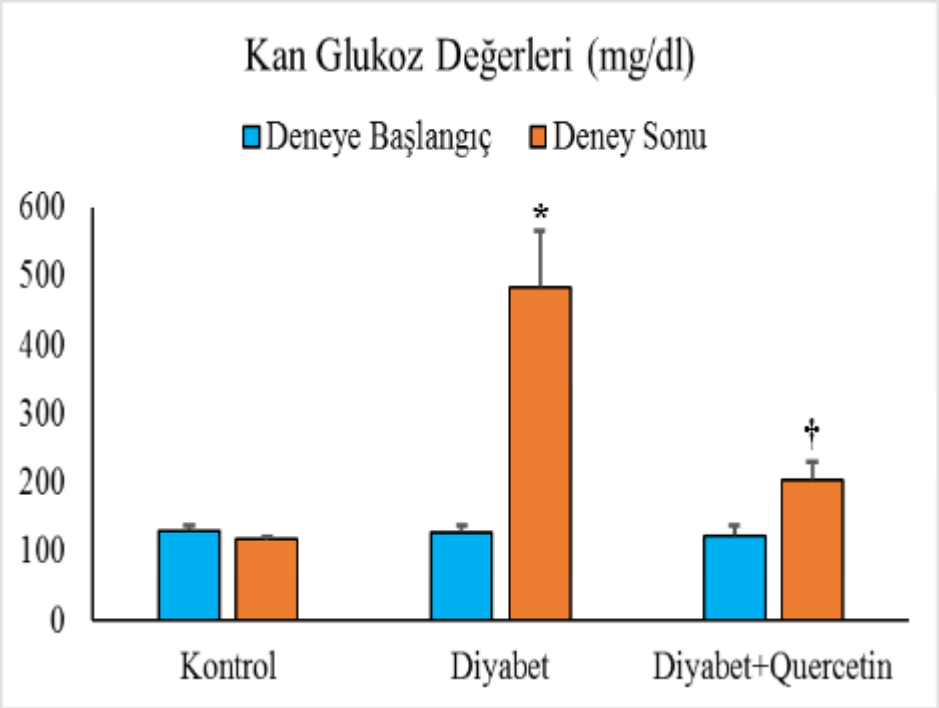
İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Niceliksel verilerin normal dağılıma uygunluğu Tek Örneklem Kolmogorov Smirnov test ile incelendi. Grupların (Kontrol, Diyabet ve Diyabet+Quercetin) normal dağılım gösteren niceliksel değerlerinin karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı, gruplar

arasında fark bulunduğunda bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede varyansların homojenlik durumuna göre Tukey HSD ya da Tamhane çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Gruplar arasında normal dağılım göstermeyen niceliksel değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı, gruplar arasında fark bulunduğunda bu farkın hangi iki grup arasında olduğunu belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ

Çalışmamızda deneysel olarak diyabet gelişimini tespit etmek amacıyla, deneye başlamadan önce, STZ uygulamasından 48 saat sonra ve deney sonunda, deneklerin açlık kan glukoz düzeyleri ölçüldü (Şekil 3). Deneklerin başlangıç kan glukoz düzeylerinin 123.33 ± 13.87 ile 130.67 ± 7.09 mg/dl arasında olduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı ($p<0.524$) tespit edildi. STZ ile diyabet indüksiyonu yapılan diyabet grubunun, deney sonunda ölçülen kan glukoz düzeyi (484.5 ± 80.36), kontrol grubuna (117.5 ± 5.01) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Diyabet indüksiyonundan 48 saat sonra quercetin uygulanmaya başlanan Diyabet+quercetin grubunun deney sonu kan glukoz değerinin (204.17 ± 26.42), diyabet grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



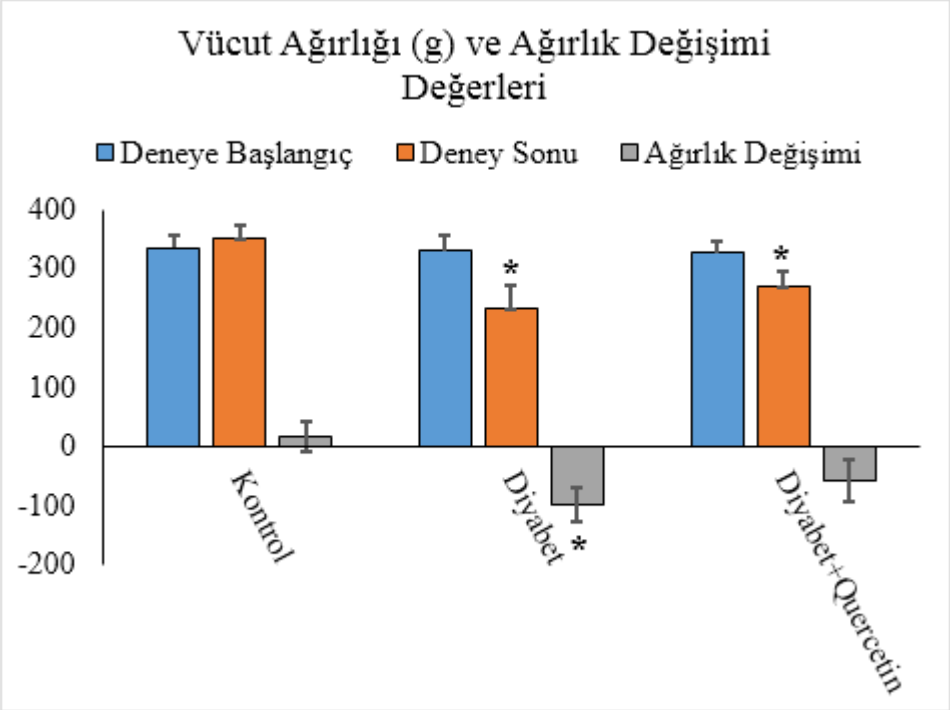
Şekil 3. Deney gruplarına ait açlık kan glukoz düzeylerinin karşılaştırılması. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

AĞIRLIK BULGULARI

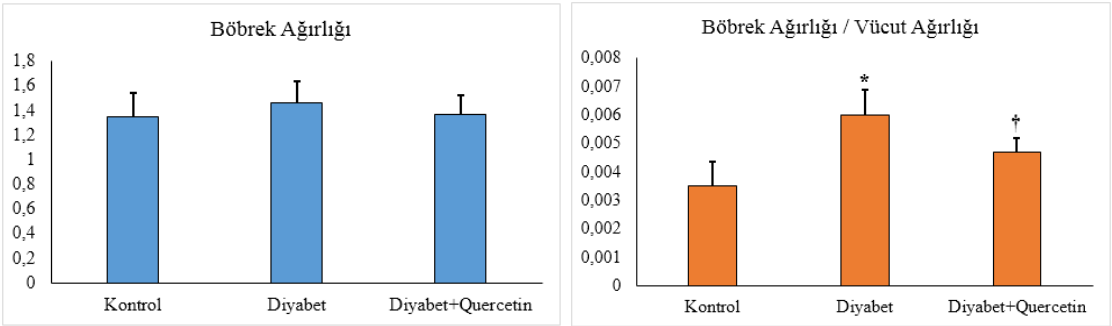
Diyabetin meydana getirdiği etkileri ortaya koymak amacıyla deneklerin, deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları ile böbrek ağırlıkları ölçülerek, deneklerin vücut ağırlık değişimi ve böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranı hesaplandı (Şekil 4 ve 5). Deney sonunda kontrol grubu deneklerinin vücut ağırlıklarının arttığı (16.5 ± 23.9 g), buna karşın diyabetin meydana getirdiği kilo kaybı nedeniyle, diyabet (-98.5 ± 28.36 g) ve diyabet+quercetin grubunun (-57.83 ± 35.19) vücut ağırlıklarının önemli oranda azaldığı gözlendi. Her iki grup kontrol ile kıyaslandığında; diyabet ($p<0.001$) ve diyabet+quercetin ($p=0.002$) grubu deneklerin deney sonunda ortaya çıkan vücut ağırlıklarındaki değişimin, anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4).

Sakrifikasyondan sonra böbrek ağırlıkları ölçüldüğünde; diyabet grubu ortalama böbrek ağırlığının (1.45 g), kontrol grubuna kıyasla hafif derecede (1.35 g) artmasına karşın, her üç grup arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlendi ($p<0.002$) (Şekil 5A). Buna karşın diyabete bağlı olarak ortaya çıkan vücut ağırlığındaki azalma nedeniyle, diyabet grubunun böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranının (0.006 ± 0.00089), kontrol grubuna (0.0035 ± 0.00084) göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlendi ($p=0,003$). Diyabet+quercetin grubunun böbrek

ağırlığı/vücut ağırlıklarının (0.00467 ± 0.00052) diyabet grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (p=0.016) (Şekil 5B).



Şekil 4. Deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlık değerleri ile vücut ağırlıkları değişimi. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.001, Quercetin tedavili grup diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel fark bulunmamıştır (p=0,074), p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 5. A) Böbrek ağırlığı (g) B) Böbrek ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Tüm gruplara ait deneklerin böbrek dokularına ait kesitler; rutin H+E boyamasında histopatolojik skorlama yapılarak, PAS boyası ile glomerüloskleroz indeksi hesaplanarak ve Sirius Red boyamasında interstisyel fibrozis düzeyi belirlenerek, histopatolojik açıdan değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. Histopatolojik değerlendirme sonuçları (ortalama ± standart sapma)

	Kontrol (n=8)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Diyabet+Quercetin Grubu (n=8)**	**p**
Histopatolojik Skor	1 ± 0.63	5.17 ± 0.98*	3.33 ± 0.52 *†	0.001
Glomerüloskleroz indeksi	0.2 ± 0.06	1.43 ± 0.1*	0.95 ± 0.05 *†	<0.001
Glomerül çapı (µm)	115.11 ± 1.25	135.53 ± 1.6*	126 ± 0.76 *†	<0.001

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

Kontrol Grubu Bulguları

Kontrol grubuna ait H+E boyalı böbrek kesitleri incelendiğinde; normal görünümlü malpighi cisimcikleri, proksimal ve distal tübüller ile toplayıcı borular ve damarlar gözlendi (Şekil 6,7).

Korteks ve kortikomedüller sınırda yerleşmiş Malpighi cisimciklerinin, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprakları tarafından sınırlandırılan idrar boşluğu (Bowman mesafesi) ile çevrelenmiş, normal görünümlü glomerüler yapıya sahip olduğu gözlendi (Şekil 7,8). Vaskuler kutupta gözlenen justaglomerüler aparatı oluşturan yapılardan biri olan makula densa; koyu boyanmış, yüksek prizmatik hücrelerden oluşmaktaydı. Bowman kapsülünün pariyetal yaprak hücreleri, yassı görünümlü, periyodik yerleşimli olup nukleusları idrar boşluğuna doğru hafifçe çıkıntı oluşturuyordu. PAS boyalı kesitlerde hem pariyetal yaprak hücrelerinin üzerine oturduğu bazal membran, hem de GBM yapısının normal olduğu gözlendi. Ayrıca glomerüller de bulunan mezengiyal hücreler, endotel hücreleri ve podosit hücreleri de normal görünüm ve yerleşimdeydi (Şekil 8). Kontrol grubuna ait ortalama glomerül çapları 115 µm olarak ölçüldü (Tablo 1).

Malpighi cisimcikleri etrafında, eosinofilik boyalı piramidal şekilli hücrelerden oluşmuş, dar lümene sahip proksimal tübüller yer almaktaydı (Şekil 6,7). Hücrelerin apikal kısımlarında yüzey farklılaşması olarak bulunan fırçamsı kenar oluşumları PAS pozitif yapısı ile düzenli bir görünüm sergilemekteydi. Proksimal tübüllere kıyasla daha geniş lümene sahip, izoprizmatik hücrelerle döşenmiş distal tübüller normal görünümde idi. Bu tübüllerin normal yapıda bazal membranlara sahip olduğu gözlendi (Şekil 8). Bağ dokusu liflerine yönelik yapılan Sirius Red boyamada; nefronların, tübüllerin ve damarların, interstisyel doku olarak adlandırılan bağ dokusu ile çevrili olduğu görüldü (Şekil 9).

Tüm bu bulgular ışığında kontrol grubuna ait histopatolojik skor 1±0.63 olarak tespit edildi (Tablo 1).

Diyabet Grubu Bulguları

Diyabet grubuna ait böbrek kesitleri ışık mikroskobunda incelendiğinde; glomerüler mezengiyal matrikste artış, glomerüler hipertrofi ile proksimal ve distal tübüller de yapısal bozukluklar tespit edildi (Şekil 10-13).

Işık mikroskobik incelemeler esnasında özellikle küçük büyütmelerde; pariyetal ve visseral yapraklar arasındaki Bowman mesafesinin daralması nedeniyle, Malpighi cisimciklerinin güçlükle tespit edilebildiği görüldü (Şekil 10,11). Bu grupta gözlenen Bowman mesafesinde daralmaya neden olan glomerüler hipertrofi, diyabet grubunun ortalama glomerül çapında (135 μm), kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış meydana getirdi ($p<0,001$) (Tablo 1). Ayrıca STZ ile diyabet indüksiyonunun; bazı glomerüllerde, kollabe lümenli glomerüler kapilerler ve artmış mezengiyal matriks ile kendini gösteren sklerotik değişikliklere yol açtığı gözlendi. Etkilenen glomerüllerde ortaya çıkan kalınlaşmış GBM yapısı ve mezengiyal matriks artışı, yoğun PAS pozitif boyanma ile tespit edildi (Şekil 12). Glomerülosklerotik değişiklikler 0-4 arasında skorlandığında; % 30 glomerülün normal yapıda olduğu, %15'inde 1, %35'inde 2, %20'inde 3 düzeyinde skleroz saptanırken, glomerülün tümünü kaplayan şiddetli (4 düzeyinde) skleroz bulgularına rastlanmadı. Bu grubun glomerüloskleroz indeksi de, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$) (Tablo 1). Diyabet grubunda; tübüler dilatasyon ile birlikte, özellikle korteks ve kortikomedüller alanda glukojenik vakuolizasyon gösteren şeffaf görünümlü tübüllerin varlığı dikkati çekti (Şekil 11-13). Ayrıca bazı tübüllerde, epitel hücrelerin lümene dökülmesi nedeniyle, fırçamsı kenar yapısında bozulma ve bazal membranlarında kalınlaşma gözlendi (Şekil 12,13). Sirius Red boyamasında interstisyel alanda dikkate değer bir bağ doku artışı tespit edilmedi (Şekil 14). Yapılan değerlendirme sonucunda

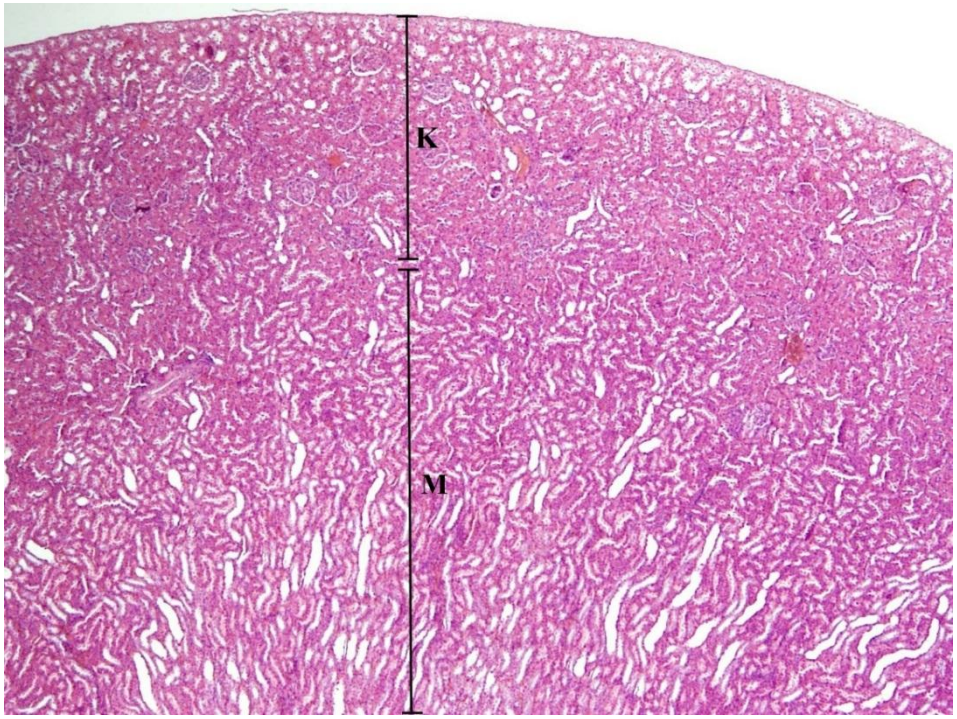
ise diyabet grubunun histopatolojik skorunun (5.17 ± 0.98), kontrol grubuna (1 ± 0.63) göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 1).

Diyabet+Quercetin Grubu Bulguları

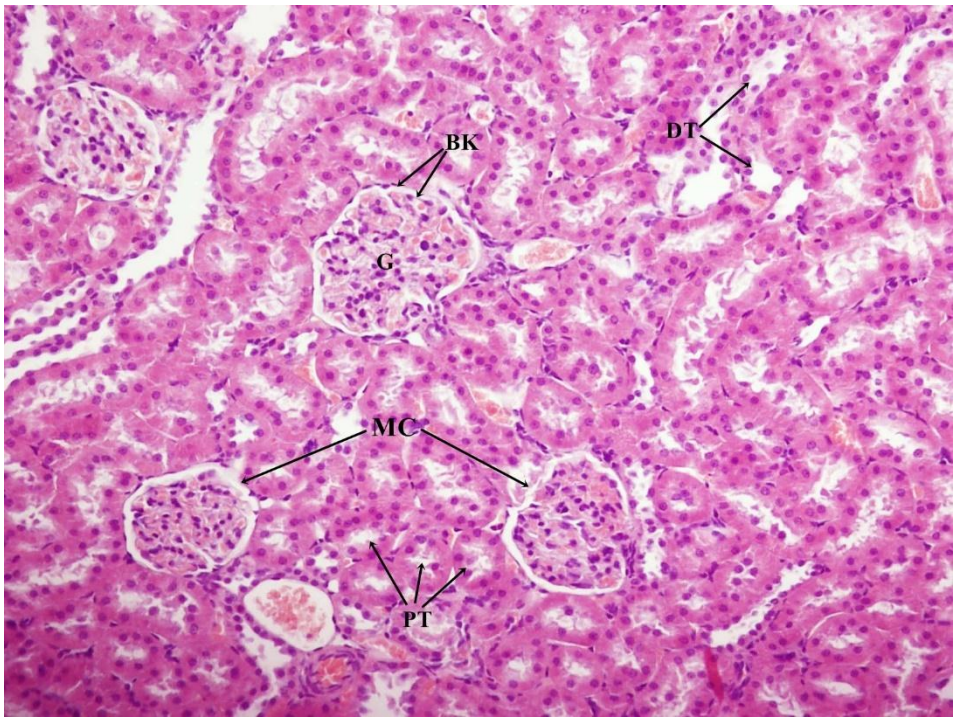
Diyabet indüksiyonundan 48 saat sonra uygulanan quercetin tedavili grubun böbrek kesitleri incelendiğinde; diyabetin neden olduğu glomerüler ve tübüler histopatolojik değişikliklerin önemli ölçüde azaldığı gözlendi (Şekil 15-18).

Korteks ve kortikomedüller alanda gözlenen pek çok Malpighi cisimciğinde, Bowman mesafesi belirgin olarak izlendi (Şekil 15-17). Bu grubun, ortalama glomerüler çap değerinin (126 μm), diyabet grubuna kıyasla anlamlı oranda azalmış olmakla birlikte, kontrol grubu değerinden yüksek olduğu saptandı (Tablo 1). PAS boyaması ile glomerüler kapiler bazal membranlarında belirgin bir kalınlaşma gözlenmeyen, nisbeten normal miktardaki mezengiyal matriks içerisinde yer alan lümenleri açık kapilerlerin oluşturduğu normal yapılı glomerüllerin çoğunlukta olduğu dikkati çekti (Şekil 17). Bununla birlikte, quercetin grubunda glomerülosklerotik değişiklikler hafif ve orta düzeyde izlendi. Glomerüllerin %40'ının tamamiyle normal yapıda olduğu tespit edildi. Buna paralel olarak diyabet+quercetin grubuna ait glomerüloskleroz indeksinin de, diyabet grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 1). Quercetin tedavili grubun deneklerinde, dilate ve şeffaf görünümlü tübüllerin, tübüler epitel hücrelerinde tespit edilen fırçamsı kenar kaybı ve bazal membran kalınlaşmalarının diyabet grubuna göre oldukça azaldığı gözlendi (Şekil 15-18). Quercetin tedavisinin diyabetik böbrek dokusunda sağladığı koruyucu etkiye paralel olarak bu grubun histopatolojik skoru, diyabet grubuna oranla anlamlı derece de azalmıştı ($p<0,05$) (Tablo 1).

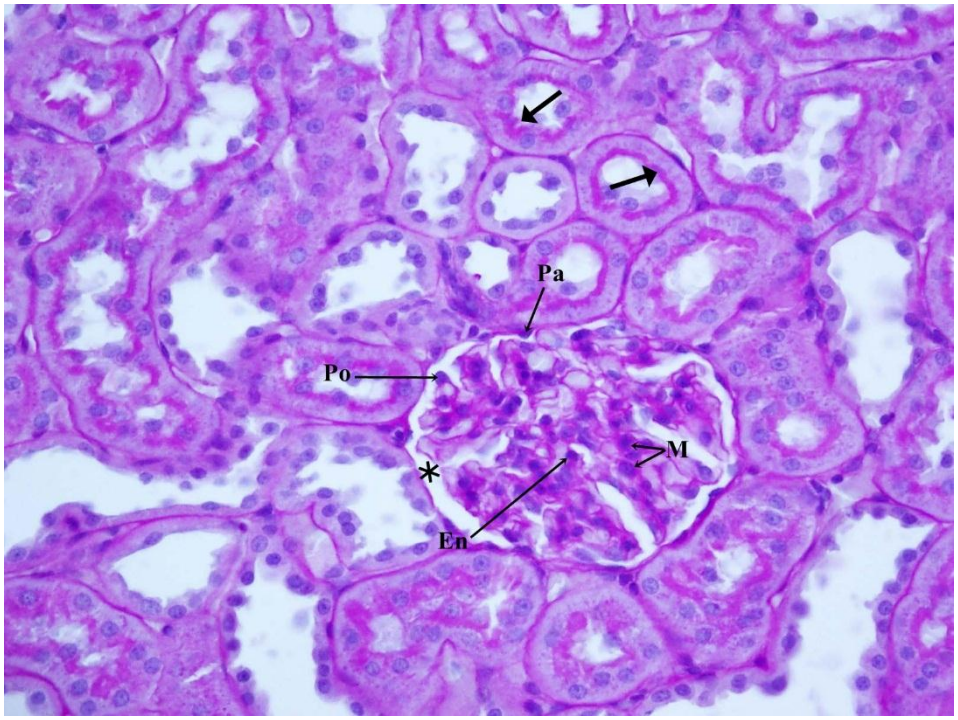
Kontrol Grubu Histopatolojik Gözlemleri



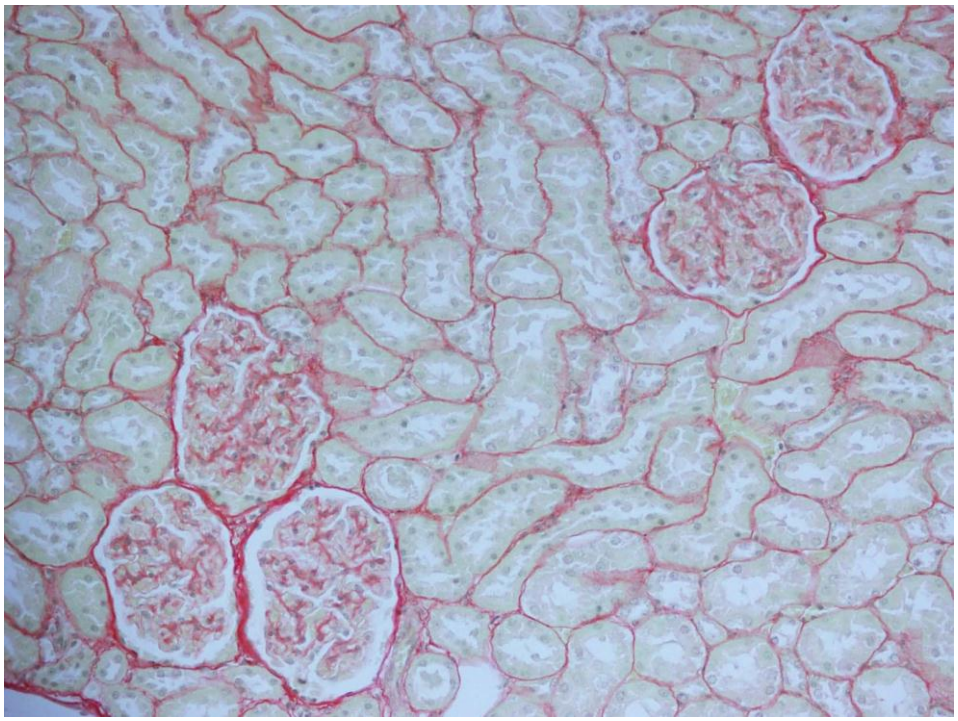
Şekil 6. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde, normal histolojik yapıya sahip korteks ve medulla kısımları gözlenmektedir. K: Korteks, M: Medulla. H+E, X40.**



Şekil 7. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, glomerül (G) ve Bowman kapsülünü (BK) içeren Malpighi cisimcikleri (MC) ile eosinofilik boyanmış proksimal tübüller (PT) ve geniş lümenleri ile ayırt edilebilen distal tübüller (DT) görülmektedir. H+E, X200.**

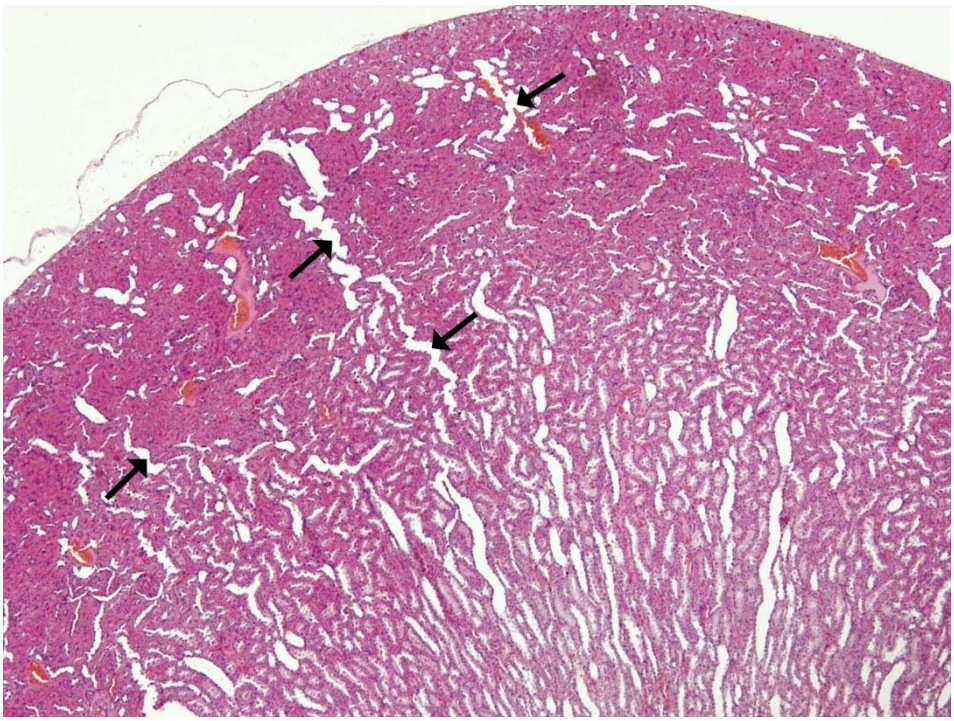


Şekil 8. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde, idrar boşluğu (*) ile birbirinden ayrılan Bowman kapsülünün parietal yaprak hücreleri (Pa) ve visseral yaprağın podositleri (Po) ile glomerüler kapiler endotel hücrelerinin (En) üzerine oturduğu bazal membran yapıları, tübül epiteli fırçamsı kenarı (→) ve tübül bazal membranlarının normal yapısı izlenmektedir. M: Mezengiyal hücre. PAS, X400.**

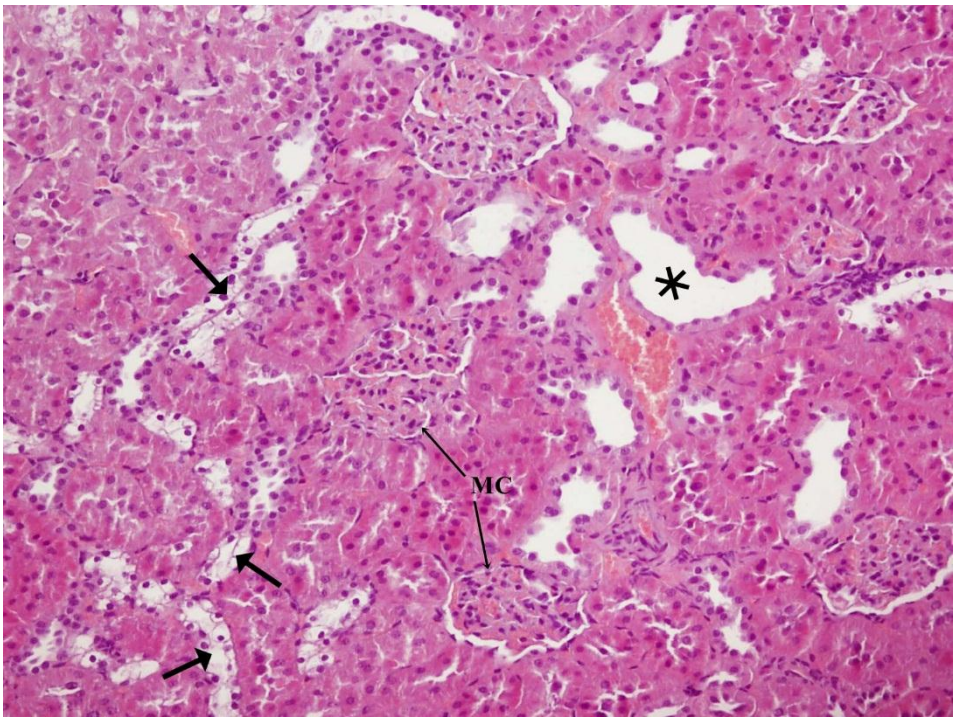


Şekil 9. **Kontrol grubunda, interstisyel doku ile çevrili Malpighi cisimcikleri ve tübüllerin bulunduğu normal böbrek histolojisi görülmektedir. Sirius Red, X200.**

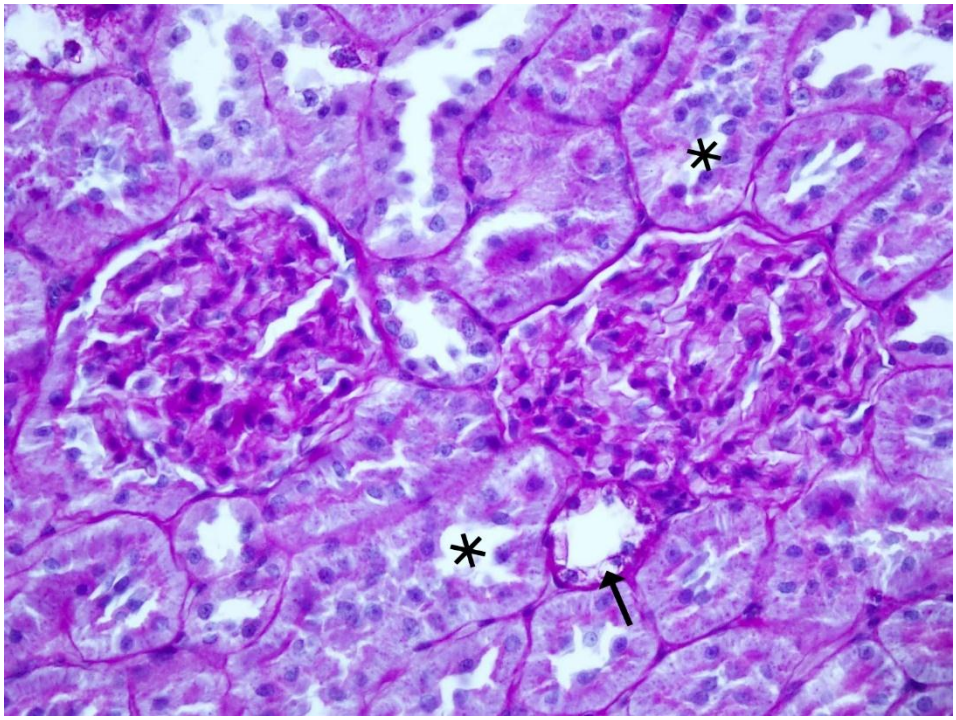
Diyabet Grubu Histopatolojik Gözlemleri



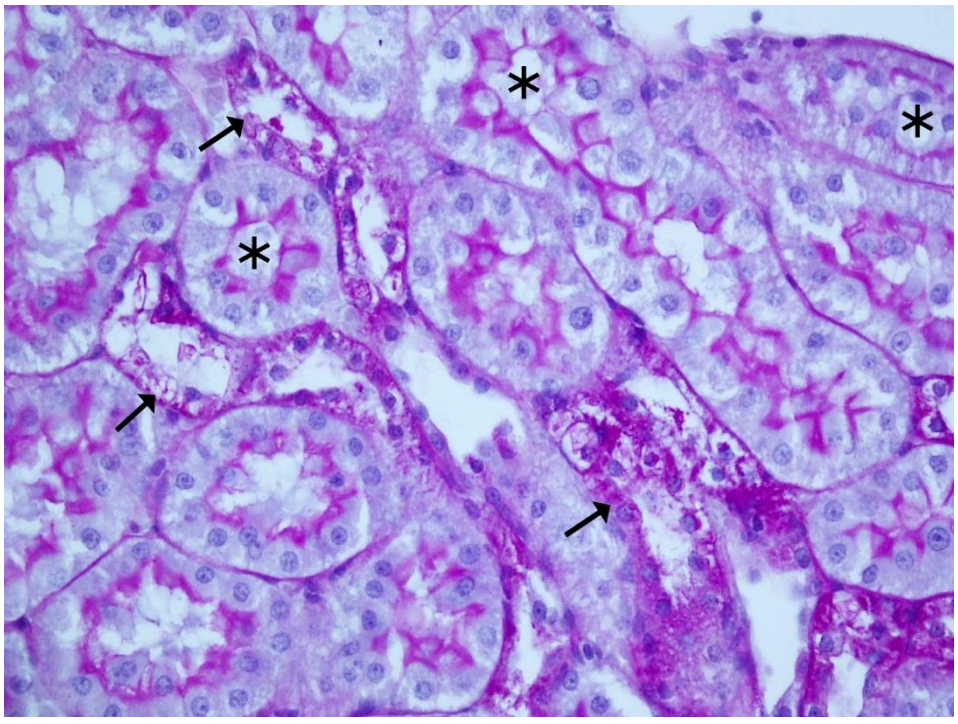
Şekil 10. **Diyabet grubuna ait böbrek kesitinde, belirgin tübül dilatasyonu (→) ve daralmış Bowman mesafesi nedeniyle Malpighi cisimciklerinin fark edilemediği dikkati çekmektedir. H+E, X40.**



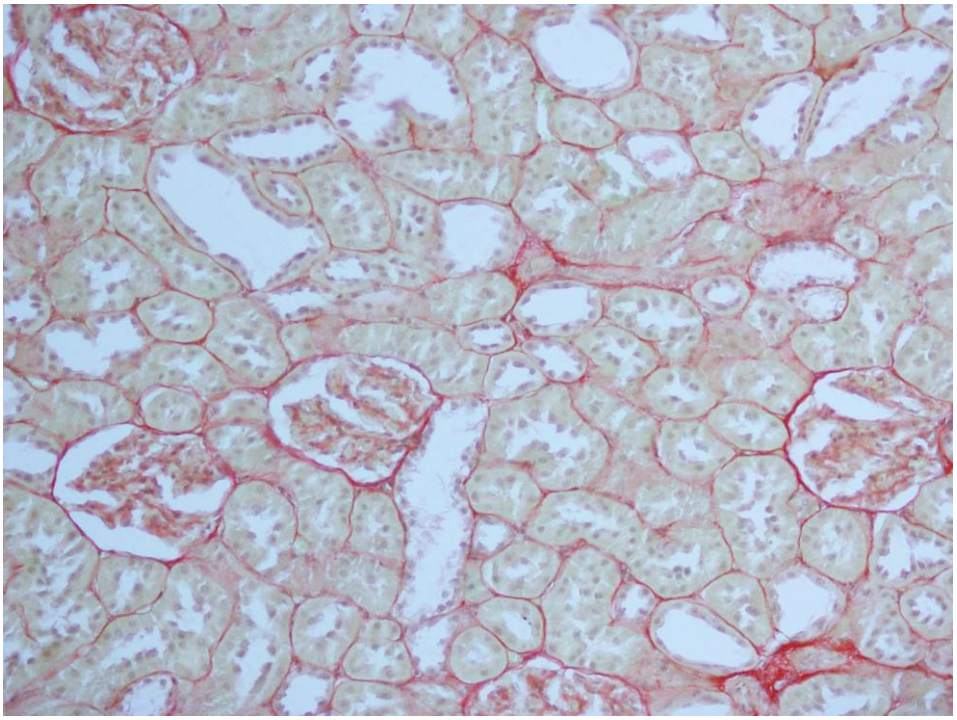
Şekil 11. **Diyabet grubunda, dilate renal tübüllerin (*) yanı sıra vakuoler dejenerasyon gösteren şeffaf görünümlü tübüller (→) ile Bowman mesafesi daralmış Malpighi cisimcikleri (MC) izlenmektedir. H+E, X200.**



Şekil 12. **Diyabet grubunda, kalınlaşmış glomerüler bazal membran yapısı ve mezengiyal matriks ve hücre artışı sergileyen glomerüllerin (G) etrafında güçlükle farkedilebilen daralmış Bowman mesafesi dikkati çekmektedir. Kalınlaşmış bazal membranı ile çevrili, epitel hücrelerinde dökülme ile birlikte fırçamsı kenar yapısı bozulmuş tübüller (*) ve glukojenik vakuolizasyon gösteren dejeneratif tübüller (→) gözlenmektedir. PAS, X400.**

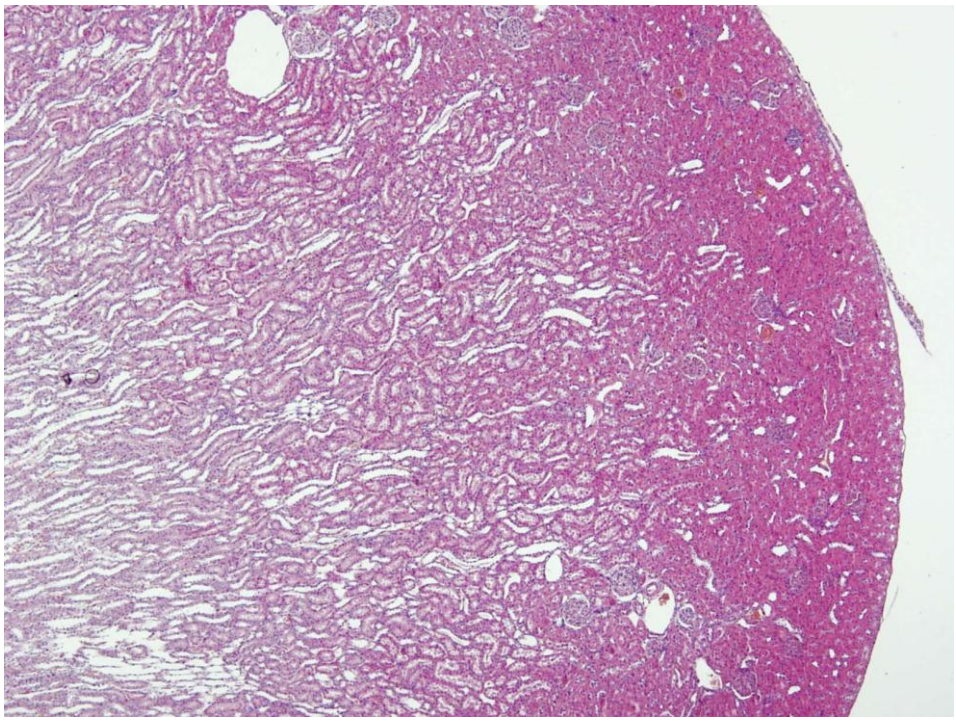


Şekil 13. **Diyabet grubunda, epitel hücrelerinin lümene dökülmesi nedeniyle fırçamsı kenar yapısı bozulmuş (*) ve glukojenik vakuolizasyon gösteren şeffaf görünümlü tübüller (→) dikkati çekmektedir. PAS, X400.**

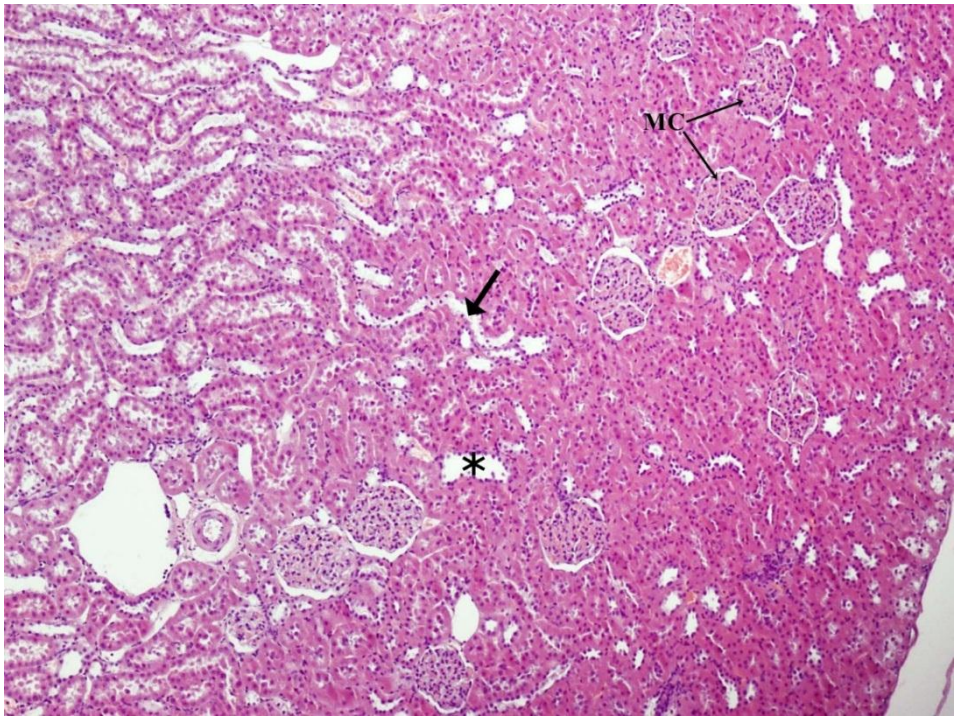


Şekil 14. **Diyabet grubunda, tübüler ve glomerüler değişikliklerin izlendiği böbrek dokusu gözlenmektedir. Sirius Red, X200.**

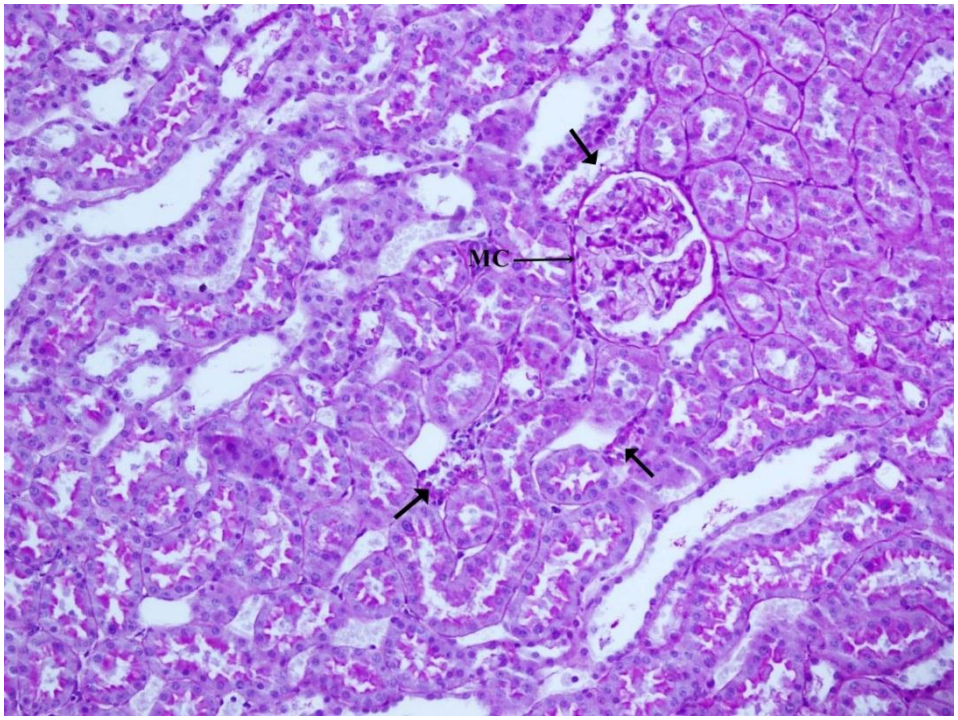
Diyabet+Quercetin Grubu Histopatolojik Gözlemleri



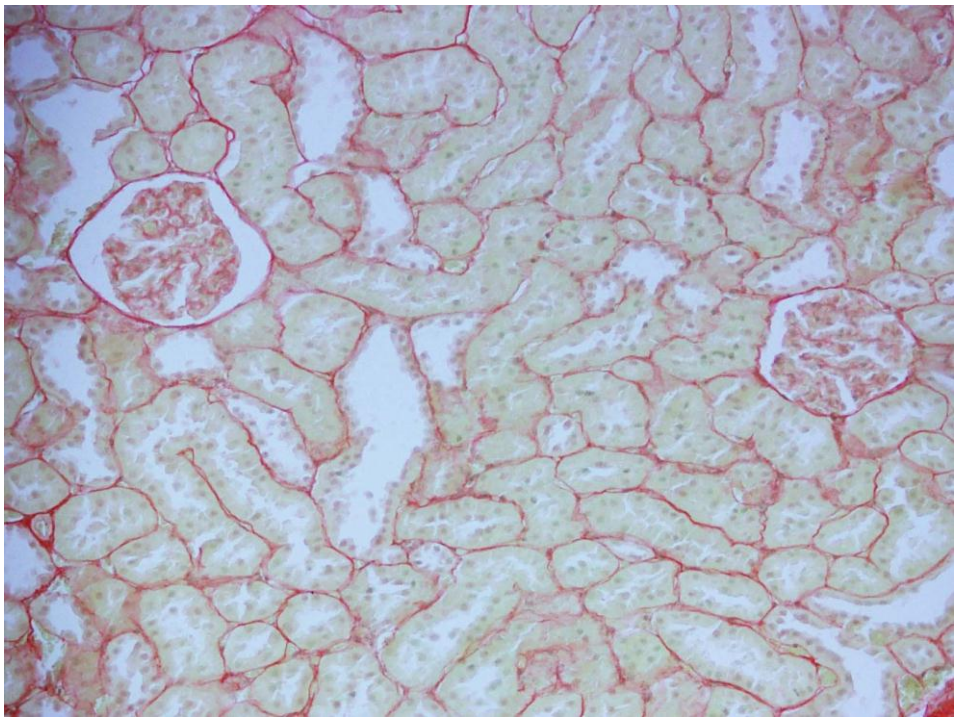
Şekil 15. **Quercetin tedavili gruba ait, normale yakın görünüme sahip böbrek dokusu izlenmektedir. H+E, X40.**



Şekil 16. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde, kısmen normal yapıya sahip Malpighi cisimcikleri (MC) ile glukojenik vakuoler dejenerasyon (→) ve dilatasyon (*) gösteren tübüllerin oldukça azaldığı dikkati çekmektedir. H+E, X100.**



Şekil 17. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde fırçamsı kenar yapısı kısmen korunmuş tübüller arasında şeffaf görünümlü tübüllerin (→) varlığı ile birlikte sklerotik değişiklerin büyük ölçüde azaldığı bir Malpighi cisimciği (MC) gözlenmektedir. PAS, X400.**



Şekil 18. **Quercetin tedavili gruba ait böbreğin histolojik kesitinde; normal görünümde interstisyel doku ile çevrili Malpighi cisimcikleri ile renal tübüller izlenmektedir. Sirius Red, X200.**

TUNEL BULGULARI VE AKTİF KASPAZ-3 İMMÜNOREAKTİVİTESİ

Çalışmada renal hücre apoptozisi, TUNEL analizi ve aktif kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile gösterildi ve sonuçlar Tablo 2'de sunuldu.

Tablo 2. Deney gruplarına ait TUNEL analizi, aktif kaspaz-3 ve PCNA immünoreaktivite değerlendirme sonuçları (ortalama ± standart sapma)

	Kontrol (n=8)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Diyabet+Quercetin Grubu (n=8)**	***p***
TUNEL Pozitif Tübüler Hücre Sayısı	0.33 ± 0.14	51.67 ± 9.7*	10.25 ± 4.17*†	<0.001
TUNEL Pozitif Glomerüler Hücre Sayısı	0.43 ± 0.1	2.23 ± 0.51*	0.63 ± 0.05*†	<0.001
Aktif Kaspaz-3 (H-SCORE)	21.3 ± 5.3	230 ± 25.3*	145 ± 30.82*†	<0.001
PCNA Pozitif Tübüler Hücre Sayısı	123.60 ± 18.88	47.20 ± 5.63*	89.80 ± 13.60*†	<0.001
PCNA Pozitif Glomerüler Hücre Sayısı	1.48 ± 0.39	3.22 ± 0.93*	2.00 ± 0.52	<0.01

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, †: Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.**

Kontrol grubu böbrek kesitlerinde, hem glomerüllerde hem de tübüllerde, oldukça az sayıda nukleusu koyu kahverengi boyanmış TUNEL pozitif hücre gözlendi (Şekil 19,20). Diyabet grubuna ait böbrek kesitlerinde, özellikle hasarlı ve dilate tübüllerde ve bazı glomerüllerde lokalizasyonu ve büyüklüğü nedeniyle, çoğunun podosit olduğu düşünülen çok sayıda TUNEL pozitif hücrenin varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 21,22). STZ ile diyabet indüksiyonunun renal hücre apoptozisini tetikleyerek, TUNEL pozitif tübüler ve glomerüler hücre sayılarını, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edildi ($p<0,05$). Quercetin uygulanan deneklerin TUNEL pozitif renal hücre sayısının, diyabet grubuna kıyasla anlamlı oranda azaldığı saptandı ($p<0,05$) (Şekil 23,24).

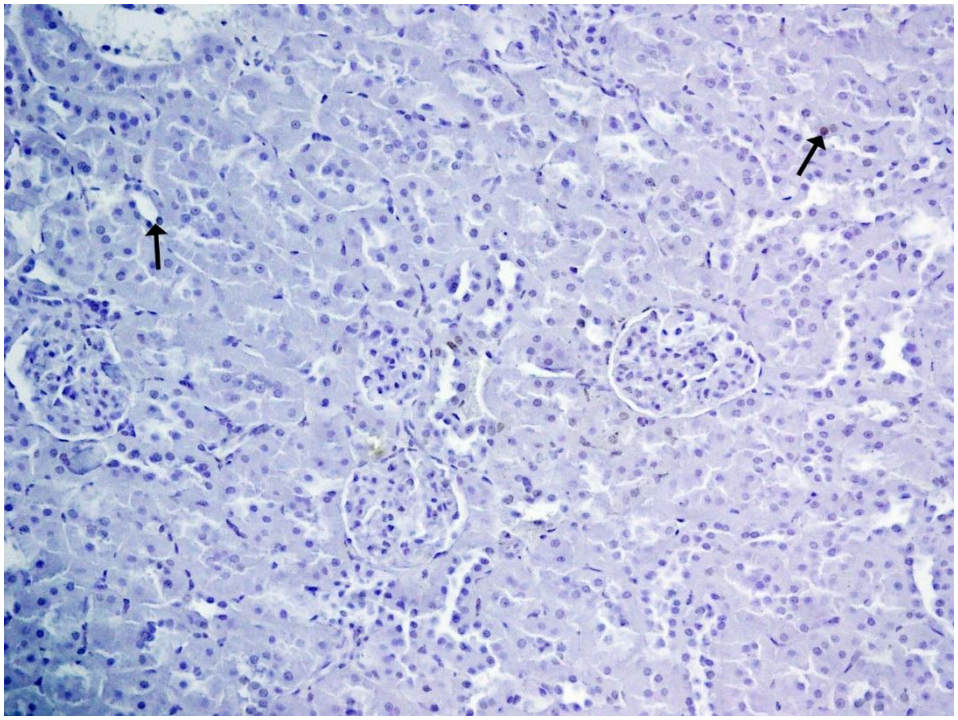
Deney gruplarına ait böbrek kesitlerinde, aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi çoğunlukla tübül epitel hücre nukleuslarında gözlenmiş olup, boyanmanın şiddeti H-SCORE yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2). Kontrol grubu böbrek kesitlerinde az sayıda tübül hücresinde, oldukça hafif şiddette aktif kaspaz-3

immünoreaktivitesi gözlendi (Şekil 25). Buna karşın diyabet grubu deneklerin renal tübüler epitel hücrelerinde oldukça yoğun immünoreaktivite izlenirken, glomerüllerin çoğunda negatif boyanma tespit edildi (Şekil 26). İki grup için aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesinin şiddeti kıyaslandığında, diyabet grubu H-SCORE değerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$). Quercetin grubu deneklerin aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesinin, diyabet grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı ($p<0,01$), ancak yine de kontrol değerinden önemli ölçüde yüksek olduğu saptandı (Tablo 2, Şekil 27).

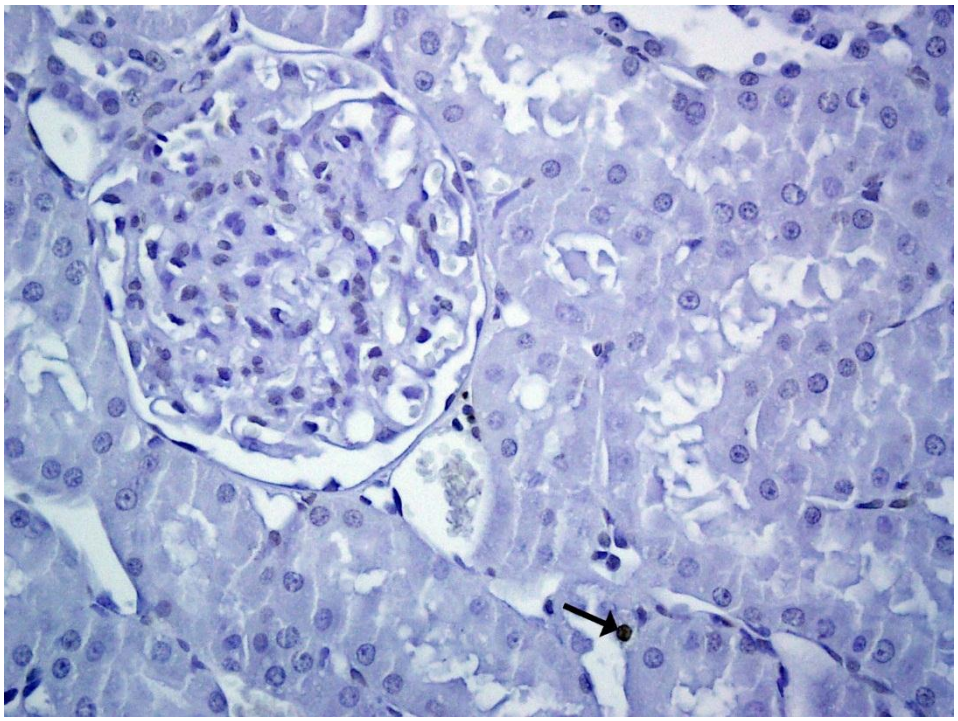
PCNA İMMÜNOREAKTİVİTESİ

Çalışmada renal hücre proliferasyonu; proliferatif aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan nükleer bir işaretleyici olan PCNA immünoreaktivitesi ile gösterildi ve nukleusu güçlü (3+) boyanma sergileyen hücreler pozitif olarak değerlendirilerek, sonuçlar Tablo 2'de sunuldu.

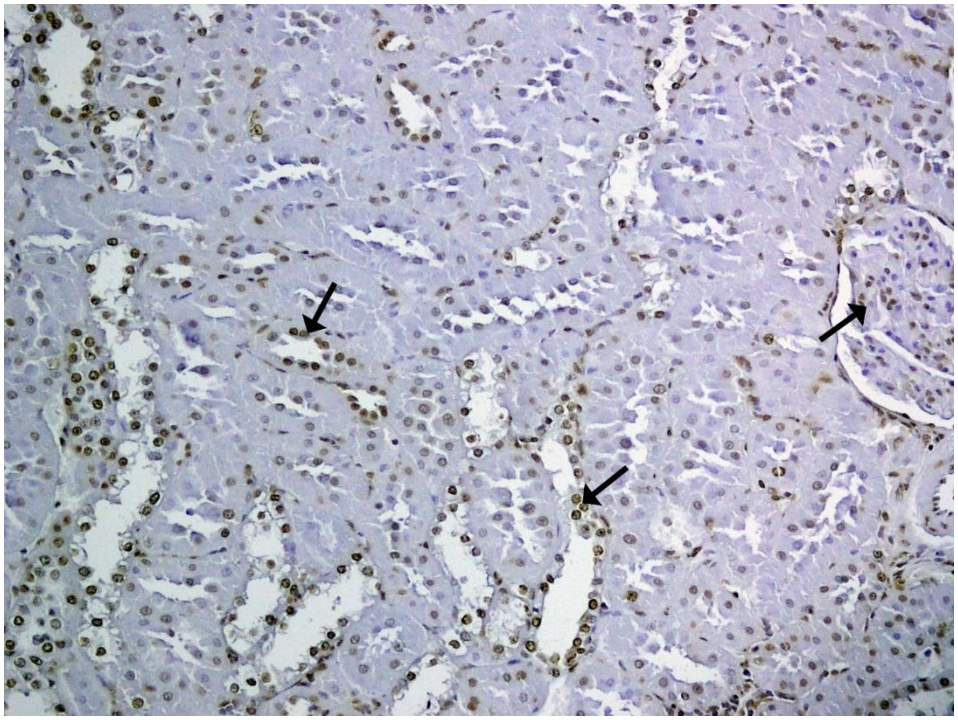
Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde, PCNA immünoreaktivitesi özellikle tübüler hücrelerde gözlenirken, glomerülerde oldukça az sayıda hücrede tespit edildi (Şekil 28,29). Diyabet grubunda ise, renal tübüler epitel hücrelerde PCNA immünoreaktivitesinin azaldığı, buna karşın glomerüllerde daha fazla sayıda hücrenin boyandığı gözlendi (Şekil 30). Bu hücrelerin çoğunun, lokalizasyonları nedeniyle mezengiyal hücreler olduğu düşünüldü (Şekil 31). İki grubun PCNA pozitif hücre sayıları kıyaslandığında, diyabet grubunda glomerüllerde anlamlı düzeyde ($p<0,05$) artış saptanırken, tübüllerde azalma ($p<0,001$) tespit edildi. Quercetin tedavisinin, diyabete bağlı olarak tübül ve glomerüllerde ortaya çıkan proliferatif değişiklikleri kısmen önlemesi nedeniyle (Şekil 32,33), bu grubun PCNA pozitif tübül hücre sayısında anlamlı ($p<0,01$) bir artış ortaya çıkarken, glomerüllerdeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,11$).



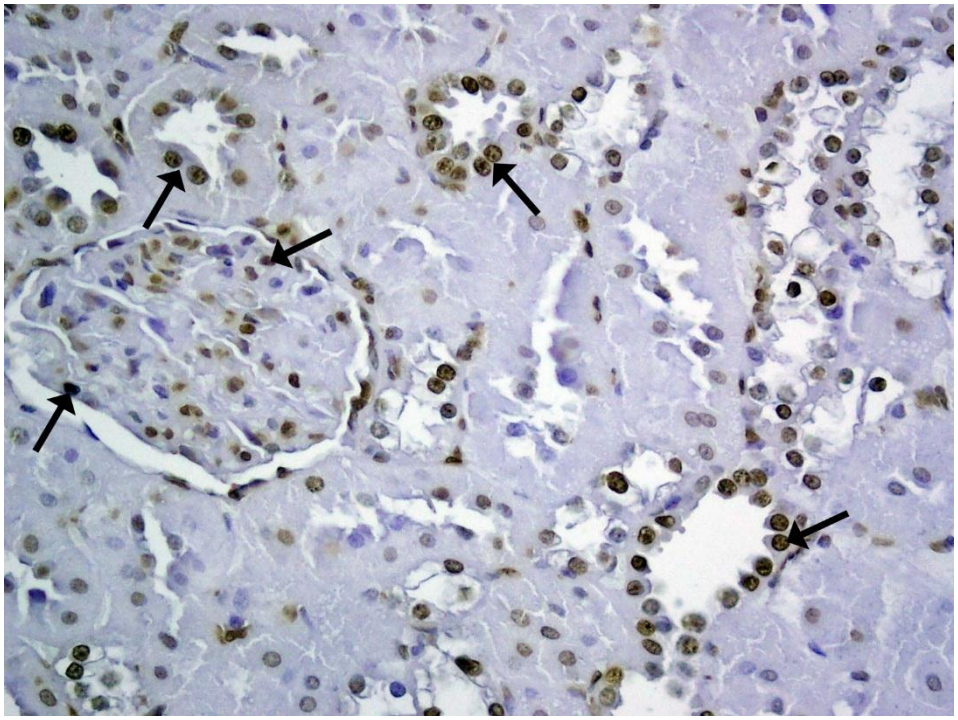
Şekil 19. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, oldukça az sayıda TUNEL pozitif hücre (→) görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



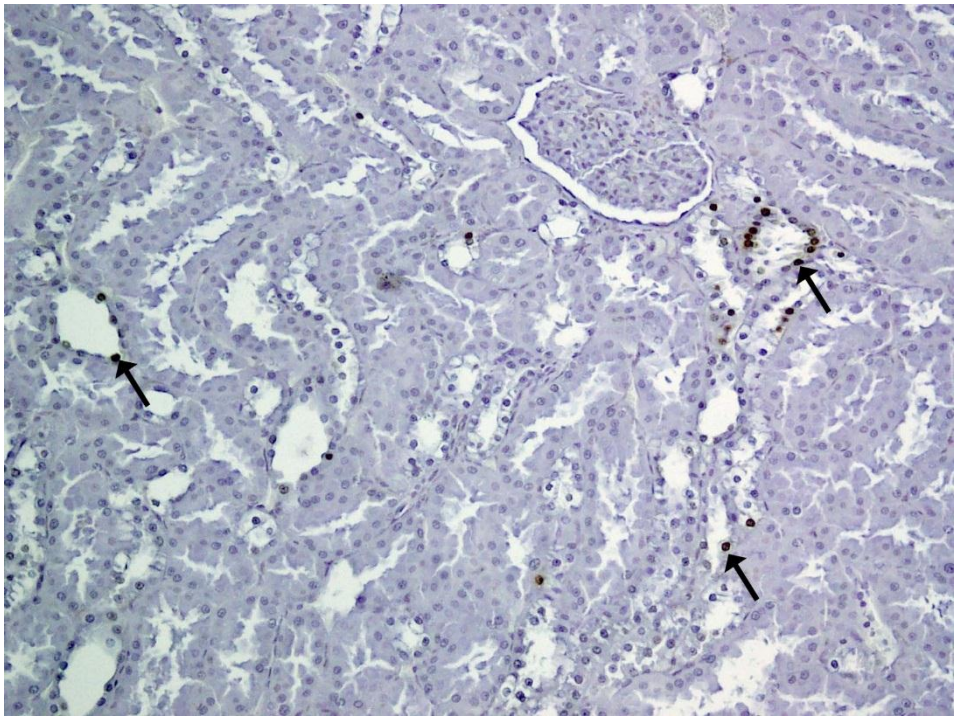
Şekil 20. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, TUNEL pozitif tübül epitel hücresi (→) izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



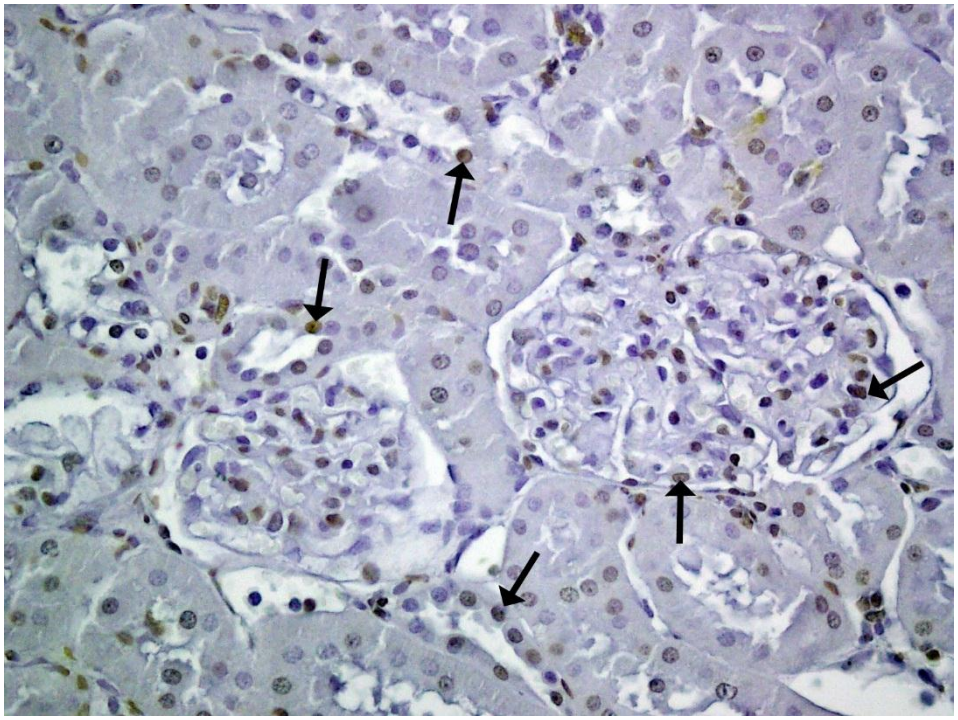
Şekil 21. **Diyabet grubuna ait böbrek kesitinde, glomerül ve tübüllerde çok sayıda TUNEL pozitif hücre (→) dikkati çekmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



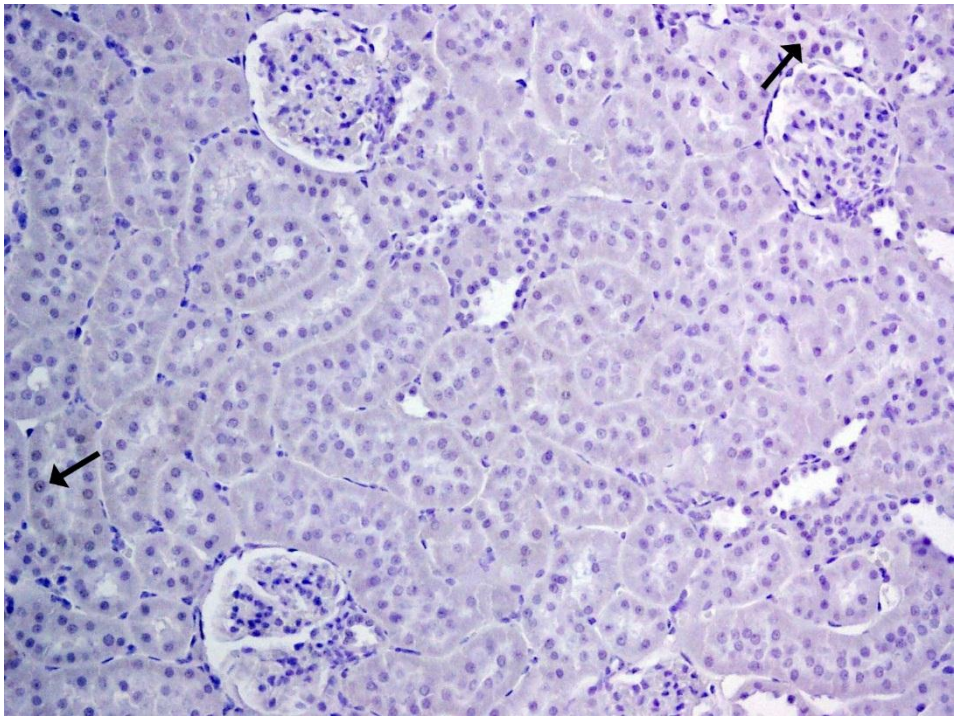
Şekil 22. **Diyabet grubuna ait böbrek kesitinde, dejeneratif tübül epitel hücrelerinde ve glomerüllerde genellikle podositlerde TUNEL pozitivite (→) gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



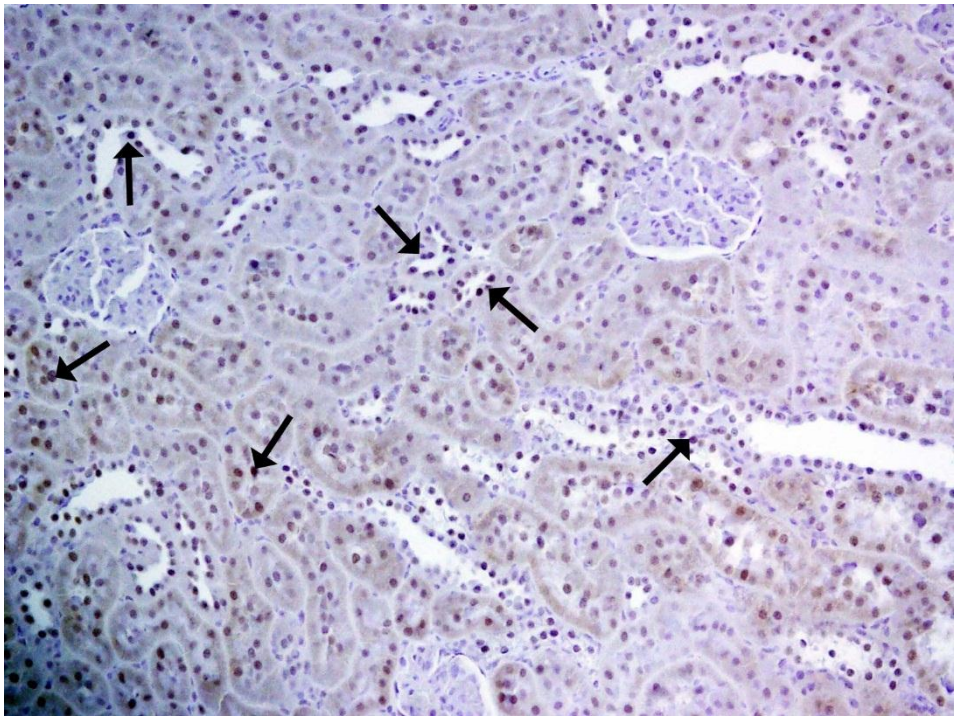
Şekil 23. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde, TUNEL pozitif hücreler (→) izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



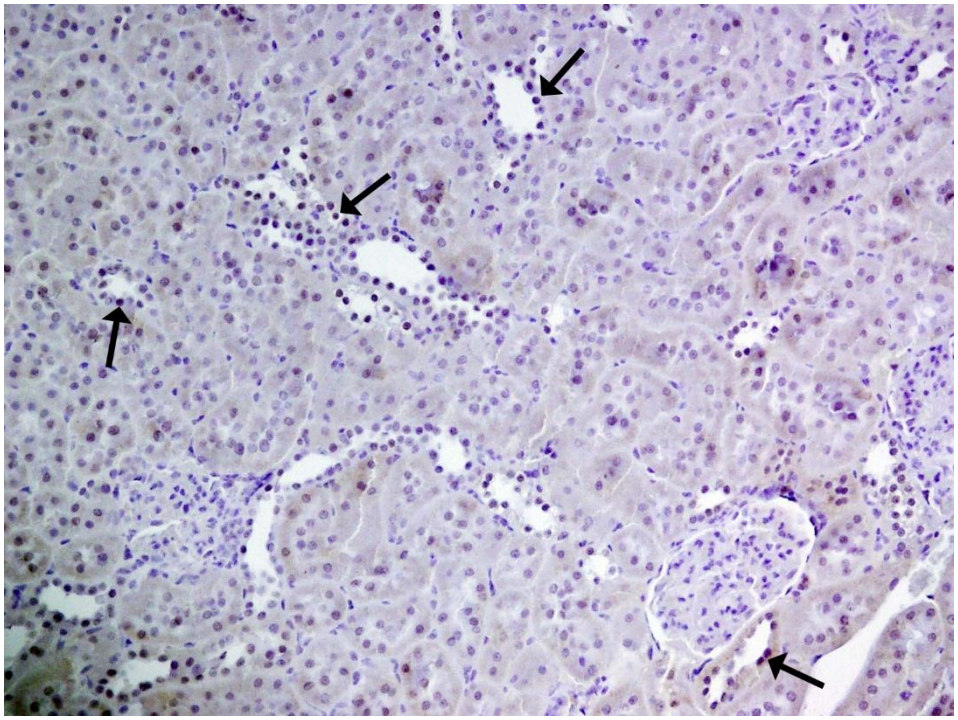
Şekil 24. **Quercetin tedavili grubun böbrek kesitinde, glomerül ve tübüllerdeki TUNEL pozitif hücreler (→) gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



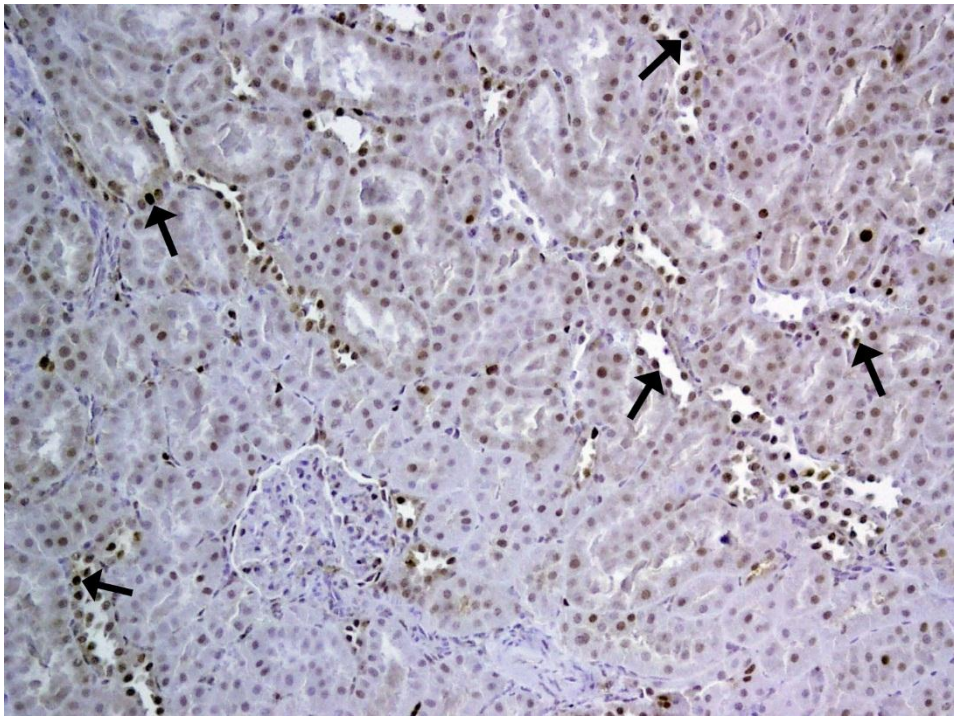
Şekil 25. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, bazı tübüllerde (→) zayıf şiddette aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



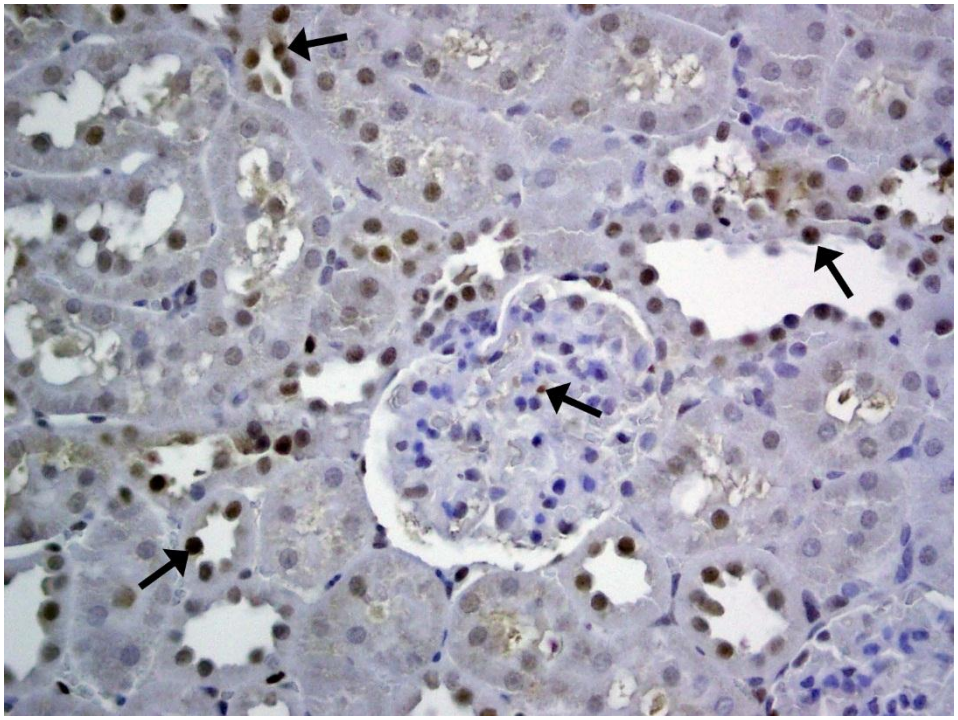
Şekil 26. **Diyabet grubu deneklerin böbrek kesitinde, özellikle tübüllerde (→) yoğun aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi dikkati çekmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



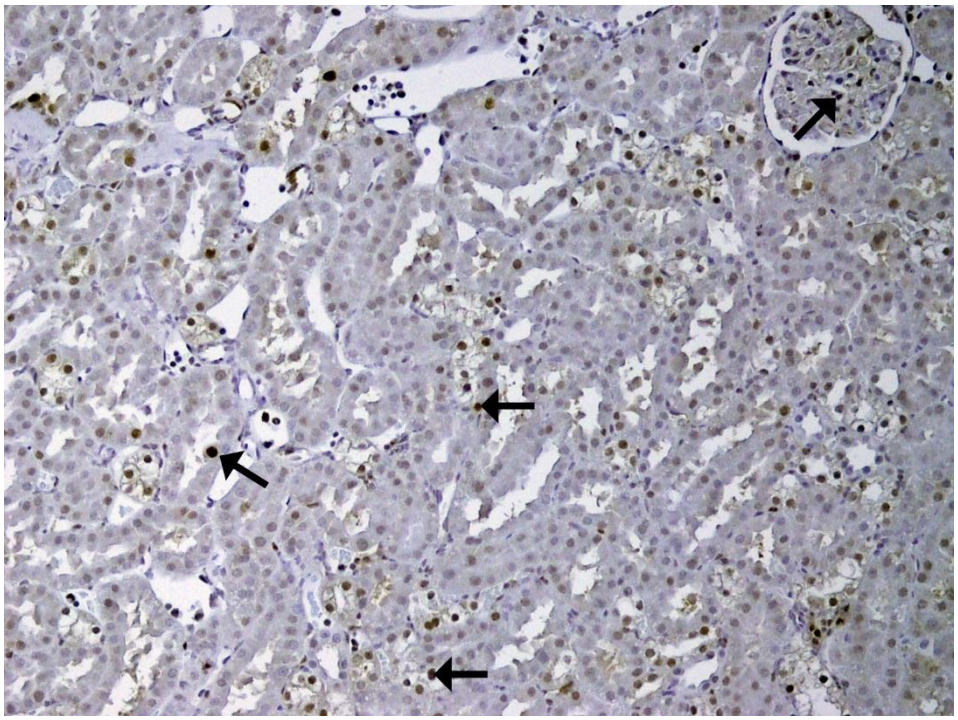
Şekil 27. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi gösteren tübül hücreleri (→) görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



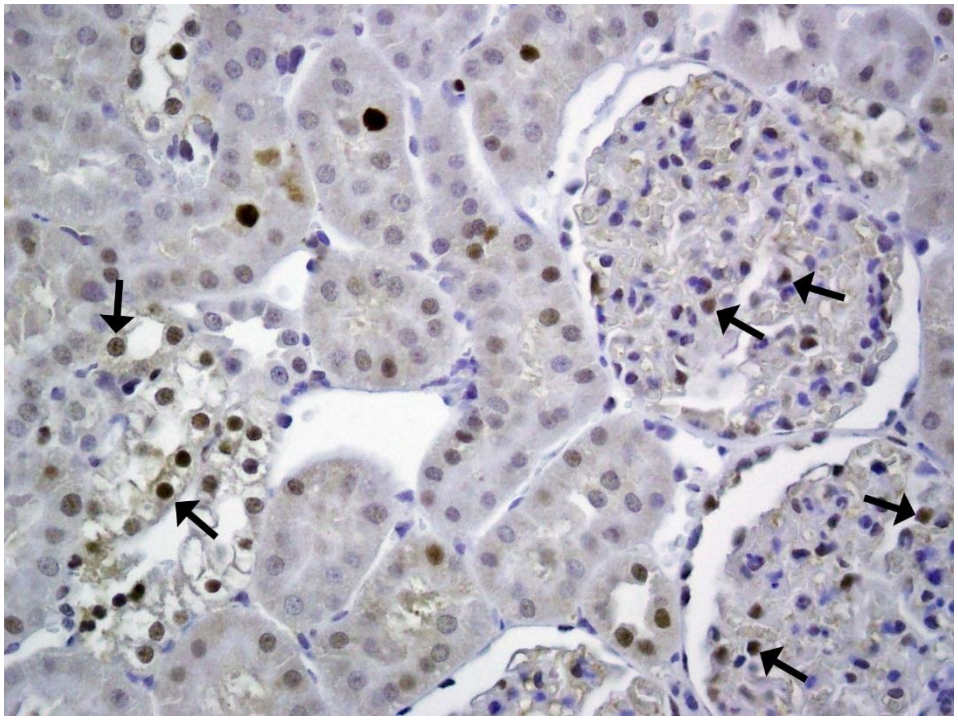
Şekil 28. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, tübüller ve glomerüllerde PCNA immünoreaktivitesi gösteren hücreler (→) izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



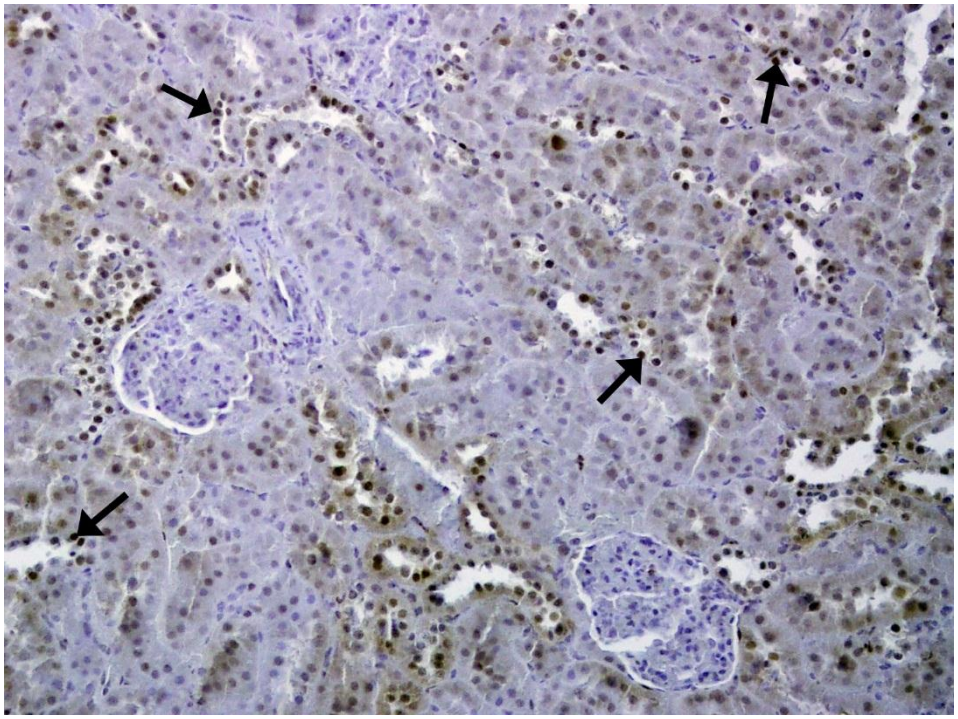
Şekil 29. **Kontrol grubuna ait böbrek kesitinde, PCNA immünoreaktivitesi gösteren çok sayıda tübüler hücre ile bir kaç glomerüler hücre gözlenmektedir. (→): PCNA pozitif hücre. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



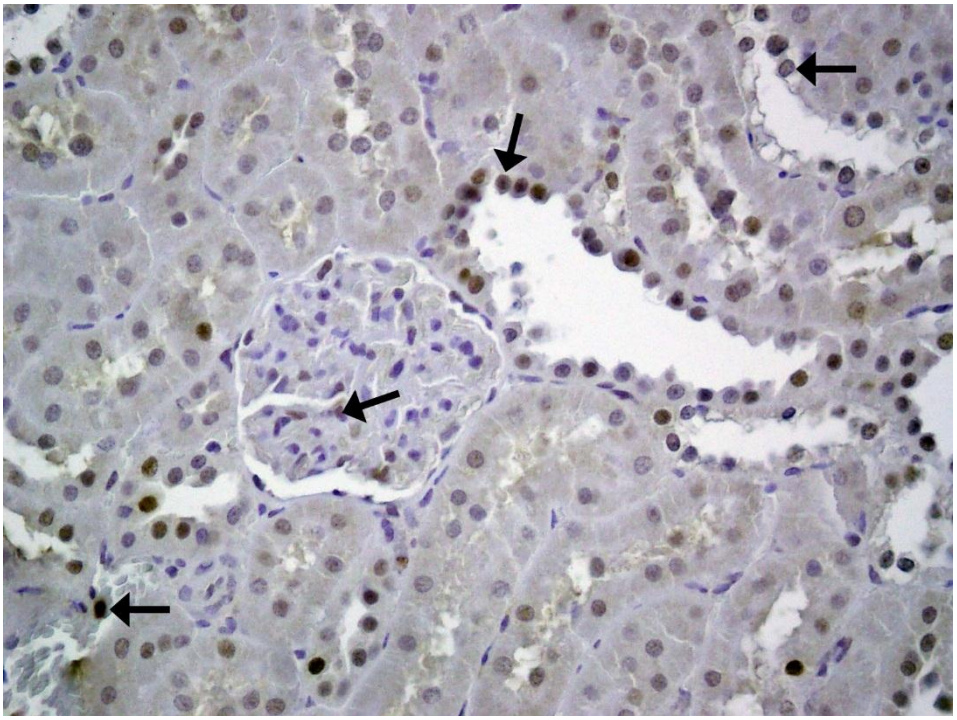
Şekil 30. **Diyabet grubuna ait böbrek kesitinde, tübüller ve glomerüllerde PCNA immünoreaktivitesi gösteren hücreler (→) izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



Şekil 31. **Diyabet grubuna ait böbrek kesitinde, PCNA pozitif tübüler hücre sayısında azalma ile birlikte glomerüler hücrelerin PCNA immünoreaktivitesindeki artış dikkati çekmektedir. (→): PCNA pozitif hücre. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



Şekil 32. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde, tübüller ve glomerüllerde PCNA immünoreaktivitesi gösteren hücreler (→) izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



Şekil 33. **Quercetin tedavili gruba ait böbrek kesitinde, diyabet grubuna oranla tübüler PCNA immünoreaktivitesinin arttığı, buna karşın glomerüler immünoreaktivitenin azaldığı görülmektedir. (→): PCNA pozitif hücre. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**

RENAL FONKSİYON PARAMETRELERİ

Çalışmamızda, STZ ile diyabet indüksiyonunun, böbrek fonksiyonları üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla, deney sonunda deneklerden alınan kardiyak kan örneklerinden elde edilen serumlarda üre ve kreatinin düzeyleri ölçüldü (Tablo 3). Diyabetin böbreklerde meydana getirdiği hasarlar neticesinde sadece STZ uygulanan diyabet grubunun serum üre değerlerinin kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0,05$). Bu artışın, STZ indüksiyonundan sonra uygulanan quercetin tedavisi ile azaldığı, ancak azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0,07$). Bununla birlikte, kreatinin düzeyleri açısından gruplar kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,19$).

Tablo 3. Deney gruplarına ait böbrek fonksiyon parametreleri (ortalama ± standart sapma)

	Kontrol (n=8)	**Diyabet Grubu (n=8)**	**Diyabet+Quercetin Grubu (n=8)**	**p**
Serum Üre (mg/dl)	40.83 ± 3.71	71.67 ± 14.87*	61.67 ± 16.17	0.003
Serum Kreatinin (mg/dl)	0.35 ± 0.05	0.27 ± 0.1	0.28 ± 0.08	0.198

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.**

TARTIŞMA

Dünya çapında yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip, DN'nin patogenezinde; genetik, metabolik ve hemodinamik faktörlerin yanısıra hiperglisemi, insülin direnci, inflamasyon, oksidatif stres, apoptozis ve RAS aktivasyonu rol oynamaktadır (4,5). STZ ile oluşturulan diyabetik nefropatiye karşı quercetinin koruyucu etkisini değerlendirdiğimiz bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular; quercetin tedavisinin, STZ aracılı diyabetik nefropatiye eşlik eden renal hücre apoptozisi (TUNEL analizi ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi) ve proliferasyonunu (PCNA immünoreaktivitesi) düzenlemek suretiyle, böbrek hasarı gelişimini (histopatolojik skor ve glomerüloskleroz indeksi) ve renal disfonksiyonu (serum üre) azalttığını göstermektedir.

Diyabetin tanı ve tedavisindeki yaklaşımların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, farklı deneysel diyabet modelleri kullanılmaktadır (28,29). Tip 1 deneysel diyabet modeli, pankreatik β hücrelerine toksik etkisi olan ajanların (alloksan ve STZ) kullanılması ile oluşturulmaktadır (28). Bu çalışmada; deneysel diyabet modeli oluşturabilmek için *Streptomyces achromogenes*'den izole edilen bir antibiyotik olan STZ tek doz 50 mg/kg olarak kullanıldı (57). Diyabet grubu deneklerinde, STZ enjeksiyonunu takiben 48. saatten itibaren deneyin sonuna kadar hiperglisemi tablosu izlenmesine karşın, quercetin tedavisi, yüksek kan-glukoz değerlerinde anlamlı ölçüde azalma meydana getirdi. Bu bulgu, farklı ajanlarla deneysel diyabet oluşturulmuş çalışmalarda, quercetinin kan glukoz düzeyleri üzerinde gösterdiği koruyucu etkisi ile desteklenmektedir (20,62,63). Vessal ve ark. (63) diyabetik sıçanlara verilen quercetinin, STZ ile hasarlanan Langerhan's adacıklarına ait β hücrelerinin rejenerasyonunu sağlamak suretiyle, insülin salımını arttırdığını bildirmiştir.

Diyabetik bireylerde vücut ağırlığında ortaya çıkan azalmanın, glukozun yeterince hücre içerisine alınamaması sonucunda, besin olarak doku proteinlerinin aşırı derecede kullanılması nedeniyle meydana geldiği belirtilmiştir (64). Birçok çalışmada, diyabetin etkisiyle deneklerin vücut ağırlıklarında azalmanın olduğu ortaya konmuştur (65,66). Bizim çalışmamızda da; deney sonunda ölçülen vücut ağırlıklarının, diyabet grubunda kontrole oranla anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, diyabetin böbrek ağırlığı üzerindeki etkisi konusunda literatür bilgisi tartışmalıdır. DN'nin erken dönemlerinde, glomerüler çap artışı ile kendini gösteren renal doku hipertrofisi ile birlikte böbrek ağırlıklarının arttığını bildiren çalışmaların (67,68) yanı sıra, diyabetin böbrek ağırlıklarını değiştirmediği (69) ve hatta azalttığı (70) rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada, kontrol grubuna göre diyabet grubunun glomerül çaplarında tespit ettiğimiz artışın, böbrek ağırlıklarında anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edildi. Böbrek ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasına karşın, diyabete bağlı olarak ortaya çıkan vücut ağırlığındaki azalma nedeniyle, diyabet grubunun böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranının, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlendi. Uyguladığımız quercetin tedavisi, diyabete bağlı kilo kaybını önledi, böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranını ve glomerül çaplarını anlamlı düzeyde azalttı. Antioksidan ve antiinflamatuar özellikli quercetinin, diyabetin vücut ve böbrek ağırlıkları ile glomerül boyutlarında meydana getirdiği olumsuz değişikliklere karşı koruyucu etkisi, diğer DN çalışmalarında da ortaya konmuştur (62,63).

Diabetes mellitus, kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra artmış bir oksidatif stres durumudur (6,7). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalara göre hipergliseminin direkt veya indirekt olarak serbest radikal oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (71-73). Diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, enzimatik olmayan glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının, serbest radikal oluşumunu arttırdığı ve antioksidan enzimlerin etkinliğini azalttığı bilinmektedir (73). Hiperglisemininin indüklediği serbest radikal oluşumunun, diyabet komplikasyonlarının gelişiminde önemli bir etken olduğu (71,73), diyabetik böbrekte artmış oksidatif stresin apoptozu teşvik ettiği (74), hem podosit hem de renal tübül hücre apoptozisinin DN'nin başlangıcında kritik olan glomerüler hasar ile hastalığın ilerlemesine katkı sağlayan tübüler atrofi gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (8-10). Bununla birlikte DN'nin erken veya geç evlerinde, böbrekte proliferatif değişikliklerin meydana geldiği; yüksek kan glukoz düzeylerinin, tübüler epitelial hücreler, mezengiyal hücreler, vasküler endotelial hücreler gibi çeşitli hücrelerde, ECM

üretimini artırmak suretiyle fibrotik süreçleri başlattığı bilinmektedir (13,75,76). DN, erken aşamasında glomerüllerin etkilendiği kronik ve kompleks bir süreç olup, glomerüloskleroz gelişimi ile birlikte renal fonksiyonda kademeli azalmaya neden olan tübüler atrofi ve interstisyel fibrozisle karakterizedir (4,10).

Yapılan çalışmalarda glomerüllerde tespit edilen histopatolojik değişiklikler; glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler hipertrofi, mezengiyal matriks birikimi, GBM kalınlaşması ve glomerülоskleroz olarak bildirilmektedir (4). Erken dönemde gözlenen glomerüler genişleme; bazal membran kalınlaşması şeklinde iken daha sonra mezengiyal genişleme olarak ortaya çıkmaktadır (37). Çalışmamızda, diyabet grubuna ait böbreklerde, GBM kalınlaşması, mezengial matriks artışı, kollabe lümenli glomerüler kapilerler ile birlikte glomerüler genişlemenin aracılık ettiği Bowman mesafesinde daralma tespit edildi. Diyabetik böbreklerdeki en belirgin histolojik değişiklik, kollajen tip IV, fibronektin ve laminin gibi ECM proteinlerinin aşırı üretimi ve birikimi sonucu mesangiyumdaki genişlemedir (43,44). Bununla birlikte, mezengiyal hücre proliferasyonunun kontrolündeki dengesizliğin, glomerülosklerozun başlaması ve ilerlemesinde erken ve önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Glomerülоskleroz, mezengiyal hücre proliferasyonu ile birlikte mezengiyal matrikste artış ile karakterizedir (42,43). Yüksek kan glukoz düzeylerinin; tübüler epitelial hücreler, mezengiyal hücreler, vasküler endotelial hücreler gibi çeşitli hücrelerde, TGF-β Smad sinyal yolağının aktivasyonu ile ECM üretimini indüklediği gösterilmiştir (13). Fibrotik özelliklere sahip önemli bir sitokin olan TGF-β'nın, fibrotik süreçlerde bu hücrelerde matriks protein sentezini uyardığı ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve apoptozisi gibi hücresel yanıtları düzenlediği bilinmektedir. (75,76). Bunlarla birlikte RAS'nin bir parçası olan anjiyotensin II (A II)'nin; damar ve mezengiyum hücreleri için mitojen etki gösteren büyüme faktörlerinin sentez ve salınımını uyarmasıyla; mezengiyal hücre proliferasyonuna, mezengiyal matriks artışına ve ekspansiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (77). ECM birikimi ve GBM kalınlaşması, DN patogenezinde önemli mekanizmalar olarak karşımıza çıkmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar, hipergliseminin neden olduğu podosit apoptozunun da, DN gelişiminde önemli rol oynadığını ve albüminüriyi önlemeye yönelik kritik hücreler olduğunu göstermektedir (8,78-80). Podositler oksidatif strese duyarlı olmaları nedeniyle, DN de ilk hasar gören ve apoptozise uğrayan hücrelerdir (79,80). Glomerül başına düşen podosit sayısındaki azalma, DN'nin ilerlemesinin temel nedenlerindendir (8). DN'de meydana gelen oksidatif stres sonucunda ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu hızlanır ve podositlerde meydana gelen apoptozun, AGE birikimiyle meydana geldiği düşünülmektedir (81,82). AGE'ler ve bunların özel

reseptörlerinin (RAGE), DN'nin patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. RAGE genellikle podositlerde lokalizedir ve diyabette arttığı ortaya konulmuştur. RAGE aktivasyonu, erken DN'de hiperglisemiye bağlı podosit apoptozisine aracılık eden ROS'un üretimini arttırmakta ve diyabet gibi hastalıklarda sürekli bir ROS/AGE oluşum döngüsüne neden olmaktadır. In vitro olarak yapılan bir çalışmada AGE ve reseptörlerinin podosit apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (9).

Diyabet oluşumundan 15 gün sonra yaptığımız incelemelerde, deneklerin böbrek dokusunda; TUNEL analizi ile glomerüllerde özellikle podositlerin apoptozis aracılı ölümü gözlenirken, PCNA immünoreaktivitesi ile mezengiyal hücre proliferasyonunun arttığı ve pek çok glomerülde mezengiyal matriks artışı ile birlikte sklerotik değişikliklerin ortaya çıktığı tespit edildi. Bu değişiklikler diyabet grubunun, glomerül boyutlarında ve glomerülosklerotik indeksinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış meydana getirdi. Elde ettiğimiz histopatolojik bulgular diğer çalışmaların sonuçları ile de uyumlu idi (83,84). Giribabu ve ark. (85) STZ-nikotinamid aracılı deneysel diyabet çalışmalarında, glomerüllerde podosit sayısının azaldığını, buna karşın mesangial hücre sayısının arttığını gözlemlemişlerdir. Yapılan daha önceki çalışmalarda; diyabetin erken dönemlerinde mezengiyal matriks birikimi ile meydana gelen glomerüler genişleme, diyabetin süresine ve şiddetine göre değerlendirilmiştir (86,87). Bu çalışmalar, DN'nin henüz erken dönemlerinde glomerülosklerotik değişiklerin ortaya çıktığını ve zamanla arttığını bildirmektedir (88,89). Kısa süreli diyabetin glomerüllerde hücresel proliferasyonu indüklediğini vurgulayan Geoffroy ve ark. (83) tarafından, 65 mg/kg tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulduktan 4 gün sonra, glomerüllerde özellikle mezengiyal hücrelerin PCNA immünoreaktivitesinin anlamlı derecede artığı bildirilmiştir. Benzer olarak, Young ve ark. (90) da, glomerüler hipersellülaritenin erken dönem işareti olarak, diyabetin ilk haftası içerisinde özellikle mezengiyal hücre proliferasyonunun arttığını göstermiştir.

Diyabetik nefropatide tübüllerde gözlenen değişikliklerin patogenezinde, hiperglisemi ve hücrede biriken AGE'nin önemli rol oynadığı belirtilmiştir (81). Bleyer ve ark. (91) tübüler hücrelerin doğrudan hiperglisemi ile hasar görebileceğini göstermişlerdir. Proksimal tübül hücrelerine glukoz girişi insülinden bağımsızdır ve bu da proksimal tübül hücrelerini hiperglisemiye duyarlı yapmaktadır. Buna ek olarak, glomerüler filtratdaki fazla glukoz, proksimal tübüllerde tekrar emilime uğrar ve hipergliseminin proksimal tüp içindeki etkilerini daha da arttırır (92). Yüksek glukoza maruz kaldıklarında tübüler hücreler, TGF-β salınımını

artırmak suretiyle, ECM bileşenlerinden olan kollajenin sentezini uyarıp bazal membranın kalınlaşmasına yol açmaktadır (93). Hiperglisemi aracılı artmış ROS'un neden olduğu oksidatif stres, AGE'lerin oluşmasını da tetiklemektedir (81). Diyabetik böbrekte AGE'lerin, renal korteksin proksimal tübüllerinde lokalize olduğu bildirilmiştir (94). Gugliucci ve Bendayan (95) tarafından, sıçanlara enjekte edilen AGE içeren proteinlerin, proksimal tübül epitel hücrelerince; spesifik veya nonspesifik olarak alındığı ifade edilmiştir. Bu konudaki veriler; AGE'lerin, DN'de tübüler disfonksiyon gelişiminde merkezi bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Glomerüllerde gözlenenlere ilave olarak diyabete bağlı gelişen patolojik değişiklikler; tübüllerde bazal membran kalınlaşması, epitel hücrelerinde vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, glikojen birikimi, tübüler dilatasyon ve tübüler atrofi ile birlikte interstisyel fibrozis olarak bildirilmiştir (10,67). DN'de ortaya çıkan böbrek tübüllerinde meydana gelen patolojik değişimlerin temelini oluşturan apoptotik hücre sayısındaki artışın, bununla ilişkili tübüler atrofi gelişiminin ve interstisyal fibrozisin böbrek fonksiyon kaybına neden olduğu saptanmıştır (10,86,96). Hipergliseminin indüklediği serbest radikal oluşumuna bağlı olarak diyabetik böbrekte artmış oksidatif stresin, apoptozu teşvik ettiği ve apoptozun DN gelişimine aracılık ettiği bilinmektedir (12,74). Yüksek glukozun; proksimal tübül epitel hücrelerinde DNA fragmantasyonuna, antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-x ifadelerinde azalmaya, buna karşın proapoptotik Bax ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (11). Bu durumun, efektör kaspaz olarak bilinen kaspaz-3 aktivasyonu aracılığıyla, proksimal tübül epitel hücrelerinin apoptozunu tetiklediği bildirilmiştir (12). Çalışmamızda, tek doz 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulduktan 15 gün sonra, böbreklerde; tübüler dilatasyon ile birlikte özellikle korteks ve kortikomedüller alanda, glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüllerin varlığı ile birlikte bazı tübüllerde; bazal membran kalınlaşması ve epitel hücrelerin lümene dökülmesi nedeniyle fırçamsı kenar yapısında bozulma gözlendi. Tüm bu belirtiler göze alınarak yapılan histopatolojik skorlamanın sonucu da, diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmıştı. Ayrıca STZ enjeksiyonu, deneklerin böbreklerinde tübüler hücre apoptozisini gösteren TUNEL pozitif hücre sayısında ve tübüler hücre aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesinde anlamlı bir artışa neden olurken, tübül hücre proliferasyonunda ki inhibisyon, azalmış PCNA immünoeaktivitesi ile sonuçlandı. Tübüllerde gözlenen bu değişikliklere karşın, diyabetin erken döneminde yaptığımız değerlendirmelerde; interstisyel alanda, fibrozisi işaret eden dikkate değer bir bağ doku artışı tespit edilmedi. Diyabetik bireylerde; eşiği aşan glukoz seviyelerinde, renal tübüler hücrelerin, fazla miktarda glikozu

resorbe ederek, glukojen olarak depoladığı belirtilmiştir. Normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolunun, kanda glikoz yoğunluğunun artmasıyla aktif hale geldiği ve sorbitolun oluşmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorbitolun plazma membranında diffüze olamaması; hücre içinde birikerek, membran bütünlüğünün bozulmasına ve osmotik etkiyle hücrenin su alarak şişmesine neden olduğu, bu durumum ise diyabetik böbreklerin tübüllerinde, vakuolizasyona ve hidropik dejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir (97). Tunçdemir ve ark (41); tübüllerde biriken glukojenin, hücrelerde apoptoz oluşumuna ve DN'nin önemli bir özelliği olan tübüler atrofi gelişimine katkı sağladığını göstermiştir. Bu çalışmada, DN'nin gelişiminin erken döneminde elde ettiğimiz bulgulara paralel olarak, çeşitli patolojik durumlarda böbreklerde gözlenen tübüler hücre apoptozunun, tübüler fibrozdan daha önce ortaya çıkan bir bulgu olduğu da bilinmektedir (98,99). Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, deneysel diyabet oluşturulmuş diğer çalışmalarda da, sıçan böbrek dokularında TUNEL metodu ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi ile proksimal ve distal tübül epitel hücre apoptozisinde artış gözlenmiştir (100). Bununla birlikte, diyabet gelişimi esnasında, glomerüler ve tübüler hücre çoğalması da rapor edilmiştir (90). Ancak, yapmış olduğumuz taramalar, DN gelişiminde hücresel proliferasyona dair literatür bilgisinin, deney süresine bağlı olarak farklı olduğunu göstermektedir. Wassef ve ark. (101) yaptığı çalışmada, diyabet indüksiyonundan 2 gün sonra sakrifiye edilen şıçanların, renal tübüler hücrelerinde PCNA immünoreaktivitesinin kontrole kıyasla arttığını ve bu artışın zamanla azalarak devam ettiğini göstermişlerdir. Giribabu ve ark. (85) ise, diyabet indüksiyonundan 28 gün sonra sıçan böbrek dokusunda PCNA mRNA düzeyinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, diyabet gelişiminin ardından 15. günde, TUNEL pozitif tübül hücre sayısında artış ile birlikte PCNA immünoreaktivitesinde meydana gelen azalmanın, hücre apoptozisi ve proliferasyonu arasındaki hassas dengenin bozulmasına yol açarak, bu dönemde tübüllerde ortaya çıkan histopatolojik değişikliklere zemin hazırladığı düşüncesindeyiz.

Diyabetin patogenezinde oksidatif stresin etkileri bilindiğinden; hastalığın önlenmesi ya da tedavisi için, diyabetik böbrekleri ROS'un etkisinden korumak amacıyla, antioksidanların kullanımı gün geçtikçe daha da önemli hale gelmiştir (6,7,18,50). STZ ile indüklenmiş diyabetik rat modelinde antioksidan kullanımı sonucu, antioksidan sistemi ile serbest radikaller arasında oluşan dengesizliğin engellenebileceği ve böbrekte görülen patolojik değişikliklerin azaltıldığı bildirilmiştir (7,50). Çalışmamızda kullandığımız flavonoid içerikli olan quercetinin; katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon aktivitesini arttırarak, aktivasyon sonucunda ortamda ki ROS bileşenlerini süpürmek suretiyle antioksidan, antiinflamatuar ve

antiapoptotik özellik sergilediği bilinmektedir (53,63,102). Vücudu reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı koruyan en güçlü flavonoidlerden birisi olarak görülmektedir (46). Aynı zamanda quercetin, hiperglisemiyi hedef alan antidiyabetik bir bileşiktir (103). Diyabetin seyri sırasında, hipergliseminin arttırdığı ROS ile birlikte AGE'lerin aşırı oluşumunun, DN patogenezinde önemli bir rol oynadığı ve flavonoid içerikli antioksidan kullanılması sonucu, AGE oluşumunun azaldığı bilinmektedir. (104). Li ve ark. (105) yaptığı çalışmada quercetinin, bir glikoz metaboliti olan metilglioksali yakalama yeteneğine sahip olduğu ve böylece AGE oluşumunu engellediğini belirtmiştir. Bu çalışmada diyabetin etkilerini azaltmak amacıyla kullandığımız quercetin, hiperglisemi aracılı artmış ROS'un yol açtığı apoptotik ve proliferatif değişiklikleri önlemek suretiyle, diyabete bağlı renal histopatolojik değişiklikleri azalttığı görüldü. Bulgularımız, quercetinin oksidatif stresi azaltmak suretiyle böbrekte meydana gelen değişiklikleri önlediğini gösteren diğer diyabet çalışmaları ile uyumluydu (56,63,102). Quercetinin sağlıklı hücrelerde; hidrojen peroksit, glukoz oksidaz ve düşük yoğunluklu lipoprotein gibi çeşitli uyaranlardan kaynaklanan apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (36,106,107). Bu özellikleri nedeniyle, çeşitli ajanların etkisi ile farklı dokularda ortaya çıkan hücre apoptozisine karşı, quercetinin koruyucu etkisi gösterilmiştir (17,19). Ancak quercetinin, diyabete bağlı olarak böbreklerde gözlenen artmış apoptozisi inhibe ettiğini bildiren çalışmalar oldukça sınırlıdır (19,20). Bu nedenle çalışmamızda, quercetin tedavili grupta tespit ettiğimiz, TUNEL analizi ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi ile değerlendirdiğimiz apoptotik değişikliklerin anlamlı derecede azaldığı yönündeki bulgularımızın, bu yönüyle önemli bir veri oluşturduğunu düşünmekteyiz. DN'de gözlenen, endotelyal, mezengial ve interstisyel hücre proliferasyonunun, diyabete bağlı glomerüler ve interstisyel fibrotik değişikliklerin temelini oluşturduğu bilinmektedir (13). Diyabetin erken dönem etkilerini araştırdığımız çalışmamızda; quercetinin, renal tübüler ve mezengiyal hücrelerde ortaya çıkan proliferatif değişiklikleri ve bununla ilişkili glomerülosklerozgelişimini önlediğini tespit ettik. Quercetinin, renal tübüler ve mezengiyal hücrelerde ortaya çıkan proliferatif değişiklikleri önlediğini tespit ettiğimiz, diyabetin erken dönem etkilerini araştırdığımız çalışmamızda; mezengiyal hücre proliferasyonundaki artışın neden olduğu glomerülosklerozun da azaldığı gözlendi. Quercetinin DN gelişiminde ortaya çıkan proliferatif değişiklikler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak çeşitli etmenler aracılığı ile tetiklenen farklı dokulara ait patolojilerin tedavisi amacıyla kullanılan quercetinin, PCNA immünoreaktivitesi ile değerlendirilen proliferatif değişiklikleri önlediği belirtilmiştir (108,109).

Diyabetik nefropatide; böbreklerde ortaya çıkan mezengiyal ve tübüler patolojik değişimler ile bununla ilişkili tübüler atrofi gelişimi ve interstisyal fibrozis, böbrek fonksiyon kaybının başlıca nedenleri olarak görülmektedir (42,65,96,110). Mezengiyal matriksteki genişleme, glomerüler kılcal damar lümenini daraltarak veya tıkayarak, filtrasyon için mevcut alanı düşürmektedir (42). Renal hasarın sonucunda; glomerüler ve sistemik hipertansiyon ile birlikte proteinüri gelişir (111). Üre, protein metabolizmasının atılım ürünüdür ve karaciğerde üretilip böbrekler aracılığıyla atılmaktadır. Normalde böbrekler aracılığı ile atılması gereken üre, renal yetmezlik geliştiğinde plazmada birikir ve üremiye sebep olur (112). Kas dokusunda bulunan kreatinden üretilen kreatininin; bir protein olup, kan dolaşımı ile böbreklere taşınır ve idrar yolu ile dışarı atılır (113). Deneysel çalışmalar; diyabetin böbrek fonksiyonlarında yol açtığı bozukluğun göstergesi olarak, serum üre ve kreatinin düzeylerinde artış meydana geldiğini bildirmektedir (100,114-116). Kumar ve ark. (100), 65 mg/kg STZ kullandıkları diyabet çalışmalarında, 2 hafta sonra deneklerden alınan serum örneklerinde; üre ve kreatinin değerinin kontrol grubuna göre anlamlı dercede arttığını belirtmişlerdir. Buna karşın, Ersöz ve ark. (114), uygulanan 65 mg/kg STZ enjeksiyonundan 30 gün sonra, deneklerin serum kreatinin değerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda; 50 mg/kg STZ uygulamasının ardından 17 gün sonra, diyabet grubunun serum üre değerlerinde, kontrole kıyasla anlamlı derecede artış gözlenirken, kreatinin seviyesinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Uyguladığımız quercetin tedavisi, diyabetin böbreklerde neden olduğu, apoptotik ve proliferatif değişiklikler ile doku hasarı üzerinde meydana getirdiği koruyucu etki doğrultusunda, serum üre düzeyinde de belirgin bir iyileşme sağlamıştır. Bulgularımızla uyumlu olarak, quercetinin diyabete bağlı renal yetmezlik üzerine olan benzer etkileri ortaya konulmuştur (62,115,116).

Sonuç olarak bu çalışmada; STZ ile diyabet indüksiyonunun, şıçanların, kan glukoz düzeylerinde artışa, vücut ağırlığında azalmaya, renal tübüler ve glomerüler hücrelerde apoptotik ve proliferatif değişikliklere ve dolayısı ile histopatolojik değişikliklere neden olmak suretiyle nefropati gelişimini tetiklediği ve renal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan ve antidiabetik etkisi bilinen quercetinin, diyabetin erken döneminde ortaya çıkan apoptotik ve proliferatif değişiklikleri düzenlemek suretiyle diyabetik nefropati gelişimini önlemede faydalı olduğu saptanmıştır.

Diyabet gelişimi ve komplikasyonlarının önlenmesinde, quercetin tedavisinin farklı etki mekanizmalarının araştırılması ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebileceği ve diyabetik hastaların yaşam kalitesinin arttırılabileceği kanaatindeyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, STZ ile oluşturulmuş DN'de, şıcan böbreklerinde meydana gelen histopatolojik hasar (H+E, PAS ve Sirius Red), renal hücre apoptozisi (TUNEL analizi ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi) ve proliferasyonu (PCNA immünoreaktivitesi) ile böbrek fonksiyonu (serum üre ve kreatinin) üzerine, quercetinin koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Deney sürecinde yapılan tüm incelemeler sonucunda;

1. Tek doz 50 mg/kg STZ uygulanan diyabet grubunun, deney sonunda ölçülen kan glukoz düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Diyabet indüksiyonundan 48 saat sonra uygulanan 30 mg/kg quercetinin, deneklerin kan glukoz düzeyini anlamlı derecede azalttığı belirlendi .
2. Deney başlangıcında tüm gruplara ait deneklerin vücut ağırlıklılarının birbirine yakın olduğu, ancak deney sonunda diyabet grubuna ait deneklerin anlamlı düzeyde kilo kaybettiği tespit edildi. Quercetin tedavisinin, deneklerde diyabete bağlı kilo kaybını azalttığı ancak deney sonu vücut ağırlıklarında anlamlı fark oluşturmadığı gözlendi.
3. Diyabetin erken dönem etkilerini incelediğimiz deney süresi sonunda, deneklerin böbrek ağırlıklarının değişmediği gözlendi. Bununla birlikte, diyabete bağlı kilo kaybı nedeniyle, diyabet grubunun böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu, quercetinin kilo kaybı üzerindeki koruyucu etkisi ile bu oranın diyabet grubuna göre azaldığı tespit edildi.
4. Diyabette meydana gelen glomerüler hipertrofi sonucu, diyabetik grubun ortalama glomerüler çapının kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı, quercetinin bu değişikliği anlamlı derecede azalttığı gözlendi.

5. Diyabetin glomerüllerde ortaya çıkardığı sklerotik değişiklikleri tespit etmek için değerlendirdiğimiz glomerüloskleroz indeksinin; diyabet grubunda, kontrol ve diyabet+quercetin gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi.
6. Histopatolojik olarak tübüler hasar, interstisyel fibrozis ve Bowman mesafesi darlığının değerlendirildiği histopatolojik skorlama sonucunda, diyabet grubu skorunun, kontrol ve diyabet+quercetin grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derece de yüksek olduğu tespit edildi.
7. Tek doz 50 mg/kg STZ indüksiyonunun renal hücre apoptozisini tetiklemesiyle, diyabet grubunda TUNEL pozitif tübüler ve glomerüler hücre sayısının, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı ve antioksidan etkili quercetin uygulanan grupta apoptotik hücre sayısının, diyabet grubuna göre anlamlı oranda azaldığı görüldü.
8. Deney sonucunda böbrek kesitlerine uygulanan aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi çoğunlukla tübül epitel hücrelerinde gözlendi ve boyanma şiddeti H-SCORE yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirildiğinde; diyabet grubu H-SCORE değerinin, kontrol ve diyabet+quercetin grubuna göre anlamlı oranda yüksek olduğu gözlendi.
9. Renal hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla yaptığımız PCNA immün boyaması, diyabetin tübüler hücre proliferasyonunu azalttığını, ancak glomerüllerde mezengiyal hücrelerin proliferasyonunu tetiklediğini gösterdi. Quercetin tedavisi ile, bu proliferatif değişikliklerin önlendiği gözlendi.
10. STZ aracılığı ile oluşturduğumuz deneysel diyabetin erken döneminde, renal fonksiyon parametrelerinden serum üre değerlerinin kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı, ancak kreatinin düzeylerinin değişmediği tespit edildi. Uyguladığımız quercetinin, artan serum üre düzeylerinde anlamlı olmayan bir azalmaya neden olduğu gözlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, STZ ile diyabet indüksiyonunun; şıçanların, kan glukoz düzeylerinde artışa, vücut ağırlığında azalmaya, renal tübüler ve glomerüler hücrelerde apoptotik ve proliferatif değişikliklere neden olmak suretiyle histopatolojik değişiklikleri ve nefropati gelişimini tetiklediği ve dolayısı ile renal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan ve antidiabetik etkisi bilinen quercetinin, diyabetin erken döneminde ortaya çıkan apoptotik ve proliferatif değişiklikleri düzenlemek suretiyle diyabetik nefropati gelişimini önlemede faydalı olduğu saptanmıştır.

ÖZET

Diabetes mellitus, sıklığı ve komplikasyonları nedeniyle dünyada önemi her geçen gün artan bir sağlık sorunudur. Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabetin erken dönemlerinde, sıçan böbrek dokusunda meydana gelen değişiklikler üzerine, quercetinin koruyucu etkisi değerlendirildi.

Bu amaçla 24 adet Wistar Albino erkek sıçanlardan rastgele 3 grup (Kontrol, diyabet ve diyabet+quercetin) oluşturuldu. Diyabet ve diyabet+quercetin gruplarına tek doz 50 mg/kg STZ i.p olarak uygulandı. STZ uygulamasından 48 saat sonra kan glukoz değeri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler, diyabetik kabul edilerek deneye alındı. Quercetin tedavili gruba, diyabet indüksiyonundan 48 saat sonra başlayarak, 15 gün boyunca günde bir kez, i.p. 30 mg/kg quercetin verildi. Quercetin tedavisinin bitiminde, anestezi altında deneklerden alınan kardiyak kan örneklerinden elde edilen serumlarda üre ve kreatinin düzeyleri ile böbrek dokularında; in situ DNA uç işaretleme metodu (TUNEL) ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi ile hücre apoptozisi, prolifere nükleer antijen (PCNA) immünoreaktivitesi ile hücre proliferasyonu ve ayrıca renal histopatoloji değerlendirildi.

Deneklerde STZ aracılığı ile diyabetin indüksiyonu, böbrek dokusunda histopatolojik skor ile glomerüloskleroz indeksinde, serum üre düzeyinde, TUNEL pozitif ve aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi gösteren tübüler ve glomerüler hücre sayısında anlamlı derecede artışa neden olurken, renal tübüler PCNA immünoreaktivitesinde azalmaya, glomerüllerde ise artışa neden oldu. Quercetin desteği böbrek dokusunda ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri, renal hücrelerin apoptosis aracılı ölümünü ve PCNA immünreaktivitesindeki değişiklikleri önemli ölçüde engelledi.

Bu çalışmanın bulguları, quercetinin STZ ile indüklenen diyabetin erken dönemlerinde, sıçan böbrek dokusunda açığa çıkan fonksiyonel ve histopatolojik değişiklikleri, renal hücre apoptozisini baskılamak, hücre proliferasyonunu düzenlemek suretiyle diyabetik nefropati gelişimini önlemede ve tedavisinde faydalı olabileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Streptozotosin, Quercetin, Nefropati, Apoptozis, Sıçan.

PROTECTIVE EFFECTS OF QUERCETIN IN KIDNEY TISSUE OF DIABETIC RATS

SUMMARY

Diabetes mellitus is a health problem that is increasing day by day in the world due to its frequency and complications. In this study, the protective effect of quercetin on the changes of rat kidney tissue in the early stages diabetes induced by streptozotocin (STZ) was evaluated.

Twenty-four Wistar albino male rats divided from 3 groups randomly (1. Group: Control, 2. Group: Diabetes and 3.Group: Diabetes + quercetin). STZ was applied single dose of 50 mg/kg i.p. to diabetes and diabetes+quercetin groups. Fourty-eight hours after administration of STZ, rats with blood glucose levels > 250 mg/dl were considered diabetic and these were taken to experiment. Quercetin was given 30 mg/kg i.p. once daily for 15 days, 48 hours after induction of diabetes. At the end of quercetin treatment, all animals were sacrificed and their cardiac blood samples and kidney were harvested. The urea and creatinin levels in serum were assesed. After weighing, the kidney tissues were evaluated by terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end labeling (TUNEL) and active caspase-3 immunoreactivity for apoptosis, by immunohistochemically proliferative nuclear antigen (PCNA) for proliferation and also renal histopathology.

The induction of diabetes via STZ was caused a significant increase in the index of glomerulosclerosis, the pathologic score, the number of TUNEL and active caspase-3 positive tubuler and glomerular cell and serum urea levels. We also shown that decreased PCNA immunoreactivity in tubuler cells and increased glomeruli in diabetic animals kidney. Quercetin

treatment prevented renal histopathologic changes, apoptosis-mediated death in renal cells and changes of PCNA immunoreactivity in kidney tissue.

The findings of this study suggested that quercetin may be useful in the prevention and treatment of STZ-induced diabetic nephropathy by modulating functional and histopathological changes in kidney, suppressing renal cell apoptosis, and regulating cell proliferation.

Keywords: Streptozotocin, Quercetin, Nephropathy, Apoptosis, Rat.

KAYNAKLAR

1. Cheisson G, Jacqueminet S, Cosson E, Ichai C, Leguerrier AM, Nicolescu-Catargi B et al. Review of hyperglycaemia: definitions and pathophysiology. Anaesth Crit Care Pain. In press 2018.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2010;33(Suppl 1):62–69.
3. Ayodele OE, Alebiosu CO, Salako BL. Diabetic nephropathy a review of the natural history, burden, risk factors and treatment. J Natl Med Assoc 2004;96(11):1445-54.
4. Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. Am J Nephrol 2007;27(6):554-64.
5. Mori J, Patel VB, Ramprasath T, Alrob OA, DesAulniers J, Scholey JW et al. Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. Am J Physiol Renal Physiol 2014;306(8):F812–21.
6. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr. 2002;76:1191–201.
7. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. J Pineal Res 2001;31(3):193-8.
8. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes 2006;55(1):225-33.
9. Chuang PY, Yu Q, Fang W, Uribarri J, He JC. Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. Kidney Int 2007;72(8):965-76.
10. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? Kidney Int 1999;56(5):1627-37.

11. Oritz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. J Investig Med 1997;45:50-56.

12. Allen DA, Harwood S, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. FASEB J 2003;17(8):908-10.

13. Li JH, Huang XR, Zhu H, Johnson R, Lan HY. Role of TGF B signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. Kidney Int 2003;63(6):2010-9.

14. Cai X, Fang Z, Dou J, Yu A, Zhai G. Bioavailability of quercetin: Problems and promises. Curr Med Chem 2013;20(20):2572-82.

15. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food Chem Toxicol 2007;45(11):2179-205.

16. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. Biochemistry 1992;31(34):8059-63.

17. Al-Rasheed NM, Fadda LM, Attia HA, Ali HM. Quercetin inhibits sodium nitrite-induced inflammation and apoptosis in different rats organs by suppressing Bax, HIF1-α, TGF-β, Smad-2, and AKT pathways. J Biochem Mol Toxicol. In press 2017.

18. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, an antioxidan bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004;31:244-8.

19. Lin CF, Kuo YT, Chen TY, Chien CT. Quercetin-Rich Guava (Psidium guajava) Juice in Combination with Trehalose Reduces Autophagy, Apoptosis and Pyroptosis Formation in the Kidney and Pancreas of Type II Diabetic Rats. Molecules 2016;21(3):334-52.

20. Gomes IB, Porto ML, Santos MC, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS et al. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. Lipids Health Dis 2014;13:184-94.

21. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. Sultan Qaboos Univ Med J 2013;13(3): 368–370.

22. Eknoyan G,Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. Advances in Chronic Kidney Disease 2005;12(2):223-9.

23. American Diabetes Associtation. Standards of medical care in diabetes. Clin Diabetes 2016;34(1): 3–21.

24. Bally L, Laimer M, Stettler C. Exercise-associated glucose metabolism in individuals with type 1 diabetes mellitus. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2015;18(4):428-33.

25. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of

intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur J Immunol 1992;22(2):301-7.

26. Charles JL, Jay LD, Solomon HS. Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120(3):227-37.

27. Mirghani DA, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. World J Diabetes 2017;8(12):489-506.

28. Szkudelski T. The mechanism of alloksan and STZ action in beta cells of rat pancreas. Physiol Res 2001;50:536-46.

29. BellR H, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus. Journal of Surgical Research 1983;5:433–60.

30. Koh PO, Sung JH, Won CK, Cho JH, Moon JG, Park OS et al. Streptozotocin-induced diabetes decreases placenta growth factor (PlGF) levels in rat placenta. J Vet Med Sci 2007;69(9):877-80.

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

32. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. Nature 1981;294(5838):284-6.

33. West E, Simon OR, Morrison EY. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. West Indian Med J 1996;45(2):60-2.

34. Kurcer Z, Karaoğlu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. Turk Jem 2012:16:34-40.

35. Mauer S, Steffes M, Ellis E, Sutherland D, Brown D, Goetz FC. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. Clin Invest 1984;74(4):1143–55.

36. Ruggenenti P, Remuzzi G. Nephropathy of type 1 and type 2 diabetes: diverse pathophysiology, same treatment? Nephrol Dial Transplant 2000;15(12):1900-2.

37. Trevisan R, Barnes DJ, Viberti G. Textbook of Diabetes. In: Pickup JC, Williams G (Eds) Pathogenesis of diabetic nephropathy. 2th ed. London:Blackwell,1997:52.

38. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of ıncipient diabetic nephropathy. Diabetes 1983;32(2):64-78.

39. Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy. Eur J Intern Med 2009;20(6):551-5.

40. Turgut F, Çarlıoğlu A, Alkan R, Akdeniz D, Haltaş H, Balçık Şahin E. Erdosteinin diyabetik ratlarda böbrek hasarı üzerine koruyucu etkisi. Turkish Nephrology 2010; 13(3):157-161.

41. Tunçdemir M, Öztürk M. Deneysel diyabetik nefropatide İrbesartan'ın apoptoz üzerine koruyucu etkileri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2009;40(1):15-22.

42. Steffes MW, Osterby R, Chavers B, Mauer SM. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. Diabetes 1989;38(9):1077–81.

43. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2003;14(5):1358–73.

44. Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. J Histochem Cytochem 2012;60(12):976–86.

45. Stokes MB, Holler S, Cui Y, Hudkins KL, Eitner F, Fogo A et al. Expression of decorin, biglycan, and collagen type I in human renal fibrosing disease. Kidney Int 2000;57(2):487–98.

46. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol 2008;585(2-3):325-37.

47. Ader P, Wessmann A, Wolffram S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. Free Radic Biol Med 2000;28(7):1056–67.

48. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J Nutr 1995;125(7):1911-22.

49. Middleton E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. Advances in Research Since 1994;676:619-52.

50. Mahesh T, Menon VP. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res 2004;18(2):123-7.

51. Mutlu Altundağ E, Kasacı T, Yılmaz AM, Karademir B, Koçtürk S, Taga Y, Yalçın AS. Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells. J Thyroid Res. In press 2016.

52. Haenen GR, Bast A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. Methods Enzymol 1999;301:490-503.

53. Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA Jr, Jabor JR, Santos AC, Fonseca MJ. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. AAPS PharmSciTech 2006;7(1):E1-9.

54. Manjeet KR, Ghosh B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. Int J Immunopharmacol 1999;21(7):435-43.

55. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res 2005;51(2):117-23.

56. Edremitlioğlu M, Andiç MF, Oğuzhan K. Quercetin, a powerful antioksidant bioflavonoid, prevents oxidative damage in different tissues of long-term diabetic rats. Balkan Med J 2012;29:49-55.

57. Ali MAM, Heeba GH, El-Sheikh AAK. Modulation of heme oxygenase-1 expression and activity affects streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. Fundam Clin Pharmacol 2017;31(5):546-57.

58. Yang DK, Kang HS. Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-ınduced diabetic rats. Biomol Ther (Seoul) 2018;26(2):130-8.

59. Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. Kidney Int 1987;32(5):691-9.

60. Tunçdemir M, Ozturk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. J Mol Histol 2008;39(6):605-16.

61. Zhou L, An XF, Teng SC, Liu JS, Shang WB, Zhang AH et al. Pretreatment with the total flavone glycosides of Flos Abelmoschus manihot and hyperoside prevents glomerular podocyte apoptosis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. J Med Food 2012;15(5):461-8

62. Elbe H, Vardi N, Esrefoglu M, Ates B, Yologlu S, Taskapan C. Amelioration of streptozotocin -induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. Hum Exp Toxicol 2015;34(1):100-13.

63. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. Comparative Biochemistry and Physiology 2003;135C(3):357–64.

64. Andallu B, Varadacharyulu NC. Antioxidant role of mulberry (Morus indica L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. Clin Chim Acta 2003;338(1-2):3-10.

65. Kelly DJ, Cox AJ, Tolcos M, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE. Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-angiotensin system in diabetic Ren-2 rats. Kidney Int 2002;61(1):31-9.

66. Cam M, Yavuz O, Güven A et al. Protective effects of chronic melatonin treatmant against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. J Pineal Res 2003;35(3):212-20.

67. New JP, Canavan JP, Flyvbjerg A, Hamon G, Bilous RW, Marshall SM. Renal enlargement and insulin-like growth factor-1 accumulation in the wistar rat model of experimental diabetes is not prevented by angiotensin converting enzyme inhibition. Diabetologia 1996;39(2):166-11.

68. Garman JH, Mulroney S, Manigrasso M, Flynn E, Maric C. Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. Am J Physiol Renal Physiol 2009;296(2):306-16.

69. Teoh SL, Latiff AA, Das S. Histological changes in the kidneys of experimental diabetic rats fed with Momordica Charantia (bitter gourd) extract. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2010;51(1):91-5.

70. Coldiron AD, Sanders RA, Watkins JB. Effects of combined quercetin and coenzyme Q10 treatment on oxidative stress in normal and diabetic rats. J Biochem Molecular Toxicology 2002;16(4):197-202.

71. Vıncent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Endocrine Reviews 2004;25(4):612–28.

72. Armagan A, Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Asian J Androl 2006;8(5):595-600.

73. Baynes JW, Thorpe SR. Perspectives in diabetes role of oxidative stress in diabetic complications a new perspective on an old paradigm. Diabetes 1999;48(1):1-9.

74. Zhang W, Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH. Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. Biochem Mol Med 1997;61(1):58-62

75. Yasuda Y, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Naruse K et al. Role of PKC and TGF-beta receptor in glucose-induced proliferation of smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 2001;16;281(1):71-7.

76. Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Isono M, Casaretto A, Ziyadeh FN. The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Ren Fail 2001;23(3-4):471-81.

77. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. Kidney Int 2000;77:93-8.

78. Eid S, Boutary S, Braych K, Sabra R, Massaad C, Hamdy A et al. mTORC2 signaling regulates Nox4-ınduced podocyte depletion in diabetes. Antioxid Redox Signal 2016; 25(13):703-19.

79. Wang RM, Wang ZB, Wang Y, Liu WY, Li Y, Tong LC. Swiprosin-1 promotes mitochondria-dependent apoptosis of glomerular podocytes via P38 MAPK pathway in early-stage diabetic nephropathy. Cell Physiol Biochem 2018;45(3):899-916.

80. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int 2006;69(12):2131-47.

81. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. Semin Nephrol 2007;27(2):130-43.

82. Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R et al. Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2003;14(5):1383-95

83. Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S. Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels. FEBS Lett 2005;579(5):1249-54.

84. Tunçdemir M, Öztürk M. Octreotidenin yenidoğan streptozotocin diyabetik siçan böbreği ve Igf-1 düzeyleri üzerine etkileri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2002;33(2):118-25.

85. Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Salleh N. Phyllanthus niruri leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. J Ethnopharmacol 2017;205:123-137.

86. Cortes P, Dumler F, Goldman J, Levin NW. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozocin-induced diabetes in rats. Diabetes 1987;36(1):80-7.

87. Hirose K, Qsterby R, Nozawa M, Jorgen H, Gundersen G. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. Kidney Int 1982;21:689- 695.

88. Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O et al. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. Diabetologia 2000;43(1):91-100.

89. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blantz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. Kidney Int 1991;39(6):1176–83.

90. Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy.Kidney Int 1995;47(3):935-44.

91. Bleyer AJ, Fumo P, Snipes ER, Goldfarb S, Simmons DA, Ziyadeh FN. Polyol pathway mediates high glucose-induced collagen synthesis in proximal tubule. Kidney Int 1994;45(3):659 –66.

92. Wolf G, Neilson EG, Goldfarb S, Ziyadeh FN: The influence of glucose concentration on angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 1991;176(2):902–9.

93. Nessar A. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pract 2005;67(1):3–21.

94. Youssef S, Nguyen DT, Soulis T, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME. Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advanced glycation end-product binding. Kidney Int 1999;55(3):907-16.

95. Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. Diabetologia 1996;39(2):149-60.

96. Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, Gingras D, Bendayan M. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. Lab Invest 2003;83(7):1069-80.

97. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complication. J Am Osteopath Assoc 2000;100(10):621-34.

98. Misseri R, Meldrum DR, Dinarello CA, Dagher P, Hile KL, Rink RC, Meldrum KK. TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. Am J Physiol Renal Physiol 2005;288(2):406-11.

99. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. Kidney Int 2000;58(6):2301–13.

100. Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin- diabetic rat kidney. Nephron Exp Nephrol 2004;96(3):77-88.

101. Wassef L, Kelly DJ, Gilbert RE. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates early kidney enlargement in experimental diabetes. Kidney Int 2004;66(5):1805-14.

102. Moskaug JQ, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. Moleculer imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. Mech Ageing Dev 2004;125(4):315-24.

103. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. Mol Nutr Food Re. 2009;53(7):859–68.

104. Kaur N, Kishore L, Singh R. Dillenia indica L. attenuates diabetic nephropathy via inhibition of advanced glycation end products accumulation in STZ-nicotinamide induced diabetic rats. J Tradit Complement Med 2017;8(1):226-38.

105. Li X, Zheng T, S Sang, Lv L. Quercetin ınhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal. J Agric Food Chem 2014;62(50):12152-8.

106. Yao S, Sang H, Song G, Yang N, Liu Q, Zhang Y et al. Quercetin protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting the endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway. Exp Biol Med 2012;237(7):822-31.

107. Park C, So H.S, Shin CH, Baek SH, Moon BS, Shin S.H et al. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. Biochem.Pharmacol 2003;66(7):1287–95.

108. Baltaci BB, Uygur R, Caglar V, Aktas C, Aydin M, Ozen OA. Protective effects of quercetin against arsenic-induced testicular damage in rats. Andrologia 2016;48(10):1202-13.

109. Erşahin A, Hocaoglu M, Demirer S, Cengiz F. Quercetin improves metabolic sequels and placental morphology in streptozotocin-induced diabetic rats. Perinatal Journal 2016;24(3):147-55.

110. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. Lancet 1968;2(7564):363-6.

111. Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. Pharmacol Ther 2006;111(1):81-98.

112. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. Diabetes 2003;52(12);2969-74.

113. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. Clin Chem 1992;38(10):1933-53.

114. Ersöz HÖ, Budak Y, Akalın S. The effect of specıfic angıotensın receptor antagonıst losartan on dıabetıc nephropathy ın dıabetıc rat model. Office Journa of the Turkish Nephrology 1997;106-11.

115. Lu Q, Ji XJ, Zhou YX, Yao XQ, Liu YQ, Zhang F. Quercetin inhibits the mTORC1/p70S6K signaling-mediated renal tubular epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy. Pharmacol Res 2015;99:237-47.

116. Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-κB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. Biomed Pharmacother 2017;90:500-8.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Sıçan pankreas B hücrelerinde streptozotosin (STZ)-aracılı toksisite mekanizması…6
Şekil 2. Quercetinin yapısal formülü.....9
Şekil 3. Deney gruplarına ait açlık kan glukoz düzeylerinin karşılaştırılması…….18
Şekil 4. Deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlık değerleri ile vücut ağırlıkları değişimi.. 19
Şekil 5. A) Böbrek ağırlığı B) Böbrek ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı……19
Şekil 6. Kontrol grubu, H+E, X40 23
Şekil 7. Kontrol grubu, H+E, X200 23
Şekil 8. Kontrol grubu, PAS, X400..... 24
Şekil 9. Kontrol grubu, Sirius Red, X200 24
Şekil 10. Diyabet grubu, H+E, X40 25
Şekil 11. Diyabet grubu, H+E, X200 25
Şekil 12. Diyabet grubu, PAS, X400..... 26
Şekil 13. Diyabet grubu, PAS, X400 26
Şekil 14. Diyabet grubu, Sirius Red, X200 27
Şekil 15. Diyabet+quercetin grubu, H+E, X40 28
Şekil 16. Diyabet+quercetin grubu, H+E, X100 28
Şekil 17. Diyabet+quercetin grubu, PAS, X400 29
Şekil 18. Diyabet+quercetin grubu, Sirius Red, X200..... 29
Şekil 19. Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X200 32
Şekil 20. Kontrol grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X400 32

Şekil 21. Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X200 33
Şekil 22. Diyabet grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X400 33
Şekil 23. Diyabet+quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X200 34
Şekil 24. Diyabet+quercetin grubu, TUNEL, hematoksilen zıt boyanması, X400 34
Şekil 25. Kontrol grubu, Aktif Kaspaz-3, hematoksilen zıt boyanması, X200 35
Şekil 26. Diyabet grubu, Aktif Kaspaz-3, hematoksilen zıt boyanması, X200 35
Şekil 27. Diyabet+quercetin grubu, Aktif Kaspaz-3, hematoksilen zıt boyanması, X400 36
Şekil 28. Kontrol grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X200 36
Şekil 29. Kontrol grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X400 37
Şekil 30. Diyabet grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X200 37
Şekil 31. Diyabet grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X400 38
Şekil 32. Diyabet+quercetin grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X200 38
Şekil 33. Diyabet+quercetin grubu, PCNA, hematoksilen zıt boyanması, X400 39

TABLOLAR

Tablo 1. Histopatolojik değerlendirme sonuçları 20
Tablo 2. Deney gruplarına ait TUNEL analizi, aktif kaspaz-3 ve PCNA immünoreaktivite değerlendirme sonuçları 30
Tablo 3. Deney gruplarına ait böbrek fonksiyon parametreleri 40

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İstanbul ilinin Bakırköy ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini Bursa'da tamamladıktan sonra, 2011 yılında başladığı Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda, yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2017/05 **Karar Tarihi: 31.05.2017**

KARAR NO: 2017.05.02

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'ın yaptığı, Emine Ceyda SÖZÜER'in Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2017/15 protokol nolu "**Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçan Böbrek Dokusunda Quercetinin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-MAZERETLİ-
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

-MAZERETLİ-
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır