

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**



**DENEYSEL DİYABETİK NEFROPATİDE
BOR' UN PAR1 ARACILI NLRP3
İNFLAMAZOMU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ve
PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI
DOKTORA TEZİ
Müge METİN ATALAY**

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DENEYSEL DİYABETİK NEFROPATİDE BOR' UN PAR1
ARACILI NLRP3 İNFLAMAZOMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER ve PATOLOJİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Müge METİN ATALAY

Danışman
Prof. Dr. Aydın ÇEVİK

MAYIS, 2024
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY SAYFASI

Tez Başlığı:

Tez Yazarı:

Program/ Anabilim Dalı:

Tez Danışmanı:

İkinci Tez Danışmanı (varsa):

Tez İlk Teslim Tarihi: .../.../20...

Tez Savunma Tarihi: .../.../20...

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan	Unvan, Adı Soyadı	_____
Üye	Unvan, Adı Soyadı	_____
Üye	Unvan, Adı Soyadı	_____
Üye	Unvan, Adı Soyadı	_____
Üye	Unvan, Adı Soyadı	_____

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

Unvan, Adı Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Müge METİN ATALAY

Tarih:

İmza:

İTHAF

Kocaman kalpleri ve güler yüzleriyle hayatıma güneş gibi doğan
oğlum Hasan ATALAY ve
kızım Nil ATALAY' a ithaf edilmiştir

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresi boyunca tezimin her aşamasında yol gösteren, kıymetli tez danışman hocam Prof. Dr. Aydın ÇEVİK' e ve doktora eğitimim boyunca sonsuz destek ve yardımını hissettiğim değerli Anabilim Dalı Başkanı hocamız Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ' e tüm özverisi için teşekkür ederim.

Doktora eğitimime katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ ve Prof. Dr. Necati TİMURKAAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda değerli katkılarıyla destek veren Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nevin İLHAN' a ve Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Abdullah ASLAN' a sonsuz teşekkür ederim.

Patoloji Anabilim dalı asistanları Arş. Gör. Dr. Burak KARABULUT, Arş. Gör. Dr. Canan AKDENİZ İNCİLİ ve Arş. Gör. Eren ÇANKAYA' ya teşekkür ederim.

Her koşulda bana sonsuz destek ve güç veren değerli eşim Veteriner Hekim Ebubekir ATALAY' a tüm katkıları ve bana olan inancı için sonsuz teşekkür ederim.

Tüm başarılarımın mimarı, değerli babam Zahit METİN' e ve annem Fatma METİN' e hiçbir teşekkürün bu emeğe yetmeyeceğinin bilinciyle, sonsuz teşekkür ederim.

Deney aşamasında desteklerini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM) personellerine teşekkür ederim.

Bu çalışmanın maddi desteğini sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-Proje No:122O196)' na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ETİK BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
1.ÖZET.....	xviii
2.ABSTRACT	xx
3. GİRİŞ	1
3.1. Pankreas.....	1
3.1.1. Pankreas Anatomisi	1
3.1.2. Pankreas Histolojisi	2
3.1.2.1. Ekzokrin Pankreas	2
3.1.2.2. Endokrin Pankreas.....	2
3.2. Böbrek	3
3.2.1. Böbrek Anatomisi.....	3
3.2.2. Böbrek Histolojisi.....	3

3.2.2.1. Nefron.....	4
3.2.2.1.a. Renal Korpuskul/ Malphigi Cisimciği.....	5
3.2.2.1.b. Proksimal Tübül	6
3.2.2.1.c. Henle Kulpu.....	6
3.2.2.1.d. Distal Tübül	7
3.2.2.1.e. Toplayıcı Kanal	7
3.2.2.2. Jukstaglomerular aygıt	7
3.3. Diabetes Mellitus	8
3.3.1. Diabetes Mellitus’ un Tanı Kriterleri	8
3.3.2. Diabetes Mellitus’ un Etiyolojik Sınıflandırılması.....	9
3.3.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	10
3.3.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	11
3.3.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus	11
3.3.2.4. Spesifik Diabetes Mellitus Tipleri.....	11
3.4. Deneysel Diabetes Mellitus	12
3.4.1. Streptozotosin ve Etki Mekanizması	12
3.5. Diabetes Mellitus’ un Komplikasyonları.....	14
3.6. Diyabetik Nefropati	15
3.7. DN’ de Kullanılan Tedavi	16
3.8. Diyabetik Nefropatinin Klinik Sınıflandırılması.....	17

3.9. Diyabetik Nefropatinin Patolojik Sınıflandırılması.....	18
3.10. Diyabetik Nefropati Patofizyolojisi.....	19
3.11. İnflamazomlar.....	21
3.12. PAR-1/Trombin Sinyal Yolağı.....	27
3.12.1. Diyabetik Nefropati ile PAR-1 /Trombin Sinyal Yolağı Arasındaki İlişki.	28
3.13. Borik Asit	30
4.GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
4.1. Hayvan Deneyleri	37
4.1.1. Hayvanların Gruplandırılması	37
4.1.2. Deney Hayvanlarına Yapılan Uygulamalar.....	38
4.1.3. Deney Hayvanlarına Uygulanan Kimyasallar ve Hazırlanmaları	41
4.1.3.1. Streptozotosin Solüsyonu Hazırlanması ve Uygulanması.....	41
4.1.3.2. Borik Asit Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması	42
4.1.3.3. İnsülin Uygulanması.....	42
4.1.4. Araştırmanın Sonlandırılması.....	42
4.1.4.1. Canlı Ağırlık Ölçümü.....	43
4.1.4.2. Rölatif Böbrek Ağırlığı Ölçümü.....	43
4.2. Histopatolojik Analizler	44
4.2.1. Histokimyasal Analizler	44
4.2.2. İmmunohistokimyasal Boyamalar.....	45

4.2.2.1. Immunohistokimyasal Boyamanın Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi	46
4.3. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	48
4.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve RNA İzolasyonu	48
4.3.2. RNA' dan cDNA Sentezi	48
4.3.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Ölçümü	49
4.3.4. $2^{-\Delta\Delta CT}$ Metodu Kullanılarak qRT-PCR Ürünlerinin Hesaplanması	50
4.4. Western Blot Analizleri	51
4.5. Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA) Analizleri	52
4.5.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması	52
4.5.2. IL-18 Tayini	53
4.5.3. IL-1 β Tayini	53
4.5.4. Trombin Aktivitesinin Tayini	54
4.6. Biyokimya Analizleri	55
4.6.1. İdrar Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	55
4.6.2. Kan Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	55
4.7. İstatistiksel Analiz	55
5. BULGULAR	56
5.1. Klinik Bulgular	56
5.2. Canlı Ağırlık Bulguları	57
5.3. Açlık Kan Glukoz Seviyesi Bulguları	60

5.4. Rölatif Böbrek Ağırlığı Bulguları.....	63
5.5. Histopatolojik Bulgular	65
5.5.1. Pankreas Dokusu Histopatolojik Bulguları	65
5.5.2. Böbrek Dokusunun Histopatolojik Bulguları	71
5.6. Immunohistokimyasal Bulguları	79
5.6.1. NLRP3	79
5.6.2. Kaspaz-1	81
5.6.3. NF-κβ.....	83
5.6.4. PAR-1	85
5.6.5. VEGF	87
5.6.6. Ki67	89
5.7. RT-PCR Bulguları	92
5.7.1. NLRP3 Gen Ekspresyon Seviyesi	92
5.7.2. PAR-1 Gen Ekspresyon Seviyesi	94
5.8. Western Blot Bulguları.....	96
5.8.1. NLRP3.....	96
5.8.2. PAR-1 Protein Ekspresyonu.....	97
5.8.3. Kaspaz-1 Protein Ekspresyonu.....	98
5.8.4. NF-κβ Protein Ekspresyonu	99
5.9. ELİSA Bulguları.....	100

5.9.1. IL-1 β Bulguları	100
5.9.2. IL-18 Bulguları	102
5.10. Trombin Aktivitesi Bulguları	104
5.11. Biyokimyasal Bulgular	106
5.11.1. İdrarda Keton Cisimciğinin Ölçümü	108
6. TARTIŞMA	109
7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	120
8. KAYNAKÇA	120
9. ÖZGEÇMİŞ	142

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Pankreasın çevre organlarla ilişkisi.....	1
Şekil 2. Türlerle göre pankreasın anatomik yapısı.	2
Şekil 3. Nefron yapısı	4
Şekil 4. Glomerulusun yapısı.....	5
Şekil 5. Renal tübül histolojisi.....	7
Şekil 6. STZ'nin kimyasal yapısı	13
Şekil 7. STZ' nin beta hücreleri üzerindeki seçici toksikasyon mekanizması	14
Şekil 8. NLRP3 İnflamazomunun yapısı ve aktifleşmesi.....	22
Şekil 9. NLRP3 inflamazom aktivasyonu	24
Şekil 10. IL-1 β üretimi ve salınımı.....	25
Şekil 11. Diyabette trombin ile aktive edilen PAR1' in NF- κ B aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyon modeli.....	30
Şekil 12. Borik asidin yapısı.....	31
Şekil 13. Boronik asitin moleküler hedefleri	34
Şekil 14. Orgonobor bileşiklerinin kimyasal yapısı	34
Şekil 15. Deney hayvanlarının gruplandırılması, kafeslendirilmesi ve muhafaza edilmesi	38
Şekil 16. Çalışmada kullanılan glukometre cihazı görseli	39
Şekil 17. Çalışmada kullanılan deneysel prosedürün şematik tablosu	41
Şekil 18. Çalışmada kullanılan cihazlar.	48
Şekil 19. Çalışmada kullanılan spektrofotometre cihazı ve mikropipet yıkayıcı	52
Şekil 20. Diyabet grubuna ait ratlar.....	57
Şekil 22. BA' in diyabetik ratlarda açlık kan glukoz seviyeleri (mg/dL) üzerindeki etkisi.60	
Şekil 23. BA' in diyabetik ratlarda 69. gün açlık kan glukoz seviyeleri (mg/dL) üzerindeki etkisi.	61

Şekil 24. BA' in diyabetik ratlarda rölatif böbrek ağırlığı üzerindeki etkileri.	63
Şekil 25. Kontrol grubu ratlarına ait pankreas dokusu.	66
Şekil 26. STZ grubu ratlara ait pankreas dokusu.....	67
Şekil 27. STZ grubu ratlara ait pankreas dokusu.	68
Şekil 28. Gruplara ait rat pankreası.	68
Şekil 29. Gruplara ait rat pankreası.	70
Şekil 30. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu.....	72
Şekil 31. STZ grubuna ait böbrek dokusu.	73
Şekil 32. STZ grubuna ait böbrek dokusu.	74
Şekil 33. STZ grubuna ait böbrek dokusu.....	75
Şekil 34. Diyabet grubuna ait böbrek dokusu.....	76
Şekil 35. Tüm gruplara ait böbrek dokusu.....	77
Şekil 36. Böbrek dokusuna ait histopatolojik bulgular skorlaması	77
Şekil 37. Rat böbreklerine ait NLRP3 immunoreaktivitesi.	79
Şekil 38. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 immunoskor üzerindeki etkileri.....	80
Şekil 39. Rat böbreklerine ait kaspaz-1 immunoreaktivitesi.	81
Şekil 40. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda kaspaz-1 immunoskor üzerindeki etkileri.....	82
Şekil 41. Rat böbreklerinin NF- κ B immunoreaktivitesi.	83
Şekil 42. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusu NF- κ B immunoskor üzerindeki etkileri.....	84
Şekil 43. Rat böbreklerinin PAR-1 immunoreaktivitesi.....	85
Şekil 44. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 immunoskor üzerindeki etkileri.	86

Şekil 45. Rat böbreklerinin VEGF immunoreaktivitesi.	87
Şekil 46. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda VEGF immunoskor üzerindeki etkileri.	88
Şekil 47. Rat böbreklerinin ki67 immunoreaktivitesi.	89
Şekil 48. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda ki67 immunoskor üzerindeki etkileri.	90
Şekil 49. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri.	92
Şekil 50. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri.	94
Şekil 51. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri.	96
Şekil 52. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri.	97
Şekil 53. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda kaspaz-1 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri.	98
Şekil 54. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NF- κ B protein ekspresyonu üzerindeki etkileri.	99
Şekil 55. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-1 β sitokin seviyesi üzerindeki etkileri.	100
Şekil 56. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-18 sitokin seviyesi üzerindeki etkileri.	102
Şekil 57. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-18 sitokin seviyesi üzerindeki etkileri.	104
Şekil 58. Strip idrar örneğinin idrar stripi ile ketozis bakımından değerlendirilmesi.	108

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. DM' nin etiyolojik sınıflandırılması	9
Tablo 2. ADA' ya göre anormal albüminüri tanısında kullanılan parametreler.....	16
Tablo 3. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve yapılan uygulamalar	40
Tablo 4. Tübüler ve glomeruler hasarın derecelendirilmesi.....	45
Tablo 5. İmunohistokimya Skolama Parametreleri.....	47
Tablo 6. PCR Protokolü	50
Tablo 7. Termal Döngü Koşulları.....	50
Tablo 8. $\Delta\Delta$ Ct değęrlerinin hesaplanması	51
Tablo 9. Deney sonu gruplar arası canlı ağırlık ortalamaları (gr.)	59
Tablo 10. Gruplar arası açlık kan glukoz seviyesi ortalamaları.	62
Tablo 11. Gruplar arası böbrek ağırlığı ortalamaları (gr.).....	64
Tablo 12. Gruplar arası adacık sayısı ortalamaları	69
Tablo 13. Gruplar arası adacık çapı ortalamaları (μ m)	70
Tablo 14. Böbrek dokusuna ait histopatolojik bulgular skolasması.	78
Tablo 15. Böbrek dokusuna ait NLRP3, PAR-1, NF- κ B, kaspaz-1, VEGF ve ki67 immunreaktivitelerinin skolasması	91
Tablo 16. Gruplar arası NLRP3 mRNA ekspresyon ortalamaları.....	93
Tablo 17. Gruplar arası PAR-1 mRNA ekspresyon ortalamaları.....	95
Tablo 18. Gruplar arası IL-1 β sitokin seviyeleri ortalamaları.	101
Tablo 19. Gruplar arası IL-18 sitokin seviyeleri ortalamaları	103
Tablo 20. Gruplar arası trombin aktivitesi ortalamaları.	105
Tablo 21. Gruplar arası böbrek fonksiyon testi ortalamaları.....	107

KISALTMALAR LİSTESİ

- ABC** : Avidin-Biotin Kompleks
- ACE** : Anjiyotensin dönüştürücü enzim
- ACTB** : Beta aktin
- ADA** : American Diabetes Association
- AEC**: 3-Amino-9-Ethylcarbazole
- AGE** : Glikasyon son ürünü
- AIM2** : Pirin ve absent in melanoma 2
- ALR** : Absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor
- ATP** : Adenozin trifosfat
- BB** : Biobreeding
- BCA** : Bicinchoninic Acid
- BUN** : Blood Urea Nitrogen
- CA** : Canlı ağırlık
- CD** : Cluster of differentiation
- cGMP** : Siklik guanozin monofosfat
- CTGF** : Connective tissue growth factor
- DAB** : 3,3`Diaminobenzidine
- DAMP** : Hasarla ilişkili moleküler kalıp
- DM** : Diabetes Mellitus
- DN** : Diabetik Nefropati
- DNA** : Deoksiriboz nükleik asit
- eGFR** : Glomerüler filtrasyon hızı
- ELISA** : Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
- FADD** : Fas ile ilişkili ölüm domaini

GFH : Glomerüler filtrasyon hızı

GSDMD : Kaspaz-1 gasdermin D

HbA1C : Glikolize edilmiş hemoglobin

HxE : Hematoksilen x Eozin

IDF : Uluslararası Diyabet Federasyonu

IFN- γ : İnterferon-gama

IFTA : İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi

IL-18 : İnterlökin-18

IL-1 β : İnterlökin-1 β

i.p. : İntraperitoneal

M : Mol

mg : Miligram

ml : Mililitre

NAD : Nikotamid adenin dinükleotid

NADH : Nikotinamid Adenin

NF- $\kappa\beta$: Nükleer faktör kappa b

NLR : NOD benzeri reseptör

NLRC4 : NLR-family CARD domain-containing protein 4

NLRP3 : NOD benzeri reseptör proteini 3

nm : Nanometre

NO : Nitrik oksit

NOD : Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain

NP-DN : Proteinürük Olmayan DN

OD : Optik dansite

PAMP : Patojenle ilişkili moleküler kalıp

PAR : Proteazla aktifleşen reseptör

PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz

PAS : Periodic Acid-Schiff

PRR : Kalıp Tanıma Reseptörü (Pattern recognition receptor)

PBS : Phosphate Buffered Saline

PMSF : Fenil metil sülfonil florid

RIPK1: Reseptör etkileşimli serin/treonin protein kinaz 1

RLR : Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen- (RIG)-I benzeri reseptör

RNA : Ribonükleik asid

ROS: Reaktif oksijen türleri

SD: Sprague Dawley

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliğine

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

ss : Standart sapma

STZ: Streptozotosin

T1DM : Tip 1 Diabetes Mellitus

T2 DM : Tip 2 Diabetes Mellitus

TLR : Toll benzeri reseptör

UV : Ultraviyole

vWF : von Willebrand faktörü

X: ortalama

µL: Mikrolitre

µm: Mikrometre

1. ÖZET

DENEYSEL DİYABETİK NEFROPATİDE BOR' UN PAR1 ARACILI NLRP3 İNFLAMAZOMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE PATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Diyabetik nefropati (DN), yaşam kalitesini bozan ve son dönem böbrek yetmezlikleri ile sonuçlanabilen, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Böbrek dokusunda artan inflamatuvar hücrelerin ve yangısal süreçlerin DN' nin potansiyel modülatörleri olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışma; diyabetik nefropatide inflamasyonun rolü ve borik asitin diyabetik nefropati üzerine anti-trombotik, anti-inflamatuvar etkilerini açıklamak için planlanmıştır.

Çalışmada streptozotosin (50 mg/kg intraperitoneal) ile diyabetin indüklendiği Sprague Dawley ırkı ratlara 63 gün boyunca oral gavaj ile borik asit (50, 100 ve 200 mg/kg) tedavisi uygulandı. Haftalık canlı ağırlık ve açlık kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Deney sonunda biyokimyasal, moleküler ve serolojik parametrelerin araştırılması için kan, pankreas ve böbrek dokusu alındı. Böbrek ve pankreas dokusu histopatolojik (hematoksilen-eosin, periodic acid schiff) olarak incelendi. Böbrek dokusunda immunohistokimyasal (NLRP3, kaspaz-1, NF- κ B, PAR-1, ki67, VEGF), real-time qPCR (NLRP3 ve PAR-1), Western Blot (NLRP3, kaspaz-1, NF- κ B, PAR-1), ELİSA (IL-18 ve IL-1 β) yöntemleri kullanılarak inceleme yapıldı. Serum örneklerinde trombin aktivasyonu, böbrek fonksiyon testleri (albümin, kreatinin, üre nitrojen ve ürik asit) ölçüldü.

İstatistiksel analizler sonucunda; borik asit verilen diyabetik rat gruplarındaki canlı ağırlık artışının; kontrol ve STZ+insülin gruplarından düşük, diyabet grubuna benzer olduğu tespit edildi. Borik asit tedavisi alan diyabetik ratlar açlık kan glikoz seviyesi bakımından kontrol ve diyabet gruplarından farklı ancak STZ+insülin grubuna yakın iyileşme sağladığı görüldü. Tübüler ve glomeruler yapının kontrol ve STZ+insülin grubuyla benzer olduğu

görüldü. Diyabet grubunda artan NLRP3, kaspaz-1, NF- κ B, IL-18, IL-1 β , PAR-1 ekspresyonları ve trombin aktivasyonunun borik asit uygulaması ile STZ+insülin grubuna yaklaştırarak iyileşme sağladığı tespit edildi. Kontrol ve/veya STZ+insülin grubuna en yakın sonucun STZ+BA₂₀₀ grubuna ait olduğu görüldü.

Sonuç olarak; PAR-1' in yukarı regülasyonunun NLRP3 aktivasyonuna aracılık ettiği ve borik asitin anti-inflamatuar etkisinin bu sinyal yollarını inhibe ederek nefroprotektif etki gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Borik asit, diyabetik nefropati, inflamazom, NLRP3, PAR-1



2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BORON ON PAR1-MEDIATED NLRP3 INFLAMMASOME IN EXPERIMENTAL DIABETIC NEPHROPATHY WITH MOLECULAR AND PATHOLOGICAL METHODS

Diabetic nephropathy (DN) is one of the microvascular complications of diabetes that impairs life and may result in end-stage renal failure. Increased inflammatory changes and inflammation in kidney tissue suggest that they are potential modulators of DN. This work; The role of diabetic nephropathy treatment and the anti-thrombotic, anti-inflammatory effects of boric acid on diabetic nephropathy are planned to be revealed.

In the study, diabetes was induced with streptozotocin (50 mg/kg intraperitoneally) in Sprague Dawley rats, combined with boric acid (50, 100 and 200 mg/kg) by oral gavage for 63 days. Weekly body weight and fasting blood glucose levels were measured. At the end of the experiment, blood, pancreas and kidney tissue were taken because biochemical, strict and serological individuals were found. Kidney and pancreatic tissues were examined histopathologically (hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff). In kidney tissue, immunohistochemistry (NLRP3, caspase-1, NF- κ B, PAR-1, ki67, VEGF), real-time qPCR (NLRP3 and PAR-1), Western Blot (NLRP3, caspase-1, NF- κ B, PAR-) 1), ELISA (IL-18 and IL-1 β) methods were examined. Thrombin activation and kidney function tests (albumin, creatinine, urea nitrogen and uric acid) were measured in serum samples.

Statistical analysis results; Live weight gain in diabetic rats given boric acid; It was found to be lower than the control and STZ+insulin groups, and similar to the diabetes group. Fasting blood glucose levels of diabetic rats receiving boric acid treatment were different from the control and diabetes groups, but the STZ + insulin group showed close improvement. Tubular and glomerular women were found to be similar to the control and STZ+insulin group. Increased NLRP3, caspase-1, NF- κ B, IL-18, IL-1 β , PAR-1 expressions

and thrombin activation during the diabetes period were determined by boric acid application and healing rates, mainly by approximating STZ+insulin. It was observed that the closest result in the control and/or STZ+insulin group was in the STZ+BA200 group.

In conclusion; Upregulation of PAR-1 mediates NLRP3 activation and boric acid exerts its anti-inflammatory effects where it exerts nephroprotective effects by inhibiting these signaling pathways.

Keywords: Boric acid, diabetic nephropathy, inflammasome, NLRP3, PAR-1



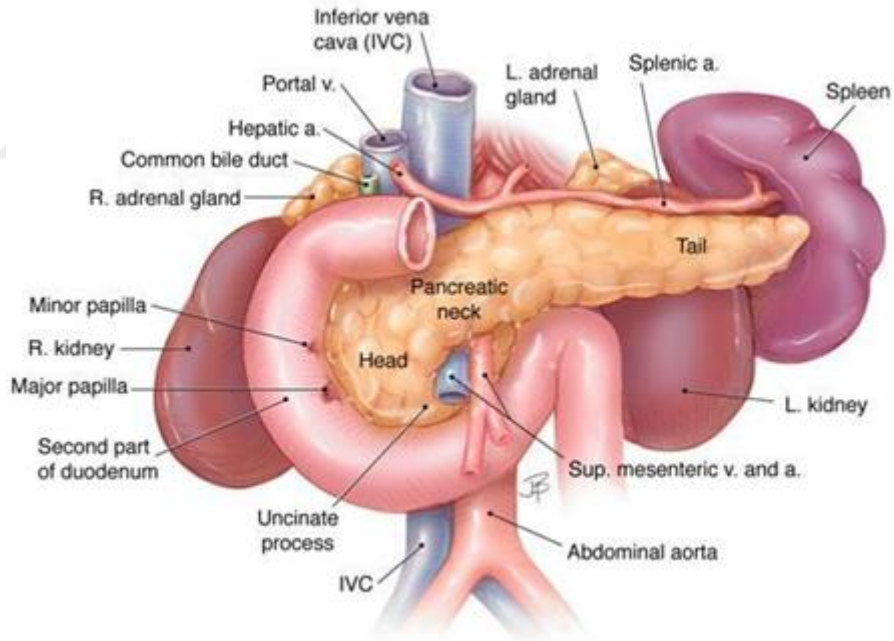
3. GİRİŞ

3.1. Pankreas

Pankreas sindirim enzimleri salgılayarak sindirime yardımcı ekzokrin; glukoz, lipid ve protein metabolizmasını düzenleyen hormonlar salgılayan endokrin bölümlere sahip bir bezdir (Longnecker, 2021).

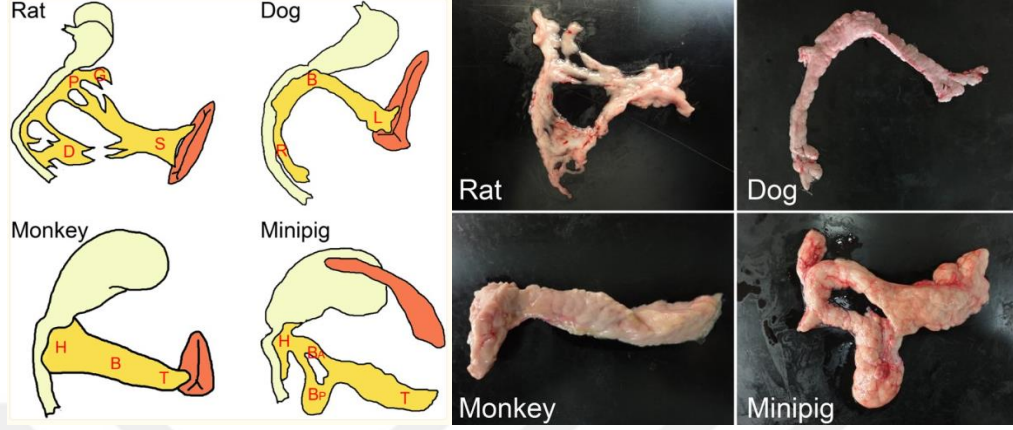
3.1.1. Pankreas Anatomisi

Pankreas insanlarda gastrointestinal kanalın duodenal kıvrımının içinde yer alan, gevşek bağ doku kılıfıyla sarılı lob ve lobüllerden oluşan bir organdır. Pankreas Şekil 1’ de görüldüğü gibi duodenum ve jejunumun proksimalinden geçer, dalağın hilusunda sonlanır (Longnecker, 2021).



Şekil 1. Pankreasın çevre organlarla ilişkisi. (L:sol, R:sağ, v:ven, a:arter) (Longnecker, 2021).

Pankreas ince gevşek bağ dokusuna sahip bir kapsüle ile çevrilidir. Şekil 2’ de olduğu gibi pankreas her hayvan türüne göre farklı lobülasyon ve konfigürasyon modeli göstermektedir (Tsuchitani vd., 2016).



Şekil 2. Türler göre pankreasın anatomik yapısı. D; duodenal segment, P; parabiliar segment, G; mide segmenti, S; dalak segmenti, R; sağ lob, B; gövde, B A, vücudun ön kısmı; B P, vücudun arka kısmı, L; sol lob, H; baş, T; kuyruk. (Tsuchitani vd., 2016).

3.1.2. Pankreas Histolojisi

3.1.2.1. Ekzokrin Pankreas

Ekzokrin bölüm, ince fibrovasküler septalarla lobüllere ayrılır. Görevi; amilaz, lipaz, proteaz gibi sindirim enzimleri salgılayarak sindirimi kolaylaştırmak ve mide asidini nötralize eden alkali bir sıvıyı kanal sistemiyle proksimal duodenuma boşaltmaktır. Bazofilik sitoplazmasında sindirim enzimleri barındıran ve eozinofilik boyanan zimojen granüller içeren poligonal, piramidal hücreler barındıran asinilerden oluşur. Pankreasın %98’ ini oluştururlar (R. J. ve C. Premanandan, 2017).

3.1.2.2. Endokrin Pankreas

Endokrin pankreas ekzokrin parankima içerisinde düzensiz dağılan Langerhans adacıklarından oluşur. Langerhans adacıkları alfa, beta, delta ve F tipi hücrelerden meydana

gelir. Alfa hücreleri glukagon (düşük kan glukoz konsantrasyonu bağlı olarak salınır), beta hücreleri insülin (yüksek kan glukoz konsantrasyonuna tepki olarak salınır), delta hücreleri gastrin ve somatostatin (insülin ve glukagon salınımını inhibe eder) ve F tipi hücreler ise pankreatik polipeptid hormonunu (pankreas ve safra kesesi salgılarını azaltır) salgılar. Bu bölüm pankreasın %2' sini meydana getirir (Ross ve Pawlina, 2011).

3.2. Böbrek

Boşaltım sistemi iki böbrek, iki üreter, bir idrar torbası ve bir üretradan oluşmaktadır. Amaçları süzme ve boşaltım ile artık metabolitleri vücuttan uzaklaştırmak, vücut sıvılarının ve elektrolitlerin yoğunluğunu dengelemek, amino asit, glukoz ve peptid gibi molekülleri ve sodyum, klorür, kalsiyum gibi iyonların geri Emilimi ile hemostasisi sağlamaktır Böbrekler eritropoietin (kemik iliğinde kırmızı kan hücrelerinin yapımını uyarır), angiotensin II ve prostaglandin E2 salgılayarak endokrin organ görevi yapar, renin enzimi salgılayarak kan basıncı düzeyini dengeler, 1,25 hidroksikolekalsiferol' ü aktive ederek vitamin D sentezinde rol alır (Kierszenbaum ve Tres, 2016).

3.2.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler karın duvarının ventralinde retroperitoneal olarak yerleşim gösteren, sağ ve sol olarak v. cava caudalis ve aorta abdominalis' in her iki yanında konumlanmış fasülye şeklinde organlardır. İç bükey kısımda kan damarlarının üreterin çıktığı hilum bulunurken dış bükey kısım dış kenarı oluşturur. Her bir böbrek bağ dokusundan oluşan kapsüle ile çevrilidir (Sharp ve Regina, 2010).

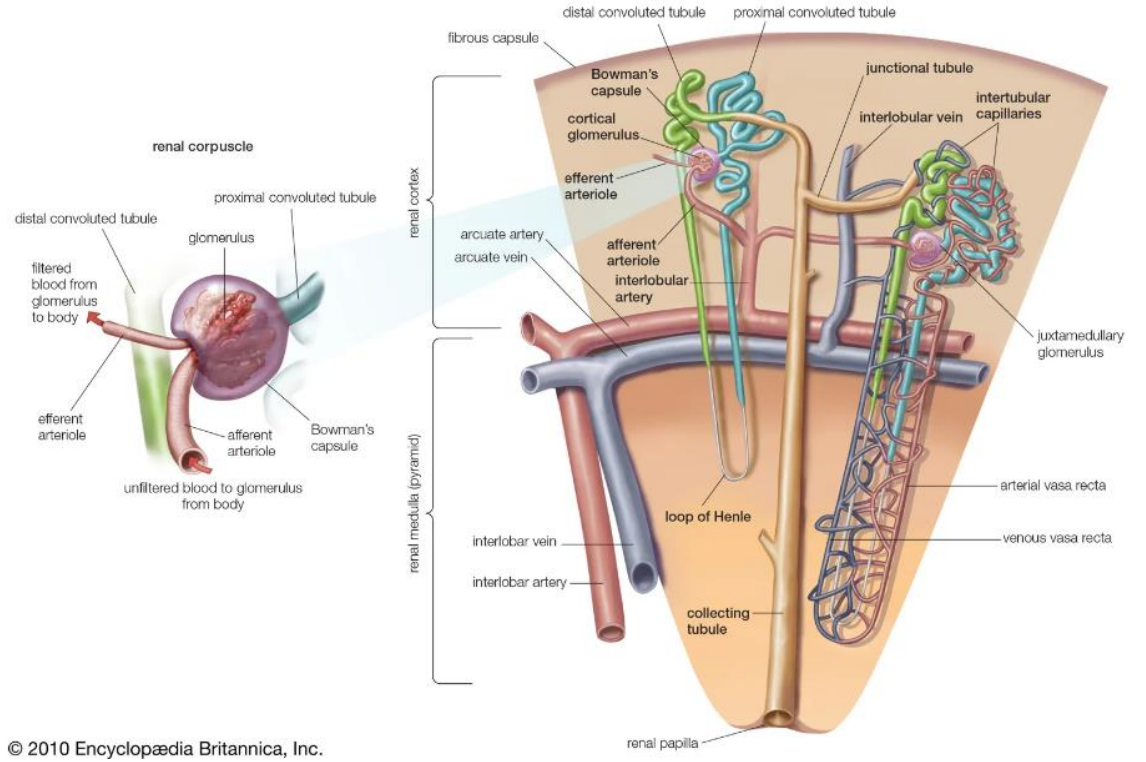
3.2.2. Böbrek Histolojisi

Böbrek lobüllerden oluşan, idrar salgılayan ekzokrin bir bezdir. Ancak diğer ekzokrin bezler gibi lobüller septalarla ayrılmamaktadır (Sharp ve Regina, 2010). Böbrek histolojisi korteks ve medulla olarak incelenir. Renal korteks; kortikal labirent/pars

konvoluta (renal korpuskul, distal ve proksimal tübüller barındırır) ve medullar ışın/pars radiata (proksimal ve distal düz tübüller ve toplama kanalları barındırır) bileşenlerinden oluşur. Renal medulla; dış medulla (düz tübüller ve toplama kanalları barındırır) ve iç medulla (ince tübüllerin ve toplama kanalları barındırır) bileşenlerinden oluşur (Eurell ve Frappier, 2013).

3.2.2.1. Nefron

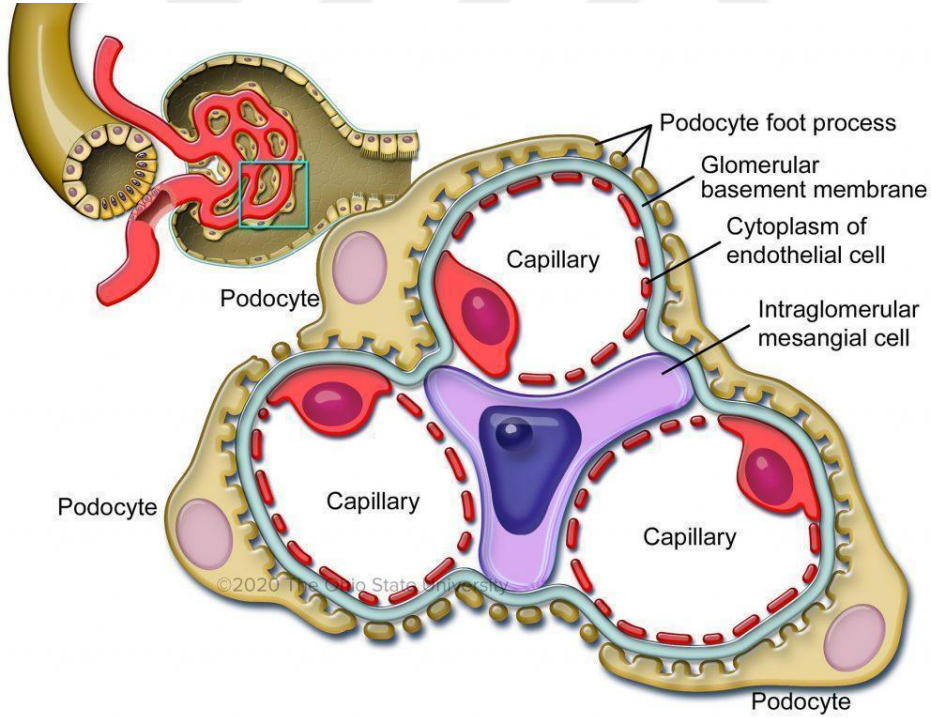
Nefron 5 yapıdan oluşan fonksiyonel bir birimdir; renal korpuskül, proksimal düz ve kıvrımlı tübül, henle kulpu (ince tübül), distal kıvrımlı ve düz tübül, toplama kanallarından oluşur (Maynard ve Downes, 2019) (Şekil 3).



Şekil 3. Nefron yapısı (Anonymus, 2023).

3.2.2.1.a. Renal Korpuskul/ Malphigi Cisimciği

Afferent ve efferent kılcal damarların oluşturduğu bir düğüm halindeki glomerulus bu yapının merkezidir. Bu kılcal damar ağı bazal membran ile çevrili olup mezabağngiyal hücrelerle destek sağlanır. Glomerulusun etrafını çift katmanlı Bowman kapsülü sarar. Dış katman basit tek katlı yassı epitelden oluşan kapsüler (pariyetal) epitelyumdur. Bowman kapsülünün visceral epitelyumunu podositler oluşturur. Kılcal damarların endotel hücre stoplazmasında ortalama 80 nm çapında yarıklar bulunur ve bu yarıklar boyunca kılcal damarı saran podosit isimli özel hücreler bulunur. Işık mikroskopuyla incelendiğinde podositleri endotel hücrelerden ayırmak oldukça zordur. Bowman kapsülü ile glomerulus arasında idrar boşluğu bulunur (Maynard ve Downes, 2019) (Şekil 4).



Şekil 4. Glomerulusun yapısı (C. Premanandan ve Jennings, 2017).

3.2.2.1.b. Proksimal Tübül

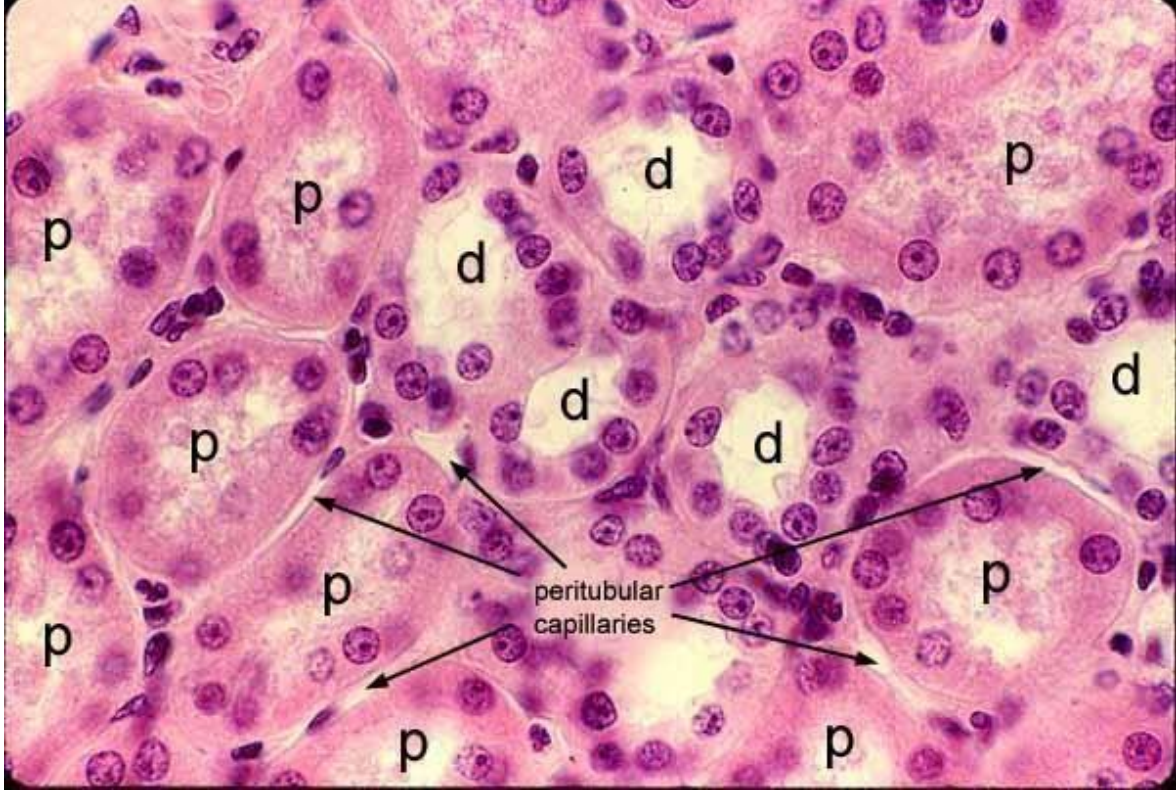
İdrar boşluğundaki (üriner boşluk/Bowman boşluğu) idrarın tahliyesi bu tübül ile başlar. Başlangıçta kıvrımlı olup medullar ışınılardaki son kısmı düzdür. Proksimal kıvrımlı tübül epiteli fırçası kenara sahip basit küboidal epitel ile kaplıdır. Bu tübüllerin çekirdek sayısı az ve aktif transportta görev alan mitokondri yoğunluğuna sahip oldukları için asidofilik boyanır. Oluşan plazma ultrafiltrata (primer idrar) ait su, glukoz, sodyum, potasyum gibi katı maddelerin %70' i buradan emilir. Proksimal düz tübüller, medullada seyrederek ve proksimal kıvrımlı tübüllere göre hücreler daha kısadır ve fırçası kenar daha az gelişmiştir (Maynard ve Downes, 2019).

3.2.2.1.c. Henle Kulpu

Böbrek medullasında bulunur. Proksimal düz tübülün devamı olan bir kalın inen kol, bir ince inen kol; bir ince çıkan kol, bir kalın çıkan kol olarak U yapısında bir tübüldür. Tek katlı yassı epitele sahiptir. Suyun %15' i katı maddelerin %25' i buradan emilir (Maynard ve Downes, 2019).

3.2.2.1.d. Distal Tübül

Distal tübül ince düz olarak medullada devam eder ve idrar toplama kanalına açılmadan önce kıvrımlı distal tübülü oluşturur. Distal tübül kısa villuslu ve sıkı bağlantılara sahip basit küboidal epitel ile döşenmiştir (Maynard ve Downes, 2019)(Şekil 5).



Şekil 5. Renal tübül histolojisi (p: proksimal tübül, d: distal tübül) (King, 2022).

3.2.2.1.e. Toplayıcı Kanal

Basit küboidal hücreler ile döşenen nefronun son bölümüdür (Maynard ve Downes, 2019).

3.2.2.2. Jukstaglomerular aygıt

Renal korpuskulun vasküler kutbunda küçük bir endokrin yapıdır. Makula densa, ekstraglomeruler mezangiyal hücreler ve jukstaglomerular hücrelerden oluşur. Makula densa; distal kıvrımlı tübül duvarındaki yoğun epitel bölgesidir. Distal tübüldeki NaCl

derişimindeki düşüşü algılayarak jukstaglomeruler hücrelerden renin salınımını tetikler. Renin ise afferent arteriyolün vazokontrüksiyonunu sağlar. Böylece glomerulusa giren kan akışı kontrol edilmiş olur. Ekstraglomeruler mezangiyal hücreler (lakis hücreler/polkissen hücreleri) fagositik özellikleri vardır ve atrial natridiüetik peptid reseptörlerine sahiptirler. Bunlar afferent ve efferent kan basıncı arasında dengeyi sağlamada görevlidir (Kierszenbaum ve Tres, 2016).

3.3. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) insülin sekresyonunun ya da etkisinin kısmen veya tamamen bozulması sonucu hiperglisemiyle karakterize metabolik bir sendromdur. Dolayısıyla DM karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozulması sonucu gelişen glukoz toksikasyonunun yol açtığı spesifik patolojik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile ilgilidir (Ferri, 2020). Diabetes Mellitus (DM) prevalansı dünyada hızla artış göstermektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) raporuna göre diyabetin dünya genelinde görülme sıklığı epidemik boyutlara ulaşmıştır. 2022’ de küresel nüfusta 540 milyon insan etkilenmiştir, bu sayının 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 781 milyona çıkması tahmin edilmektedir (International Diabetes Federation, 2021).

3.3.1. Diabetes Mellitus’ un Tanı Kriterleri

American Diabetes Association (ADA) tanı kriterlerine göre en az 8 saatlik açlık sonrası ölçülen açlık plazma glukozu (APG) ≥ 126 mg/dL, oral glukoz tolerans testi (OGTT) 2. saat plazma glukozu (PG) ≥ 200 mg/dL, HbA1c (eritrositlerin maruz kaldığı ortalama glukoz seviyesine ilişkin bilgi verebilen glikozillenmiş hemoglobin testidir) $\geq \%6,5$ (48 mmol/mol) ve hipergliseminin klasik semptomları olan hastalarda random PG değerinin ≥ 200 mg/dL olmasını DM olarak tanımlamaktadır (American Diabetes Association, 2014).

3.3.2. Diabetes Mellitus' un Etiyolojik Sınıflandırılması

DM' nin etiyolojik sınıflandırılması Tablo 1' de özetlenmiştir.

Tablo 1. DM' nin etiyolojik sınıflandırılması (Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2022).

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM: Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet formudur)	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β -hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) • 20. Kromozom, HNF-4 α (MODY1) • 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) • 12. Kromozom, HNF-1 α (MODY3) • 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) • 17. Kromozom, HNF-1 β (MODY5) • 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) • 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) • 9. Kromozom, CEL (MODY8) • 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) • 11. Kromozom, INS (MODY10) • 8. Kromozom, BLK (MODY11) • Mitokondriyal DNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kır6.2, ABCCB, KCNJ11 mutasyonu) • 11. Kromozom, KJN11 (MODY13) • 3. Kromozom, APLL1 (MODY14) • Diğerleri	C. İlaç ve kimyasal ajanlar • Atipik anti-psikotikler • Anti-viral ilaçlar • β-adrenerjik agonistler • Diazoksid • Fenitoin • Glukokortikoidler • α-İnterferon • Nikotinik asit • Pentamidin • Proteaz inhibitörleri • Tiyazid grubu diüretikler • Tiroid hormonu • Vacor • Statinler • Diğerleri (Transplant rejeksiyonunu önlemek için kullanılan ilaçlar)
B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler • Leprechaunism • Lipoatrofik diyabet • Rabson-Mendenhall sendromu • Tip A insülin direnci • Diğerleri	D. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları • Anti insülin-reseptör antikorları • “Stiff-man” sendromu • Diğerleri

E. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları • Fibrokalkülöz pankreatopati • Hemokromatoz • Kistik fibroz • Neoplazi • Pankreatit • Travma/pankreatektomi • Diğerleri	G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar • Alström sendromu • Down sendromu • Friedreich tipi ataksi • Huntington korea • Klinefelter sendromu • Laurence-Moon-Biedl sendromu • Miyotonik distrofi • Porfiriya • Prader-Willi sendromu • Turner sendromu • Wolfram (DIDMOAD) sendromu • Diğerleri
F. Endokrinopatiler • Akromegali • Aldosteronoma • Cushing sendromu • Feokromositoma • Glukagonoma • Hipertiroidi • Somatostatinoma • Diğerleri	H. Enfeksiyonlar • Konjenital rubella • Sitomegalovirus • Koksaki B • Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

3.3.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) Langerhans adacığına sızan CD4+ ve CD8+ T lenfositleri ve makrofajların infiltrasyonu sonucu beta hücrelerinin otoimmün yıkımıyla karakterizedir (Baynest, 2015). Viral enfeksiyonlar, toksinler, diyabetojenik bileşikler (Streptozotosin, Alloksan) veya genetik olarak Wolfram sendromuna bağlı olarak oluşan β hücrelerinin dejenerasyonu nedeniyle insülin miktarın da azalma ya da tamamen durması sonucu kanda artan glukoz kas ve yağ dokuda kullanılamaz. Vücut için gerekli enerji yağ ve protein katabolizması ile sağlanır. Lipoliz ile kanda yağ asitleri, gliserol artar. Böylece karaciğerde Asetil-CoA artacak sonuçta hiperglisemi, kilo kaybı, polifaji, polidipsi, poliüri, idrarda keton cisimcikleri şekillenir, bu da asetik aside dönüştürülür ve sonuçta p-

hidroksibutirik aside indirgenir veya asetona dekarboksillenir. Normalde lipolizi az miktarda insülin inhibe edebileceği için başlarda keton cisimciği konsantrasyonu azdır (Nugroho, 2006).

3.3.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) patofizyolojisi ise ya insüline periferik doku cevabının azalmasıyla karakterize insülin direnci ya da pankreastaki beta hücrelerinin kandaki glukoz konsantrasyonuna cevabı olan insülin salgılama yeteneğindeki azalmaya dayanır. Genelde yaşlılarda ortaya çıkar ve kandaki insülin keton oluşumunu önlemeye yeter. Ancak ketotik olmayan hiperozmolar koma hali şekillenebilir. T2DM’ de hiperglisemiye hiperinsülinemi de eşlik eder. Bu durum insülin reseptörlerinde ve/veya postreseptörlerde bir problem olduğunu gösterse de beta hücreleri kendi kendine adaptasyona uğrayarak insülin salgılama yeteneğinde azalma şekillenir ve plazma insülin seviyesinde azalma görülür. Oral yolla antidiyabetik sülfonilürelerin uygulanması Langerhans adacıklarından insülin salgılama yeteneğini uyarabilir (Gülsün ve Şahin, 2017).

3.3.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gebelik döneminde maternal obezite ve/veya plasentada inflamasyonun artması gibi nedenlerle diyabetojenik hormonlardaki artış insülin duyarlılığında %60 düşüş olmasına neden olabilir. Sonuç olarak şekillenen hiperglisemi durumu anne ve fötusta diyabetik komplikasyonlara yol açmaktadır (Öztürk ve Altuntaş, 2015; Pedersen, 1997).

3.3.2.4. Spesifik Diabetes Mellitus Tipleri

Spesifik nedenlerle ortaya çıkan DM tipleri aşağıda belirtilmiştir (Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2022);

- Beta-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (Monogenik diyabet formları)

- İnsülinin etkisindeki genetik defektler
- Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları
- Endokrinopatiler
- İlaç ve kimyasal ajanlar
- İmmun aracılıklı nadir diyabet formları
- Diyabetle ilişkili genetik sendromlar
- Enfeksiyonlar

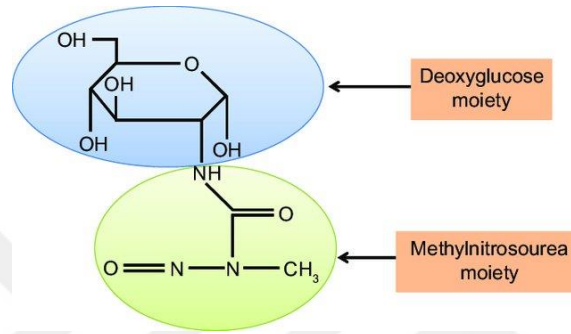
3.4. Deneysel Diabetes Mellitus

Diyabetin patogenezi, komplikasyonlarını ve seyrini tam olarak yansıtabilecek tek bir deneysel diyabet modeli yoktur. İnsan homeostatik mekanizmasını tam olarak yansıtmamasına rağmen, kullanışlı ve maliyetinin düşük olması nedeniyle çalışmaların %85 den fazlasında deney hayvanı olarak kemirgenler kullanılmaktadır. Deney hayvanlarında diyabet oluşturmak için kimyasal (streptozotosin, alloxan), cerrahi müdahaleyle ve genetik/immünolojik (BB:Biobreeding veya NOD:obez olmayan sıçanlar) uygulamalar mevcuttur. Deneysel diyabet indüksiyonu için pankreatik beta hücrelerini seçici olarak yıkımlarken diğer yapılara hasar vermemesi, insanlardaki T1DM' na benzemesi gibi üstün özelliklerinden dolayı streptozotosin (STZ) kullanımı yaygındır (Radenković vd., 2016).

3.4.1. Streptozotosin ve Etki Mekanizması

Streptozotosin, *Streptomyces achromogenes*' den elde edilen deneysel tip 1 ve tip 2 diyabeti indüklemek için kullanılan antineoplastik ve diyabetojenik özellikleri olan bir antibiyotik ajandır. Kimyasal yapısı 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukan piranoz] dur (Szkudelski, 2001) (Şekil 6). İntravenöz olarak T1DM' yi indüklemek için i.p.

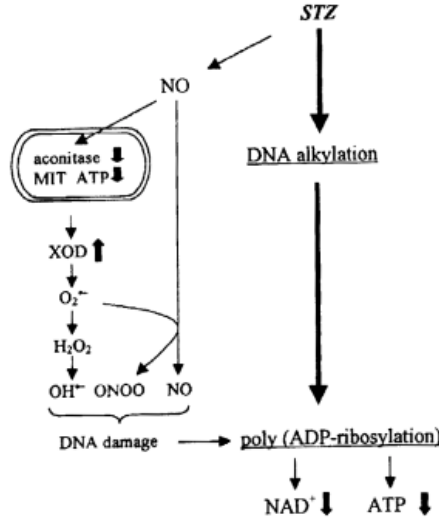
yada i.v. en yaygın kullanılan doz 40-70 mg/kg' dır (Furman, 2021). Yüksek dozlarda STZ uygulaması böbreğe, özellikle de tübüler hücrelere spesifik olmayan sitotoksik etki göstererek akut böbrek hasarına neden olur, bu da böbrek lezyonlarının hiperglisemiye mi yoksa doğrudan toksik etkiyle mi ilişkilendirilebileceğini açıklamayı zorlaştırır (Luo vd., 2023).



Şekil 6. STZ'nin kimyasal yapısı (Yan ve Wu, 2015).

Yapısındaki glukoz nedeniyle Langerhans β hücrelerine kolaylıkla GLUT-2 (Glikoz Taşıyıcı-2) yoluyla seçici olarak nüfuz eder. Toksik etkisinin genelde Langerhans β hücrelerinde DNA alkillasyon yoluyla DNA hasarına sebep olduğu varsayılmaktadır. STZ'ye ait metil grubunun hücrede DNA hasarına yol açar ve DNA onarım mekanizması için poli (ADP-riboz) polimeraz' ı (PARP) aşırı uyarır. Sonuçta hücre enerjisinin tükenmesi beta hücrelerinin nekrozuna sebep olur. PARP inhibitörlerinin STZ ile kullanımıyla toksik etkiye karşı koruduğu bilinmektedir. Diğer bir varsayım ise STZ' nin diyabetojenik etkisinin bir NO (nitrik oksit) vericisi ile ilgili olabileceği yönündedir. Bu varsayım Şekil 7' de özetlenmiştir. STZ' nin yapısındaki nitrozo grubu NO' yu serbest bırakarak artan guanilil siklaz aktivitesinde ve cGMP oluşumu yoluyla hücre hasarına yol açmaktadır. STZ' nin diyabetojenik etki mekanizmasıyla ilgili bir diğer varsayım ise STZ' nin mitokondrideki hipoksantin mekanizmasını uyarması ile ilgilidir. Buna göre artan ksantin oksidaz aktivitesi

nedeniyle süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi bazı reaktif oksijen türleri (ROS) açığa çıkar. Bu durum, STZ krebs döngüsünü inhibe eder ve mitokondriyal oksijen tüketimini azaltır. Sınırlı mitokondriyal ATP üretimi, pankreatik hücre DNA' sında hasara neden olur (Kamli-Salino vd., 2023; Lenzen, 2008).



Şekil 7. STZ' nin beta hücreleri üzerindeki seçici toksikasyon mekanizması (Szkudelski, 2001).

3.5. Diabetes Mellitus' un Komplikasyonları

Mikrovasküler komplikasyonlar hücre içi gelişen hiperglisemiyle ilintiliyken, makrovasküler komplikasyonlar insülin direnci kaynaklı artan lipid oksidasyonu ile ilişkilidir. Akut dönemde ketoasidoz ve nonketotik hiperosmolar durum, laktik asidoz, hipoglisemiye yol açarak hayati tehlike oluştururken; kronik olarak hiperglisemiye maruz kalınmasıyla nefropati, nöropati, retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlara ve koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı gibi kardiyovasküler sistemi ilgilendiren makrovasküler komplikasyonlara sebep olur (Ohiagu vd., 2021).

3.6. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, diabetes mellitusun kronik mikrovasküler komplikasyonlarından biridir ve son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) sebep olur. DM'li hastaların %20-40'ında SDBY görülmektedir (American Diabetes Association, 2014).

DN; albüminüri, düşük tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) veya böbrek hasarının diğer belirtileriyle teşhis edilse de, klasik olarak 24 saatte 0.5 g protein atılımıyla belirlenir. Bu aşama klinik DN olarak tanımlanır. Klinik DN normoalbuminüri, mikroalbuminüri (üriner albümin atılımı 20-199 µg/dk), makroalbuminüri (üriner albümin atılımı >200 µg/dk) ile başlar ve sonuçta kronik böbrek yetmezliğine doğru ilerler. Ancak normoalbuminüri seviyesinde de DN gelişme ihtimali mümkündür (Gross vd., 2005). DN tanısında proteinüri altın standart olsa da bu aşamaya gelene kadar böbrek fonksiyonlarında azalma görülmesi aslında bu standartın yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu nedenle erken dönem DN biyobelirteçlerinin ortaya konulması önem taşır. İnflamasyon sitokinleri ve kemokinlerinin erken DN tanısında potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği de varsayılmaktadır (J. Zhang vd., 2018).

Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association-ADA)'ya göre anormal albüminüri 3 yöntemle saptanabilir (Tablo 2);

1. Rastgele spot idrarda albümin-kreatinin oranının ölçülmesi
2. 24 saatlik idrar örneğinde kreatinin klirensinin eş zamanlı ölçümü
3. Saatlik (4 saat/gece boyunca) (American Diabetes Association, 2004).

Tablo 2. ADA' ya göre anormal albüminüri tanısında kullanılan parametreler (American Diabetes Association, 2004).

Kategori	Spot ($\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinin)	24 saatlik ($\text{mg}/24$ saat)	Saatlik ($\mu\text{g}/\text{min}$)
Normal	<30	<30	<20
Mikroalbüminüri	30–299	30–299	20–199
Makroalbüminüri	≥ 300	≥ 300	≥ 200

Diyabetik nefropati ile diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından bir başkası olan önemli körlük sebebi diyabetik retinopati arasında güçlü bir korelasyon bulunduğu da göz ardı edilmemelidir (Roelofs ve Vogt, 2019). Bu nedenle albüminüri ve retinopati varlığı diyabetik nefropatiyi de düşündürmelidir (Parving vd., 1992).

Normal DN bulguları dışında gizli seyreden DN tipi de bulunmaktadır; proteinürik olmayan DN (NP-DN). Dolayısıyla DN'nin tanı ve terapötik tedavi zamanının seçim zorluğu, konvansiyonel tedavilerin dışında inflamasyonu hedef alan tedavilerin geliştirilmesinin önemli olduğunu düşündürmektedir (Samsu, 2021).

3.7. DN' de Kullanılan Tedavi

Diyabetik nefropati, diyabetin tetiklediği hiperglisemi ve hipertansiyonun etkisiyle son dönem böbrek yetmezliğine neden olmaktadır. Bu hasarı azaltmak için hedef hipertansiyonu 130 mmHg' nin altına indirmek ve tansiyonu kontrol altına almak olmalıdır. Dünya çapında standart DN tedavisi için renin-anjiyotensin sistem blokajı tedavisi uygulanmaktadır. ADA 2022' ye göre glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ≥ 25 ml/dk/1.73 m² ve albümin düzeyi $\geq 300\text{mg}/\text{g}$ olan hastalarda kardiyovasküler riskin ve kronik böbrek hasarının ilerlemesini azaltmak amacıyla sodyum-glukoz ko-transporter 2 inhibitörünün kullanımını; bunu kullanamayan hastalar için nonsteroidal mineralokortikoid reseptör

antagonisti (finerenon) tavsiye edilmektedir. Glisemik ve kan basıncı kontrollerinin optimizasyonu sağlanmalıdır. Günlük protein alımı maksimum 0,8 g/kg olarak sınırlandırılmalıdır. Gebelik durumu olmayan ve mikroalbuminüri bulgusu olan hastalarda kontrollü olarak ACE (anjiyotensin dönüştürücü enzim) inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokerleri veya diüretikler önerilmektedir (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2021).

3.8. Diyabetik Nefropatinin Klinik Sınıflandırılması

Yapılan çalışmalar neticesinde Morgensen DN' yi klinik olarak aşağıdaki gibi sınıflandırmıştır (Morgensen vd., 1983). Buna göre;

1.Aşama; Tanı esnasında gelişen erken hipertrofi ve hiperfonksiyonun şekillendiği, fiziksel egzersiz ile albuminüride artış gözlemlenen ve insülin tedavi ile geri dönüşü olabilen bir evredir.

2.Aşama; Uzun yıllar subklinik seyreden histolojik değişikliklerin olduğu ancak böbrek fonksiyon testleri ve biyopsi örnekleri ile teşhis edilebilen evredir. GFH de artış söz konusudur.

3.Aşama; Mikroalbuminürinin (15-300 µg/mg) görülmesi ile karakterizedir. Kan basıncı yüksek hastalarda albumin atılımı arasında korelasyon bulunur. GFH hala yüksektir.

4.Aşama; Proteinüri (>0,5g/24 saat) ile karakterizedir. Hipertansiyon tedavi edilmez ise GFH' de 1 ml/dak./ay hızda düşüş görülür. Antihipertansif tedavi bu düşüşü yaklaşık 6 kat azaltır ve üremiyi geciktirir.

5.Aşama; DN' ye bağlı üremi ve son dönem böbrek yetmezliği ile karakterizedir.

3.9. Diyabetik Nefropatinin Patolojik Sınıflandırılması

Nefromegali ve glomeruler genişleme diyabet başlangıcının 4. gününden itibaren tübüler hipertrofi, hiperplazi ve interstisyel genişlemeye bağlı olarak gelişen DN' nin erken özelliğidir (Hasslacher ve Böhm, 2005). Erken dönemde tübüler hipertrofi tablosu mevcut olsa da ilerleyen süreçte tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis tablosuna dönüşür (Lim, 2014).

Glomeruler bazal membranda, tübüler bazal membran ve Bowman kapsülünde kalınlaşma görülür. Mezanşimal hücre hipertrofisi aşırı ekstrasellüler matriks üretiminin artmasına yol açar. Interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (IFTA), interstisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu, parietal epitel ve Bowman kapsülü arasında kapsüler damla lezyonları, afferent ve efferent arteriollerde hiyalinizasyon sonucu nodüler sklerotik lezyonları tanımlayan Kimmelstein Wilson lezyonları görülür. Daha ileri süreçte diffuz glomeruloskleroz gelişir (Tervaert vd., 2010).

Klinik olarak diyabet tanısı alan hastalara ait böbrek dokusu Hematoksilen-eosin (HxE), Periyodik asit-schiff (PAS), Masson trikrom (MT), metenamin gümüş-periyodik asit-schiff boyaları gibi bazal membran ve bağ dokuyu boyayan yöntemler kullanılarak histopatolojik açıdan sınıflandırmak mümkündür. Bunun için en az 10 glomerul incelenecek şekilde tanımlanan bulgular 4 sınıfta değerlendirilmektedir (Tervaert vd., 2010):

Sınıf I: Işık mikroskopunda DN için spesifik bulguların olmadığı durumlarda elektron mikroskop ölçümleriyle glomeruler bazal membrandaki kalınlaşmanın ölçülmesiyle tespit edilir. Kullanılan ölçüm tekniğine göre GBM kalınlığının üst sınırında değişiklik göstermektedir.

Sınıf II: Hafif ve şiddetli mezangiyal genişleme mevcuttur. Biyopsi materyalinde mezangiyumun %25' inden fazlasında hafif mezangiyal genişleme varsa IIa olarak; mezangiyumun %25' inden fazlasında şiddetli mezangiyal genişleme varsa IIb olarak

sınıflandırılır. Mezangiyal genişleme miktarının ölçümü için farklı endeksler kullanılmaktadır.

Sınıf III: Biyopsi materyalinde %50' nin altında glomeruloskleroz görülmesi ve en az bir adet Kimmelstein Wilson lezyonunun tespiti gerekmektedir. Nodüler sklerotik lezyonlar; mezangiyoliz ve endotel hücrelerinin glomerüler bazal membrandan ayrılması olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Bu lezyonlar kollajen iplikleri, lipid parçaları ve hücre kalıntılarından oluşur. Nodüller, periferik veya intralobüler mezangiyumda at nalı şeklinde glomeruler alanı tahrip eder.

Sınıf IV: DN' ye ait klinik bulguların görüldüğü ve %50' den fazla global glomerulosklerozlu biyopsileri tanımlar. Mezangiyal genişleme ve mezangiyal alanda kollajen tip I,II, IV ve fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinlerinin aşırı birikimiyle sonuçlanan çok yönlü mekanizmaların sonucunda glomeruloskleroz şekillenir.

3.10. Diyabetik Nefropati Patofizyolojisi

DN' nin erken döneminde fonksiyonel olarak albüminüri ve glomeruler hiperfiltrasyon, histolojik olarak tübüler hipertrofi bulgularını, ilerleyen zamanda fonksiyonel olarak proteinüri ve GFH' nin azalması, histolojik olarak ise tübüler atrofi, interstisyel fibrozis ve mononükleer hücre infiltrasyonları izler. Fonksiyonel ve hücre DN patofizyolojisini 5 başlıkta incelenmiştir (Lim, 2014);

Hemaodinamik Mekanizma

Diyabetle şekillenen glomeruler hidrostatik basınç artışı ve hiperfiltrasyon Renin-Anjiyotensin sistemini aktive eder ve anjiyotensin II seviyesinin artmasıyla efferent arteriolde vazokonstriksiyon meydana gelir. Bu durum glomeruler hidrostatik basıncın artmasına sebep olur (Pelle vd., 2022).

Metabolik Faktörler

Oksidatif stres ve ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumu DNA hasarına sebep olur. Oksidatif stres lokal ve sistemik inflamasyonu artırır (Pelle vd., 2022).

Fazla glukozun sorbitole ve ardından fruktoza dönüşümünün aktivasyonu (poliyol yolağı) ile NADH/NAD oranında artışa ve oksidatif strese katkı sağlar (Pelle vd., 2022).

Glukozun protein, lipid ve nükleik asitlere bağlanmasıyla şekillenen AGE (glikasyon son ürünleri) oksidatif strese, proinflamatuvar sitokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonuna sebep olur (Pelle vd., 2022).

Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

DN'de hücre dışı matris oluşumu ve fibrozis gelişmesinden TGF- β ve bağ dokusu büyüme faktörünün (connective tissue growth factor: CTGF) olduğu bilinmektedir. Ayrıca kemotaksi, vasküler tonus ve trombosit agregasyonundan sorumlu tutulan PDGF ekspresyonu, DN' de artış göstermektedir. Anjiyogenez, vazodilatasyon ve kemotaksiye neden olabilen VEGF ekspresyonunda da artış gözlemlenmektedir (Pelle vd., 2022).

Hücre Sinyali ve Transkripsiyon Faktörleri

Protein Kinase C (PKC) aktivasyonu anjiyotensin II' de artış, nitrik oksit düzensizliği, endotel disfonksiyonu, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ve Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) aktivasyonunda etkilidir.

MAPK aktivasyonu NF- κ B aktivasyonu ile sonuçlanır ve çeşitli sitokinlerin salınımına neden olur. Toll benzeri reseptörler (Toll-like receptor TLR)' den TLR2, TLR4 ve B7-1' de inflamasyona katkı sağlayabilir.

Sonuçta transkripsiyon faktörleri genlere bağlanarak haberci RNA (mRNA) transkripsiyonunu modüle eder. NF- κ B aktivasyonu ile DN arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır (Pelle vd., 2022).

İnflamasyon

DN' de makrofaj ve lökositlerin infiltrasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı söz konusudur. Erken evrede glomeruluslarda görülen bu birikim ilerleyen süreçte interstisyel alanda da görülmektedir. DN' de esas etkili proinflamatuvar sitokinler TNF- α , MCP-1, ICAM-1, IL-1, IL-6 ve IL-18' dir (Lim, 2014).

3.11. İnflamazomlar

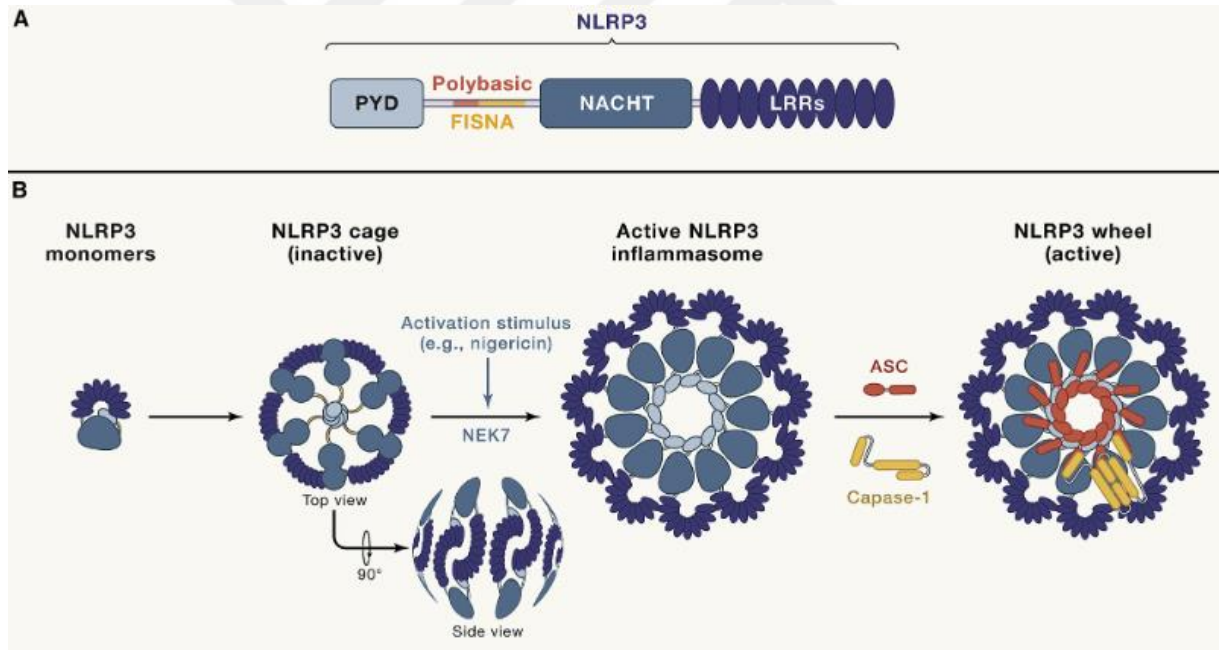
İnflamazomlar doğal bağışıklık yanıtını ve piroptotik hücre ölümünü düzenleyen önemli multimerik bir protein kompleksidir. Yapısında patern tanıma reseptörleri (pattern recognition receptor, PRR) sınıfına ait bir sensör proteini (NLR, ALR, pirin), 1 adaptör proteini (ASC-CARD içeren apoptozis ile ilişkili benek benzeri protein) ve bir inflamatuvar proteaz enzim (kaspaz-1) içeren multiprotein kompleksidir (Sharma ve Kanneganti, 2016).

Kalıp tanıma reseptörleri, örgü tanıma reseptörleri olarak da bilinen PRR' ler makrofajlar, nötrofiller, monositler gibi immun sistem hücrelerinde bulunur. PRR' ler, hasarla ilişkili moleküler modeller (damage-associated molecular pattern, DAMP) ve patojenle ilişkili moleküler modelleri (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) tanırlar ve onarım için aşağı akış inflamatuvar yollarını aktive eder. Bu reseptörlerin temel görevi inflamazomları bir araya getirmek ve sistein proteaz kaspaz-1(pro-kaspaz-1)' i aktive etmektir. Aktifleşen kaspaz-1 enzimi ise pro-IL-1 β ve pro-IL-18' i proteolitik olarak kesmesiyle IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salınımında görevlidir. PRR' ler yerleşim yerlerine göre hücre yüzeylerinde yada hücre içinde olmak üzere ikiye ayrılırlar. Toll benzeri reseptörler (Toll like receptor, TLR), CLR hücre membranında yer alırken; nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain (NOD) benzeri reseptörler (NLR), retinoic acid-inducible

gene- (RIG)-I-like receptors (RLR) ve absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor (ALR)'ler hücre sitozolünde yerleşim gösterirler.

1.11.1. NLRP3

PRR sınıfına ait alt tip olan NLR ailesinin NOD benzeri reseptör proteini 1 (NLRP1), NOD benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3), NLR-family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4), pirin ve absent in melanoma 2 (AIM2) gibi alt tiplerin inflamazom oluşturduğu bildirilmektedir. Bunlardan en iyi çalışılan ve karakterize edilen NLRP3 inflamazomudur (Kelley vd., 2019). NLRP3 oldukça geniş yelpazede tehlike sinyali tanıma özelliğine sahiptir. İnflamazom aktivasyonu, konakçıların patojenlere ve de karşı savunması için kritik öneme sahiptir. Ayrıca pekçok otoimmün hastalıkla da ilişkilidir (Furman, 2021).



Şekil 8. NLRP3 İnflamazomunun yapısı ve aktifleşmesi (Schroder ve Coll, 2021).

NLRP3; Kryopirin, NALP3 veya CIAS1 olarak da adlandırılır. NLRP3 amino-terminal pirin alanı (PYD), merkezi nükleotit bağlama ve oligomerizasyon alanı (NOD alanı /NACHT alanı) ve bir C-terminal lörin açısından zengin tekrar (LRR) alanından oluşan multikompleks bir proteindir (Kesavardhana ve Kanneganti, 2017).

Herhangi bir uyarımın olmadığı normal şartlarda NLRP3 inflamatuvar hücre sitozolünde inaktif halde bulunur. ASC ile bağlanması inhibe edildiğinden inflamazom oluşumu gerçekleşmez. Yani ortamda NLRP3 aktivatörlerinin bulunması tek başına yeterli değildir. NLRP3 aktivasyonu iki aşamalı bir sinyal modelidir. Bunlardan ilki hazırlık (priming) aşamasıdır ve ilk (primer) sinyalizasyon adını alır. Bu dönemde PRR'lerin DAMP yada PAMP ile uyarılması ile NF- κ B sinyalizasyonu aktive olur. NF- κ B'nin nükleer translokasyonu ile NLRP3, pro-IL-18 ve pro-IL-1 β 'nin ekspresyonunu yukarı regüle eder. ASC ve pro-kaspaz-1 NLRP3'e bağlanır (Williams vd., 2022) (Şekil 9).

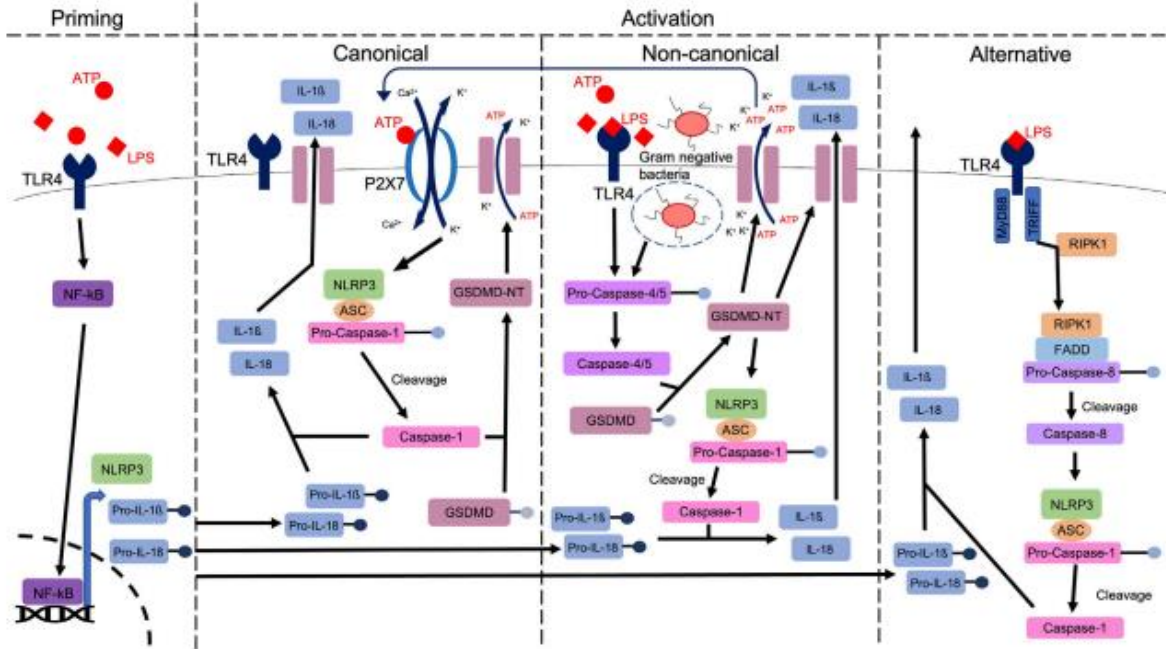
Priming aşamasını takiben NLRP3 oluşumu ve aktivasyonunun şekillendiği ikinci sinyalizasyon devreye girer. NLRP3 aktivasyonu ile potasyum akışı, hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) homestazı, lizozom dengesizliği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur (Williams vd., 2022).

NLRP3 düzenlenmesinde üç farklı mekanizma bulunmaktadır (Williams vd., 2022) (Şekil 9);

Kanonik (klasik) yol: DAMP'ların pürinerjik P2X7 reseptörlerine yada TLR reseptörlerine bağlanır, ardından ASC ve pro-kaspaz-1'in bağlanmasıyla NLRP3 aktivasyonu sağlanır. Kaspaz-1 aracılı bölünme ile olgun IL-1 β ve IL-18 üretimi başlatılır. Ayrıca kaspaz-1 gasdermin D (GSDMD)'ni ayırarak N ve C terminal alanlarına böler. N terminal alanı GSDMD-NT hücre membranını hedef alarak büyük geçirgen gözenek komplekslerini birleştirir. Böylece IL-1 β ve IL-18 salınımıyla litik gözenekler oluşturması yönüyle programlı hücre ölümü tipi olan piroptozisi anımsatır.

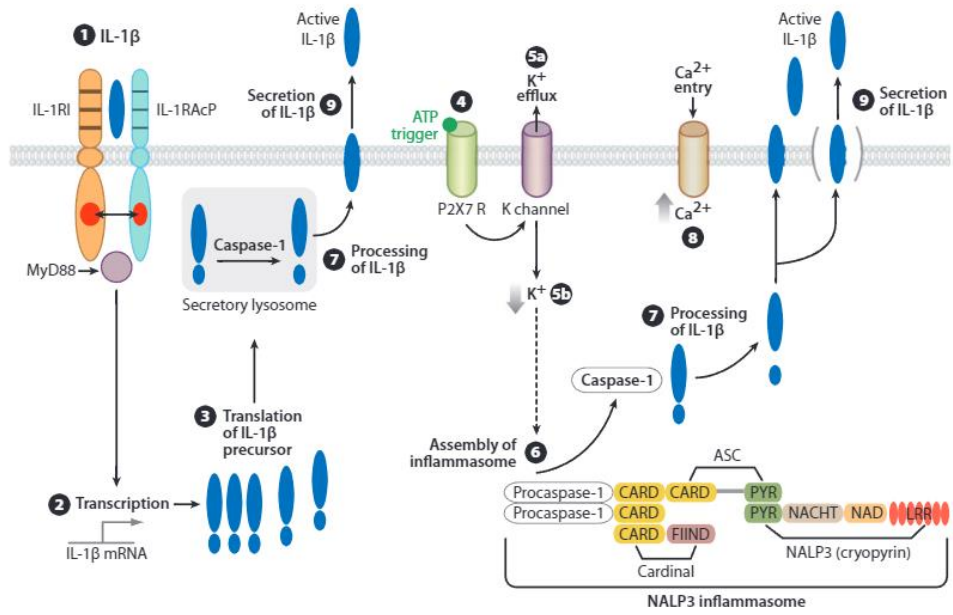
Non-kanonik yol: Lipopolisakkarit ile aktive olur ve farelerde kaspaz-11, insanlarda kaspaz-4/5 aktivasyonu GSDMD bölünmesine yol açar. Hücre içine potasyum akışı şekillenir ve kaspaz-1 aracılı IL-1 β ve IL-18 maturasyonu ve salınımı gerçekleşir.

Alternatif yol: Monositlere özeldir ve potasyum akışı şekillenmez. Reseptör etkileşimli serin/treonin protein kinaz 1 (RIPK1) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD)-kaspaz-8 yolağı devrededir.



Şekil 9. NLRP3 inflamazom aktivasyonu (Williams vd., 2022).

IL-1 β , ateş yükselmesine, vazodilatasyon ve immün hücrelerin inflamasyon alanına kolay infiltrasyonunu sağlayan güçlü bir pro-inflamatuardır (Kelley vd., 2019). IL-18, interferon-gama (IFN- γ) üretiminde ve adaptif bağışıklıkta rol alan bir sitokindir (Dinarello, 2009). IL-1 β üretim aşamaları ve salınımı Şekil 10’ da verilmiştir.



Şekil 10. IL-1 β üretimi ve salınımı (Dinarello, 2009); 1.İnflamatuar hücreler IL-1 β ile aktive edilir, IL1 reseptör kompleksi heterodimeri oluşur. Toll IL-1 reseptör (TIR-kırmızı alan) alanları yakınlılaşır ve MyD88 toplanır. 2.Transkripsiyon (sitozolde). 3.Öncü IL-1 β 'nın translasyonu (sitozolde). Aktive edilen inflammatuar hücre ATP yi hücre dışı boşluğa salar. 4.P2X7 reseptörü ATP ile aktive olur. 5.Hücre dışına potasyum akışı şekillenir. 6.Hücre içindeki potasyum düşüşü NLRP3 bileşenlerinin birraaya gelmesini indükler. 7.Aktif kaspaz-1, öncü IL1 β 'nın maturasyonunu sağlar. 8.Hücre içine Ca girişi. 9. IL-1 β salınımı

1.11.1. Diyabetik Nefropati ile NLRP3 İnflamazom Arasındaki İlişkisi

Diyabetik nefropati (DN) son dönem böbrek hastalığının önemli nedenlerindendir. Günümüzde mevcut terapilerin yetersiz olması yeni tedavi arayışlarını da beraberinde getirmektedir. DN tedavisinde özellikle renal hasarın gelişimini hedefleyen yeni terapötik stratejilerin belirlenmesi önemlidir. Böbrek dokusunda artan makrofaj infiltrasyonlarının progresif DN ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar nedeniyle yangısal süreçlerin DN' nin potansiyel modülatörleri olduğu düşünülmektedir (Awad vd., 2011; Chow vd., 2004). DN' de makrofaj birikimi ve aktivasyonu uzun süreli hiperglisemi, glomerular immun kompleks birikimi, artan böbrek kemokin üretimi önemli rol oynar. Yapılan deneysel çalışmalar inflammatuar hücre inhibisyonunun DN' de koruyucu etki gösterdiğini bildirmektedir (Chow vd., 2004). Makrofaj ve monositlerin endotel hücrelerine yapışarak aşırı sitokin salınımına neden olması DN patogeneze katkı sağlamaktadır (Awad vd., 2011). Bununla birlikte

inflamazomlar pro-IL-1 β ve pro-IL-18' in IL-1 β (interlökin-1 β) ve IL-18 (interlökin-18)' in olgun formlarına bölünmesinde önemli bir rol oynarlar (Shahzad vd., 2015). İnflamazomlar inflamasyonu uyaran patojen ile ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) ya da doku hasarı ile ilişkili moleküler kalıplarını (DAMP) tanıyan ve buna inflamatuvar hücrelerden IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salınmasını sağlayarak piroptozis aracılı hücre ölümüne yol açan büyük protein kompleksleridir. Dört farklı inflamazom kompleksi tanımlanmakla birlikte diyabetik nefropati ile ilişkisi rapor edilen inflamazom Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3)' tür (Swanson vd., 2019). Diyabetik nefropati (DN) patogenezinde, NLRP3 inflamazomunun giderek artan önemli bir yeri vardır (Qiu ve Tang, 2016). NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunun DN' yi şiddetlendirdiği bildirilmiştir. Sadece bağışıklık hücreleri değil, aynı zamanda podositler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve mezangiyal hücreler gibi intrinsik renal hücreler de sitokin salgılayabilir (Shahzad vd., 2015). NLRP3 endojen tehlike sinyallerini algılayabilir, kaspaz-1' in yanı sıra interlökin IL-1 β , IL-18 ve diğer sitokinlerin aktivasyonu ile sonuçlanır (Qiu ve Tang, 2016). Streptozotosin (STZ) ile indüklenen DN modelinde NLRP3 ve kaspaz-1 ekspresyonunda ve IL-1 β , IL-18 seviyesindeki artışın böbrek hasarına yol açtığı ve tedavide kullanılan quercetin ve allopurinol' ün renal NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu baskılayarak nefrotoksisitede iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Fu vd., 2017). Kronik hiperglisemi ile aktive olan NLRP3 inflamazomunun kalıcı inflamatuvar yanıt oluşturarak diyabetik nefropati gelişimine neden olabildiği ve diyabetik nefropatili sıçanlarda renal NLRP3, IL-1 β ve kaspaz-1 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Fu vd., 2017). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada DAMP ile intraperitoneal yangı uyarılmış ve tedavide organoboron bileşikler grubundan olan 2-aminoethoxy diphenylborinate (2APB) kullanıldığı ve 2APB' nin yanıt olarak IL-1 β salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Baldwin vd., 2017). Farelerde oksalat veya adenin açısından zengin diyetler tarafından indüklenen kristal nefropati modelinde böbrek fibrozu

NLRP3 inflamasyonunun spesifik bir inhibitörü CP-456,773 ile erken tedavisinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunun inhibe edilmesiyle böbrek fibrozunun zayıflatıldığı bildirilmiştir (Ludwig-Portugall vd., 2016). Yukarıdaki kanıtlar gösteriyor ki NLRP3 ve inflamatuvar faktörler DN oluşumu ve gelişimi sırasında böbreklere zarar verir. Böylece NLRP3 kaynaklı renal inflamatuvar hücre infiltrasyonunun önlenmesi, DN progresyonunu önlemenin yeni bir yolu olabileceğini düşündürmektedir (Samra vd., 2016).

3.12. PAR-1/Trombin Sinyal Yolağı

Hemostaz kan kaybının durdurulması için koagülasyon ve fibrinolizis arasındaki fizyolojik dengedir. Hemostazın dört evresi vardır; vasküler bütünlüğün bozulduğu tromboksan A2, serotonin, endotelin, norepinefrin gibi etkilerle vasküler kontraksiyonun gerçekleştiği vasküler faz, hasarlı endotel ve bağ dokudan von Willebrand faktörünün (vWF) salınımıyla trombositlerin birbirine ve hasarlı dokuya yapışmasıyla trombosit tıkaçının olduğu trombosit fazı, dolaşımdaki pıhtılaşma faktörlerinin doku faktörünün etkisi ile (İntrinsik yol-Kontakt Aktivasyon Yolu) yada kanın dışındaki doku faktörlerinin etkisi ile (ekstrinsik yol-doku faktörü yolu) yada ortak yol izlenerek bir dizi zimojen aktivasyon sonucunda gerçekleşen koagülasyon kaskadının şekillendiği koagülasyon fazı ve fibrinin yıkımlandığı fibrinoliz fazıdır (Zaidi ve Green, 2022).

Trombin sinyalini anlamak patolojik süreçlerde trombosit ve diğer hücrelerin nasıl etkilendiğini anlamak ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Serin proteaz sınıfı bir enzim olan trombin, hemostaz, yara iyileşmeleri, hastalık süreçleri ve tromboz olaylarında kilit role sahiptir. Çeşitli pıhtılaşma ve plazma faktörlerini aktive etme potansiyeline sahip olması yönüyle moleküler düzeyde güçlü hemostatik etkiye sahiptir. Ayrıca trombosit sekresyonu ve agregasyonunu indükler, makrofaj ve fibroblast gibi hücrelerde mitogeneze neden olması ve kemotaktik olması gibi yönleriyle güçlü bir hücre aktivatörüdür (Bode, 2006).

Proteazlar hücre davranışı ve programlı hücre ölümlerinin önemli düzenleyicileridir. Proteazlar hücre yüzeyi reseptörlerinden G-protein kenetli reseptörler (GPCR) ailesinde yer alan proteazla aktifleşen reseptörler (PAR) aracılı sinyalleme ile hücrelerle doğrudan iletişime geçerler. Vücutta geniş çapta eksprese edilirler. PAR' lar PAR-1/2/3/4 olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır. Bu reseptörler hemostaz, tromboz, rejenerasyon, inflamasyon gibi olaylarda fizyolojik görev alırlar. Ekstrasellüler matrikste proteolitik olarak kesimlenerek aktifleşirler. Aktive olduktan sonra G-protein aracılı ve diğer sinyal yollarını uyarırlar (X. Han vd., 2021).

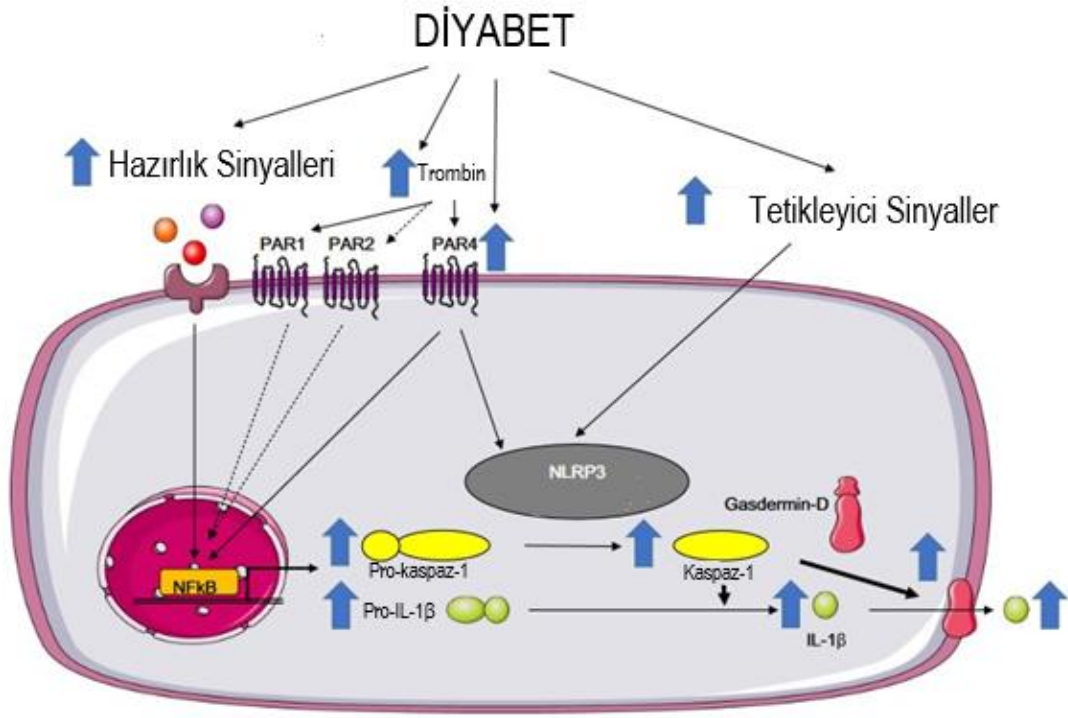
Trombinin hücrel etkileri G-proteinine kenetli reseptör olan trombin reseptörlerinin aktifleşmesiyle şekillenir. PAR-1 yedi transmembrandan oluşan, trombin tarafından aktive edilen G-proteinlerine kenetli reseptörler (GPCR) ailesine bağlı bir reseptördür (Coughlin, 2000). PAR-1' i aktive eden ilk protein trombin olduğu için trombin reseptörü olarak adlandırılır (X. Han vd., 2021). Ligand bağlanma yerine bir dizi proteolitik bölünme gerektirir (Waasdorp vd., 2016). PAR-1 glomeruler endotelyum, mezangiyal ve epitel hücrelerde ve interstisyel renal damar endotelyumunda eksprese edilir (Coughlin, 2000).

Trombin sinyali ve PAR' lar patolojik süreçlerde kilit role sahiptir. Trombin bir dizi zimojen dönüşümü gerektiren pıhtılaşma kaskadının baş efektörü bir serin proteazdır. Bahsettiğimiz pıhtılaşma kaskadında trombin oluşumu; normal şartlarda dolaşımdan uzak olan doku faktörlerinin (doku tromboplastin-faktör III) doku hasarı ve/veya vasküler sızıntı durumunda plazma pıhtılaşma faktörleriyle teması ile protrombinin trombine aktive olmasıyla şekillenir (Coughlin, 2000).

3.12.1. Diyabetik Nefropati ile PAR-1 /Trombin Sinyal Yolağı Arasındaki İlişki

DN' de üriner trombin konsantrasyonu arttığında proteazla aktive olan reseptörlerin (PAR) aşırı uyarılması hücre içi Ca^{++} artışı ve apoptoza yol açmasını takiben proteinüri ve

glomeruler hasar ile sonuçlanır (Antoniak vd., 2017). Trombin ve reseptörü proteazla aktive olan reseptör-1 (PAR-1) vasküler endotelial hasarlarda ve kronik hastalıklarda önemli rol oynadığı için trombin/ PAR-1 sinyali diyabetik nefropati komplikasyonlarında da rol oynayabilir (Antoniak vd., 2017). Deneysel çalışmalar DN' de PAR-1' in fibroblast proliferasyonunun aktivasyonuna ve ekstraselüler matriks üretimine yol açtığını göstermiştir (Isermann vd., 2007; Palygin vd., 2016). STZ ile indüklenen diyabetik fare modelinde, PAR-1 mRNA' nın renal ekspresyonunun diyabetik olmayan farelere kıyasla daha yüksek olduğu ve PAR-1 eksikliği olan farelerde diyabetik nefropatinin azaldığı bildirilmiştir (Waasdorp vd., 2016). Wild tip farelerde kalıcı hiperglisemi durumunun böbrekte artan PAR-1 mRNA seviyesine neden olduğu, tüm nefropati biyobelirteçlerinin wild tip farelere kıyasla PAR-1 eksikliği olan farelerde önemli ölçüde azaldığı, sonuçta da PAR-1' in diyabetik nefropatiyi arttırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada böbrek dokusunun histopatolojik yönden incelenmesi sonucunda PAR-1 eksikliğin böbrek hasarını azalttığı ifade edilmiştir (Waasdorp vd., 2016). Yine aynı çalışmanın İn vitro kısmında PAR-1 aktivasyonunun mezangiyal genişlemeyi doğrudan etkilediği gösterilmiştir (Waasdorp vd., 2016). Ayrıca diyabet durumunda trombin ile aktive edilen PAR1' in NF- κ B aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonuna sebep olabilmektedir (Fender vd., 2020) (Şekil 11).



Şekil 11. Diyabette trombin ile aktive edilen PAR1' in NF- κ B aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyon modeli (Fender vd., 2020).

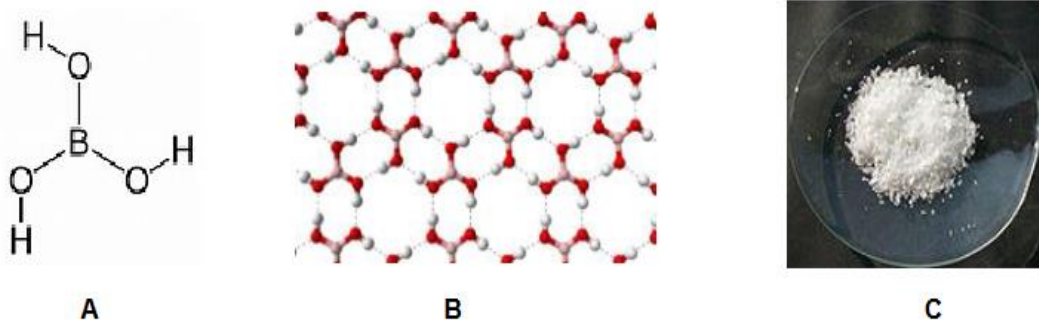
3.13. Borik Asit

Bor doğada element halinde bulunur ve “B” ile simgelenir. Periyodik cetvelde 3A grubuna aittir ve grubundan farklı olarak metal ile ametal arası yarı iletkenidir. Bor madeni beyaz bir kaya görünümünde, sert yapıda ve ısıya dayanıklıdır. Bor kristali ise sarımsı kahverengi olup gevrek ve parçalanabilir haldedir. Doğada element halinde bulunmaz, oksijen ile bağlı bulunurlar. Bor’ un oksijenle yaptığı bileşiklere borat denilir. Yer kabuğunda borat ve borosilikatlar olarak bulunurlar (Uçkun, 2013).

Bor ve türevleri seramik, cam, kozmetik, kimya, deterjan, makine sanayisi, askeri ve zırhlı araçlar dahil otomotiv sanayisinde, tarım, tekstil, kağıt, elektronik ve bilgisayar sanayi, inşaat alanı, enerji sektörü, plastik sanayi, metalurji, nükleer sanayi ve tıp alanında kullanılmaktadır (Hadrup vd., 2021; Tanaka ve Fujiwara, 2008; Uçkun, 2013; Woods, 1994).

Yaklaşık 230 bor türevi vardır (Uçkun, 2013). Bor minerallerinin sınıflandırılmasına yönelik bir literatür bulunmamakla birlikte doğal boratlar (tinkal, kolemanit, üleksit, vb.), rafine boratlar (boraks pentahidrat, boraks dekahidrat, susuz boraks, borik asit, vb.), özel bor kimyasalları (elemental bor, bor karbür, bor halidler, inorganik boratlar, organobor bileşkileri vb.), birincil bor kimyasallar (sodyum boratlar, kalsiyum boratlar vb.), bor türevleri (elementer bor, bor halidler, inorganik boratlar, fluoroboratlar, organoboronlar vb.) gibi tanımlamalar mevcuttur (TENMAK BOREN, 2024).

En yaygın olarak borik asit formuna rastlanılmaktadır ve kimyasal formülü H_3BO_3 ya da $B(OH)_3$ ’ dır (Şekil 12). Borosik asit yada ortoborik asit olarak da isimlendirilir (Pal, 2018).

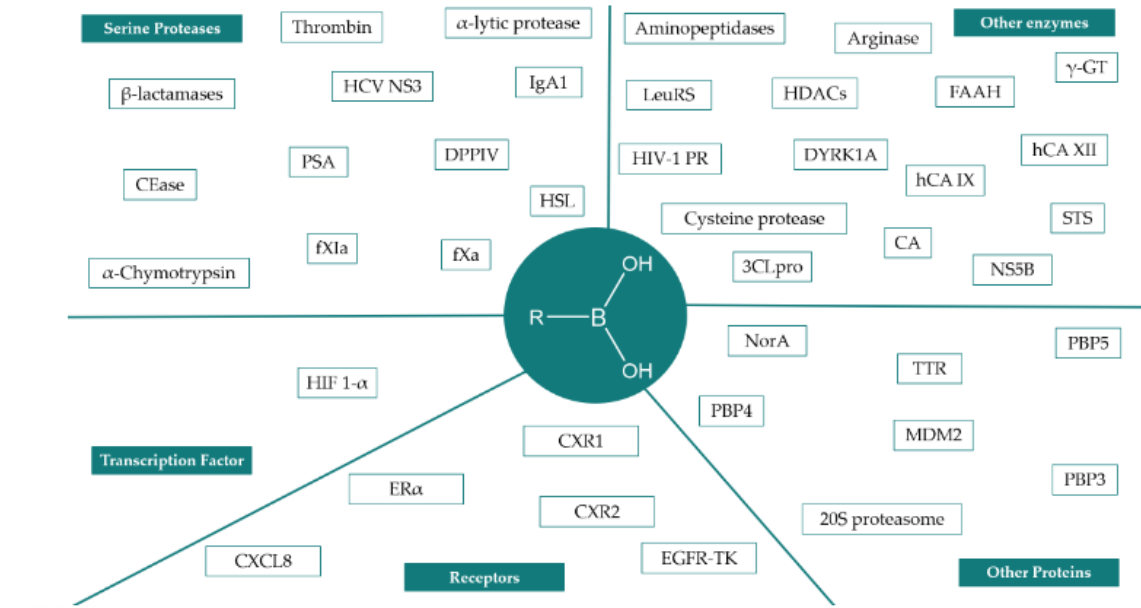


Şekil 12. Borik asidin yapısı. A. borik asit kimyasal yapısı, B. katı haldeki paralel katmanlar, C. kristal formu (Pal, 2018).

Borik asit doğada yaygın olarak bulunan, canlıların birçok yaşam fonksiyonu için gerekli temel bir mikro besindir. Gıda ile fizyolojik miktarlarda bor alımı hücre yenilenmesi, gelişimi ve metabolik süreçlerde oldukça faydalıdır (Hunt, 1998; Park vd., 2005). Borun mineral ve hormon metabolizması, antioksidan savunma sistemi ve immun sistemde çok önemli görevlere sahip olduğu bildirilmektedir. Organizmada hidroksil grubuyla çeşitli bileşiklerle kompleks yapı oluşturur ve şeker türevleri ve çeşitli enzimlerle tepkimeye girer (Khaliq vd., 2018).

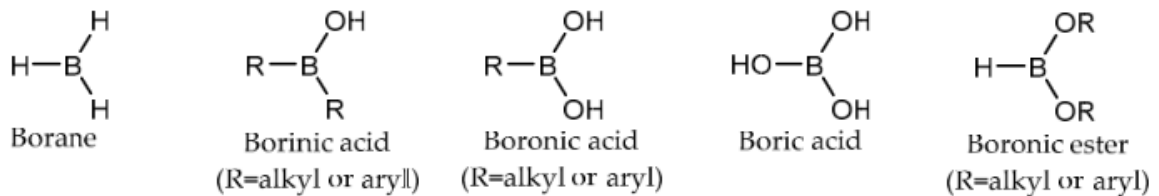
Bor bileşikleri oral yolla alındığında gastrointestinal sistemde borik asite çevrilir ve bu şekilde emilerek kan yolu ile dokulara dağılır. En yoğun kemik dokuda, en az ise adipoz dokuda dağılım gösterir. Vücuttan büyük çoğunluğu idrar ile atılır. Sprague Dawley ratlarda borik asit letal dozu (LD₅₀) oral gavaj ile 3,45 g/kg' dır (Weir ve Fisher, 1972).

Uzun yıllar toksik olduğu düşüncesiyle bor üzerinde çalışma yapılmamıştır ancak son yıllarda kanser tedavisinde proteozom inhibitörü olarak bortezomib'in keşfiyle bor türevlerine ilgi artmıştır (Silva vd., 2020). Borik asitin çeşitli serin proteazları inhibe ettiği bilinmektedir (Sağlam vd., 2013). Boronik asitler serin, histidin ve lisin bora bir çift elektron vererek amino asit kalıntılarıyla geri dönüşümsüz etkileşime girerek inhibisyonu sağlar (Whyte vd., 2013). Borik asit karbona yapısal olarak benzediği için yapısında karbon bulunan; peptidazlar, proteazlar, proteozomlar gibi enzim ve birçok substrat için inhibitör görevi gören hafif bir organik Lewis asidi olması yönüyle önemlidir (McAuley vd., 2011). Borik asit trombinin Ser-195' i ile reaksiyona girebilen elektrofilik gruplara sahip düşük molekül ağırlıklı doğal trombin inhibitörüdür (Kibirev ve Gershkovich, 1999; Smoum ve ark., 2012).



Şekil 13. Boronik asitin moleküler hedefleri : Serin Proteazlar: Dipeptidil Peptidaz IV(DPPIV), Faktor Xa (fXa) ve XIa, Hepatitis C Virus (HCV) NS3, Hormon-sensitif lipaz (HSL), IgA1 proteaz, Pankreatik kolesterol esteraz (CEase), Prostat spesifik antijen (PSA), Trombin, α-Kimotripsin, α-litic proteaz, β-laktamaz. Diğer enzimler: Aminopeptidaz, Arginaz, human Karbonik anhidraz IX (hCA IX), hCA XII), Sistin proteaz, Yağ Asidi Amid Hidrolaz (FAAH), Histon deasetilaz (HDACs), HIV-1 Proteaz (HIV-1 PR), Lösil-tRNA sentetaz (LeuRS), RNA bağımlı RNA polimeraz NS5B (NS5B), Tirozin Kinaz DYRK1A (DYRK1A), Steroid sulfataz(STS), γ-Glutamil transpeptidaz (γ-GT), 3C benzeri proteaz (3CLpro). Proteinler: Murine double minute 2 (MDM2), NorA efflux pump (NorA), Penisilin bağlayıcı protein 3 (PBP3), PBP4, PBP5, Transtiretin (TTR), 20S proteazom. Transkripsiyon faktörleri: Hypoxia-inducible factor 1-α (HIF 1-α). Reseptörler: Kemokin reseptörleri 1 (CXCR1), CXCR2, CXCL8, Epidermal büyüme faktör reseptör tirozin kinaz (EGFR-TK), Östrojen Reseptör α (ERα) (Silva vd., 2020).

Kolay hazırlanabilen, çok yönlü reaktivite ve stabilite gösteren organobor bileşikleri ilaç tasarımı yönünden geniş uygulama alanına sahiptir. Bu bileşikler çevre dostu yeşil bileşik olan borik asite indirgenmesi sonucunda vücuttan kolay elimine edilir. Pek çok organoboron bileşiği bulunmaktadır ve borik asit bunlardan biridir (Şekil 13, Şekil 14) (Silva vd., 2020).



Şekil 14. Organobor bileşiklerinin kimyasal yapısı (Silva vd., 2020).

Ratlar üzerinde i.p. 50mg/kg/gün tek doz STZ verilerek deneysel diyabet modeli oluşturulan bir araştırmanın tedavi grubu olarak 28 gün boyunca gastrik gavaj yoluyla 5, 10 ve 20 mg/kg/gün boron verildiği ve boron uygulanan ratlarda adacık hücrelerinin yapısını koruduğu, serum glukoz seviyesinde %8-17 oranında azalma görüldüğü bildirilmiştir (Coban vd., 2015).

Borik asitin mineral ve hormon metabolizması, antioksidan savunma sistemi ve immun sistemde çok önemli görevlere sahip olduğu bildirilmektedir (Eren, 2004). Ratlarda 350 ppm ve altındaki miktarlarda boronun toksikolojik yan etkiye yol açmadığı bildirilmiştir (Weir ve Fisher, 1972). Embriyogeneizde optimum gelişimi ve reproduksiyon için, kemik gelişimi ve bileşimi için, göz gelişimi ve bileşimi için, beyin işlevi ve bilişsel performans için borun gerekliliğini düşündüren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca derin yara iyileşmelerinde fayda sağladığı, hatta eksikliğinde bazı kanser türlerindeki insidansın arttığı bildirilmiştir (Nielsen, 2002). Oksidatif hasarı azalttığı, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir (Nielsen, 2017). Bor, enerji substrat metabolizması için gerekli enzim aktivitelerinde etkilidir. Borun hidroksil gruplarıyla (transferazlar) nikotamid adenin dinükleotid (NAD) koenzimi ve polisakkaritler, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit ve piridin nükleotidleri gibi organik moleküllerle kompleks oluşturma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Borun çeşitli metabolit ve enzimlerle reaksiyona girebilmesi memelilerde mineral ve enerji metabolizması üzerine etki edebileceğini düşündürmektedir (Kabu ve Akosman, 2013). 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulan bir çalışmada Wistar Albino ratlara oral gavaj ile borik asit tedavisi yapmıştır. 10 mg/kg borik asit tedavisi yapılan grupta canlı ağırlık, plazma insülin seviyesi ve lipaz aktivitesi yönünden artış olduğu MDA (Malondialdehit) seviyesinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Cakir vd., 2018). Başka bir çalışmada ise Sprague Dawley ratların standart yemine 100 mg/kg dozlarında borik asit ve boraks takviyelerinin antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirdiği bildirilmiştir (Ince

vd., 2010). Yapılan bir çalışmada hastaneye gelen 40 yaş üstü sağlıklı, diyabetik ve obez diyabetik hastalardan alınan kan örneklerinde çeşitli biyokimyasal parametrelere bakarak kandaki bor düzeyinin karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Buna göre serum bor düzeylerinin karbonhidrat metabolizmasını etkilediği ve bor takviyesinin diyabet tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Demirdogen, 2020). Borun enerji substrat metabolizması yolağını inhibe eden enzimlerin yapısında bulunduğu ve karaciğerde glikolitik mekanizmayı etkileyebileceği bildirilmiştir (Hunt, 1994). Dört hafta oral gavaj ile 100 mg/kg borik asit takviyesinin oksidatif stresi azaltarak tubül epitellerini apoptoza karşı koruduğu bildirilmiştir (Cikler-Dulger ve Sogut, 2020). Wistar ratlarda parasetamol ile indüklenen nefrotoksisite üzerinde yapılan bir çalışmada 50-100-200 mg/kg dozda bor uygulamasının antioksidan kapasite üzerinde koruyucu bir etkisi olabileceği görüşü bildirilmiştir (Özkan ve Karabağ, 2020). Deneysel olarak uygulanan borik asit tedavileri sonucunda Wistar ratlarda borik asit ve boraksın böbrekte apoptotik hasarı azalttığı bildirilmiştir (Hazman vd., 2018). Sprague Dawley albino rata sağ böbrek nefrektomisi uygulandıktan 15 gün sonra i.p 50-100-200 mg/kg borik asit uygulanmasının ardından sol böbreğe iskemi/reperfüzyon (I/R) şekillendirilen bir çalışmada antiapoptotik, antiinflamatuvar ve antioksidan parametreler incelendiği ve sonuç olarak 200 mg/kg dozda uygulanan BA grubunda belirgin olarak önemli farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (Kar vd., 2020). Sprague Dawley sıçanların 50 dakikalık iskemiye ve ardından üç saatlik reperfüzyona tabi tutularak böbrek I/R hasarının oluşturulduğu bir çalışmada propolis ve borik asitin birlikte antioksidan, anti-inflamatuvar ve antiapoptotik ajan olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Geyikoglu vd., 2019). Cıvcivler üzerinde yapılan deneysel çalışmada pankreasta insülin salınımını arttırdığını, antijen enjeksiyonuyla tetiklenen artrit çalışmasında diyetinde bor takviyesi olan grupta daha az şişlik, kanda daha çok nötrofil, natural kiler hücreler ve

CD8a1/CD42 hücre konsantrasyonlarının yoğun olması bağışıklık sistemini dengeleyen bir rolünün olduğunu göstermektedir (Hunt ve Idso, 1999).



4.GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hayvan Deneyleri

Çalışmada, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) temin edilen, 60 adet, 10 haftalık, erkek, Sprague Dawley (SD) ratlar kullanıldı. Çalışma için gerekli etik izin Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (27.01.2021, Karar No: 2021/02).

Tüm hayvanlara standart fare yemi ve çeşme suyu *ad-libitum* olarak verildi. Ratlar standart oda sıcaklığında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) tutuldu ve 12:12 saatlik gece gündüz döngüsü uygulandı. Kullanılacak hayvanların ortama uyum sağlamaları için 1 hafta adaptasyon süreci uygulandı.

Diyabetik hayvanların bakımında, glukozüri, poliüri ve polidipsi özellikleri dikkate alınarak günde iki defa içme suyu ve yeme erişim, kafes hijyeni açısından kontrol edildi ve hayvan refahına özen gösterildi.

4.1.1. Hayvanların Gruplandırılması

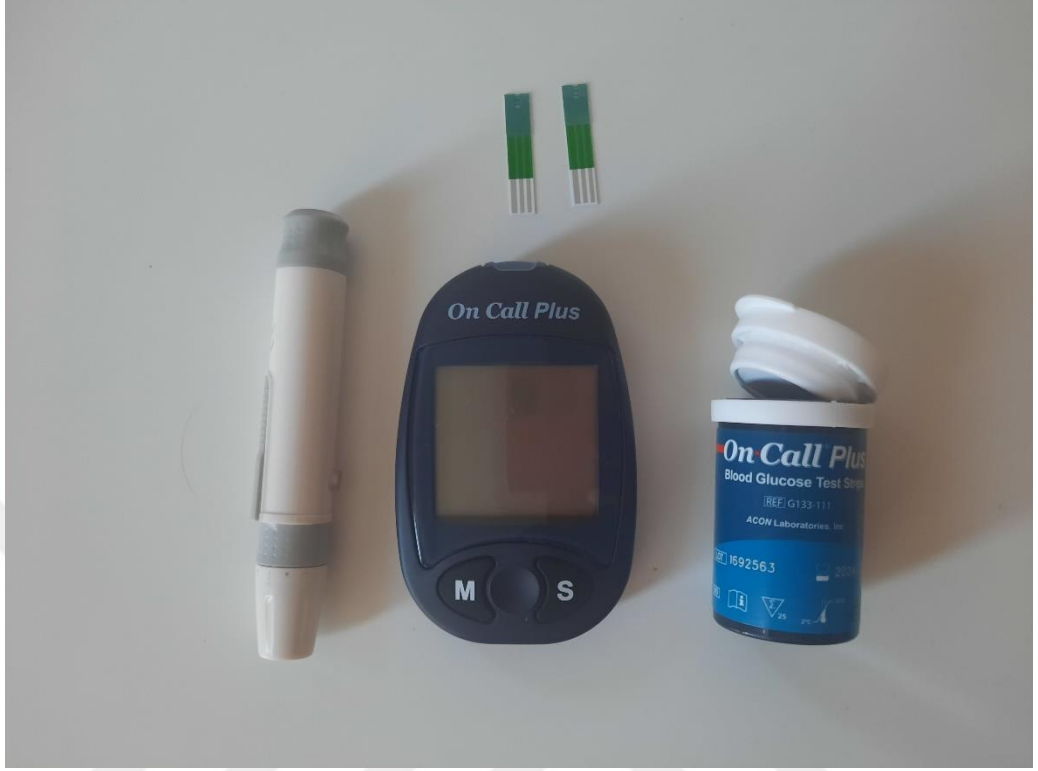
Altmış adet rat, her grupta 10 rat olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Bunlar; Kontrol (K), Streptozotsin (STZ), STZ+İnsülin (STZ+İ), STZ+50 mg/kg borik asit (STZ+BA₅₀), STZ+100 mg/kg borik asit (STZ+BA₁₀₀), STZ+200 mg/kg borik asit (STZ+BA₂₀₀) olacak şekilde oluşturuldu (Tablo 3). Ratlar, deneysel araştırma boyunca laboratuvar hayvanları bakım ve kullanım şartlarına uygun olarak ayrı kafeslerde bakıldı (Şekil 15).



Şekil 13. Deney hayvanlarının gruplandırılması, kafeslendirilmesi ve muhafaza edilmesi

4.1.2. Deney Hayvanlarına Yapılan Uygulamalar

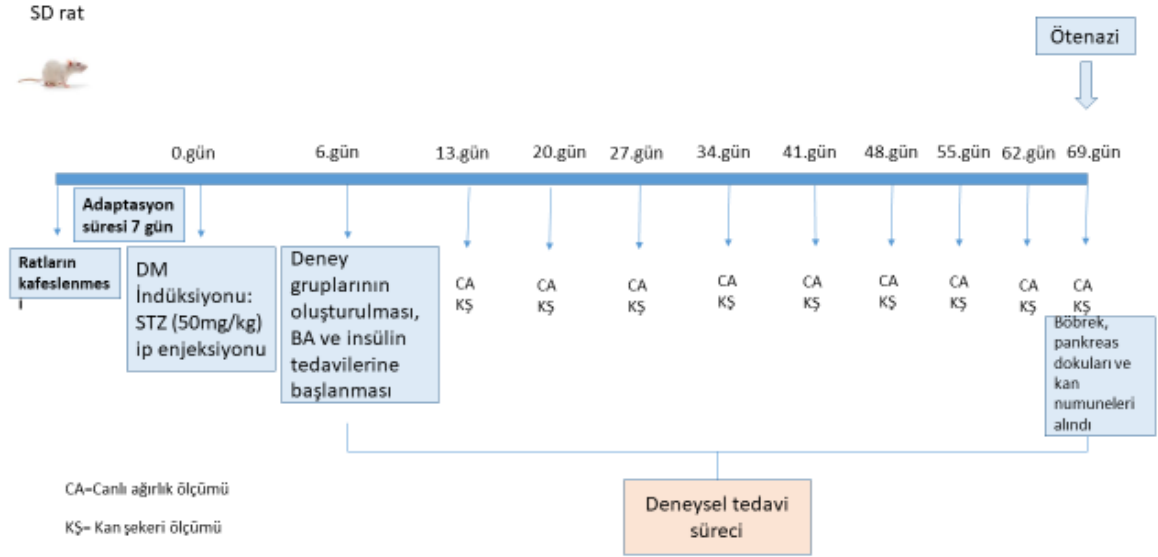
Kontrol grubu dışındaki 50 adet rata, 50 mg/kg tek doz Streptozotosin (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, A.B.D.) intraperitoneal (ip) yolla enjekte edildi (0.gün). Streptozotosin (STZ) enjeksiyonundan 24 saat sonra oluşabilecek hipoglisemi ile hayvan kaybını önlemek amacıyla 1 gün süreyle ratların içme sularına %15 glukoz takviyesi yapıldı. Diyabet indüksiyonundan altı gün sonra, gece boyunca (14-16 saat) aç bırakılarak açlık kan glukoz (AKG) seviyesi ölçüldü. AKG seviyelerini belirlemek için her hayvanın kuyruk veninden lanset kullanılarak kan alındı (6. gün). Kan alımını takiben kan alınan bölge antiseptik solüsyon ile dezenfekte edildi. Kalibre edilmiş bir glikometre cihazı (On Call Plus, ACON Laboratories, A.B.D.) ve uyumlu stripleri kullanılarak kan glukoz seviyeleri belirlendi (Şekil 16). AKG seviyesi 250 mg/dl üzeri olan ratlar diyabetik olarak kabul edildi. 6.gün borik asit (Tekkim Kimya Sanayi Tic. Ltd. Şti., Bursa, Türkiye) ve insülin tedavilerine başlandı (Şekil 17).



Şekil 14. Çalışmada kullanılan glukometre cihazı görseli

Tablo 3. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve yapılan uygulamalar

Denek		
Gruplar	Sayısı (n)	Uygulama
Kontrol Grubu (K)	10	0.5ml/100g(canlı ağırlık) Serum Fizyolojik i.p.
STZ Grubu (STZ)	10	50mg/kg(canlı ağırlık) STZ (tek doz) i.p.
Diyabet+İnsülin (STZ+İ)	10	50mg/kg(canlı ağırlık) STZ (tek doz) i.p. + 1 ünite/100gr insülin (sc.). (63gün)
STZ+Borik Asit (STZ+BA ₅₀)	10	50mg/kg(canlı ağırlık) STZ (tek doz) i.p. + 50 mg/kg borik asit oral gavaj. (63gün)
STZ+Borik Asit (STZ+BA ₁₀₀)	10	50mg/kg(canlı ağırlık) STZ (tek doz) i.p. + 100 mg/kg borik asit oral gavaj. (63gün)
STZ+Borik Asit (STZ+BA ₂₀₀)	10	50mg/kg(canlı ağırlık) STZ (tek doz) i.p. + 200 mg/kg borik asit oral gavaj. (63gün)



Şekil 15. Çalışmada kullanılan deneysel prosedürün şematik tablosu

4.1.3. Deney Hayvanlarına Uygulanan Kimyasallar ve Hazırlanmaları

4.1.3.1. Streptozotosin Solüsyonu Hazırlanması ve Uygulanması

Toz halinde ki STZ karanlıkta ve -20°C ' de saklandı. STZ, uygulamadan hemen önce taze olarak 0.1 M ve pH' sı 4.5 sitrat tampon içinde çözündürülerek hazırlandı ve $+4^{\circ}\text{C}$ ' de ışıktan korundu.

Sitrat tamponu ise 0,68 gr sitrik asit monohidrat ve 0,51 gr. sodyum sitrat tribazik tartılarak 500 ml distile suda çözündürülüp pH' sı 4,5' e ayarlandı. Hazırlanan STZ-sodyum sitrat çözeltisi 30 saniye boyunca vortekslendi ve ratlara tek doz 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.) yolla 15 dakika içinde uygulandı.

4.1.3.2. Borik Asit Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması

Günlük hazırlanmasına dikkat edilen borik asit, günlük sonda ile her rat için 0,5 ml serum fizyolojik içinde çözündürülerek hazırlanan 50-100-200 mg/kg/gün dozlarda borik asit solüsyonu deneme gruplarının oluşturulması ile eş zamanlı olarak (STZ enjeksiyonunun 6.gününde) oral gavaj yolu ile verilmeye başlandı ve deney sonuna kadar her sabah 09:00' da uygulamaya devam edildi.

4.1.3.3. İnsülin Uygulanması

Diyabet+insülin grubuna STZ enjeksiyonundan 6 gün sonra insülin uygulamasına başlandı ve deney sonuna kadar günlük 1 ünite/100 gr dozda orta etkili NPH (Neutral Protamine Hagedorn) insülin (# HI0319, Humulin-N, Lilly France S.A.S., Fransa) kullanıldı. Hesaplanan doz ikiye bölünerek sabah 09:00 ve akşam 17:00 saatlerinde günde 2 kez deri altı yolla uygulandı (Pugliese vd., 1994).

4.1.4. Araştırmanın Sonlandırılması

Çalışmanın 69. gününde ratlara ötenazi yapıldı. Deneme süresince 9 rat olası diyabetik komplikasyonlar nedeniyle öldü. Kontrol grubunda 9, STZ grubunda 9, STZ+İ grubunda 7, STZ+BA₅₀ grubunda 8, STZ+BA₁₀₀ grubunda 9, STZ+BA₂₀₀ grubunda 9 rat deney süresini tamamladı. Haftalık canlı ağırlıkları (CA) ve AKG seviyeleri ölçüldü.

Deneme sonunda ötenazi edilen ratlardan böbrek dokusu alındı. Böbrek ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı. Her iki böbrek koronal düzlem boyunca kesildi. Sağ ve sol böbreklerin yarısı patolojik incelemeler için %10 tamponlu formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Böbreklerin diğer yarısı ise serolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere taze olarak -20°C' de saklanmak üzere alındı.

Ötenazi edilen ratlardan temiz, kuru tüplere ve biyokimyasal analizler için serum tüplerine juguler venden kan numuneleri alındı. Serum elde etmek için +4°C’ de 10.000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Serum örnekleri ependorf tüplere konularak analiz zamanına dek -20°C’ de muhafaza edildi.

4.1.4.1. Canlı Ağırlık Ölçümü

Deney başlangıcında ve deney sonuna kadar haftalık olarak ratların canlı ağırlıkları tartılarak kaydedildi (Tablo 9).

4.1.4.2. Rölatif Böbrek Ağırlığı Ölçümü

Deney sonunda ratlardan alınan sağ ve sol böbreklerin ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Rölatif böbrek ağırlığının hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı (Ra vd., 2020).

$$\text{Rölatif Böbrek Ağırlığı} = \frac{\text{Sağ + sol böbrek ağırlığı}}{\text{Canlı ağırlık}} \times 100$$

4.2. Histopatolojik Analizler

4.2.1. Histokimyasal Analizler

Böbrek ve pankreas dokuları %10'luk formalin solüsyonuna alınarak 48 saat tespit işlemi gerçekleştirildi ve standart doku takip kasetlerine (#0106-1100-16, Cıtotest labware manufacturing co.) alındı. Rutin takip işlemleri (dehidrasyon, şeffaflaştırma, parafinleme) yapıldı (Leica TP1020, Almanya) ve parafin bloklara gömüldü (Leica EG 1160, Almanya). Rotary mikrotom kullanılarak 3-5 µm kalınlığında kesitler alındı (Leica RM 2255, Almanya). Kesitler otomatik doku boyama makinesinde hematoksilin-eosin yöntemi ile boyamaya tabi tutuldu (Leica Autostainer XL, Almanya). Ayrıca glomeruler hasarın (mezangiyal genişleme ve glomeruloskleroz) değerlendirilmesi amacıyla Periodic Acid-Schiff (PAS) boyama yöntemi kullanıldı. Preparatlar en az 20 glomerulus olacak şekilde incelendi. Hazırlanan tüm preparatlar taranarak 0' dan 5' e kadar derecelendirildi. Tübüler ve glomeruler hasarın değerlendirilmesi ve skorlanması Tablo 4' te belirtilen şekilde yapıldı (C. Zhang vd., 2019).

Değerlendirme ve görüntüleme için Leica DFC500 (Heerbrugg, İsviçre) kamera ile sabitlenmiş ve Leica Application Suit V4.12 programı ile desteklenmiş Leica DM5500 B ışık mikroskobu kullanıldı.

Tablo 4. Tübüler ve glomeruler hasarın derecelendirilmesi

Derecelendirme	Glomeruler ve tübüler hasar
0	Normal/hasar yok
1	<%10' unu içeren hasar
2	<%10-20' unu içeren hasar
3	<%20-30' unu içeren hasar
4	<%30-40' unu içeren hasar
5	>%40' unu içeren hasar

4.2.2. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Avidin-Biotin Kompleks (ABC) İmmunohistokimya yöntemi kullanıldı (Hsu vd., 1981). Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler ksilende deparafinize ve azalan dereceli alkollerde dehidre edildikten sonra sırasıyla distile suda 5 dakika, pH' ı 7.6 olan fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)' da 5 dakika yıkandı. Antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılması için uygulanan "ısı aracılı antijen retrieval" işlemi 750 W dalga boyuna ayarlanmış mikrodalga fırında sitrat tampon (pH=6.0) içinde uygulandı. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra PBS ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için %3' lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) içerisinde 5 dakika muamele edildi. PBS' de 3 kez 5 dakika (3x5 dakika) yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için oda sıcaklığında 10 dakika UV Blok (%3 Bovine Serum Albümin) solüsyonunda bekletildi. Antikor sulandırma

solüsyonu (Thermo Fischer Scientific, Superfrost, Massachusetts, A.B.D.) ile farklı dilusyonlarda sulandırılarak hazırlanmış poliklonal/monoklonal antikörler (Rabbit polyclonal anti-NLRP3 primer antikoru (#bs-10021R, Bioss Inc.) 1:200 dilüsyonda, rabbit poliklonal anti-kaspaz-1 primer antikoru (#E-AB-65717, Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin) 1:100 dilüsyonda, mouse monoklonal anti-NK- $\kappa\beta$ p65 primer antikoru (#E-AB-22066, Elabscience Biotechnology Wuhan, Çin) 1:200 dilüsyonda, mouse monoklonal anti-VEGF primer antikoru (#MA1-16629, Invitrogen ThermoFisher Scientific, A.B.D.) 1:50 dilüsyonda, rabbit poliklonal anti-PAR-1 primer antikoru (#PAC939Ra01, Cloud-clone) 1:200 dilüsyonda, anti-ki67 primer antikoru (#FNab09788, Fine Biotech, Wuhan, Çin) 1:100 dilüsyonda +4°C’ de 1 gece (18 saat) inkübe edildi. PBS’ de 3 kez 10 dakika (3x10 dakika) yıkanan kesitlere 37°C’ de 30 dk süreyle biyotin ile konjuge sekonder antikör uygulandı. PBS’ de 3 kez 10 dakika (3x10 dakika) yıkandıktan sonra kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatılıp 30 dakika inkübe edildi. PBS’ de 3 kez 10 dakika (3x10 dakika) yıkanan kesitler, sinyalleri görselleştirmek için 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) veya 3,3’Diaminobenzidine (DAB) kromojenleri ile boyandıktan sonra distile su ile reaksiyon sonlandırılıp yıkandı. Takiben Harris Hematoksilen ile zıt boyama yapılarak distile sudan ve hızlıca alkol serilerinden geçirildikten sonra havada kurutularak ksilene konuldu. Su bazlı yapıştırıcı (AEC ile boyananlar) veya entellan (DAB ile boyananlar) ile kapatılarak mikroskopik incelemeleri yapıldı.

4.2.2.1. Immunohistokimyasal Boyamanın Semi-Kantitatif Değerlendirilmesi

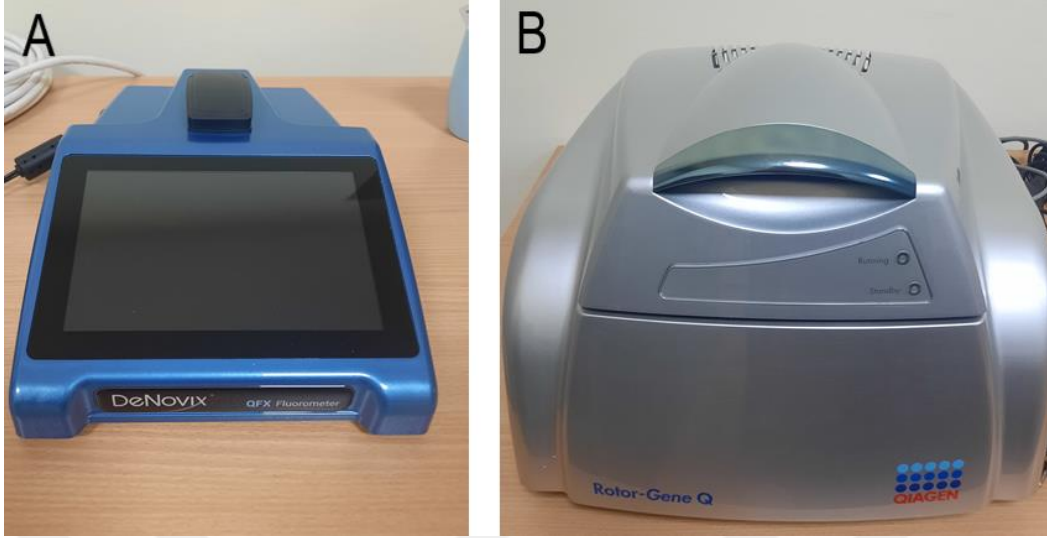
Yapılan çalışmalar esas alınarak tüm gruplarda NLRP3, kaspaz-1, NK- $\kappa\beta$, VEGF, PAR-1 ve ki67 ekspresyonları Tablo 4’ te gösterilen immunohistokimyasal değerlendirme parametreleri temel alınarak değerlendirildi. Kombine immunohistokimyasal skora=boyanma yoğunluğu $\times$ boyanma yaygınlığı formülü ile hesaplandı. Boyanma indeksine göre 0-6 arası nihai toplam puan düşük ekspresyon ifadesi olarak kabul edilirken;

7-12 arası toplam puan yüksek ekspresyon ifadesi olarak kabul edildi (Mustafa, 2022; Shi vd., 2021; Tanji vd., 2000).

Tablo 5. İmunohistokimya Skorlama Parametreleri

İmmünopozitif Hücre Boyanma Yoğunluğu	İmmünopozitif Hücre Yaygınlığı
0=boyanma yok	0=%0 immünopozitif hücre
1=zayıf boyanma	1=%1-25 immünopozitif hücre
2=orta boyanma	2=%26-50 immünopozitif hücre
3=güçlü boyanma	3=%51-75 immünopozitif hücre
	4=%76-100 immünopozitif hücre

4.3. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)



Şekil 16. Çalışmada kullanılan cihazlar. A. florometre, B. Rotor-Gene Q rotary thermal cycler cihazı

4.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve RNA İzolasyonu

Böbrek örnekleri RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) ile muamele edilip -20°C ' de muhafaza edildi. Doku örnekleri yaklaşık 30 mg olacak şekilde tartılarak 1:5 oranında steril PBS karışımı eklenerek doku parçalayıcı ile homojenize edildi. Homojenizatlardan, RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak ve aşamaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini DeNovix QFX Florometre (Denovix Inc., Wilmington, A.B.D.) cihazı kullanılarak belirlendi.

4.3.2. RNA' dan cDNA Sentezi

Bu bölümün her aşaması cold block üzerinde yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinden, RT² First Strand cDNA Sentezis kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici talimatına uygun olarak cDNA sentezi yapıldı. 1 μl RNA' da 100 nanogram konsantrasyon olacak şekilde ayarlama yapıldı. Genomik DNA eliminasyon karışımı (RNA

+ Buffer GE 2µl + DNAs/RNAs içermeyen su <20µl= 20µl total hacim) 5 dakika 42°C’ de inkübe edildi. Genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her bir tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı (5xbuffer BC3 4µl + Control P2 1µl + RE3 Reverse Transcriptase Mix 2µl + DNAs/RNAs içermeyen su 3µl = 10µl total hacim) eklendi ve pipetleme yapıldı. 42°C’ de 15 dakika thermal cycler cihazında inkübe edildi. Ardından, 95°C’ de 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında reaksiyon sonlandırıldı.

4.3.3. Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Ölçümü

Çalışma Syber Green tabanlı bir çalışma olup, gen ekspresyon master mix kiti (#.330500, RT² SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen,) kullanıldı. Toplam iki hedef gen (PAR-1 ve NLRP3), bir referans gen (beta aktin: ACTB) olmak üzere üç gen üzerinden gerçekleştirildi.

Araştırılması planlanan PAR-1 ve NLRP3 gen ifadeleri düzeylerinin ölçülmesi için doğrulaması yapılmış primerler (#PPR42797C, #PPR56639A, #PPR06570C; RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) kullanıldı.

Real Time PCR reaksiyonları her örnek ve her gen bölgesi için üç tekrar şeklinde yapıldı.

Her bir örnek için master mix karışımları Tablo 6’ da belirtilen hacme göre hazırlandı. Hazırlanan master mix karışımları Real-time PCR cihazında (Rotor-Gene Q, Qiagen, Hilden, Almanya) Tablo 7’ de belirtilen protokole göre analiz edildi.

Tablo 6. PCR Protokolü

RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT ² qPCR Primer Assay	1 µl
RNAs içermeyen su	10.5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 7. Termal Döngü Koşulları

PCR başlangıç aktivasyonu	95 °C- 10 dk	1X
Denatürasyon Bağlanma/Uzatma	95 °C- 15 sn	40X
Melt Curve (Erime Eğrisi)	60 °C- 30 sn	1X

4.3.4. 2^{-ΔΔCT} Metodu Kullanılarak qRT-PCR Ürünlerinin Hesaplanması

Gerçekleştirilen RT-PCR sonucu elde edilen döngü eşik (Ct) değerleri Rotor-Gene Q Real-Time PCR cihazının yazılımı “Rotor-Gene Q Software” (Qiagen, Hilden, Almanya) içinde yer alan “Delta delta CT relative quantitation” aracı kullanılarak $\Delta\Delta Ct$ ’ ye çevrildi. Hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyelerindeki nispi değişiklikler için endojen kontrol olan ACTB gen ekspresyonuna göre normalize edildi.

Ayrıca gerçekleştirilen qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden Tablo 8’ de belirtilen formüller ile ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri ayrı ayrı hesaplanarak doğrulaması yapıldı (Pfaffl, 2001). Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 8. $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin hesaplanması

$$\Delta Ct = Ct (\text{ilgilenilen gen}) - Ct (\text{housekeeping gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{böbrek dokusu}) - \Delta Ct (\text{normal kontrol dokusu})$$

$$\text{Hedef gen ekspresyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.4. Western Blot Analizleri

Böbrek örnekleri mekanik homojenizatör yardımıyla içerisinde 0,5 M Tris, EDTA (pH: 7,4), β -Merkaptoetanol, soybean tripsin inhibitör, fenil metil sülfonil florid (PMSF) ve NP-40 bulunan lizis tamponu kullanılarak 4°C’ de 30 dakika boyunca homojenize edildi. Ardından 4°C’ de 45 dakika boyunca 15.000 rpm’ de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Dokulara ait PAR-1, kaspaz-1, NLRP3, NF- $\kappa\beta$ protein numuneleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak %12’ lik jelde göç ettirildi ve jeldeki proteinler western blot yöntemiyle nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran 60 dakika boyunca %2’ lik süt tozu çözeltisi ile bloke edildi ve rabbit anti-PAR-1 (#PAC939Ra01, Cloud-clone), rabbit anti-kaspaz-1 (# MAB592RA21, Cloud Clone), rabbit anti-NLRP3(#bs-10021R, Bioss Inc.), rabbit anti-P(Ser536)NF- $\kappa\beta$ p65 (#E-AB-22066,

Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin) primer antikorlarıyla +4°C’ de gece boyunca inkübe edildi. Proteinler goat anti rabbit IgG (H+L) (#E-AB-1003, Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin), goat anti mouse IgG (H+L) (#E-AB-1001, Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin), sekonder antikorlarından uygun olanı seçilerek tespit edildi. İmmunreaktif ışımaları görüntülemek için infrared görüntüleme sistemi uygulanarak protein ekspresyon düzeylerini belirlemek için otomatik analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, A.B.D.) kullanıldı.

4.5. Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA) Analizleri

4.5.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

-20°C’ de saklanan renal doku örnekleri çalışma günü oda sıcaklığına gelene kadar yaklaşık 20 dakika bekletildi, PBS (pH 7,2–7,4) ile yıkanarak fazla kandan uzaklaştırıldı, 1-2 mm parçalar halinde doğranıp homojenize edildi. Deiyonize su (1000 mg/mL) ile dilüe edildi. Ardından 20 dakika boyunca x 3000 rpm’ de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA (Bicinchoninic Acid) protein kolorimetrik test kiti (#E-BC-K318-M, Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda protein tayini yapıldı.



Şekil 17. Çalışmada kullanılan spektrofotometre cihazı ve mikroyıkayıcı

4.5.2. IL-18 Tayini

IL-18 ölçümü, rat IL-18 Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) kiti (#201-11-0118, Elabscience Biotechnology, Wuhan, Çin) kullanılarak 0.472 ng/L analiz hassasiyeti ve 0.5ng/L-150ng/L analiz aralığı ile yapıldı. Kitin kullanım kılavuzuna uygun olarak numune ve standartlar hazırlandı. Standartlar duplike çalışılarak yukarıdaki konsantrasyonlarına ve karşılık gelen optik dansite (OD) değeri alındı, kalibrasyon eğrisi çizildi. Standart eğri doğrusal regresyon denklemi hesaplanarak tüm numunelerin serum konsantrasyonları ölçüldü.

+4°C' de saklanan IL-18 ELİSA test kit reaktiflerinin çalışma günü oda sıcaklığına gelmesi için oda ısısında yaklaşık 30 dakika bekletildi. Test kitinden çıkan 96 kuyucuklu plâga kontrol solüsyonları ve zero standart olarak belirlenen 6. kuyucuğa dilüent eklendi. Standart kuyucukların dışında kalan her kuyucuğa 40 µl hazırlanan süpernatantlar, 10 µl IL-18 antibody eklendi. Zero standart dışındaki kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP conjugate eklenerek 37°C' de 60 dakika inkübe edildi. 30x yıkama solüsyonu seyreltilerek otomatik yıkama cihazında 4 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Ardından 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B kromojen solüsyonları eklenerek karanlık ortamda 37°C' de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek analiz sonlandırıldı ve mikropate okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak optik dansitesi ölçüldü (Şekil 19).

4.5.3. IL-1β Tayini

IL-1β ölçümü, rat IL-1β ELISA kiti (Elabscience Biotechnology, Çin, katalog no: 201-11-0120) kullanılarak 20.118 pg/L analiz hassasiyeti ve 25pg/L-8000pg/L analiz aralığı ile yapıldı. Kitin kullanım kılavuzuna uygun olarak numune ve standartlar hazırlandı.

Standartlar standart dilüent ile sulandırılarak hazırlandı. Standartlar duplike çalışarak konsantrasyonlarına ve karşılık gelen OD değeri alınarak, kalibrasyon eğrisi çizildi. Standart eğri doğrusal regresyon denklemi hesaplanarak tüm numunelerin serum konsantrasyonları ölçüldü.

+4 °C’ de saklanan IL-1 β ELİSA test kiti reaktiflerinin çalışma günü oda sıcaklığına gelmesi için oda ısısında yaklaşık 30 dakika bekletildi. Test kitinden çıkan 96 kuyucuklu plağa kontrol solüsyonları ve zero standart olarak belirlenen 6. kuyucuğa dilüent eklendi. Standart kuyucukların dışında kalan her kuyucuğa 40 μ l hazırlanan süpernatantlar, 10 μ l IL-1 β antibody eklendi. Zero standart dışındaki kuyucuklara 50 μ l Streptavidin-HRP conjugate eklenerek 37°C’ de 60 dakika inkübe edildi. 30x yıkama solüsyonu seyreltilerek otomatik yıkama cihazında 4 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Ardından 50 μ l substrat A ve 50 μ l substrat B kromojen solüsyonları eklenerek karanlık ortamda 37°C’ de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak her kuyucuğa 50 μ l stop solüsyonu eklenerek analiz sonlandırıldı ve spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak OD değeri ölçüldü.

4.5.4. Trombin Aktivitesinin Tayini

Trombin aktivitesi, Thrombin Activity Assay Kit (#ab234620, Abcam, A.B.D) kullanılarak yapıldı. Kitin kullanım kılavuzuna uygun olarak numune ve standartlar hazırlandı. Bir kısmı +4°C’ de ve bir kısmı -20°C’ de saklanan kit reaktifleri ve -20°C’ de tutulan kan serumu örnekleri çalışma günü oda sıcaklığına getirildi. Test kitinden çıkan 96 kuyucuklu plağa kontrol solüsyonları ve zero standart olarak belirlenen 6. kuyucuğa diluent eklendi. Standart kuyucukların dışında kalan her kuyucuğa 10 μ l hazırlanan serum örnekleri, 65 μ l diluent ve 25 μ l trombin substratı eklendi. 405 nm dalga boyunda okutuldu. Ardından plaka, buharlaşmayı önlemesi bakımından sızdırmazlık özelliği bulunan bir band ile kapatılarak 37°C’ de inkübe edildi. 2 saat boyunca her 30 dakikada bir 405 nm dalga

boyunda absorbansı okutuldu. Her standart ve örnek için ikili okumaların ortalaması hesaplandı.

4.6. Biyokimya Analizleri

4.6.1. İdrar Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Deney sonunda ratlara perineal masaj yapılarak alınan idrar örneğinden keton cisimciğinin ölçümü için yarı kantitatif reaktif çubuklar (Urinalysis Reagent Strips, Laboquick) kullanıldı.

4.6.2. Kan Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Deney sonunda alınan serum örneklerinden kreatinin, BUN (Blood Urea Nitrogen), üre ve ürik asit analizleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında otoanalizör kullanılarak yapıldı.

4.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanıldı. Sonuçların tümü sürekli değişkenlerdi ve ortalama ($\bar{x}$) $\pm$ standart sapma (ss) olarak özetlendi. Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığını görmek için Shapiro-Wilk W testi kullanıldı. Ayrıca normal dağılımı test etmek için kurtosis ve skewness testi kullanıldı. Varyansların homojenlik varsayımını test etmek için ise Levene/Welch testleri kullanıldı. p değeri 0.05' ten büyük olan ölçüm varyanslarının homojen dağıldığı kabul edildi. Normal dağılım gösteren ölçümlerin gruplar arasındaki farklılıklarını karşılaştırmak için Tek Yönlü Varyans Analizi (one-way ANOVA) testi ardından ve eşit varyansa sahip sayısal ölçümlerin gruplar arası karşılaştırılması Tukey post-hoc analizi, eşit varyansa sahip olmayan sayısal

ölçümlerin gruplar arası karşılaştırılması için Games-Howell post-hoc analizi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal Wallis testi yapıldı. Bu karşılaştırmalarda anlamlı bulunan durumlar için grupların ikili karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltmesi yapılmış Mann Whitney U testi uygulandı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $p<0.05$ olarak alındı. Grafik çizimi için GraphPad 8.0 Prism (La Jolla, CA) yazılımı kullanıldı.



5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

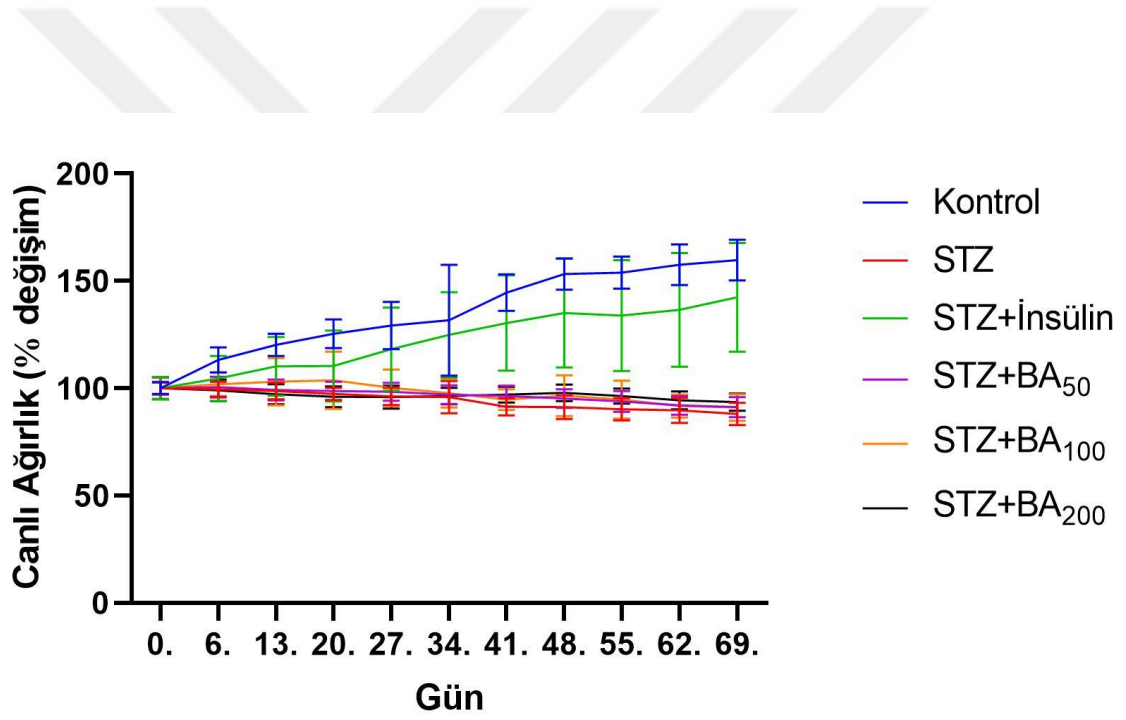
Kontrol grubu hariç, tüm diyabet modeli geliştirilen gruplarda poliüri, polifaji, polidipsi gibi klinik semptomlar tespit edildi. Bununla birlikte STZ grubunda diğer gruplara kıyasla bu semptomlar daha fazlaydı. Diyabetik ratların tüylerinde seyrelme ve donukluk, derisinde kuruluk belirtileri deney sonuna doğru artarak devam etti. Ayrıca bazı ratlarda sinirlilik, huzursuzluk, saldırganlık, depresyon, durgunluk gibi davranış değişiklikleri görüldü (Şekil 20).



Şekil 18. Diyabet grubuna ait ratlar

5.2. Canlı Ağırlık Bulguları

Deneyin başında ve sonunda ratların canlı ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol grubu ve insülin tedavisi alan diyabetik (STZ+insülin) grupta sırasıyla yaklaşık %60, %42 oranında canlı ağırlık artışı olduğu gözlemlenirken; STZ grubunda yaklaşık %12 oranında, BA tedavisi alan diyabetik gruplarda (STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀) yaklaşık olarak sırasıyla %8.8, %8.9 ve %6.4 oranlarında canlı ağırlıklarda düşüş olduğu gözlemlendi ($p<0.001$; Tablo 9; Şekil 21).



Şekil 21. BA' in diyabetik ratlarda % canlı ağırlık üzerindeki etkisi. Ortalamalar ve standart hatalar dikey çubuklarla temsil edilmiştir.

Tablo 9. Deney sonu gruplar arası canlı ağırlık ortalamaları (gr.)

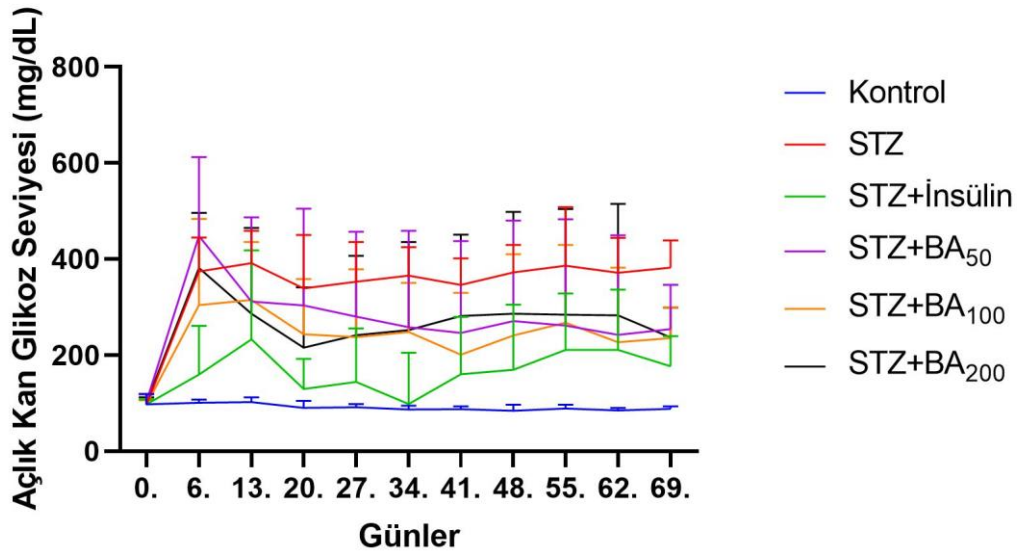
Kontrol		STZ		STZ+İnsülin		STZ+BA ₅₀		STZ+BA ₁₀₀		STZ+BA ₂₀₀	
x ± ss	n	x ± ss	n	x ± ss	n	x ± ss	n	x ± ss	n	x ± ss	n
402,1±24,2 ^a	9	185,3±10,9 ^c	9	318,6±56,9 ^b	7	204,00±10,31 ^c	8	207,33±13,89 ^c	9	208,00±8,79 ^c	9

Veriler gram ölçüsüyle ve ortalama ± standart sapma (x ± ss) olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir (p<0,001; F=105.414). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Games Howell post hoc testi kullanıldı.

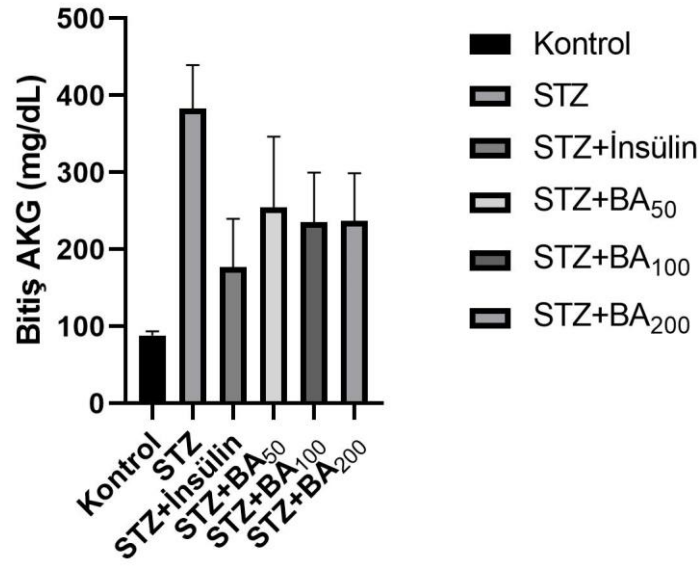
5.3. Açlık Kan Glukoz Seviyesi Bulguları

Deneyin 0. günü tüm hayvanların glisemisi normal aralıktaydı ve gruplar arasında AKG seviyeleri bakımından önemli bir fark yoktu ($p>0,05$). STZ uygulamasının 6. günü yapılan AKG ölçümü sonucunda kontrol grubuyla STZ+insülin grubunda anlamlı bir farklılık olmadığı ancak STZ grubu ve borik asit tedavisi alan diyabetik grupların AKG seviyelerinde önemli artış olduğu dikkati çekti ($p<0,05$)(Şekil 22).

Deney sonunda AKG seviyesi STZ grubundaki diyabetik hayvanlarda, kontrol grubu hayvanlarına göre yaklaşık 4,3 kat daha fazlaydı ($p<0,001$). Kontrol grubu ile STZ+insülin grubu arasında AKG düzeyleri bakımından benzerlik olduğu görüldü ($p>0,05$). Bununla birlikte STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi grupları ile STZ+İnsülin grubu arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($p>0,05$)(Şekil 23; Tablo 10).



Şekil 19. BA' in diyabetik ratlarda açlık kan glukoz seviyeleri (mg/dL) üzerindeki etkisi. Ortalamalar ve standart hatalar dikey çubuklarla temsil edilmiştir.



Şekil 203. BA' in diyabetik ratlarda 69. gün açlık kan glukoz seviyeleri (mg/dL) üzerindeki etkisi. Ortalamalar ve standart sapmalar dikey çubuklarla temsil edilmektedir. a,b,c farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$).

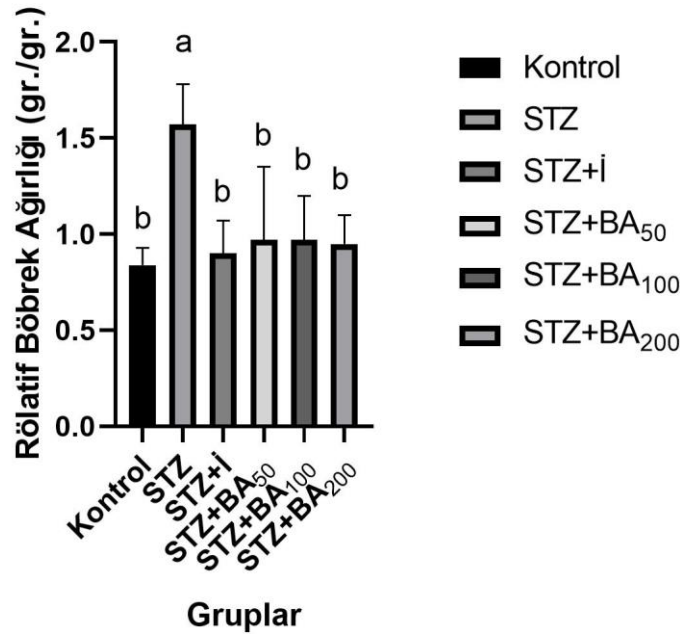
Tablo 10. Gruplar arası açlık kan glukoz seviyesi ortalamaları.

Gün	Kontrol		STZ		STZ+İ		STZ+BA ₅₀		STZ+BA ₁₀₀		STZ+BA ₂₀₀	
	Ort ± ss	n	Ort ± ss	n	Ort ± ss	n	Ort ± ss	n	Ort ± ss	n	Ort ± ss	n
0.	97,9 ± 21,2	10	96,4 ± 22,4	10	97,5 ± 10,8	10	103,4 ± 16,4	10	96,9 ± 9,4	10	100,8 ± 11,4	10
6.	100,7 ± 7,1	10	374,0 ± 71,3	10	159,7 ± 101,1	10	448,2 ± 164,4	10	304,5 ± 179,0	10	381,8 ± 114,4	10
13.	102,2 ± 10,1	10	391,6 ± 67,7	10	233,1 ± 185,4	9	311,9 ± 175,3	10	315,2 ± 120,3	10	286,3 ± 178,8	10
20.	90,6 ± 14,2	10	338,9 ± 111,2	10	129,6 ± 62,5	9	303,5 ± 201,7	10	243,4 ± 115,1	10	215,6 ± 125,1	10
27.	91,5 ± 6,6	10	353,0 ± 82,5	10	144,6 ± 111,1	9	280,3 ± 176,8	9	237,9 ± 140,9	9	241,4 ± 165,9	10
34.	87,1 ± 8,0	9	365,7 ± 59,6	10	98,6 ± 106,6	8	258,1 ± 200,7	9	248,1 ± 102,1	9	252,3 ± 183,5	9
41.	87,4 ± 6,2	9	346,0 ± 55,4	10	160,0 ± 119,5	8	246,2 ± 191,5	9	200,8 ± 128,7	9	281,8 ± 169,1	9
48.	84,6 ± 12,2	9	372,5 ± 57,1	10	169,9 ± 135,1	7	270,9 ± 209,5	9	241,1 ± 169,1	9	286,4 ± 211,8	9
55.	88,7 ± 8,0	9	386,3 ± 122,3	9	210,9 ± 117,2	7	261,5 ± 221,5	8	267,6 ± 162,3	9	284,3 ± 219,8	9
62.	84,9 ± 5,6	9	371,6 ± 73,0	9	211,0 ± 125,6	7	242,5 ± 207,2	8	227,0 ± 155,4	9	282,9 ± 231,9	9
69.	88,3 ± 5,3 ^c	9	382,6 ± 56,7 ^a	9	176,9 ± 62,7 ^{b,c}	7	254,3 ± 92,3 ^b	8	235,6 ± 64,2 ^b	9	236,7 ± 62,1 ^b	9

Veriler mg/dL ölçü birimi ve ortalama ± standart sapma (x ± ss) olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.001$, F=21.611). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.4. Rölatif Böbrek Ağırlığı Bulguları

Kontrol grubu ratlar ile insülin tedavisi ve farklı dozlarda BA tedavisi gören ratlar arasında önemli bir farklılığın olmadığı görüldü ($p>0,05$). STZ grubuna ait rölatif böbrek ağırlığında artış gözlemlendi ($p<0,001$). STZ grubuyla kıyaslandığında Kontrol, STZ+İ, STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ gruplarında rölatif böbrek ağırlığının önemli düzeyde azaldığı anlaşılmıştır ($p<0,001$). Kontrol ve STZ+İ grupları ile kıyaslandığında; STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ grupları ile aralarında benzerlik olduğu görüldü ($p<0,001$)(Şekil 24; Tablo 11).



Şekil 214. BA' in diyabetik ratlarda rölatif böbrek ağırlığı üzerindeki etkileri. Ortalamalar ve standart sapmalar dikey çubuklarla temsil edilmektedir. ^{a,b} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$).

Tablo 11. Gruplar arası böbrek ağırlığı ortalamaları (gr.)

GRUPLAR	ort.	ss.	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	0,84 ^b	0,09	9	12,935	0.001
STZ	1,57 ^a	0,21	9		
STZ+İ	0,90 ^b	0,17	7		
STZ+BA ₅₀	0,97 ^b	0,38	8		
STZ+BA ₁₀₀	0,97 ^b	0,23	9		
STZ+BA ₂₀₀	0,95 ^b	0,15	9		

Veriler gram (gr.) ölçü birimi ve ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) olarak verilmiştir. ^{a, b} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.001$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.5. Histopatolojik Bulgular

5.5.1. Pankreas Dokusu Histopatolojik Bulguları

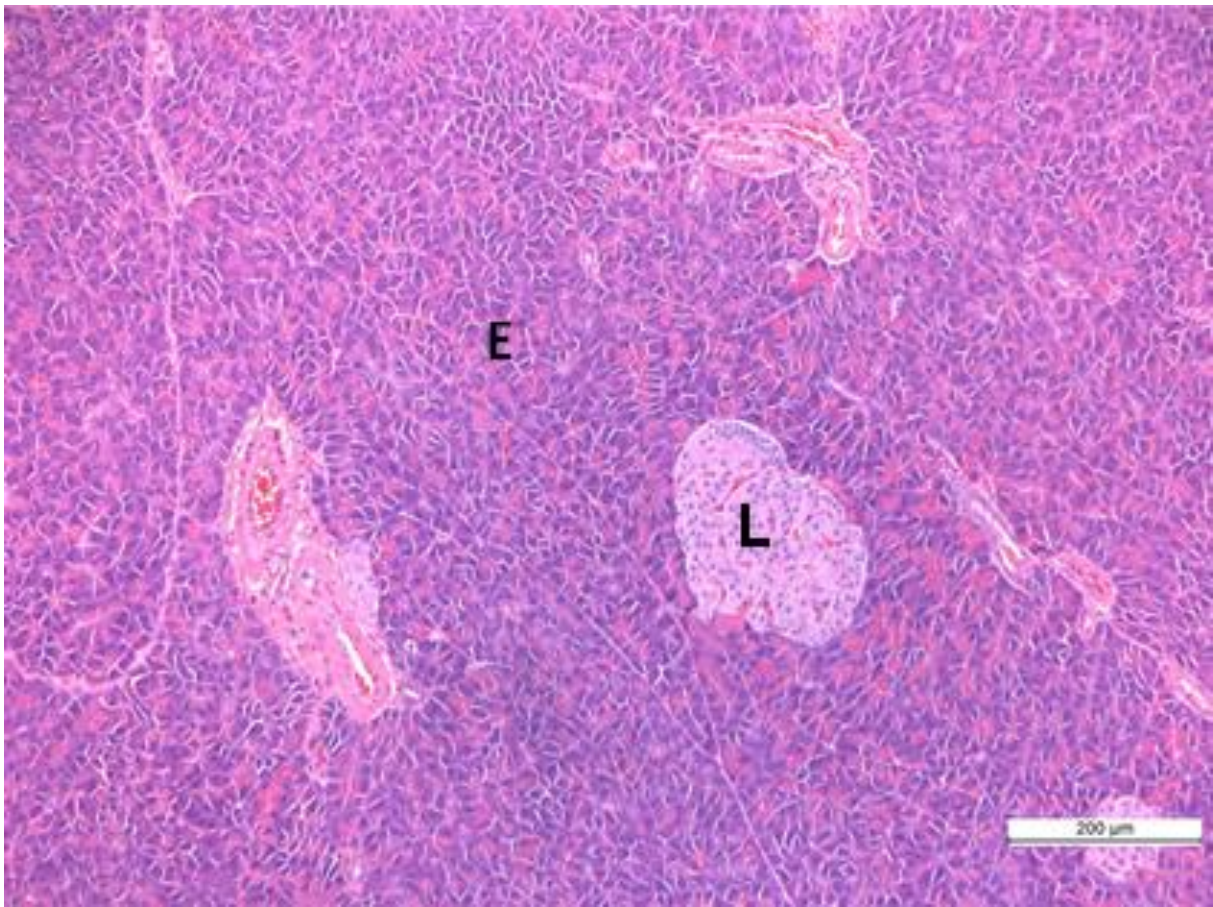
Kontrol grubunda pankreas normal lobüler yapıdaydı. Pankreas endokrin ve ekzokrin parankimal yapılarının tipik mimarisini yansıttığı görüldü. Langerhans adacıkları ekzokrin asinüsler arasında belirgin bir kontur ile ayrılmış geniş soluk oval bölgeler olarak rahatlıkla ayırt edildi. Langerhans adacıklarının, interlobüler bağ dokusunun, duktusların, kan damarlarının normal olduğu görüldü. Adacıkların yapısında, soluk boyanan β hücre ve çok sayıda piramidal asiner hücreler ve kılcal damarlar etrafında bulunan küresel büyük asidofilik hücreler mevcuttu (Şekil 25).

Sadece STZ uygulanan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan diyabet grubuna ait doku kesitlerinde patolojik bulgular mevcuttu. Endokrin ve ekzokrin bölgeler arasındaki sınır belirsiz hale gelmiş ve pankreatik lobüller yapı bozulmuş durumdaydı. Langerhans adacıkları sayıca azdı ve hücresel yoğunluğu az olduğu için güçlkle ayırt edildi. Adacık çapında belirgin küçülmeler ile karakterize bir dejenerasyon tablosu dikkati çekti (Tablo 12, 13). Langerhans adacık hücrelerinin sitoplazmasının koagülize, vakuollü veya lize olduğu nekrotik değişiklikler ayrıca yer yer hafif şiddette kanama alanları tespit edildi. Beta hücrelerinin çekirdeklerinin; piknotik, hipokromatik ve yer yer karyolizisli olduğu görüldü. Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil 26, 27).

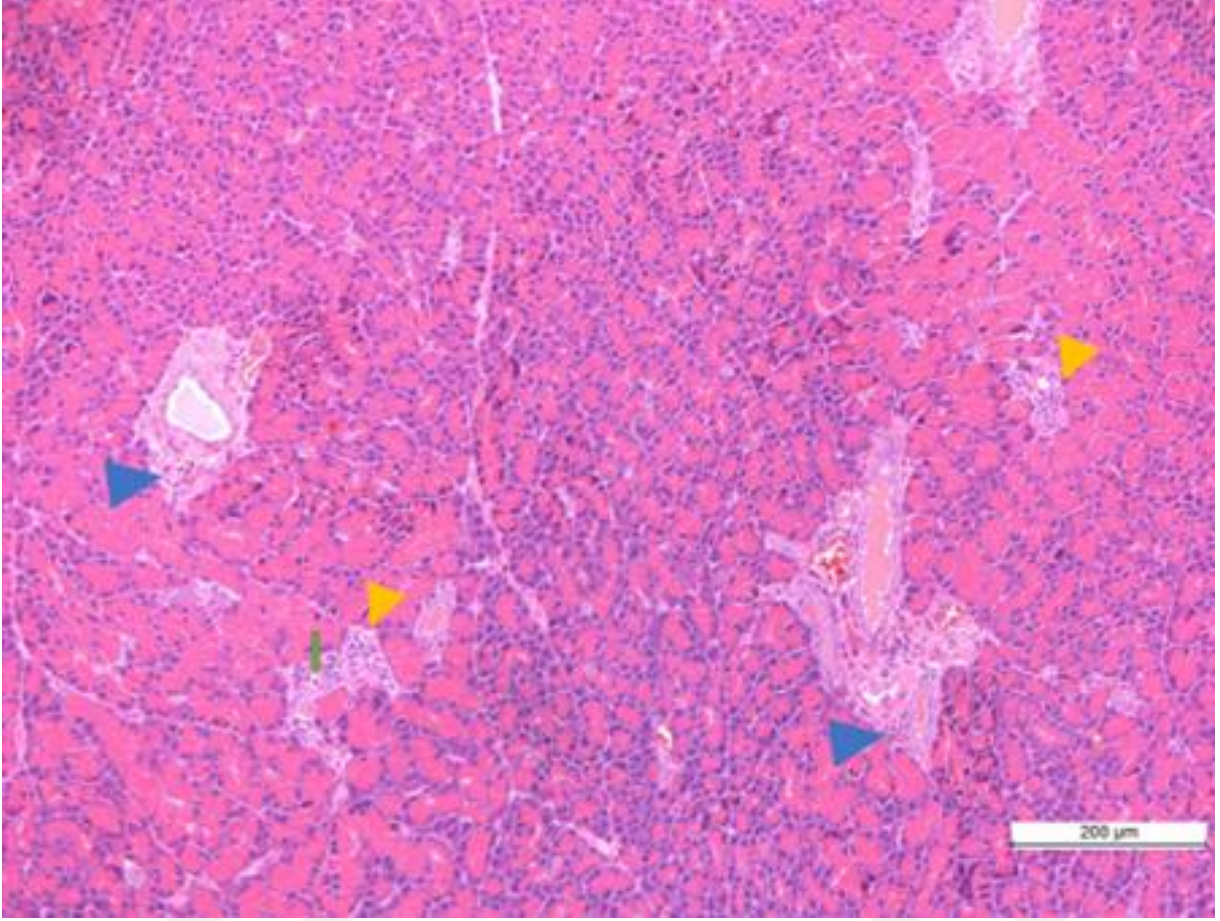
STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀, STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında piknotik veya soluk çekirdekli dejenere hücre sayısının diyabet grubuna göre nispeten daha az olduğu dikkati çekti. BA tedavisi alan diyabetli ratlarda vasküler yapı diyabet grubuna kıyasla daha hafifti. Ekzokrin parenkim diyabet grubuna göre daha iyi bir yapıya sahipti. STZ+BA₂₀₀ tedavi grubunda diğer

tedavi gruplarına göre az sayıda mononükleer inflamatuvar hücre birikimleri mevcuttu (Şekil 28).

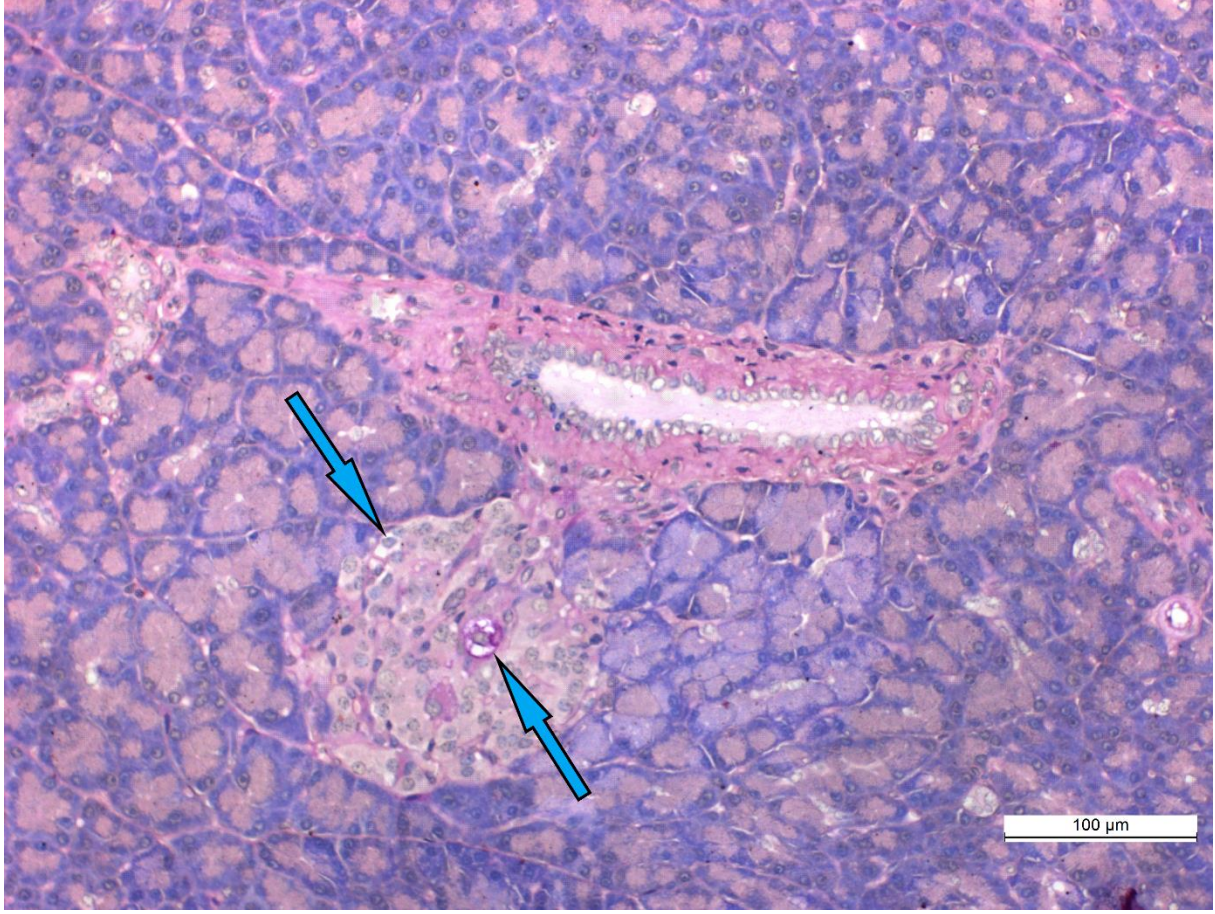
Kontrol grubu ve STZ+insülin grubu pankreasları ile karşılaştırıldığında diyabetik pankreasta glikojen birikiminin bir göstergesi olarak PAS-pozitif materyallerde (magenta plaklar) artış olduğu görüldü. Tedavi gruplarında bu durumun kısmen azaldığı dikkati çekti (Şekil 29).



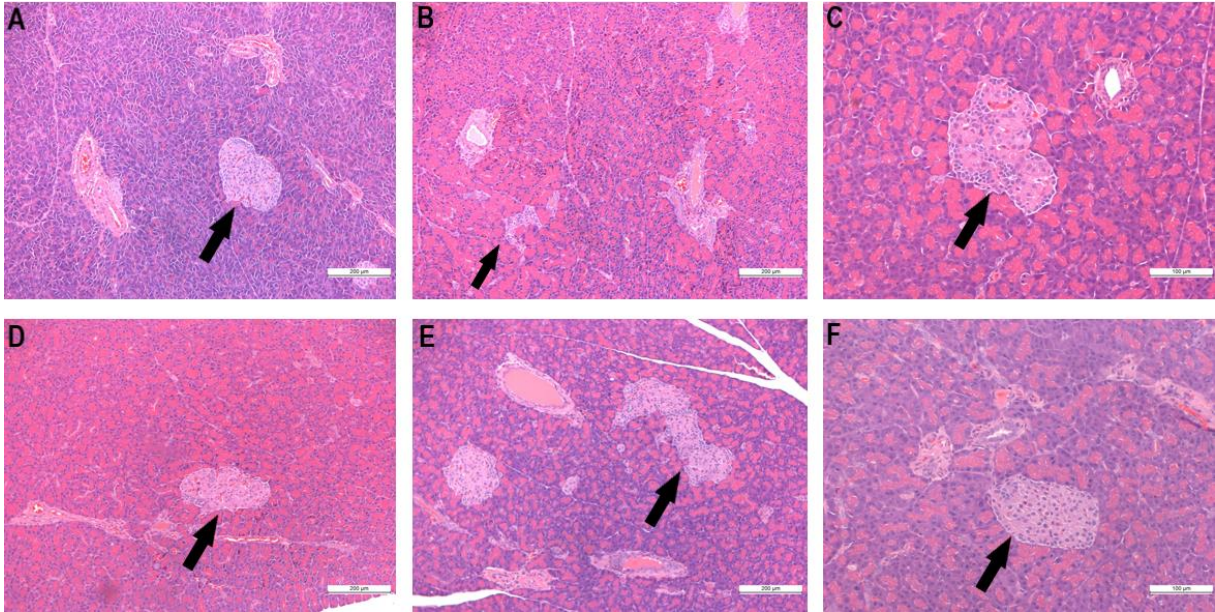
Şekil 225. Kontrol grubu ratlarına ait pankreas dokusu. Pankreasa ait ekzokrin bölüm (E), Langerhans adacığı (L) (Hx E; bar: 200µm.; 10^x).



Şekil 236. STZ grubu ratlara ait pankreas dokusu. Vakulolize ve dejenere beta hücreleri (yeşil ok), düzensizleşmiş Langerhans adacıkları (sarı ok başı), yangı hücrelerinin infiltrasyonu ve pankreas kanalında fibroblastik proliferasyon sonucu kalınlaşma (mavi ok) (HxE; bar: 200µm.; 10^x).



Şekil 247. STZ grubu ratlara ait pankreas dokusu. Vakulolize ve dejenere beta hücreleri (mavi ok) (PAS; bar: 100μm.; 20^x).



Şekil 25. Gruplara ait rat pankreası. Langerhans adacığı (ok) A: Kontrol, B: STZ, C: STZ+insülin, D: STZ+BA₅₀, E: STZ+BA₁₀₀, F: STZ+BA₂₀₀). (H&E; bar: 100/200μm.; 10^x/20^x).

Tablo 12. Gruplar arası adacık sayısı ortalamaları

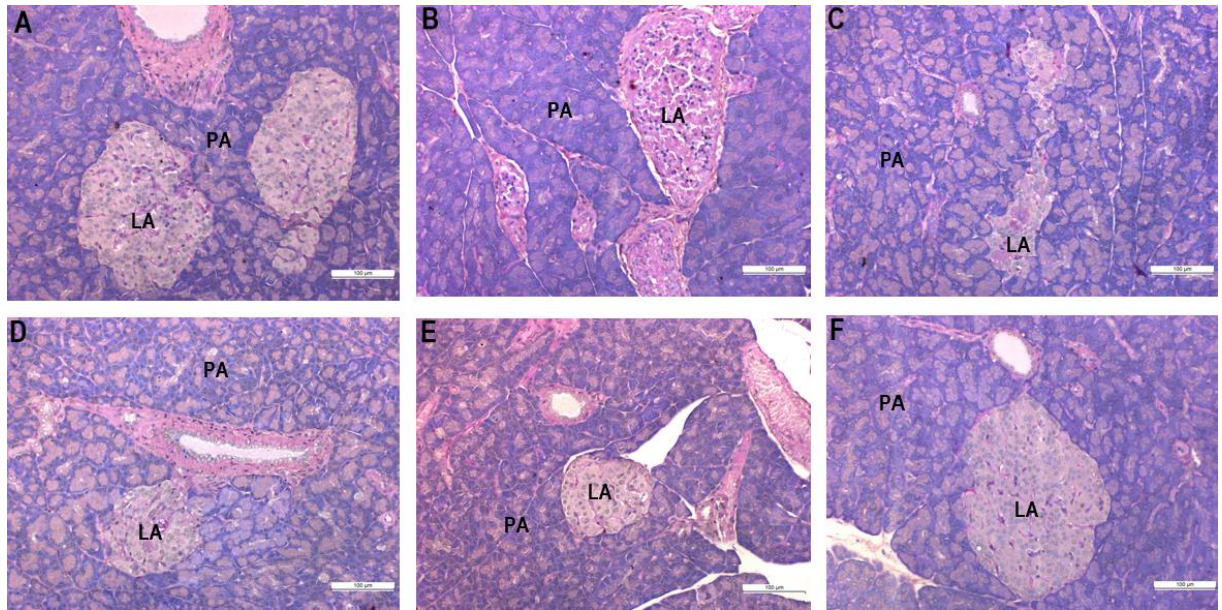
GRUPLAR	Ort.	ss	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	9,22 ^a	1,79	9	44,938	<0,001
STZ	2,33 ^c	0,71	9		
STZ+İ	3,71 ^b	1,11	7		
STZ+BA ₅₀	2,38 ^c	1,06	8		
STZ+BA ₁₀₀	3,22 ^{b,c}	0,97	9		
STZ+BA ₂₀₀	3,89 ^b	0,93	9		

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) olarak verilmiştir. ^{a, b} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.001$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

Tablo 13. Gruplar arası adacık çapı ortalamaları (µm)

GRUPLAR	Ort.	ss	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	131.29 ^a	37,34	9	30,541	<0,001
STZ	39,92 ^d	7,05	9		
STZ+İ	68,82 ^c	8,52	7		
STZ+BA ₅₀	50,32 ^{c,d}	11,18	8		
STZ+BA ₁₀₀	50,69 ^{c,d}	15,62	9		
STZ+BA ₂₀₀	89,74 ^b	7,11	9		

Veriler mg/dL ölçü birimi ve ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ ss) olarak verilmiştir. ^{a, b, c, d} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.001$) Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.



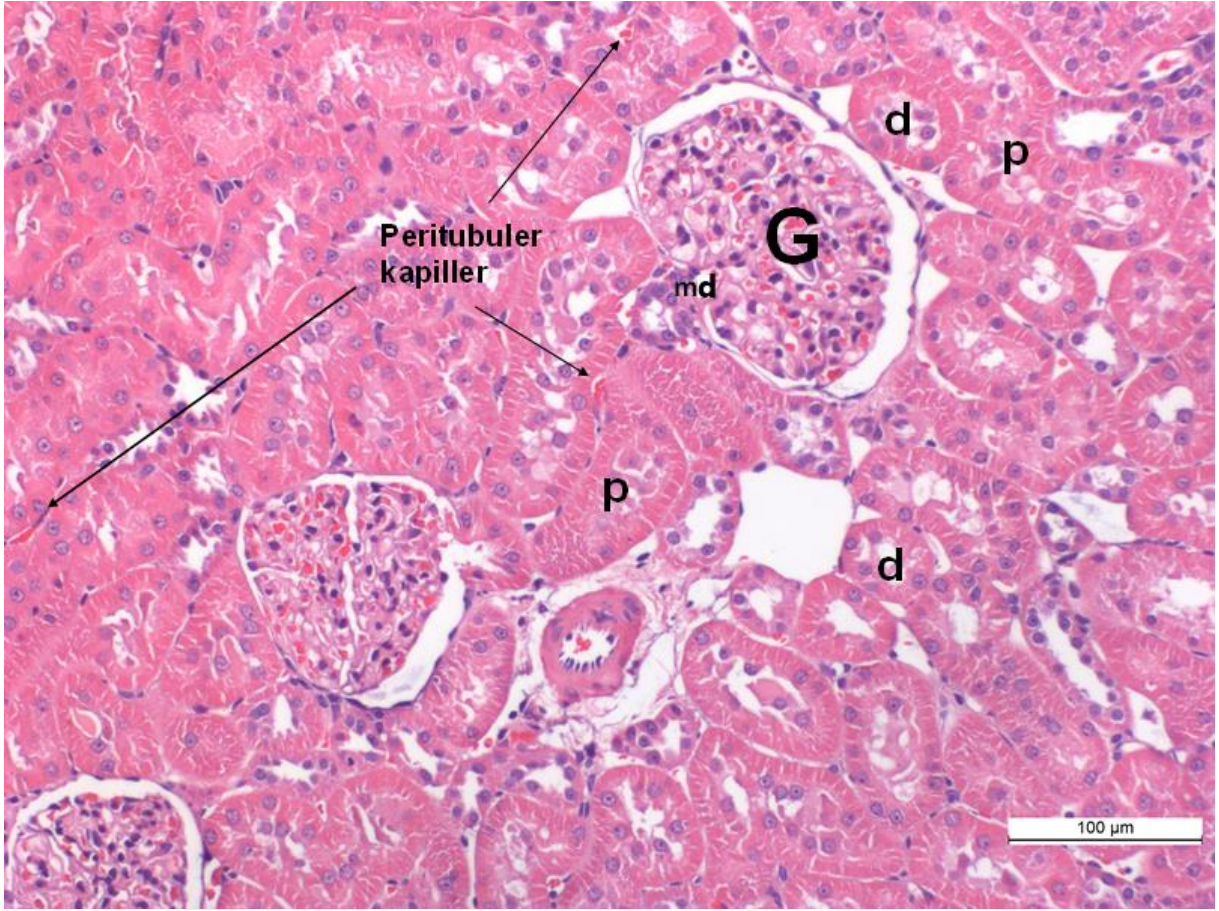
Şekil 26. Gruplara ait rat pankreası. Pankreatik asini hücreleri (PA), Langerhans adacığı (LA) A:Kontrol, B: STZ, C:STZ+insülin, D:STZ+BA₅₀, E:STZ+BA₁₀₀, F:STZ+BA₂₀₀ (PAS; bar: 100µm.; 20^x).

5.5.2. Böbrek Dokusunun Histopatolojik Bulguları

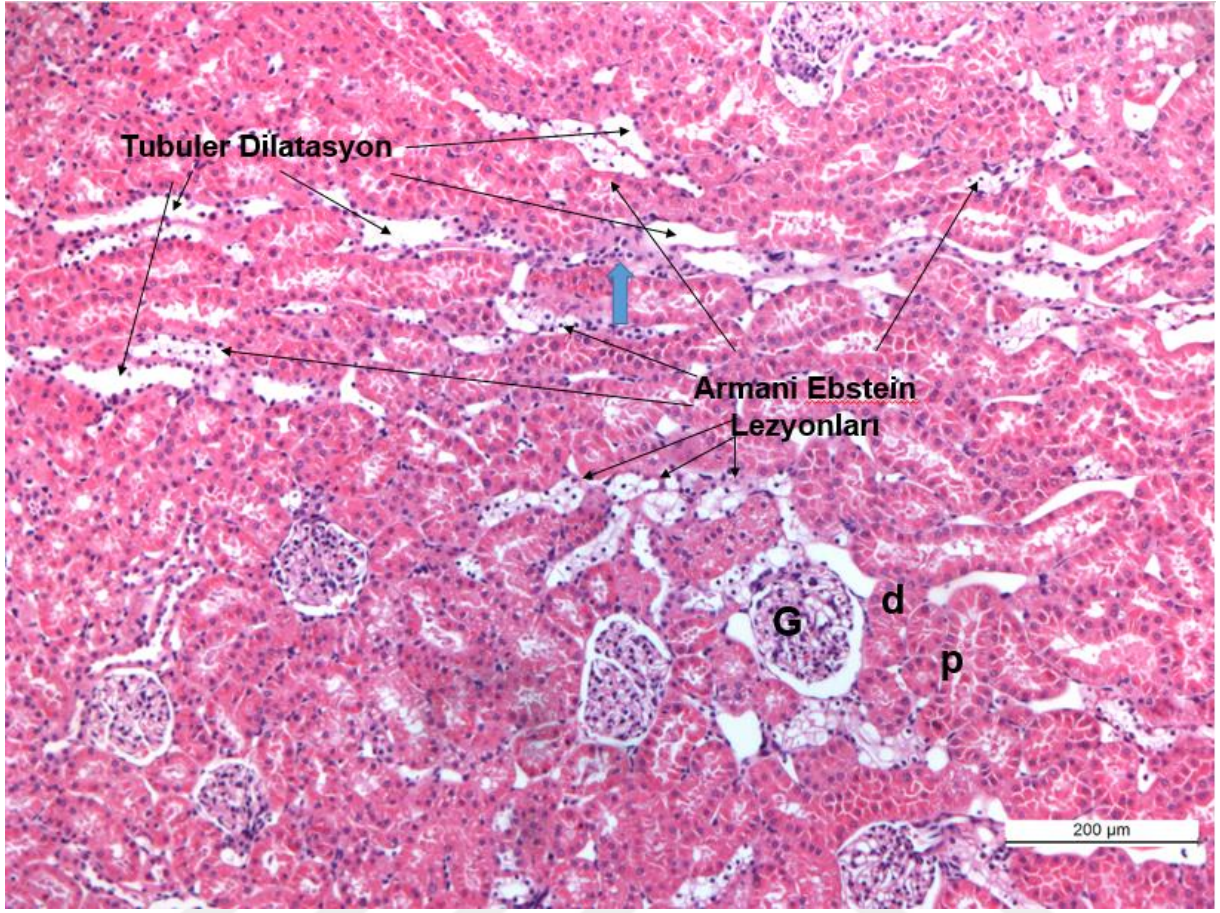
Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun korteks ve medullası normal histolojik görünümde idi. Renal glomerülleri ve renal tübüleri Şekil 30' da gösterildiği gibi düzenli morfolojiye sahipti.

Aksine STZ grubundaki diyabetik ratların bazı glomerular kapillalarında hiperemi, glomerular yumakta düzensizlik, mezangiyal hücre proliferasyonu dikkat çekiciydi. Bazı tübül epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, bazı tübül lumenlerinde protein çökeltilerine rastlanıldı. Yer yer tubüler dilatasyon ve Armani Ebstein lezyonları olarak bilinen tübüler hücre sitoplazmalarında glikojen birikimine bağlı değişen derecelerde vakuoller görüldü (Şekil 31, 32). İnterstisyel alanda mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi (Şekil 33, 34) PAS boyama sonucunda Bowman kapsülünde kalınlaşmalar dikkati çekti (Şekil 35).

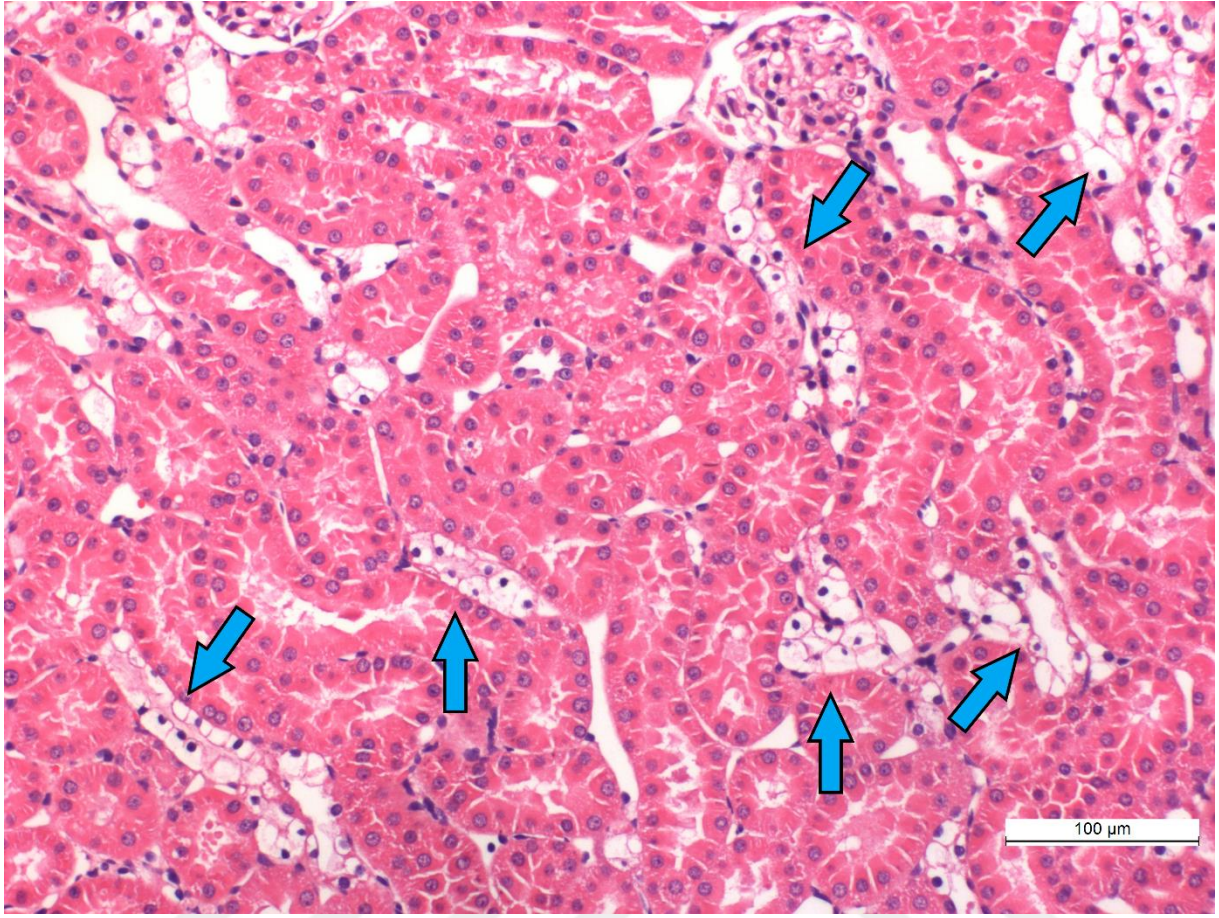
Böbrek dokusundaki lezyonlar HxE boyamayla mezangiyal matriks artışı, Armani Ebstein lezyonları, tübüler dilatasyon, Bowman aralığı ve tübüler dejenerasyon bakımından 0' dan 5' e kadar skorlanmıştır. Bu histopatolojik bulgularına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,001$; Tablo 14). STZ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında mezangiyal matriks artışı, Armani Ebstein lezyonları, tübüler dejenerasyon ve tübüler dilatasyon yönünden anlamlı farklılıkların olduğu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında mezangiyal matriks artışı, Armani Ebstein lezyonları, tübüler dejenerasyon ve tübüler dilatasyon yönünden anlamlı farklılıklar olduğu tespit edildi ($p<0,001$). STZ+İnsülin grubuyla mezangiyal matriks artışı, Armani Ebstein lezyonları, tübüler dejenerasyon ve tübüler dilatasyon yönünden karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında benzerlik olduğu gözlemlendi ($p>0,001$)(Şekil 36, Tablo 14).



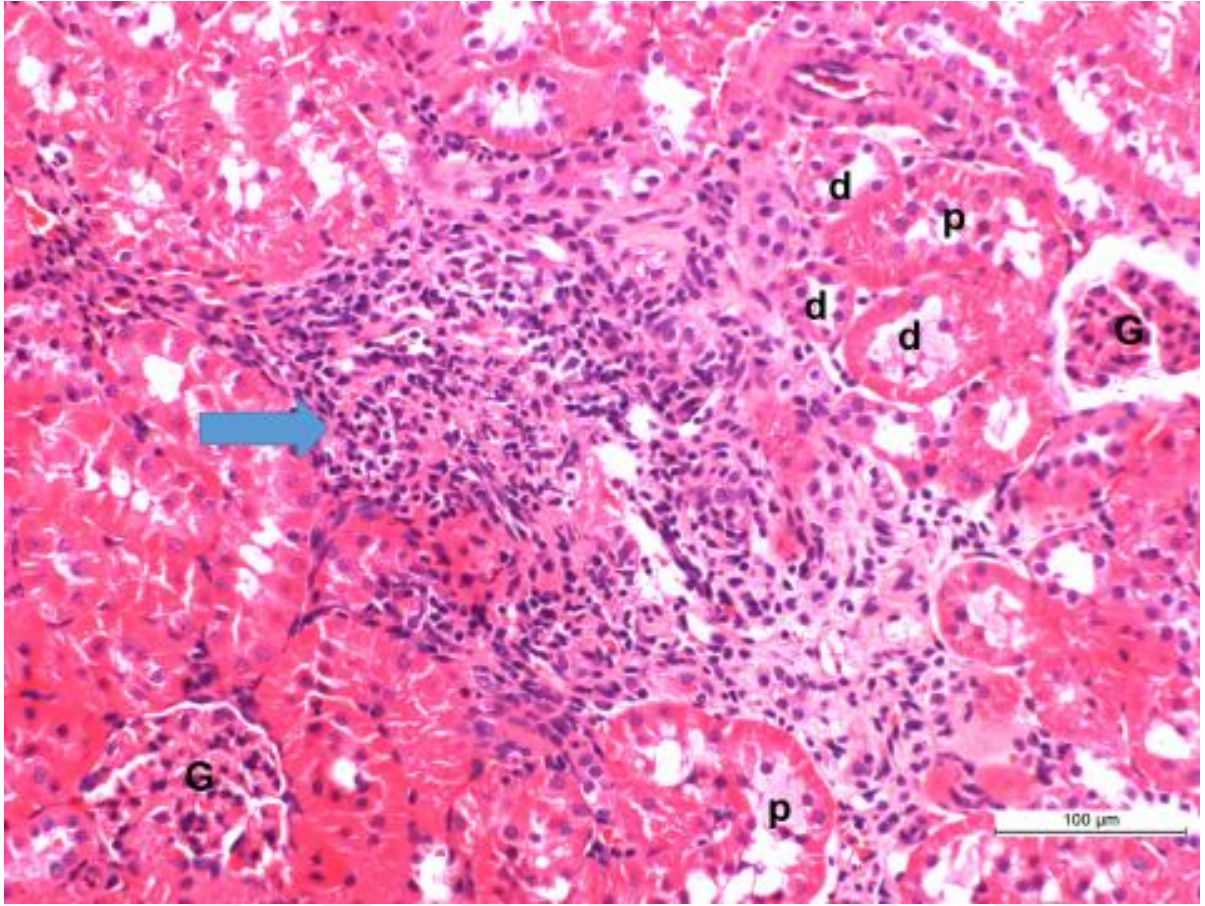
Şekil 27. Kontrol grubuna ait böbrek dokusu. Glomerulus (G), proksimal tübül (p), distal tübül (d), makula densa (md) (HxE; bar: 100µm.; 20^x).



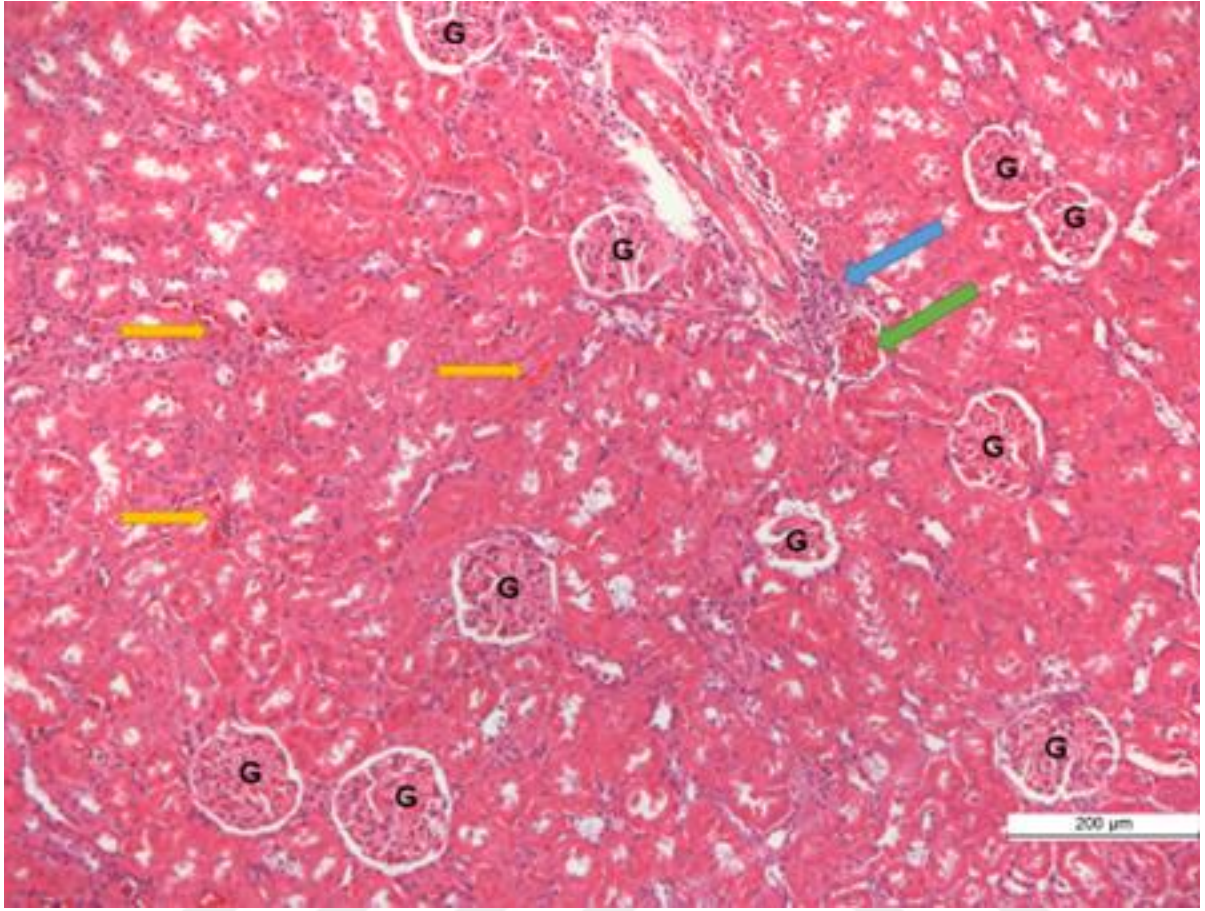
Şekil 28. STZ grubuna ait böbrek dokusu. Glomerulus (G), proksimal tübül (p), distal tübül (d) (Hx&E; bar: 200µm.; 10^x).



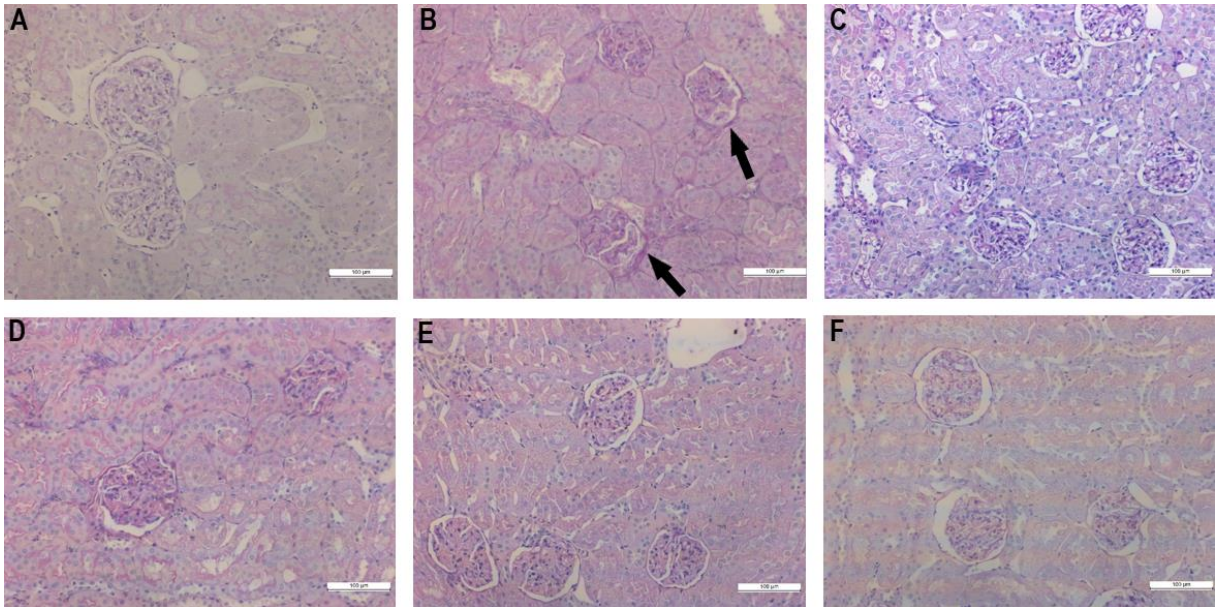
Şekil 29. STZ grubuna ait böbrek dokusu. Armani Ebstein lezyonları (mavi ok) (HxE; bar: 100µm.; 20^x).



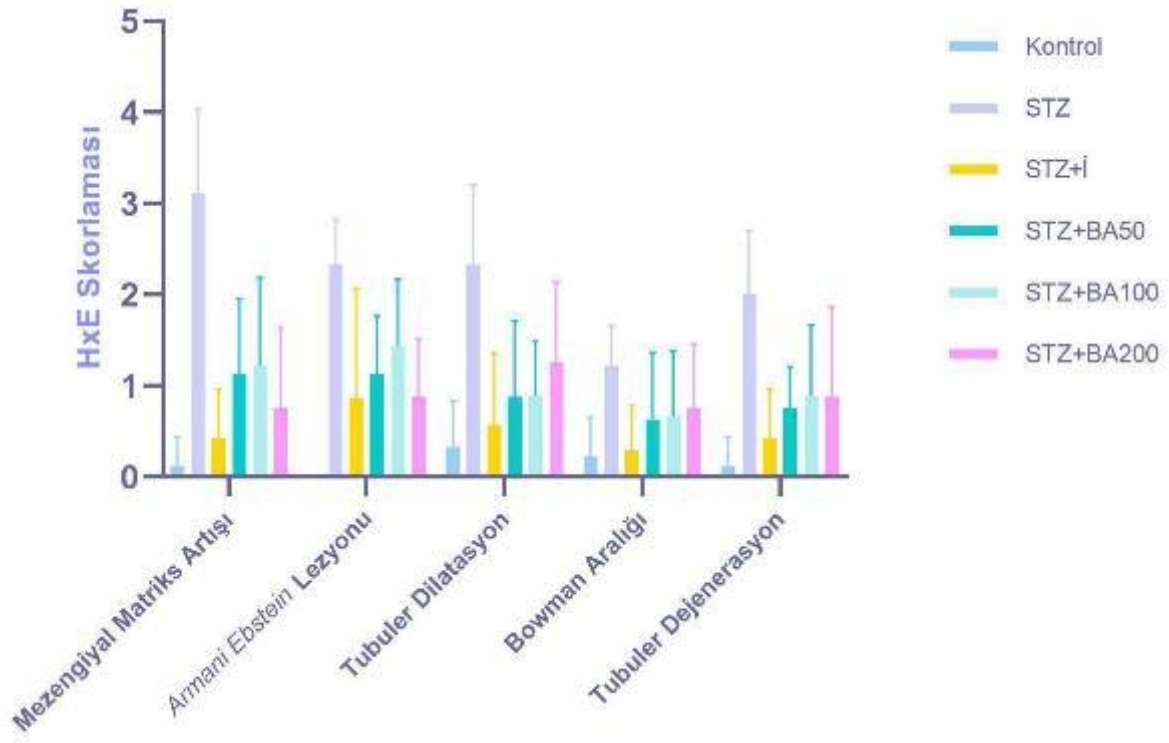
Şekil 30. STZ grubuna ait böbrek dokusu. Glomerulus (G), proksimal tübül (p), distal tübül (d), mononükleer hücre infiltrasyonu (mavi ok) (HxE; bar: 100µm.; 20^x).



Şekil 31. Diyabet grubuna ait böbrek dokusu. Glomerulus (G), interstisyel alanda mononükleer hücre infiltrasyonu (mavi ok), interstisyel konjesyon (sarı ok) (Hx&E; bar: 200µm.; 10^x).



Şekil 35. Tüm gruplara ait böbrek dokusu. Bowman kapsülünde kalınlaşma (siyah ok) A:Kontrol, B: STZ, C:STZ+insülin, D:STZ+BA₅₀, E:STZ+BA₁₀₀, F:STZ+BA₂₀₀ (PAS; bar: 200µm.; 10^x).



Şekil 32. Böbrek dokusuna ait histopatolojik bulgular skorlaması

Tablo 14. Böbrek dokusuna ait histopatolojik bulgular skorlaması.

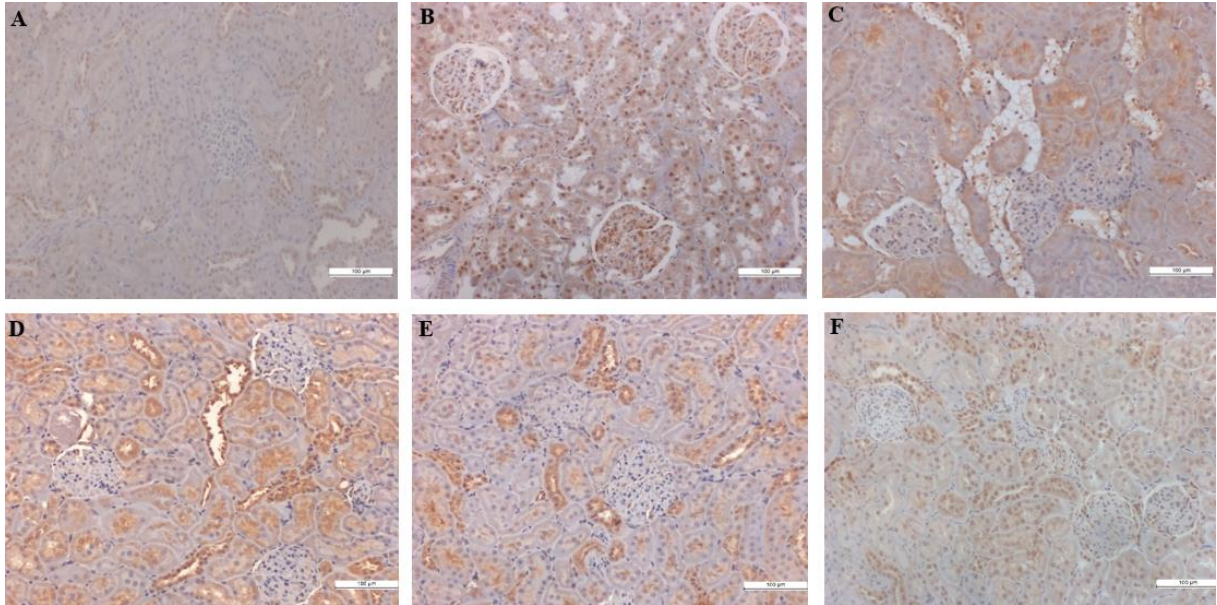
Gruplar	Mezangiyal		Armani		Tübüler		Bowman		Tübüler	
	matriks artışı		Ebstein		dilatasyon		aralığı		dejenerasyon	
	x±ss	n	x±ss	n	x±ss	n	x±ss	n	x±ss	n
Kontrol	0,11±0,33 ^c	9	0,00±0,00 ^c	9	0,33±0,50 ^c	9	0,22±0,44 ^b	9	0,11±0,33 ^c	9
STZ	3,11±0,93 ^a	9	2,33±0,50 ^a	9	2,33±0,87 ^a	9	1,22±0,44 ^a	9	2,00±0,71 ^a	9
STZ+İns	0,43±0,53 ^{b,c}	7	0,86±1,21 ^b	7	0,57±0,79 ^{b,c}	7	0,29±0,49 ^b	7	0,43±0,53 ^{b,c}	7
STZ+BA ₅₀	1,13±0,83 ^b	8	1,13±0,64 ^b	8	0,88±0,83 ^{b,c}	8	0,63±0,74 ^{a,b}	8	0,75±0,46 ^{b,c}	8
STZ+BA ₁₀₀	1,22±0,97 ^b	9	1,44±0,73 ^b	9	0,89±0,60 ^{b,c}	9	0,67±0,71 ^{a,b}	9	0,89±0,78 ^b	9
STZ+BA ₂₀₀	0,75±0,89 ^{b,c}	8	0,88±0,64 ^b	8	1,25±0,89 ^b	8	0,75±0,71 ^{a,b}	8	0,88±0,99 ^b	8

Böbrekteki hasarın şiddetine göre 0 ile 5 arasında değişen değerler verilerek patolojik değerlendirme yapıldı. 0 = normal, 1 = <%10, 2 = <%10-20 hasar, 3 = <%20-30 hasar, 4 = <%30-40 hasar, 5 = >%40 hasarı temsil etmektedir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. ^{a, b, c} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.01$; $p < 0.001$). Normal dağılım göstermeyen verilere non-parametrik test (Kruskal-Wallis) uygulandı. İkili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

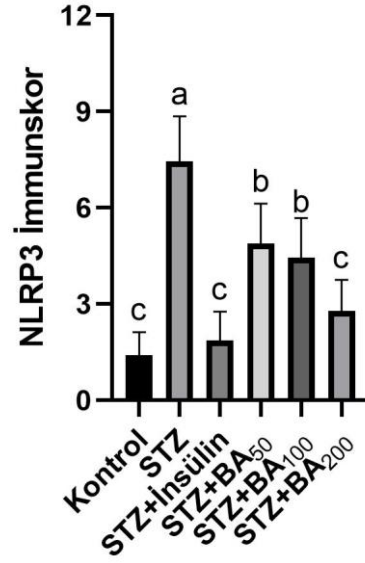
5.6. Immunohistokimyasal Bulguları

5.6.1. NLRP3

Böbrek dokusunda NLRP3 inflamazom sinyal yolağı bileşenlerinden NLRP3 protein ekspresyonları skorlandı. NLRP3 immunskorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). Özellikle STZ grubuna ait böbrek dokusu endotel hücrelerinin sitoplazmasında güçlü ve homojen immun pozitiflikler tespit edildi. Bu yönüyle en yüksek immunskorun STZ grubuna ait olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu ile STZ+İ grubunun benzer olduğu ($p>0,001$). STZ+BA₅₀ ve STZ+BA₁₀₀ gruplarının STZ, kontrol ve STZ+İ gruplarından farklı olduğu belirlendi ($p<0,001$). Kontrol ve STZ+insülin grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₂₀₀ grubu ile benzerlik olduğu belirlendi ($p>0,001$). (Şekil 37, 38; Tablo 15).



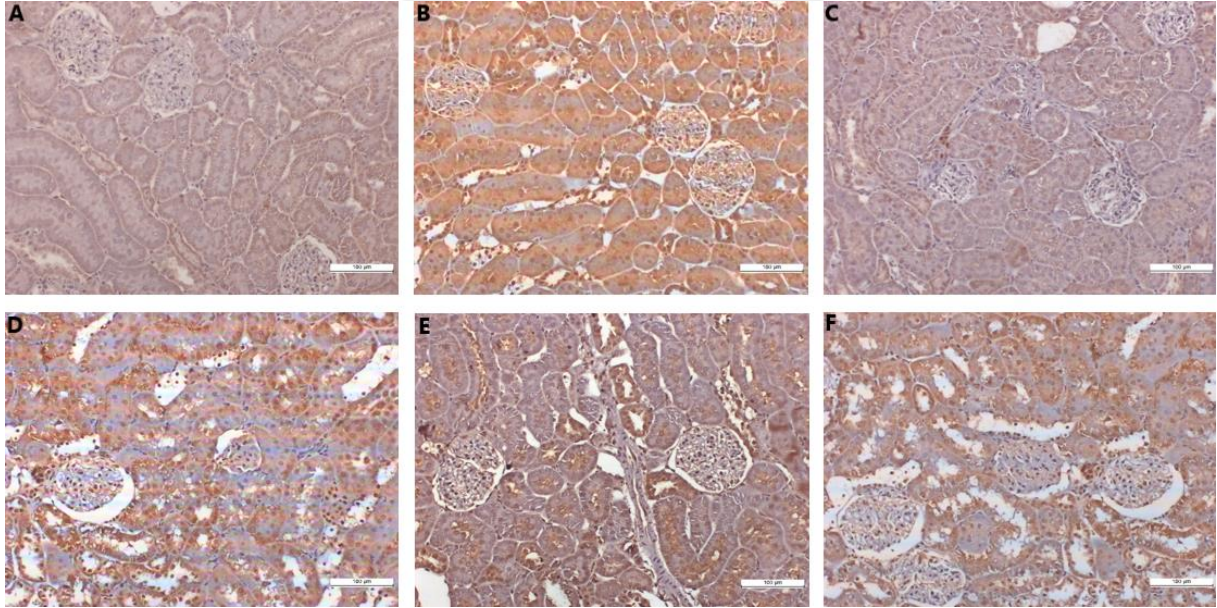
Şekil 33. Rat böbreklerine ait NLRP3 immunoreaktivitesi. A:Kontrol, B:STZ, C:STZ+insülin, D: STZ+BA₅₀, E:STZ+BA₁₀₀, F:STZ+BA₂₀₀ (IHC-P; bar:100µm; 20 $\times$).



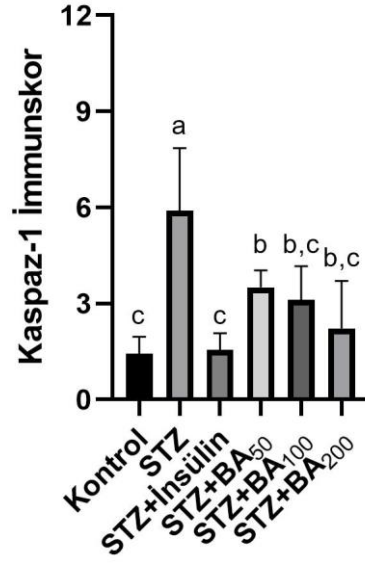
Şekil 34. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 immunoskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p < 0,001$, $F = 51.570$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.6.2. Kaspaz-1

Böbrek dokusunda NLRP3 inflamazom sinyal yolağı bileşenlerinden kaspaz-1 protein ekspresyonları skorlandı. Kaspaz-1 immunskorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). Özellikle STZ grubuna ait böbrek dokusu endotel hücrelerinin sitoplazmasında güçlü ve homojen immun pozitiflikler tespit edildi. Bu yönüyle en yüksek immunskorun STZ grubuna ait olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubu ile STZ+İ grubunun benzer olduğu ($p>0,001$). STZ+BA₅₀ ve STZ+BA₁₀₀ gruplarının STZ, kontrol ve STZ+İ gruplarından farklı olduğu belirlendi ($p<0,001$). Kontrol ve STZ+İ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ grupları ile benzerlik olduğu belirlendi ($p>0,001$). (Şekil 39, 40; Tablo 15).



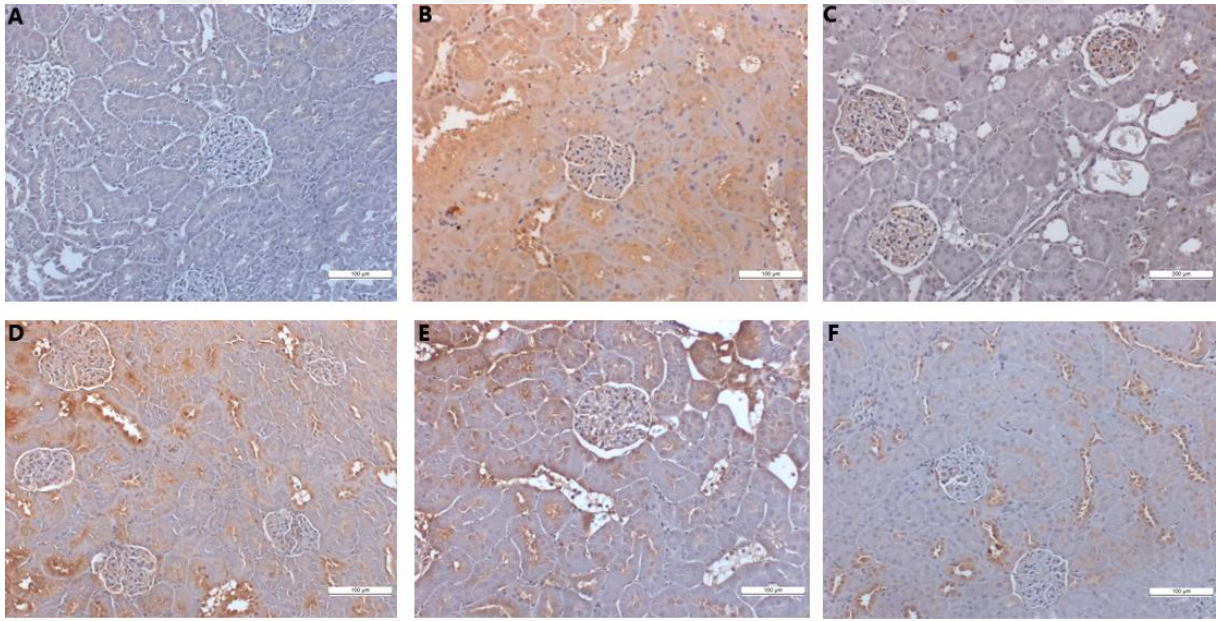
Şekil 35. Rat böbreklerine ait kaspaz-1 immunoreaktivitesi. A:Kontrol, B:STZ, C:STZ+insülin, D: STZ+BA₅₀, E:STZ+BA₁₀₀, F:STZ+BA₂₀₀ (IHC-P; bar:100µm; 20×)



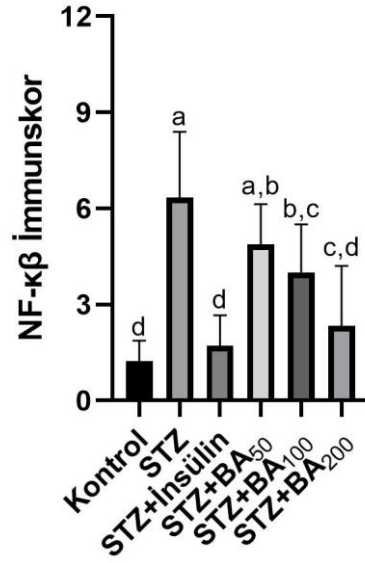
Şekil 36. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda kaspaz-1 immunskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,001$ F=26.110). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.6.3. NF- κ B

Böbrek dokusunda NLRP3 inflamazom sinyal yolağı bileşenlerinden NF- κ B protein ekspresyonları skorlandı. NF- κ B immunskorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol ve STZ grubunun diğer tedavi gruplarından farklı olduğu belirlendi ($p<0,01$). Özellikle STZ grubuna ait böbrek dokusu endotel hücrelerinin sitoplazmasında güçlü ve homojen immun pozitiflikler tespit edildi. Bu yönüyle en yüksek immunskor STZ grubuna ait olduğu görüldü ($p<0,001$). STZ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀ ve STZ+BA₁₀₀ grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,001$), STZ+BA₂₀₀ grubu arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Kontrol grubunun ise en düşük immunskoru sahip olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ+İ grubunda anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,001$). STZ+İ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₂₀₀ grubunda benzerlik olduğu belirlendi ($p>0,001$) (Şekil 41, 42; Tablo 15).



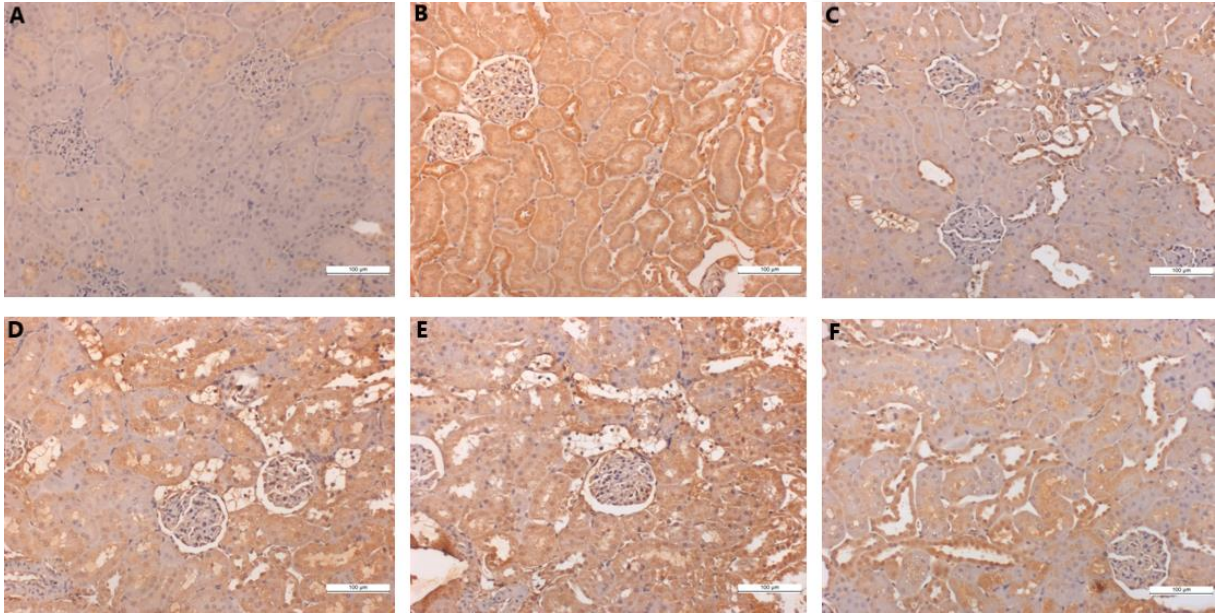
Şekil 37. Rat böbreklerinin NF- κ B immunoreaktivitesi. A: kontrol grubu, B: diyabet grubu, C: diyabet+insülin grubu, D: diabet +BA₅₀, E: diyabet+ BA₁₀₀, F: diyabet+BA₂₀₀ (IHC-P; bar:100 μ m; 20 $\times$).



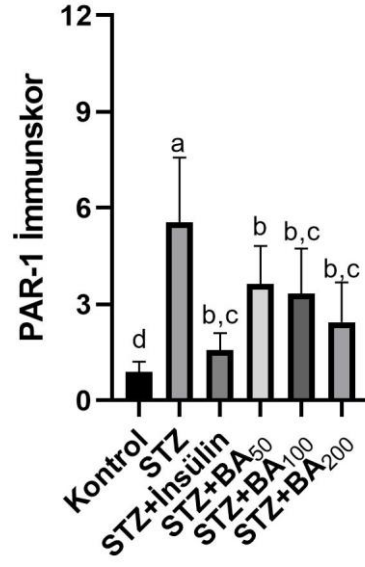
Şekil 38. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusu NF-κβ immunskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c,d} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,001$ $F=21.576$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.6.4. PAR-1

Böbrek dokusundaki PAR-1 immunpozitifliği skorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubunda diğer gruplardan farklı olduğu belirlendi ($p<0,001$). STZ grubunda diğer gruplara kıyasla en şiddetli ve homojen pozitiflik verdiği belirlendi ($p<0,001$). STZ+İ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,001$). (Şekil 43, 44; Tablo 15).



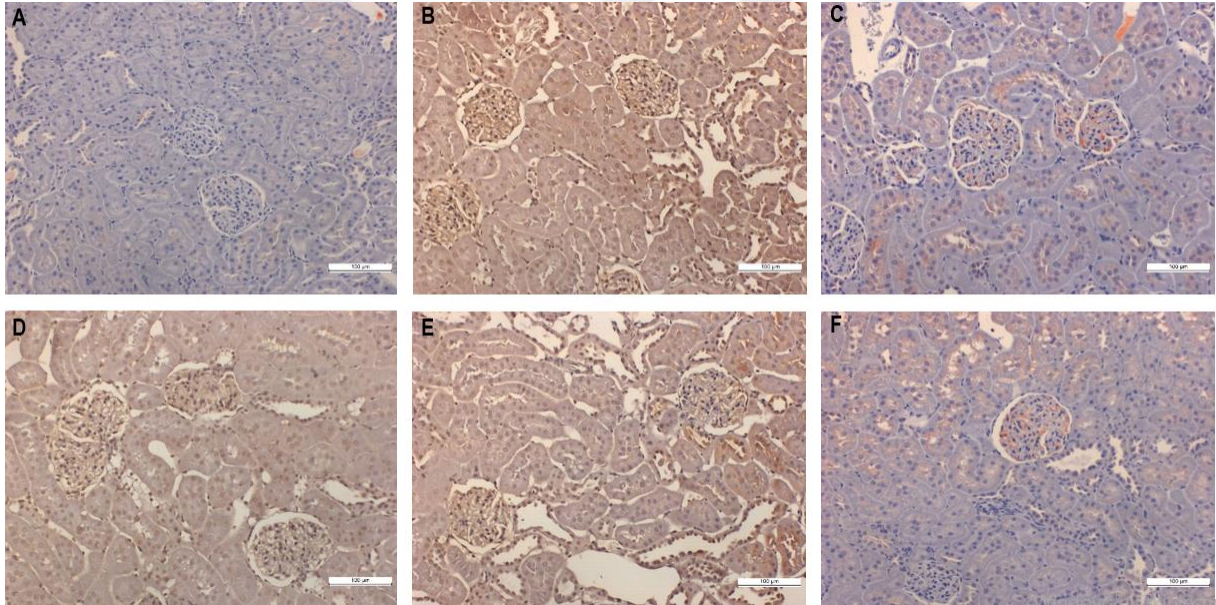
Şekil 39. Rat böbreklerinin PAR-1 immunoreaktivitesi. A: Kontrol, B: STZ, C: STZ+insülin, D: STZ+BA₅₀, E: STZ+BA₁₀₀, F: STZ+BA₂₀₀ (IHC-P; bar:100µm; 20 $\times$).



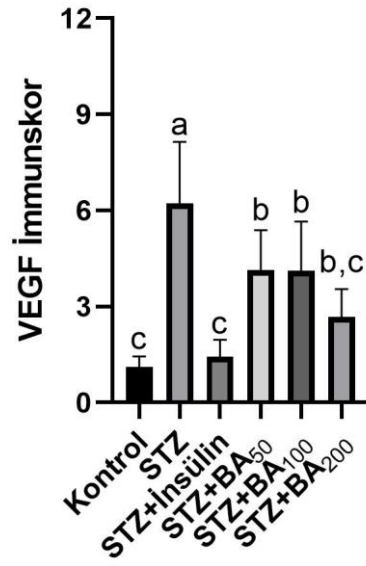
Şekil 40. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 immunskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c,d} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,001$ $F=19.815$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.6.5. VEGF

STZ ile indüklenen diyabet modeline ait böbrek dokusundan elde edilen VEGF immunskorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubunda hafif zemin boyanması dışında bir bulguya rastlanılmadı. STZ grubunun tüm gruplara göre artmış olduğu belirlendi ($p<0,01$). Bu yönüyle en yüksek immunskorun STZ grubuna ait olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubuyla STZ+İ gruplarının benzer olduğu gözlemlendi ($p>0,001$). Kontrol ve STZ+İ gruplarıyla karşılaştırıldığında STZ+BA₂₀₀ grubunda farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 45, 46; Tablo 15).



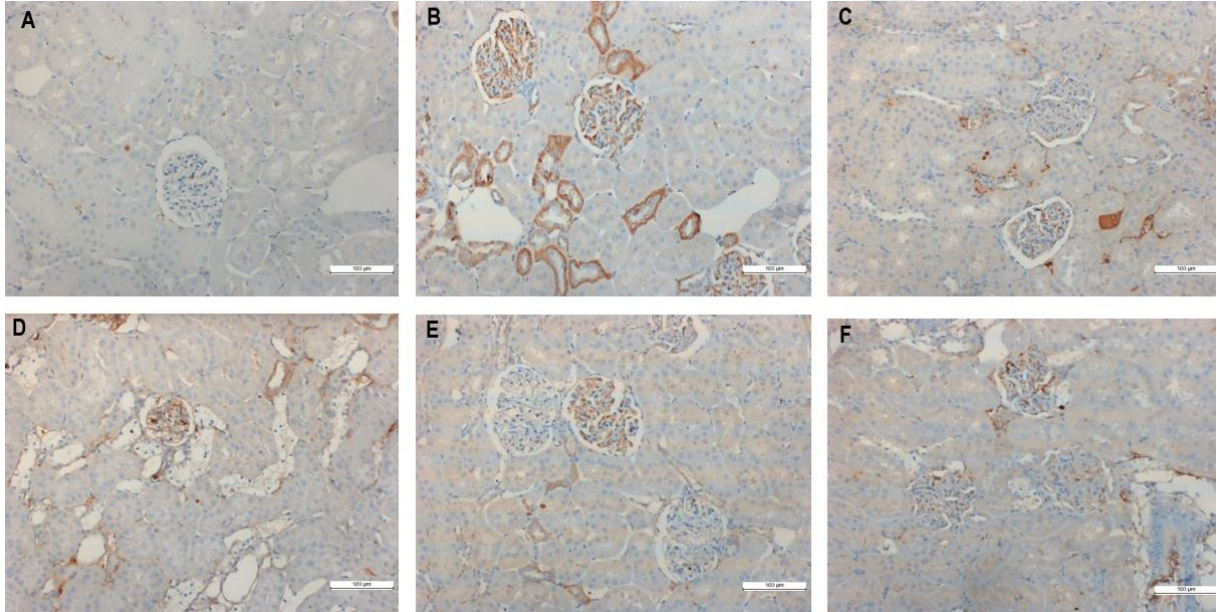
Şekil 41. Rat böbreklerinin VEGF immunoreaktivitesi. A: Kontrol, B: STZ, C: STZ+insülin, D: STZ+BA₅₀, E: STZ+BA₁₀₀, F: STZ+BA₂₀₀ (IHC-P; bar:100µm; 20 $\times$).



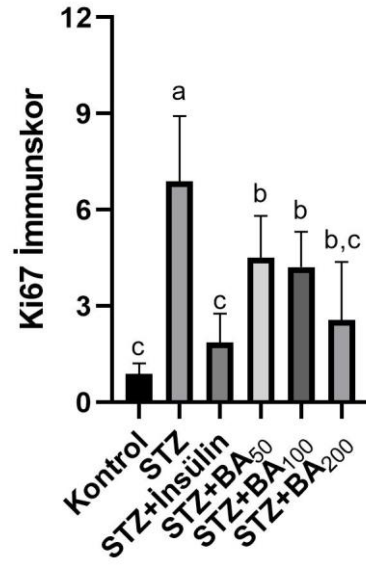
Şekil 42. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda VEGF immunoskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,001$ F=28.598). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.6.6. Ki67

Glomerullerdeki mezangiyal hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla ki67 ile boyama yapıldı. STZ ile indüklenen diyabet modeline ait böbrek dokusunda ki67 immünskorlamasına göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktaydı ($p<0,001$). Kontrol grubunda hafif zemin boyanması dışında bir bulguya rastlanılmadı. STZ grubunun tüm gruplara göre artmış olduğu görüldü ($p<0,01$). Bu yönüyle en yüksek immünskorun STZ grubuna ait olduğu görüldü ($p<0,001$). Boyanma gözlemlenmeyen kontrol grubunun ise en düşük immünskora sahip olduğu görüldü ($p<0,001$). STZ+insülin grubuyla STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi grupları karşılaştırıldığında STZ+BA₂₀₀ grubu ile farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 47, 48; Tablo 15).



Şekil 43. Rat böbreklerinin ki67 immünoaktivitesi. (A: kontrol grubu, B: diyabet grubu, C: diyabet+insülin grubu, D: diyabet +BA₅₀, E: diyabet+ BA₁₀₀, F: diyabet+BA₂₀₀) (IHC-P; bar:100µm; 20×).



Şekil 44. Diyabetik ratlara uygulanan borik asit takviyesinin böbrek dokusunda ki67 immunoskor üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$ $F=25.595$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

Tablo 15. Böbrek dokusuna ait NLRP3, PAR-1, NF- κ B, kaspaz-1, VEGF ve ki67 immunreaktivitelerinin skorlanması (ort. $\pm$ ss).

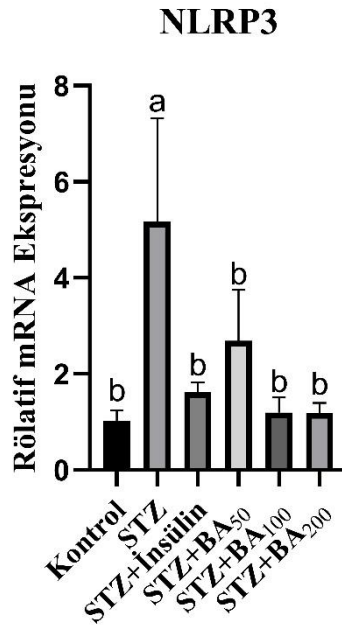
	Gruplar					
	Kontrol	STZ	STZ+İ	STZ+BA ₅₀	STZ+BA ₁₀₀	STZ+BA ₂₀₀
	(n=9)	(n=9)	(n=7)	(n=8)	(n=9)	(n=9)
	x $\pm$ ss	x $\pm$ ss	x $\pm$ ss	x $\pm$ ss	x $\pm$ ss	x $\pm$ ss
NLRP3	1,4 $\pm$ 0,72 ^c	7,44 $\pm$ 1,42 ^a	1,86 $\pm$ 0,90 ^c	4,88 $\pm$ 1,25 ^b	4,44 $\pm$ 1,24 ^b	2,78 $\pm$ 0,97 ^c
PAR-1	0,88 $\pm$ 0,33 ^d	5,56 $\pm$ 2,01 ^a	1,57 $\pm$ 0,53 ^{b,c}	3,63 $\pm$ 1,19 ^b	3,33 $\pm$ 1,41 ^{b,c}	2,44 $\pm$ 1,24 ^{b,c}
NF-κB	1,2 $\pm$ 0,66 ^d	6,33 $\pm$ 2,06 ^a	1,71 $\pm$ 0,95 ^d	4,88 $\pm$ 1,25 ^{a,b}	4,00 $\pm$ 1,50 ^{b,c}	2,33 $\pm$ 1,87 ^{c,d}
Kaspaz-1	1,43 $\pm$ 0,53 ^c	5,89 $\pm$ 1,96 ^a	1,55 $\pm$ 0,52 ^c	3,50 $\pm$ 0,53 ^b	3,11 $\pm$ 1,05 ^{b,c}	2,22 $\pm$ 1,48 ^{b,c}
VEGF	1,11 $\pm$ 0,33 ^c	6,22 $\pm$ 1,92 ^a	1,43 $\pm$ 0,53 ^c	4,13 $\pm$ 1,25 ^b	4,11 $\pm$ 1,54 ^b	2,67 $\pm$ 0,87 ^{b,c}
Ki67	0,88 $\pm$ 0,33 ^c	6,89 $\pm$ 2,03 ^a	1,86 $\pm$ 0,90 ^c	4,50 $\pm$ 1,31 ^b	4,22 $\pm$ 1,09 ^b	2,56 $\pm$ 1,81 ^{b,c}

Böbrekteki boyanmanın şiddetine ve yaygınlığına göre değerlendirme yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (x $\pm$ ss) olarak sunuldu. ^{a,b,c,d,e} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,001$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.7. RT-PCR Bulguları

5.7.1. NLRP3 Gen Ekspresyon Seviyesi

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen NLRP3 gen ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında farklı anlamlılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında en düşük seviyenin kontrol grubunda olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ grubunda NLRP3 ekspresyonu bakımından yaklaşık 5 katı artış olduğu dikkati çekti ($p<0,001$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise en düşük NLRP3 ekspresyonunun STZ+BA₂₀₀ grubunda olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol, STZ+İnsülin, STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ grupları arasında fark olmadığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 49; Tablo 16).



Şekil 45. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

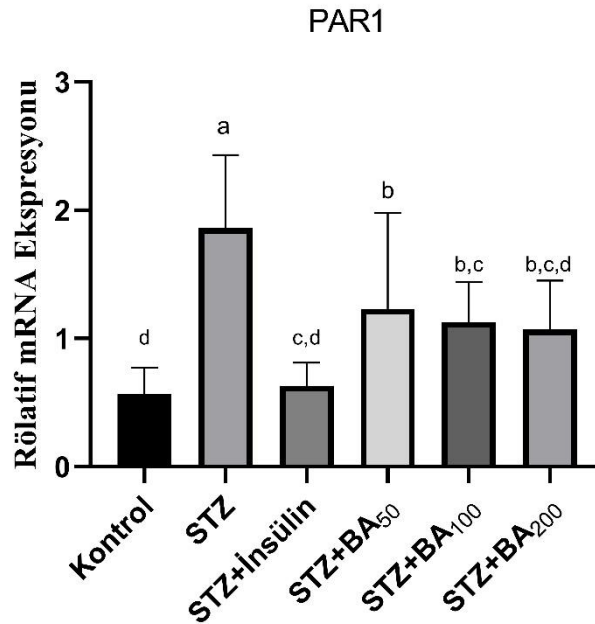
Tablo 16. Gruplar arası NLRP3 mRNA ekspresyon ortalamaları

GRUPLAR	x	ss.	n	ANOVA	
				F	p
Kontrol	1,03 ^b	0,21	9	12,175	0.001
STZ	5,17 ^a	2,15	9		
STZ+İ	1,62 ^b	0,20	7		
STZ+BA ₅₀	2,69 ^b	1,06	8		
STZ+BA ₁₀₀	1,20 ^b	0,31	9		
STZ+BA ₂₀₀	1,19 ^b	0,21	8		

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ ss) olarak verilmiştir. ^{a, b, c} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.001$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.7.2. PAR-1 Gen Ekspresyon Seviyesi

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen PAR-1 gen ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında en düşük seviyenin kontrol grubunda olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ grubunda PAR-1 ekspresyonu bakımından yaklaşık 3,25 katı artış olduğu dikkati çekti ($p<0,001$). Kontrol grubuyla STZ+İnsülin ve STZ+BA₂₀₀ grupları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). STZ+İnsülin grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀ ve STZ+BA₂₀₀ grupları arasında farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). STZ grubuyla karşılaştırıldığında ise en düşük PAR-1 ekspresyonunun STZ+BA₂₀₀ grubunda olduğu tespit edildi ($p<0,001$). STZ grubu ile BA tedavi grupları karşılaştırıldığında; STZ+BA₅₀ grubunda yaklaşık 1,64 katı oranında, STZ+BA₁₀₀ grubunda yaklaşık 1,51 katı oranında, STZ+BA₂₀₀ grubunda yaklaşık 1,74 katı oranında azalma tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 50; Tablo 17).



Şekil 46. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a,b,c,d} farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,001$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

Tablo 17. Gruplar arası PAR-1 mRNA ekspresyon ortalamaları

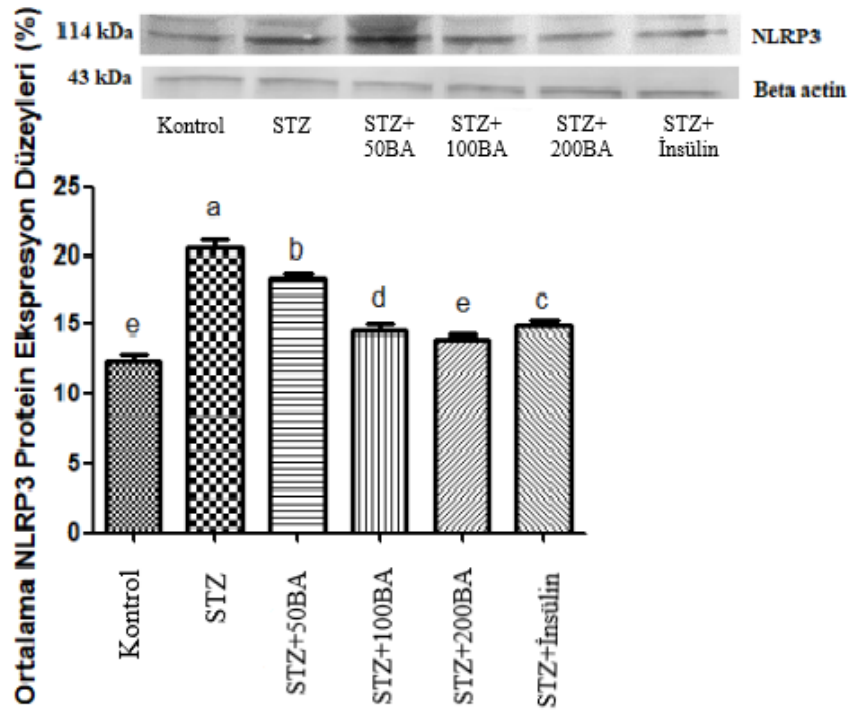
GRUPLAR	x	ss	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	0,57 ^d	0,20	9	7,712	<0.001
STZ	1,86 ^a	0,57	9		
STZ+İ	0,63 ^{c,d}	0,18	7		
STZ+BA ₅₀	1,23 ^{b,c}	0,75	8		
STZ+BA ₁₀₀	1,13 ^b	0,31	9		
STZ+BA ₂₀₀	1,07 ^{b,c,d}	0,38	8		

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ ss) olarak verilmiştir. ^{a, b, c, d} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.8. Western Blot Bulguları

5.8.1. NLRP3

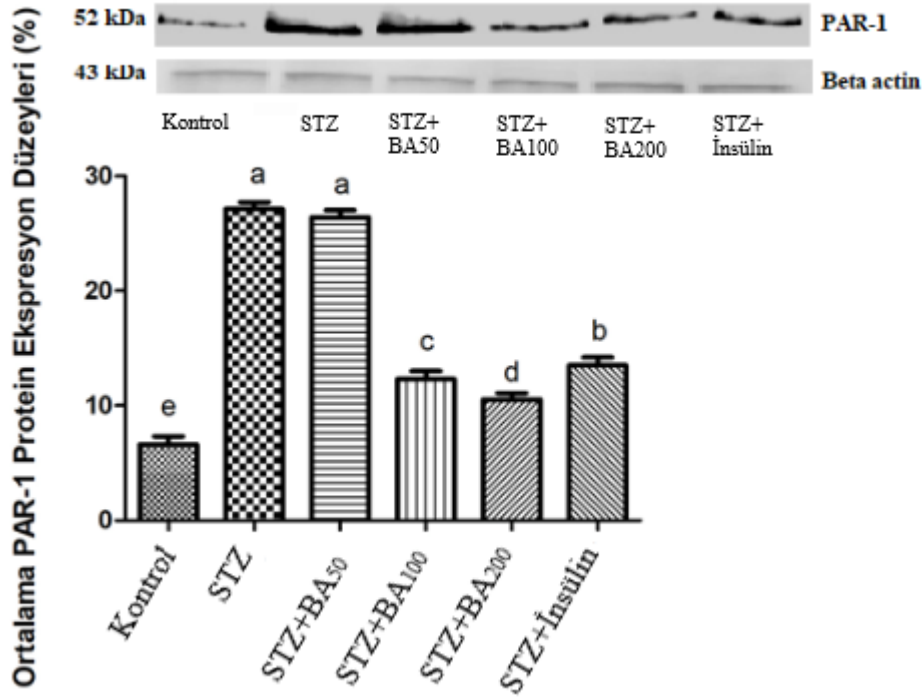
STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen NLRP3 protein ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₂₀₀ grubu arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0,05$; Şekil 51).



Şekil 47. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NLRP3 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-c}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıydı ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.8.2. PAR-1 Protein Ekspresyonu

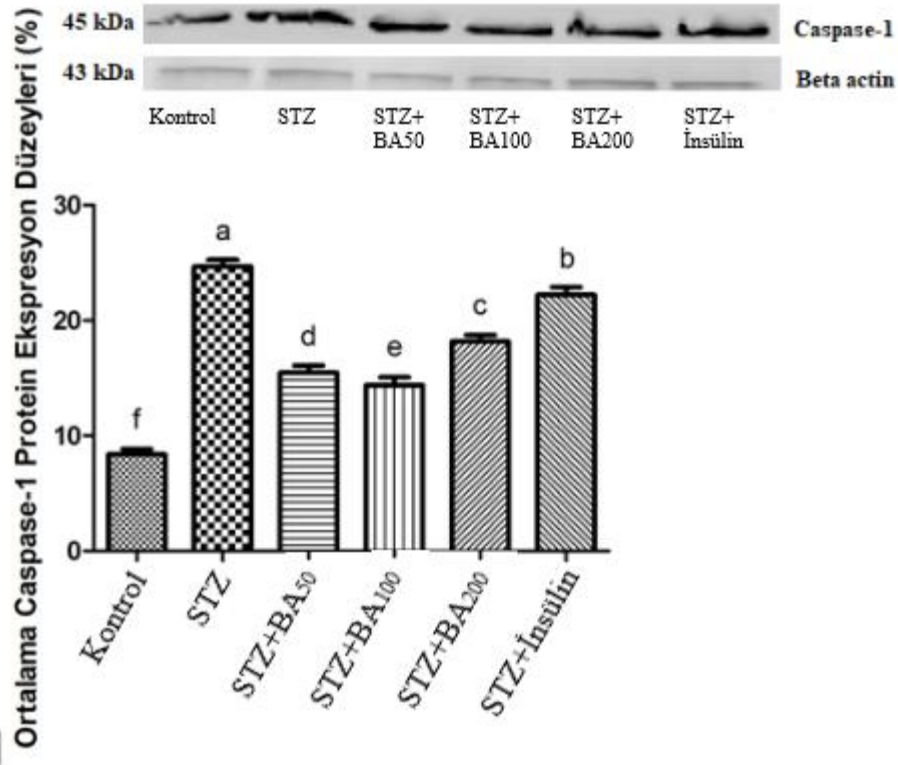
STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen PAR-1 protein ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$; Şekil 52). STZ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀ grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p>0,05$).



Şekil 48. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda PAR-1 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-e}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.8.3. Kaspaz-1 Protein Ekspresyonu

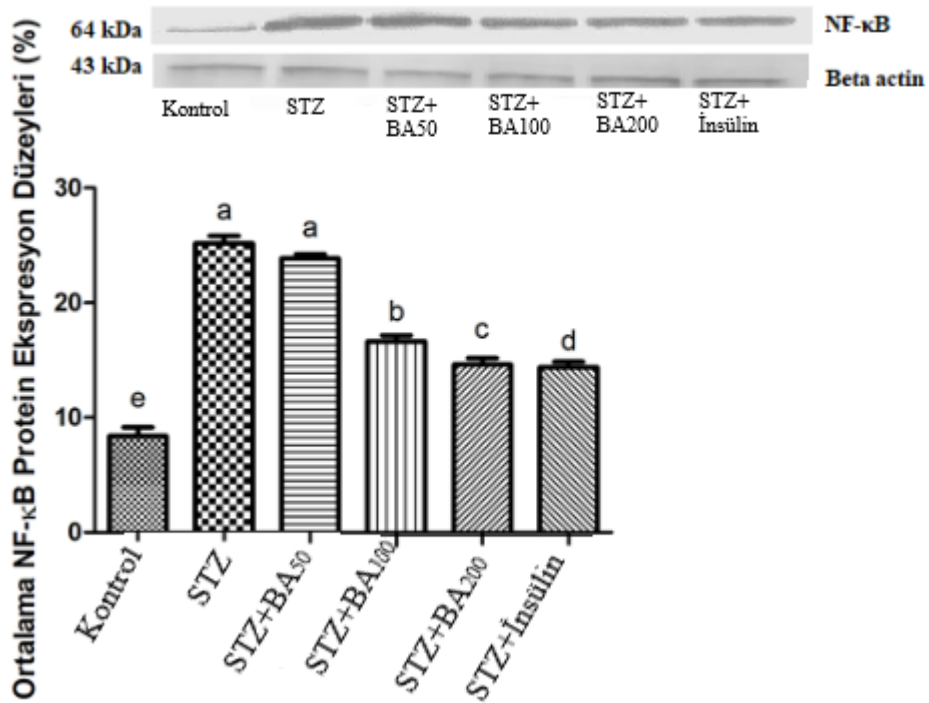
STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen kaspaz-1 protein ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$; Şekil 53). STZ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀ grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p>0,05$).



Şekil 49. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda kaspaz-1 protein ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. a-f: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.8.4. NF- κ B Protein Ekspresyonu

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen NF- κ B protein ekspresyonu sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$). STZ grubuyla karşılaştırıldığında STZ+BA₅₀ grubu arasında anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$; Şekil 54).

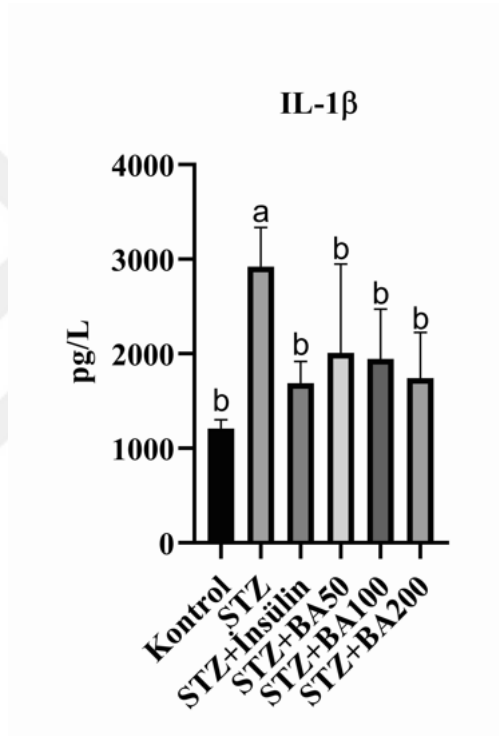


Şekil 50. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda NF- κ B protein ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-d}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

5.9. ELİSA Bulguları

5.9.1. IL-1 β Bulguları

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen IL-1 β sitokin seviyelerine göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$). STZ grubuyla karşılaştırıldığında diğer gruplarda IL-1 β sitokin seviyeleri bakımından önemli ölçüde baskılanma olduğu görüldü ($p<0,05$; Tablo 18; Şekil 55).



Şekil 51. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-1 β sitokin seviyesi üzerindeki etkileri. Veriler; ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-b}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

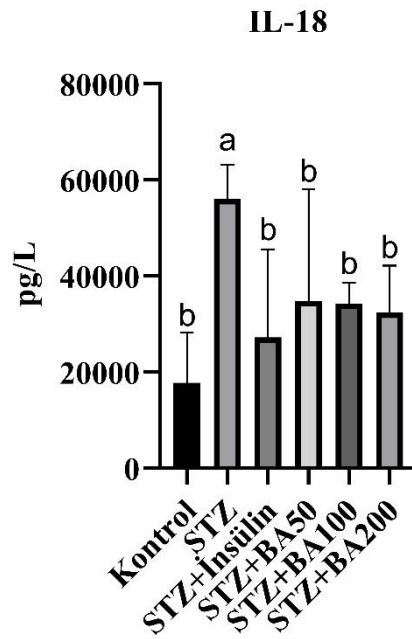
GRUPLAR	x	ss	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	1.209,71 ^b	91,18	9	5,27	<0.001
STZ	2.923,04 ^a	411,44	9		
STZ+İ	1.689,39 ^b	227,94	7		
STZ+BA ₅₀	2.008,66 ^b	938,90	8		
STZ+BA ₁₀₀	1.944,82 ^b	525,36	9		
STZ+BA ₂₀₀	1.743,04 ^b	480,81	8		

Tablo 18. Gruplar arası IL-1 β sitokin seviyeleri ortalamaları.

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) olarak verilmiştir. ^{a, b} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.9.2. IL-18 Bulguları

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde böbrek dokusundan elde edilen IL-18 sitokin seviyelerine göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$). STZ grubuyla karşılaştırıldığında diğer gruplarda IL-18 sitokin seviyeleri bakımından önemli ölçüde baskılanma olduğu tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 56; Tablo 19).



Şekil 52. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-18 sitokin seviyesi üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-b}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

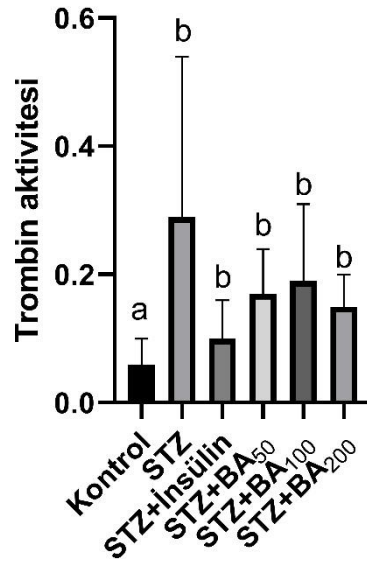
Tablo 19. Gruplar arası IL-18 sitokin seviyeleri ortalamaları

GRUPLAR	x	ss	n	ANOVA	
				<i>F</i>	<i>p</i>
Kontrol	17765,7 ^b	10453,04	9	6,312	<0.001
STZ	56085 ^a	7070,6	9		
STZ+İ	27242,9 ^b	18300,76	7		
STZ+BA ₅₀	34850 ^b	23224,19	8		
STZ+BA ₁₀₀	34296 ^b	4296,5	9		
STZ+BA ₂₀₀	32428 ^b	9714,64	8		

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ ss) olarak verilmiştir. ^{a, b} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.10. Trombin Aktivitesi Bulguları

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde; diyabetik ratlara ait serum örneklerinde kontrol grubuna kıyasla trombin aktivitesinin yaklaşık 4,83 kat arttığı görüldü ($p<0,05$). Kontrol grubu ratları ile BA tedavisi alan diyabetik rat grupları arasında farklılık olmadığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 57; Tablo 20).



Şekil 53. Diyabetik ratlara borik asit takviyesinin böbrek dokusunda IL-18 sitokin seviyesi üzerindeki etkileri. Veriler, ortalamalar ve standart hataların dikey çubuklarla temsil edildiği değerlerdir. ^{a-b}: farklı harflere sahip ortalama değerler anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Tek Yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi uygulandı.

Tablo 20. Gruplar arası trombin aktivitesi ortalamaları.

GRUPLAR	$\bar{x}$	ss	n	ANOVA	
				F	p
Kontrol	0,06 ^b	0,04	9	3,133	<0.05
STZ	0,29 ^a	0,25	9		
STZ+İ	0,10 ^b	0,06	7		
STZ+BA ₅₀	0,19 ^b	0,12	8		
STZ+BA ₁₀₀	0,17 ^b	0,07	9		
STZ+BA ₂₀₀	0,15 ^b	0,05	8		

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$) olarak verilmiştir. ^{a, b} Her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$). Tek Yönlü ANOVA testi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey post hoc testi kullanıldı.

5.11. Biyokimyasal Bulgular

STZ ile indüklenen diyabetik nefropati modelinde kan albümin üre, kreatinin ve ürik asit düzeyine göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$; $p<0,001$; Tablo 17). Albümin, BUN, kreatinin ve ürik asit değerleri incelendiğinde STZ grubunda anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$; $p<0,001$). Albümin, BUN, kreatinin değerleri bakımından STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ gruplarının kontrol ve STZ+İ gruplarına benzer olduğu tespit edildi ($p>0,001$; Tablo 21).



Tablo 21. Gruplar arası böbrek fonsiyon testi ortalamaları.

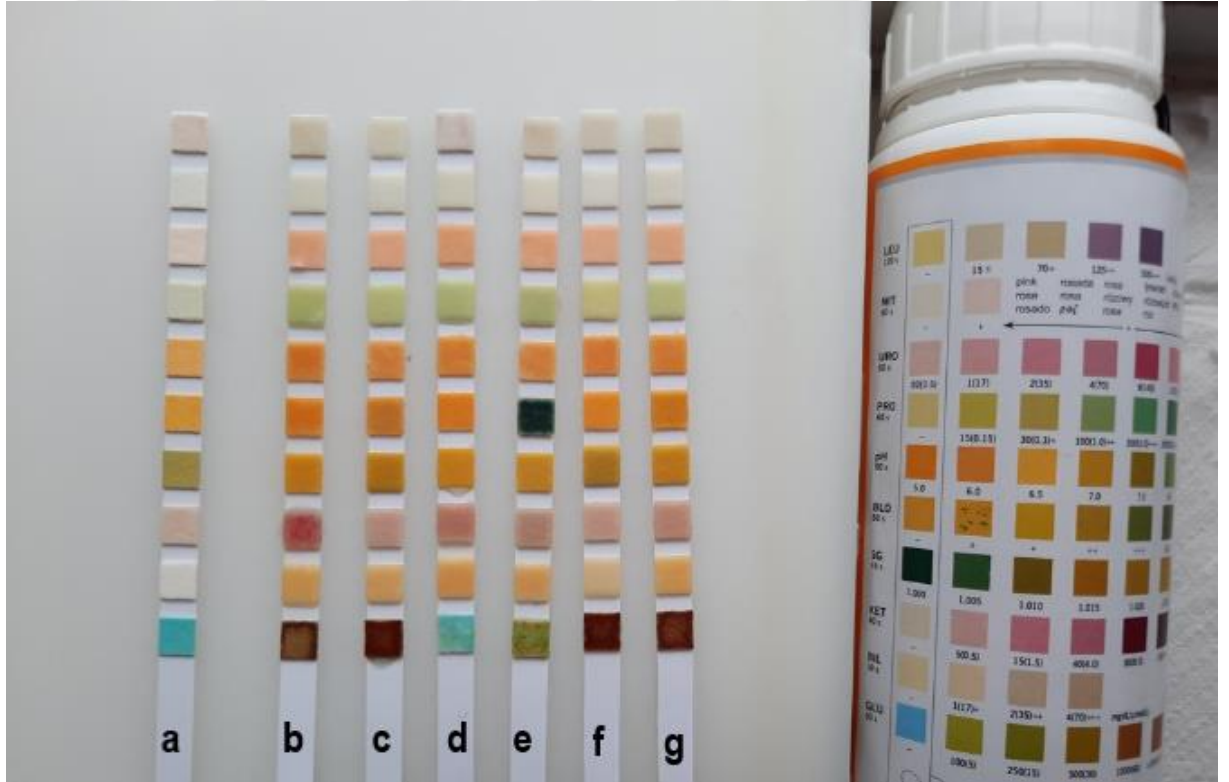
	Kontrol	STZ	STZ+İ	STZ+BA₅₀	STZ+BA₁₀₀	STZ+BA₂₀₀	ANOVA	
	x ± ss (n=9)	x ± ss (n=9)	x ± ss (n=7)	x ± ss (n=8)	x ± ss (n=9)	x ± ss (n=8)	F	p
Albümin (g/dL)	3,83±0,14 ^b	4,97±0,57 ^a	3,61±0,4 ^b	3,55±0,37 ^b	3,56±0,3 ^b	3,61±0,31 ^b	19,625	<0,001
Üre (mg/dL)	58,44±7,16 ^b	81,67±9,23 ^a	61,57±8,68 ^b	68,50±19,46 ^b	57,44±21,5 ^b	52,67±8,9 ^b	5,075	<0,05
Kreatinin (mg/dL)	0,28±0,04 ^b	1,34±0,11 ^a	0,36±0,08 ^b	0,38±0,13 ^b	0,33±0,12 ^b	0,32±0,11 ^b	146,941	<0,001
Ürik Asit (mg/dL)	0,87±0,2 ^b	2,60±0,42 ^a	1,37±0,29 ^b	1,19±0,58 ^b	1,16±0,22 ^b	1,12±0,41 ^b	27,998	<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma (ort. ± ss) olarak verilmiştir. ^{a, b} her satırdaki farklı üst simge harflerine sahip değerler önemli ölçüde farklılık gösterir ($p < 0.05$, $p < 0.001$).

Tek Yönlü ANOVA testi ve homojenite testi sağlanamadığı için gruplar arası karşılaştırma için Games-Howell post hoc testi kullanıldı.

5.11.1. İdrarda Keton Cisimciğinin Ölçümü

Ötenaziden 1 gün önce alınan idrar örneklerinden strip yardımıyla glukoz, protein ve keton cisimsiği yönünden değerlendirme yapıldı. Kontrol grubunu oluşturan ratların idrar muayenelerinde herhangi bir anormal bulguya rastlanmadı. STZ grubundaki ratlarda gözle görülebilir ve değişen seviyelerdeki glukozüri ve keton seviyesinde şiddetli; proteinüri seviyesinde hafif artış olduğu dikkati çekti (Şekil 58).



Şekil 54. Strip idrar örneğinin idrar stripi ile ketozis bakımından değerlendirilmesi. a: örnek strip, b:STZ, c: STZ+İ, d: Kontrol, e: STZ+ BA₅₀, f: STZ+BA₁₀₀, g: STZ+BA₂₀₀

6. TARTIŞMA

Bu çalışma; STZ ile oluşturulan deneysel diyabetik nefropatiye bağlı endotel hasarı durumunda, PAR-1/trombin sinyalizasyonunun aracılık ettiği vasküler inflamasyonun, NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki rolünü araştırmak; borik asitin muhtemel iyileştirici etkileri ve mekanizmasına bağlı olarak potansiyel bir terapötik yaklaşım geliştirmek için tasarlandı.

STZ ile DN oluşturulan farelerde trombin reseptörü olan PAR-1' in protein ve mRNA' sında artış görüldüğü, PAR-1 eksikliği ya da inhibisyonunun ise DN' ye karşı nefroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (Qiu ve Tang, 2016; Tang vd., 2020; Waasdorp vd., 2016). Aynı zamanda PAR-1 inhibisyonunun NF- κ B aracılı NLRP3 aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Tang vd., 2020). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar gösteriyor ki; kronik şekilde hiperglisemiye maruz kalınması glomerüler hücrelerde ve podositlerde NF- κ B aracılı NLRP3 inflamatuvar aktivasyonuna neden olmaktadır (Shahzad vd., 2015; Williams vd., 2022) ve yine diyabetik ratlarda böbrek NLRP3 aktivasyonunun inhibisyonu DN' de iyileşmeler sağlanmaktadır (Liu vd., 2020; Ohga vd., 2007). Mevcut çalışmada STZ ile indüklenen deneysel diyabetik nefropatide, diyabetik ratlarda kronik yüksek glukozun böbrek dokusunda endotel hasarına yol açtığı; trombin/PAR-1 yolağının ve NLRP3 inflamazomunun aktive olduğu tespit edildi. İki yüz mg/kg borik asitin trombin inhibisyonu veya PAR-1 antagonizması yoluyla NLRP3 inflamazom aktivasyonunu kısıtlayarak endotel hasarında iyileşme sağladığı gözlemlendi.

Diyabetik nefropati çalışmalarında diyabet oluşturulması için ortalama 50mg/kg dozda i.p. yolla tek doz halinde uygulanan STZ' nin, takip eden günlerde kan glukoz seviyesini arttırdığı, bu etkinin STZ' nin pankreatik beta hücrelerine sitotoksik etki göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Dey vd., 2022; Forbes vd., 2003; Mestry

vd., 2017; Ohga vd., 2007; Trachtman vd., 1995). Mevcut çalışmada, açlık kan glukoz seviyesinin diyabetik kabul edilebilir seviyede artmış olması STZ uygulanan grupta beta hücrelerinde nekrotik değişikliklerin görülmüş olması, STZ' nin seçici etkisi görüşlerini desteklemektedir.

Deneyssel diyabet çalışmalarında diyabetik rat grupları, sağlıklı rat gruplarıyla karşılaştırıldığında vücut ağırlığının diyabetik rat gruplarında anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Grover vd., 2001; Jain vd., 2020). Borik asit takviyesi verilen diyabetik ratlarda ise vücut ağırlığının kontrol grubundan farklı olduğu görülmüştür (Cakir vd., 2018). Aynı zamanda STZ uygulaması ve yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslenerek diyabet oluşturulmuş ratlara 2 hafta boyunca 10 mg borik asit uygulamasının HFD-STZ grubuna kıyasla bor tedavi gruplarında vücut ağırlığı bakımından anlamlı olarak azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir (López-Cabrera vd., 2018). Oral borik asit alımının katabolizmanın artmasına, metabolizma hızında artışa ve lipolize sebebiyet vermesi canlı ağırlık kaybıyla sonuçlanmaktadır (Aysan vd., 2011, 2013; Kalaçay ve Atakişi, 2022). Mevcut çalışmada sağlıklı ratlarda vücut ağırlığında artma gözlenirken, diyabetik ratlarda kilo kaybı şekillenmiştir. Bu durum diyabete bağlı kilo kaybını bildiren çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Ancak çalışmada sadece bor verilen bir grubumuz olmadığı için, kilo kaybı üzerinde borun etkisi ile ilgili bir yorum yapılamamıştır.

Diyabet modeli oluşturulan ratlara borik asit takviyesi verildiğinde AKG seviyesinde önemli ölçüde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Cakir vd., 2018). Yapılan çalışmalar borik asitin kan glukoz seviyesinde düşürücü etkisi ile anti-diyabetik yönünün olduğunu göstermektedir (Kan ve Kucukkurt, 2023). Aynı zamanda STZ uygulaması ve yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslenerek diyabet oluşturulmuş ratlara 2 hafta boyunca 10 mg borik asit uygulamasının HFD-STZ grubuna kıyasla bor tedavi gruplarında glisemide

anlamlı olarak azalmaya sebebiyet verdiği bildirilmiştir (L3pez-Cabrera vd., 2018). Mevcut çalışmada kontrol grubu ratlarda AKG seviyesinin normal seyretmesine karşılık STZ grubu ratlarda artış g3zlendi. Bununla birlikte STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi grupları ile STZ+İns3lin grubu arasında anlamlı bir farklılığın olmaması BA tedavisinin ins3lin kadar etkin olmasa da AKG seviyesinde d3şüş3 sebeb olduğunu d3ř3nd3rd3. Sonuç olarak BA ile tedavi edilen diyabetik ratların AKG seviyelerini 3nemli 3l3de azalttığı ancak normalleştirmediği g3r3ld3.

STZ ile DN ind3klendiği çalışmalarda sadece STZ uygulanan ve tedavi uygulanmayan gruplarda r3latif b3brek ağırlığında artış olduğu g3zlemlenmiştir (Gao ve Wu, 2022; Guo vd., 2021; Mestry vd., 2017; Teuma vd., 2022). Mevcut alışmada STZ uygulanan diyabetik ratlarda literat3rlerle uyumlu olarak r3latif b3brek ağırlığında artış g3zlendi. STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarının ise bu r3latif b3brek ağırlığını kontrol ve STZ+ins3lin gruplarına yaklaştırarak iyileşme sağladığı tespit edildi.

STZ ile diyabet oluşturulan deneysel çalışmalarda pankreas dokusunun ekzokrin asiner h3crelerinde ve Langerhans adacık h3crelerinde nekroz ve vakuoler dejenerasyon, kapillar hemoraji, vask3ler duvarda kalınlaşma (Alsharif vd., 2023; Hassan vd., 2023), Langerhans adacık sayılarında azalma ve çaplarının k33lmesi gibi histopatolojik değişiklikler g3r3ld3đ3 bildirilmiştir (Ali ve Mustafa, 2023). Mevcut çalışmada diyabetik pankreasın histopatolojik bulguları, daha 3nce yapılan çalışmalara ait bulgular ile paralellik arz etmektedir.

STZ ile diyabet oluşturulan ratlara 10 mg/kg/g3n dozda melatonin uygulanarak pankreas 3zerindeki etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmaya g3re melatoninin diyabetik pankreasta g3r3len dejeneratif değişiklikleri engellediği, ̢ h3cre y3zde alanının azalmasını engellediği bildirilmiştir (Alsharif vd., 2023). STZ ile diyabetin ind3klendiği

deneysel bir çalışmada 15 mg/kg dozda borik asit uygulamasının insülin sekresyonunda artış sağladığı bildirilmiştir (Çakır, 2023). İn vitro olarak hipoksi koşulları uygulanan pankreatik Beta-TC-6 hücre hattına boron bileşiklerinden sodyum pentaborat pentahidrat ve borik asit uygulamasının insülin sekresyonunun kontrol grubuna yaklaştırdığını, preproinsülin ve insülin genlerinin mRNA ekspresyonunda artış sağlayarak iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Aydın vd., 2019). Mevcut çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan ratların pankreas dokusunda adacık sayıları ve adacık çapı ortalamalarında azalışın engellendiği ve korunduğu tespit edildi.

Deneyssel DN' de böbreklerde histopatolojik olarak glomeruler hipertrofi, Bowman boşluğunda daralma, Bowman kapsülünün pariyetal tabakasında kalınlaşma, tübül epitellerinde vakuolizasyon, tübüler atrofi, tübül dilatasyonu, tübül epitellerinde piknotik çekirdekler, tübül lümeninde hiyalinoz ya da hücre dökülmesi, peri tübüler kılcıl damarlarda dolgunluk ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları gibi histolojik değişikliklerin olduğu rapor edilmiştir (Kamli-Salino vd., 2023; Mohammad vd., 2023). Mitokondri ROS (mtROS)' u hedef alan bir antioksidan olan MitoQ ile tedavi edilen db/db fareleri ile tedavi edilmeyen db/db farelerinin incelendiği 20 haftalık bir çalışmada db/db farelerinde kontrol farelerine kıyasla glomerüler mezangiyal matris proliferasyonunun arttığını, MitoQ ile tedavi edilen db/db farelerinde ise bu bulgunun hafiflediği bildirilmiştir (Y. Han vd., 2018). Ratlar üzerinde akrilamid ile oluşturulan toksikasyon çalışmasında 60 gün boyunca 5, 10 ve 20 mg/kg/gün dozlarda uygulanan borik asit böbrek dokusunda Bowman boşluğu, hiperemi ve tübül epitellerinin dejeneratif değişikliklerinde iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir (Acaroz vd., 2018). İskemi/reperfüzyon ile indüklenen böbrek hasarı ve bu hasara karşı borik asit tedavisinin kullanıldığı bir çalışmada tübüler hasarın borik asit kullanımıyla normale yakın bir histopatoloji ile iyileşme sağlandığı

bildirilmiştir (Geyikoglu vd., 2019). Kronik etanol toksisitesi oluşturulan bir çalışmada Sprague Dawley ratlara 4 hafta boyunca oral gavaj ile 100 mg/kg BA tedavisi verilmiştir. Çalışma sonunda ratlarda kronik etanol toksisitesi üzerinde borik asit kullanımının histolojik açıdan tübül epitel hücre kaybının azalttığı lümen genişliğinin kontrol grubuna yaklaştırarak iyileşme sağladığı ayrıca kaspaz-3 ve terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) immunoreaktivliğini düşürerek apoptotik faaliyetleri azalttığı bildirilmiştir (Cikler-Dulger ve Sogut, 2020). Kanser kemoterapisinde kullanılan siklofosfamid (CPM) aynı zamanda böbrek hasarına yol açmaktadır. Bu hasarın önlenabilirliğinin incelendiği bir çalışmada SD ratlara CPM uygulamasından 4 gün önce 200 mg/kg dozda BA oral gavaj ile verilmiştir. Altı gün süren çalışma sonucunda BA' nın, CPM' nin neden olduğu oksidatif stresi ve böbrek hasarını, antioksidan koruma sisteminin aktivitesinde artışa ve ayrıca lipid oksidasyonunun inhibisyonuna yol açarak renoprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Cengiz, 2018).

Mevcut çalışmada tübüler ve glomeruler hasar yönünden skorlandığında STZ grubunda söz konusu glomeruler ve tübüler hasarın daha fazla olduğu ve literatür ile uyumlu olduğu görüldü. STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ tedavi gruplarında ise kontrol ve STZ+insüline yakın histopatolojik bulgular saptanması BA tedavisinin böbrek morfolojisi üzerindeki pozitif yönde etkinlik gösterdiğini düşündürdü.

Periyodik Schiff Asit (PAS) boyamada ise sağlıklı böbrek histolojisinde Bowman kapsülünde, renal tübül bazal membranında mezangiyal matrikse ve proksimal tübülün fırçamsı kenarlarında magenta renginde pozitiflikler bulunduğu, bununla birlikte diyabetik kontrol grubunda Bowman kapsülünde kalınlaşma, mezangial matrikste genişleme, renal tübüllerin bazal membranında kalınlaşma, arteriyel hiyalinoz, PAS-pozitif hiyalin döküntüleri ve PCT' de fokal fırça kenar kaybı görüldüğü bildirilmiştir (An

vd., 2020; Mohammad vd., 2023). Sunulan çalışmada böbrek dokusunun PAS boyama sonucunda STZ grubunda Bowman kapsülünün bazal membranında kalınlaşmaların borik asit tedavisi alan diyabetik ratlara göre daha kalın olduğu görüldü.

Diyabetik nefropatide inflamatuvar aktivasyonun işlevsel ilişkisini araştırmak için STZ ile NLRP3-/- veya kaspaz-1-/- farelerinde diyabetin indüklendiği bir modelde, NLRP3-/- veya kaspaz-1-/- durumunun vücut ağırlığını veya kan şekeri seviyelerini etkilemeden albuminüriyi ve glomeruler ekstrasellüler matriks artışını iyileştirdiği bildirilmiştir. Ratlar üzerinde uzun (12 hafta) ve kısa vade (8 hafta) de deneysel DN modeli kurulan bu çalışmada; diyabetik farelerin serum IL-18 ve IL-1 β seviyelerinde ve böbrek korteksi ekstraktında NLRP3 ve kaspaz-1 artışı olduğu, NLRP3 ile kaspaz-1' in inflamasyon aktivasyonunun fonksiyonel bir rolü olduğu bildirilmiştir (Shahzad vd., 2015).

Mitokondri ROS (mtROS)' u hedef alan bir antioksidan olan MitoQ ile tedavi edilen db/db fareleri ile tedavi edilmeyen db/db farelerinin incelendiği 20 haftalık bir çalışmada proteomik analiz sonuçlarında db/db fare böbreklerindeki NLRP3, kaspaz-1 ve IL-1 β seviyelerinin, kontrol fare grubundan daha yüksek olduğunun görülmesi mitokondriyal ROS ve NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunun diyabetik nefropatiyi şiddetlendirdiği sonucuna varılmıştır (Y. Han vd., 2018).

HFD (yüksek yağlı diyet) besleme ve 100 mg/kg i.p. STZ uygulanarak diyabet geliştirilen bir çalışmada sekiz hafta boyunca intragastrik yol ile polifenol grubuna ait Punicalagin (PU) verildiği ve buna göre; kontrole kıyasla diyabetik ratlarda BUN, kreatinin ve albüminürinin artmış olması ve PU tedavi grubunda bu değerlerin azalmış olması böbrek fonksiyonunda iyileşme olarak yorumlandığı bildirilmiştir. Ayrıca western blot analiz sonucuna göre diyabetik grupta NLRP3, IL-1 β ve kaspaz-1 ekspresyonunun

kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve bu durumun PU tedavisi ile tersine çevirildiği sonuçta da PU' nun piroptozisi baskılayarak anti-inflamatuar etki sağlayabileceği bildirilmiştir (An vd., 2020).

SD ratlarda oluşturulan bir DN çalışmasında MALAT1' in pro-piroptotik özelliklerinin ve miR-23c' nin anti-piroptotik özelliklerinin NLRP3, kaspaz-1 ve IL-1 β ekspresyonlarının aşağı regülasyonunu sağlamalarıyla piroptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (Li vd., 2017).

Kanser tedavisinde kullanılan ve nefrotoksisite yan etkisi bulunan sisplatin uygulamasının üzerine BA' ın renoprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Wistar ratlara 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında oral gavaj ile BA verilmiştir. Çalışmanın 4.gününde tek doz 10 mg/kg dozda sisplatinin uygulanmış ve deney 10 gün sürmüştür. Çalışmanın sonucunda BA' ın, sisplatin toksisitesinin neden olduğu inflamasyonu (IL-1 β , IL-18) ve apoptotik hasarı (NF- κ β , kaspaz-1) azaltarak iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Hazman vd., 2018).

Wistar albino ratlara 100 mg/kg/gün dozda BA uygulanmış ve deneyin 27. ve 28. günlerinde miyokardiyal infarksiyon (MI) modeli oluşturmak üzere subkutan yolla (200 mg/kg) isoproterenol-HCl (ISO) uygulanmış, deney sonunda MI grubu serumlarında inflamasyon belirteçlerinden IL-6 ve TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre artarken, tedavi edilen gruplarda azaldığı dolayısıyla BA' ın proinflamatuvar etkiye sahip olduğu ve MI' da hücrel hasar üzerinde protektif etkileri olduğu belirtilmiştir (Karimkhani vd., 2021). Mevcut çalışmada diyabetli ratların böbrek dokusunda IL1 β , IL-18 ekspresyonunda ve kaspaz-1, NF- κ β immunpozitifliklerine rastlanılmıştır. Ancak borik asit tedavileri alan diyabetik ratlarda bu parametrelerde düşüş görülmesi, yapılan çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar literatürler ile

benzeşmekte olup diyabetin böbrek dokusunda IL1 β , IL-18, kaspaz-1 ve NF- κ β üzerinde arttırıcı etkisi olduğu görülmüştür.

Transgenik farelerde DN üzerinde ve ayrıca yüksek glukoza maruz kalan insan göbek kordonu damar endotel hücrelerine, insan akciğer mikrovasküler endotel hücre kültürü ve fare mezangiyal hücre kültürü üzerinde minoksilin ve aktif protein C' nin anti-apoptotik etki gösterdiği bildirilen bir çalışmada PAR-1' in inhibisyonunun önemini tespit etmişlerdir (Isermann vd., 2007).

Wild tip ve PAR-1 eksikliği olan farelerde diyabet geliştirilen ve 3 ay süren bir çalışmada PAR-1 eksikliği olan farelerde DN gelişiminin sınırlı kaldığı, PAR-1' in DN' de mezangiyal hücre proliferasyonunu ve hücre dışı matrisi üretimini uyararak DN' yi tetiklediğini bildirmişlerdir (Waasdorp vd., 2016).

Wild tip C57BL/6 farelerde yapılan bir DN çalışmasında PAR-1 antagonisti olarak çalışan vorapaksar uygulanan bir çalışmaya göre gruplarda benzer hiperglisemi görülmesine rağmen Varopaksar tedavisi gören grupta diyabetik kontrole oranla daha az albüminüri, mezangiyal genişleme ve fibronektin birikimi saptandığı tespit edilmiştir (Waasdorp vd., 2018).

FVL (Factor V Leiden) mutasyonu gösteren DN' li hastalarda, deneysel olarak DN oluşturulmuş farelerde, in vitro insan ve fare podositleri hücre kültürü çalışmalarında sırasıyla FVL taşıyıcılı diyabetik hastalarda düşük ama sürekli trombin üretiminin nefroprotektif etki gösterdiği ve mikroalbüminürinin azaldığını; diyabetik FVL-pozitif farelerde glomerüler apoptozun azaldığı ve podositlerin korunduğu hatta FVL' nin bu pozitif etkisinin trombin inhibitörü olan Hirudin kullanımıyla azaldığını; in vitro olarak ise, düşük doz trombinin glukoz kaynaklı apoptozu önlendiği, yüksek doz trombinin apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir (Wang vd., 2011).

Mevcut çalışmada diyabetik ratların böbrek dokusunda önemli ölçüde hasar görüldüğü, PAR-1/trombin sinyalizasyonu ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu beraberinde NF- κ B, kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının arttığı ve bu durumun yukarıdaki literatürlerle uyum içinde olduğunu gösterdi.

Diyabetik ratlar üzerinde yapılan bir çalışma sonuçlarına göre hipergliseminin NLRP3, IL-18 ve VEGF seviyelerinde artışa neden olduğu ancak *Phyllanthus emblica* L. Ekstraktının bu seviyelerde azalmaya yol açtığı ve DN' ye karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir (Lin ve Shih, 2024). Mevcut çalışmada da diyabetik nefropatili dokuda VEGF artışının, 200 mg/kg doz BA kullanımıyla azaldığı görülmüştür.

Diyabetik nefropati modeli geliştirilen çalışmalarda mezangiyal hücre proliferasyonu özellikle STZ gruplarında Ki67 belirteci kullanılarak ortaya konulduğu görülmektedir (Tang vd., 2020; Wu vd., 2024). Mevcut çalışmada da STZ grubunda Ki67 artışının mezangiyal hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu, STZ+BA₂₀₀ grubunda mezangiyal hücre proliferasyonunun önemli ölçüde azalmış olduğu görüldü. Dolayısıyla 200 mg/kg dozdaki BA'nın mezangiyal hücre proliferasyonunda iyileşme sağladığı düşünülmektedir.

SD ratlarda diyabetik nefropati oluşturulan bir çalışmada serum kreatinin, albümin, BUN değerlerinde artış olduğu ve renal disfonksiyon şekillendiği bildirilmiştir (Qi vd., 2020).

Akut ve kronik DN oluşturulan bir çalışmada akut dönemde farelerde albüminüride değişim olmadığı ancak kronik dönemde farelerde belirgin albüminüri görüldüğü; DN' li farelere IL-1 reseptör antagonisti olarak bilinen Anakinra uygulamasının albüminüriyi normal değerlere yaklaştırdığı bildirilmiştir (Shahzad vd., 2015).

Analjezik ve ateş düşürücü olarak yaygın bir şekilde kullanılan parasetamolün doz aşımıyla gerçekleşen böbrek toksisitesinde BA' in yeni bir antioksidan ajan olarak kullanımının Wistar ratlar üzerinde araştırıldığı deneysel bir çalışmada 2 g/kg parasetamol gastrik sonda ile BA ise oral gavaj yoluyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında uygulanmıştır. Parasetamolün sebep olduğu nefrotoksisiteden dolayı BUN ve kreatinin seviyelerinin arttığı bununla beraber Parasetamol+BA grubunda azaldığı ve nefroprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Özkan ve Karabağ, 2020). Yine 1mg/kg dozda parasetamol ile böbrek hasarı oluşturulan SD ratlarda 6 gün boyunca boron kaynaklı sodyum pentaborat (B50 ve B100 mg/kg) intragastrik yol ile verilmiştir. Deney sonunda parasetamol grubunda serum kreatinin ve BUN seviyelerinde artış olmasına rağmen borik asit tedavisi alan grupta bu parametrelerde azalma şekillendiği bildirilmiştir (Aktas Senocak vd., 2024).

SD ratların böbrek dokusuna 45 dk. iskemi, 24 saat reperfüzyon işlemi uygulanan bir çalışmada reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal olarak 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda serum fizyolojik içerisinde çözündürerek BA uygulanmıştır. Buna göre 50 mg/kg BA tedavisi uygulana grubu serum kreatinin ve BUN artışını inhibe ettiği, böbrek fonksiyonlarında iyileşmeler görüldüğü bildirilmiştir (Şentürk vd., 2018). ADH antagonisti konivaptan (10mg/ml/kg) ile BA (50 mg/kg) tek taraflı iskemi-reperfüzyon (I/R) modeliyle akut böbrek hasarı üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada sözkonusu kombinasyonun BUN ve kreatinin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Ancak bu olumsuz durum olası konivaptan ve borik asitin etkileşime girmesi yönünde yorumlanmıştır (Can vd., 2022).

Yapılan çalışmada kan numunelerinden böbrek fonksiyon testleri (albümin, BUN, kreatinin, ürik asit) incelendiğinde STZ grubunda kontrol grubuna göre artış

olduğu; albümin, BUN, kreatinin, ürik asit değeri bakımından STZ+BA₅₀, STZ+BA₁₀₀ ve STZ+BA₂₀₀ gruplarının kontrole benzer olduğu tespit edildi. Diyabet grubunda böbrek hasarını gösteren parametrelerin yüksek olmasına rağmen borik asit tedavisi alan diyabetik ratlarda bu değeri kontrolle yaklaşmış olması borik asitin nefroprotektif etkisini göstermiştir.



7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada borik asitin, diyabetik sıçanlarda renal disfonksiyonları hafiflettiği ve kronik yüksek glukozun neden olduğu glomerüler mezangial hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edildi. Buna ek olarak NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile birlikte NLRP3, kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 seviyelerinde ayrıca NF- κ B protein ekspresyonunda artışlar görülmüştür. Bununla birlikte PAR-1 artışının DN' de glomeruler hasara sebep olduğu, Borik asitin PAR-1' i aşağı yönde regüle ederek PAR-1 inhibisyonuna ve dolayısıyla bu durumu hafiflettiği tespit edilmiştir.

Borik asit tedavisiyle NLRP3 aktivasyonunun baskılanmasının, muhtemelen PAR-1 reseptörünün aşağı regülasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, borik asitin doğrudan PAR-1' e bağlanıp bağlanamayacağı ve ardından PAR-1' in aşağı akış sinyalini inhibe edip edemeyeceği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgulara gözönüne alındığında tutulduğunda borik asitin hem anti-inflamatuar hem de antikoagülasyon ve antitrombotik özellikleri sayesinde nefroprotektif bir ajan olabileceği kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKÇA

Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Arslan, H. O., Varol, N., ve Zhu, K. (2018). The ameliorative effects of boron against

acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 745-752.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.029>

Aktas Senocak, E., Utlü, N., Kurt, S., Kucukler, S., ve Kandemir, F. M. (2024). Sodium Pentaborate Prevents Acetaminophen-Induced Hepatorenal Injury by Suppressing Oxidative Stress, Lipid Peroxidation, Apoptosis, and Inflammatory Cytokines in Rats. *Biological Trace Element Research*, 202(3), 1164-1173.
<https://doi.org/10.1007/s12011-023-03755-4>

Ali, M. A., ve Mustafa, N. G. (2023). A comparative histopathological study of pancreas, intestine, and liver of experimentally induced diabetes in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 37(4), s971-s978.
<https://doi.org/10.33899/ijvs.2023.138343.2791>

Alsharif, K. F., Hamad, A. A., Alblihd, M. A., Ali, F. A. Z., Mohammed, S. A., Theyab, A., Al-Amer, O. M., Almuqati, M. S., Almalki, A. A., Albarakati, A. J. A., Alzahrani, K. J., Albrakati, A., Albarakati, M. H., Abass, D., Lokman, M. S., ve Elmahallawy, E. K. (2023). Melatonin downregulates the increased hepatic alpha-fetoprotein expression and restores pancreatic beta cells in a streptozotocin-induced diabetic rat model: A clinical, biochemical, immunohistochemical, and descriptive histopathological study. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1214533.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1214533>

American Diabetes Association. (2004). Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care*, 27, s79-s83. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.2007.S79>

American Diabetes Association. (2014). Standards of Medical Care in Diabetes 2014. *Diabetes Care*, 37,1. <https://doi.org/10.2337/dc14-S014>

- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2021). 11. Chronic Kidney Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, s175-s184. <https://doi.org/10.2337/dc22-S011>
- An, X., Zhang, Y., Cao, Y., Chen, J., Qin, H., ve Yang, L. (2020). Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway. *Nutrients*, 12, 5. <https://doi.org/10.3390/nu12051516>
- Anonymus. (2023). *Nephron | Definition, Function, Structure, Diagram, & Facts | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/nephron>
- Antoniak, S., Cardenas, J. C., Buczek, L. J., Church, F. C., Mackman, N., ve Pawlinski, R. (2017). Protease-activated receptor 1 contributes to angiotensin II-induced cardiovascular remodeling and inflammation. *Cardiology*, 136(4), s258-s268. <https://doi.org/10.1159/000452269>
- Awad, A. S., Kinsey, G. R., Khutsishvili, K., Gao, T., Bolton, W. K., ve Okusa, M. D. (2011). Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 301(6), s1358-s1366. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00332.2011>
- Aydın, S., Demirci, S., Doğan, A., Sağraç, D., Kaşıkçı, E., ve Şahin, F. (2019). Boron containing compounds promote the survival and the maintenance of pancreatic β -cells. *Molecular Biology Reports*, 46, 5. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05002-3>
- Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Erdem, M., Muslumanoglu, M., Yardımcı, E., ve Bektasoglu, H. (2013). Mechanism of Body Weight Reducing Effect of Oral Boric Acid Intake. *International Journal of Endocrinology*, 2013, e914651. <https://doi.org/10.1155/2013/914651>

- Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Yalvac, M. E., Emre, S. H., Karaca, C., ve Muslumanoglu, M. (2011). Body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Medical Sciences*, 8(8). <https://doi.org/10.7150/ijms.8.653>
- Baldwin, A. G., Rivers-Auty, J., Daniels, M. J. D., White, C. S., Schwalbe, C. H., Schilling, T., Hammadi, H., Jaiyong, P., Spencer, N. G., England, H., Luheshi, N. M., Kadirvel, M., Lawrence, C. B., Rothwell, N. J., Harte, M. K., Bryce, R. A., Allan, S. M., Eder, C., Freeman, S., & Brough, D. (2017). Boron-Based Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Chemical Biology*, 24(11), s1321-s1335. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.011>
- Baynest, H. W. (2015). Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6(5), s1-s9. <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000541>
- Bode, W. (2006). The structure of thrombin: A janus-headed proteinase. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32 Suppl 1, s16-s31. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939551>
- Cakir, S., Eren, M., Senturk, M., ve Sarica, Z. S. (2018). The Effect of Boron on Some Biochemical Parameters in Experimental Diabetic Rats. *Biological Trace Element Research*, 184, 1. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1182-0>
- Can, B., Kar, F., Kar, E., Özkoç, M., Şentürk, H., Dönmez, D. B., Kanbak, G., ve Alataş, İ. Ö. (2022). Conivaptan and Boric Acid Treatments in Acute Kidney Injury: Is This Combination Effective and Safe? *Biological Trace Element Research*, 200(8), s3723-s3737. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02977-8>

- Cengiz, M. (2018). Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 64(12), s11-s14.
- Chow, F., Ozols, E., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C., ve Tesch, G. H. (2004). Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney International*, 65(1), s116-s128. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00367.x>
- Cikler-Dulger, E. ve Sogut, I. (2020). Investigation of the protective effects of boric acid on ethanol induced kidney injury. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 95(3), s186-s193. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1662086>
- Coban, F. K., Liman, R., Ince, S., Hazman, O., ve Bozkurt, M. F. (2015). The AntioxiDant Effect Of Boron On Oxidative Stress And Dna Damage In Diabetic Rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(11).
- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *In Nature* (407, 6801). <https://doi.org/10.1038/35025229>
- Çakır, S. (2023). Effect of Boric Acid on Metabolic Peptides and Some Biochemical Parameters in Experimental Diabetic Rats. *Biological Trace Element Research*, 202, s1001-s1008. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03910-x>
- Demirdogen, R. E. (2020). Relationship Among Blood Boron Level, Diabetes Mellitus, Lipid Metabolism, Bone Metabolism and Obesity: Can Boron Be An Efficient Indicator for Metabolic Disesesases? *Health Science Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.36648/1791-809X.14.1.689>

- Dey, P., Kundu, A., Lee, H. E., Kar, B., Vishal, V., Dash, S., Kim, I. S., Bhakta, T., ve Kim, H. S. (2022). Molineria recurvata Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy through Antioxidant and Anti-Inflammatory Pathways. *Molecules*, 27(15). <https://doi.org/10.3390/molecules27154985>
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. İçinde *Annual Review of Immunology* (C. 27, ss. 519-550). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Eren, M. (2004). Bor'un Biyolojik Önemi ve Metabolizma Üzerine Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), Article 1.
- Eurell, J. A., & Frappier, B. L. (2013). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. John Wiley & Sons.
- Fender, A. C., Kleeschulte, S., Stolte, S., Leineweber, K., Kamler, M., Bode, J., & Dobrev, D. (2020). Thrombin receptor PAR4 drives canonical NLRP3 inflammasome signaling in the heart—PubMed. *Basic Research in Cardiology*, 115(10). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31912235/>
- Ferri, F. F. (2020). *Ferri's Clinical Advisor 2021: 5 Books in 1*. Elsevier Health Sciences.
- Forbes, J. M., Thallas, V., Thomas, M. C., Founds, H. W., Burns, W. C., Jerums, G., & Cooper, M. E. (2003). The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(12), s1762-s1764. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1102fje>
- Fu, Y., Wu, N., ve Zhao, D. (2017). Function of NLRP3 in the Pathogenesis and Development of Diabetic Nephropathy. *Medical Science Monitor : International*

- Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, s3878-s3884.
<https://doi.org/10.12659/MSM.903269>
- Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
- Gao, H., & Wu, H. (2022). Maslinic acid activates renal AMPK/SIRT1 signaling pathway and protects against diabetic nephropathy in mice. *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00935-6>
- Geyikoglu, F., Koc, K., Colak, S., Erol, H. S., Cerig, S., Yardimci, B. K., Cakmak, O., Dortbudak, M. B., Eser, G., Aysin, F., Ozek, N. S., ve Yildirim, S. (2019). Propolis and Its Combination with Boric Acid Protect Against Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation, DNA Damage, and Apoptosis in Rats. *Biological Trace Element Research*, 192(2), s214-s221. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-1649-2>
- Gross, J. L., Azevedo, M. J. D., Silveiro, S. P., Canani, L. H., Caramori, M. L., & Zelmanovitz, T. (2005). Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*, 28(1), s164-s176.
<https://doi.org/10.2337/DIACARE.28.1.164>
- Grover, J. K., Vats, V., Rathi, S. S., ve Dawar, R. (2001). Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), s233-s238.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00246-X)
- Guo, L., Jiang, B., Li, D., ve Xiao, X. (2021). Nephroprotective effect of adropinin against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: Inflammatory mechanism

- and yap/taz factor. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, s589-s600.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S294009>
- Gülsün, T., ve Şahin, S. (2017). Diyabet ve Diyabete Bağlı Fizyolojik ve Farmakokinetik Değişiklikler. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2.
- Hadrup, N., Frederiksen, M., ve Sharma, A. K. (2021). Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, undefined-undefined.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104873>
- Han, X., Nieman, M. T., ve Kerlin, B. A. (2021). Protease-activated receptors: An illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), s17-s26. <https://doi.org/10.1002/rth2.12454>
- Han, Y., Xu, X., Tang, C., Gao, P., Chen, X., Xiong, X., Yang, M., Yang, S., Zhu, X., Yuan, S., Liu, F., Xiao, L., Kanwar, Y. S., ve Sun, L. (2018). Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis. *Redox Biology*, 16.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.02.013>
- Hassan, M., Rasul, A., Ajmal Shah, M., Jabeen, F., ve Sadiqa, A. (2023). Effect of PENN-DIABEX, a novel polyherbal formulation, in high fat diet streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(11), 103816.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103816>
- Hasslacher, C., ve Böhm, S. (2005). *Diabetes and the Kidney: Diabetic Nephropathy: Prevention, Diagnosis, Treatment*. John Wiley & Sons.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., ve Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and

Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, 41(3), s1032-s1048. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0756-0>

Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 29(4), s577-s580. <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>

Hunt, C. D. (1994). The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environmental Health Perspectives*, 102(7), s35-s43.

Hunt, C. D. (1998). Regulation of enzymatic activity: One possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), s205-s225. <https://doi.org/10.1007/BF02783139>

Hunt, C. D., & Idso, J. P. (1999). Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: A review and current research progress. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 12(3), s221-s233. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-670X\(1999\)12:3<221::AIDJTRA6>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-670X(1999)12:3<221::AIDJTRA6>3.0.CO;2-X)

Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., ve Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3). <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.003>

International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition*.

- Isermann, B., Vinnikov, I. A., Madhusudhan, T., Herzog, S., Kashif, M., Blautzik, J., Corat, M. A. F., Zeier, M., Blessing, E., Oh, J., Gerlitz, B., Berg, D. T., Grinnell, B. W., Chavakis, T., Esmon, C. T., Weiler, H., Bierhaus, A., ve Nawroth, P. P. (2007). Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nature Medicine*, 13(11), 1349-1358. <https://doi.org/10.1038/nm1667>
- Jain, P. G., Nayse, P. G., Patil, D. J., Shinde, S. D., ve Surana, S. J. (2020). The possible antioxidant capabilities of formononetin in guarding against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00071-9>
- Kabu, M., ve Akosman, M. S. (2013). Biological Effects of Boron. İçinde D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* s57-s75. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6470-9_2
- Kalaçay, D., ve Atakişi, O. (2022). Investigation the Effect of Boric Acid effect on Antioxidant System, HDL Levels and PON Activity on Rats Feding to the High-Fat Diet. *Caucasian Journal of Science*, 9(1), 49-64. <https://doi.org/10.48138/cjo.994111>
- Kamli-Salino, S. E. J., Brown, P. A. J., Haschler, T. N., Liang, L., Feliars, D., Wilson, H. M., ve Delibegovic, M. (2023). Induction of experimental diabetes and diabetic nephropathy using anomer-equilibrated streptozotocin in male C57Bl/6J mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 650, s109-s116. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.01.089>

- Kan, F., ve Kucukkurt, I. (2023). The effects of boron on some biochemical parameters: A review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 79, 127249. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127249>
- Kar, F., Hacıoglu, C., Senturk, H., Donmez, D. B., ve Kanbak, G. (2020). The Role of Oxidative Stress, Renal Inflammation, and Apoptosis in Post Ischemic Reperfusion Injury of Kidney Tissue: The Protective Effect of Dose-Dependent Boric Acid Administration. *Biological Trace Element Research*, 195(1), 150-158. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01824-1>
- Karimkhani, H., Özkoç, M., Shojaolsadati, P., Uzuner, K., Donmez, D. B., & Kanbak, G. (2021). Protective Effect of Boric Acid and Omega-3 on Myocardial Infarction in an Experimental Rat Model. *Biological Trace Element Research*, 199,7. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02360-z>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., ve He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (20, 13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kesavardhana, S., ve Kanneganti, T. D. (2017). Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. İçinde *International Immunology* (29, 5). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx018>
- Khaliq, H., Juming, Z., ve Ke-Mei, P. (2018). The Physiological Role of Boron on Health. İçinde *Biological Trace Element Research* (186, 1). <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1284-3>
- Kibirev, V. K., ve Gershkovich, A. A. (1999). [Natural and synthetic inhibitors of thrombin. II. Synthetic low-molecular-weight inhibitors]. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal* (1999), 71(1), s16-s26.

- Kierszenbaum, A. L., ve Tres, L. L. (2016). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Elsevier.
- King, D. (2022). *Histology at Southern Illinois University*.
<https://histology.siu.edu/crr/RN008b.htm>
- Lenzen, S. (2008). *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. *Diabetologia* 51(2). s216-s226.
- Li, X., Zeng, L., Cao, C., Lu, C., Lian, W., Han, J., Zhang, X., Zhang, J., Tang, T., ve Li, M. (2017). Long noncoding RNA MALAT1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated miR-23c targeting of ELAVL1 in diabetic nephropathy. *Experimental Cell Research*, 350(2). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.12.006>
- Lim, A. K. H. (2014). Diabetic nephropathy – Complications and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 7.
<https://doi.org/10.2147/IJNRD.S40172>
- Lin, C.-H., ve Shih, C.-C. (2024). *Protective Effects of Phyllanthus emblica L. Extract against Renal Dysfunction, Angiogenesis, and Fibrosis Occur through the Regulation of PKC α Activation, Vegf, and TGF- β 1 in a Diabetic Nephropathy Model(2024050545)*.Preprints.
<https://doi.org/10.20944/preprints202405.0545.v1>
- Liu, Y., Tang, Z.-Z., Zhang, Y.-M., Kong, L., Xiao, W.-F., Ma, T.-F., & Liu, Y.-W. (2020). Thrombin/PAR-1 activation induces endothelial damages via NLRP1 inflammasome in gestational diabetes. *Biochemical Pharmacology*, 175, 113849.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113849>
- Longnecker, D. S. (2021). Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia*, 1.

- López-Cabrera, Y., Castillo-García, E. L., Altamirano-Espino, J. A., Pérez-Capistran, T., Farfán-García, E. D., Trujillo-Ferrara, J. G., & Soriano-Ursúa, M. A. (2018). Profile of three boron-containing compounds on the body weight, metabolism and inflammatory markers of diabetic rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, s424-s429. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.009>
- Ludwig-Portugall, I., Bartok, E., Dhana, E., Evers, B. D. G., Primiano, M. J., Hall, J. P., Franklin, B. S., Knolle, P. A., Hornung, V., Hartmann, G., Boor, P., Latz, E., ve Kurts, C. (2016). An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney International*, 90(3), s525-s539. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.035>
- Luo, W., Tang, S., Xiao, X., Luo, S., Yang, Z., Huang, W., ve Tang, S. (2023). Translation Animal Models of Diabetic Kidney Disease: Biochemical and Histological Phenotypes, Advantages and Limitations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 16, s1297-s1321. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S408170>
- Maynard, R. L., ve Downes, N. (2019). *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Academic Press.
- McAuley, E. M., Bradke, T. A., ve Plopper, G. E. (2011). Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, 5(5), 382-386. <https://doi.org/10.4161/cam.5.5.18162>
- Mestry, S. N., Dhodi, J. B., Kumbhar, S. B., ve Juvekar, A. R. (2017). Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by Punica granatum

- Linn. Leaves extract. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(3), 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.06.008>
- Mogensen, C. E., Christensen, C. K., ve Vittinghus, E. (1983). The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32 Suppl 2, 64-78. <https://doi.org/10.2337/diab.32.2.s64>
- Mohammad, H. M. F., Galal Gouda, S., Eladl, M. A., Elkazaz, A. Y., Elbayoumi, K. S., Farag, N. E., Elshormilisy, A., Al-Ammash, B. B., Hegazy, A., Abdelkhalig, S. M., Mohamed, A. S., El-Dosoky, M., ve Zaitone, S. A. (2023). Metformin suppresses LRG1 and TGF β 1/ALK1-induced angiogenesis and protects against ultrastructural changes in rat diabetic nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, 114128. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114128>
- Mustafa, M. (2022). Evaluation of NLRP3 Inflammasome Protein Expression In Ulcerative Colitis. *Wiadomości Lekarskie*, 75(3), 641-644. <https://doi.org/10.36740/WLek202203113>
- Nielsen, F. H. (2002). The Nutritional Importance and Pharmacological Potential of Boron for Higher Animals and Human. İçinde H. E. Goldbach, P. H. Brown, B. Rerkasem, M. Thellier, M. A. Wimmer, ve R. W. Bell (Ed.), *Boron in Plant and Animal Nutrition* (s37-s49). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0607-2_4
- Nielsen, F. H. (2017). Historical and recent aspects of boron in human and animal health. *Journal of Boron*, 2(3).
- Nugroho, A. E. (2006). Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 7(4).

- Ohga, S., Shikata, K., Yozai, K., Okada, S., Ogawa, D., Usui, H., Wada, J., Shikata, Y., ve Makino, H. (2007). Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF- κ B activation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(4). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00288.2005>
- Ohiagu, F. O., Chikezie, P. C., ve Chikezie, C. M. (2021). Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control. *Biomedical Research and Therapy*, 8(3). <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i3.663>
- Özkan, E., ve Karabağ, F. (2020). Investigation of boron effect on trace elements and antioxidant capacity in paracetamol-induced nephrotoxicity model. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 91(1), s25-s35. <https://doi.org/10.33188/vetheder.557918>
- Öztürk, F. Y., ve Altuntaş, Y. (2015). Gestational diabetes mellitus. *Sisli Etfal Hastanesi Tip Bulteni / The Medical Bulletin of Sisli Hospital*, s1-s10. <https://doi.org/10.5350/SEMB.20150317014238>
- Pal, R. (2018). Boric acid in organic synthesis: Scope and recent developments. *Arkivoc*, 2018(1), s346-s371. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.462>
- Palygin, O., Ilatovskaya, D. V., ve Staruschenko, A. (2016). Protease-activated receptors in kidney disease progression. İçinde *American Journal of Physiology—Renal Physiology* (311, 6). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00460.2016>
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Muallem, S., ve Zeng, W. (2005). Borate transport and cell growth and proliferation: Not only in plants. *Cell Cycle*, 4(1), s24-s26. <https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1394>

- Parving, H. H., Gall, M. A., Skøtt, P., Jørgensen, H. E., Løkkegaard, H., Jørgensen, F., Nielsen, B., ve Larsen, S. (1992). Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic patients. *Kidney International*, 41(4), s758-s762. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.118>
- Pedersen, L. M. (1997). Gestationel diabetes mellitus. *Ugeskrift for Læger*, 159(30), 4617.
- Pelle, M. C., Provenzano, M., Busutti, M., Porcu, C. V., Zaffina, I., Stanga, L., ve Arturi, F. (2022). Up-Date on Diabetic Nephropathy. *İçinde Life* (12, 8). <https://doi.org/10.3390/life12081202>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9). <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Premanandan, C., ve Jennings, R. (2017). The Glomerulus. *Veterinary Histology*. <https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/chapter/11-the-glomerulus/>
- Premanandan, R. J. ve C. (2017). *Pancreas: Exocrine and Endocrine*. <https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/chapter/pancreas-exocrine-and-endocrine/>
- Pugliese, G., Tilton, R. G., Speedy, A., Oates, P. J., ve Williamson, J. R. (1994). Effects of combined insulin and sorbinil treatment on diabetes-induced vascular dysfunction in rats. *Metabolism*, 43(4), s492-s500. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90083-3)
- Qi, S. S., Zheng, H. X., Jiang, H., Yuan, L. P., ve Dong, L. C. (2020). Protective Effects of Chromium Picolinate Against Diabetic-Induced Renal Dysfunction and Renal Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomolecules*, 10(3), 398. <https://doi.org/10.3390/biom10030398>

- Qiu, Y.-Y., ve Tang, L.-Q. (2016). Roles of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Pharmacological Research*, 114, s251-s264. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.004>
- Ra, W., Daa, N., Syarifuddin, S., Hawas, A. A., Sholikhah, E., ve Ngatidjan. (2020). *Prevention of Polyuria, Glucosuria, and Increase of Kidney Weight in Diabetes Mellitus Rats by Centella asiatica Extract*.
- Radenković, M., Stojanović, M., ve Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, s13-s31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Roelofs, J. J., ve Vogt, L. (Ed.). (2019). *Diabetic Nephropathy: Pathophysiology and Clinical Aspects*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-93521-8>
- Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Sağlam, M., Köseoğlu, S., ve Enhoş, Ş. (2013). Boron in Periodontology. *Journal of Health Sciences*, 22(1), 70-75.
- Samra, Y. A., Said, H. S., Elsherbiny, N. M., Liou, G. I., El-Shishtawy, M. M., ve Eissa, L. A. (2016). Cepharanthine and Piperine ameliorate diabetic nephropathy in rats: Role of NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Life Sciences*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.002>
- Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Research International*, 2021, 1497449. <https://doi.org/10.1155/2021/1497449>

- Schroder, K., ve Coll, R. C. (2021). Caging NLRP3 tames inflammasome activity. *Cell*, 184(26), s6224-s6226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.035>
- Shahzad, K., Bock, F., Dong, W., Wang, H., Kopf, S., Kohli, S., Al-Dabet, M. M., Ranjan, S., Wolter, J., Wacker, C., Biemann, R., Stoyanov, S., Reymann, K., Söderkvist, P., Groß, O., Schwenger, V., Pahernik, S., Nawroth, P. P., Gröne, H. J., ... Isermann, B. (2015). Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney International*, 87(1). <https://doi.org/10.1038/ki.2014.271>
- Sharma, D., ve Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. İçinde *Journal of Cell Biology* (213, 6). <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Sharp, P. E., ve Regina, M. C. L. (2010). *The Laboratory Rat*. Taylor & Francis.
- Shi, F., Wei, B., Lan, T., Xiao, Y., Quan, X., Chen, J., Zhao, C., ve Gao, J. (2021). Low NLRP3 expression predicts a better prognosis of colorectal cancer. *Bioscience Reports*, 41(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20210280>
- Silva, M. P., Saraiva, L., Pinto, M., ve Sousa, M. E. (2020). Boronic Acids and Their Derivatives in Medicinal Chemistry: Synthesis and Biological Applications. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184323>
- Smoum, R., Rubinstein, A., Dembitsky, V. M., ve Srebnik, M. (2012). Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors. *Chemical Reviews*, 112(7), s4156-s4220. <https://doi.org/10.1021/cr608202m>
- Swanson, K. V., Deng, M., ve Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature reviews. Immunology*, 19(8), s477-s489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. İçinde *Physiological Research* (50, 6) s537-s546.
- Şentürk, H., Kar, F., Hacıoğlu, C., ve Kanbak, G. (2018). Renal İskemi-Reperfüzyon ile İndüklenmiş Oksidatif Stres Hasarının Pankreas Üzerine Etkisi: Doza Bağımlı Borik Asitin Rolü. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(6). <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.430369>
- Tanaka, M., ve Fujiwara, T. (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: Perspectives from plants. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 456(4), s671-s677. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0370-8>
- Tang, Z.-Z., Zhang, Y.-M., Zheng, T., Huang, T.-T., Ma, T.-F., ve Liu, Y.-W. (2020). Sarsasapogenin alleviates diabetic nephropathy through suppression of chronic inflammation by down-regulating PAR-1: In vivo and in vitro study. *Phytomedicine*, 78, 153314. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153314>
- Tanji, N., Kikugawa, T., ve Yokoyama, M. (2000). Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; Relationship to apoptosis and bcl-2 protein expression. *Anticancer Research*, 20(4), s2313-s2319.
- TENMAK BOREN. (2024). *Terminoloji*. <https://boren.tenmak.gov.tr/tr/calisma-alanlari/terminoloji.html>
- Tervaert, T. W. C., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., TerenceCook, H., Drachenberg, C. B., Ferrario, F., Fogo, A. B., Haas, M., Heer, E. D., Joh, K., L, L. H. N., Radhakrishnan, J., Seshan, S. V., Bajema, I. M., ve Bruijn, J. A. (2010). Pathologic classification of diabetic nephropathy. İçinde *Journal of the American Society of Nephrology* (21, 4). <https://doi.org/10.1681/ASN.2010010010>

- Teuma, L., Eshwaran, R., Fongang, U. T., Wieland, J., Shao, F., Lagana, M. L., Wang, Y., Agaci, A., Hammes, H. P., ve Feng, Y. (2022). Glucosamine inhibits extracellular matrix accumulation in experimental diabetic nephropathy. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1048305>
- Trachtman, H., Futterweit, S., Maesaka, J., Ma, C., Valderrama, E., Fuchs, A., Tarectecan, A. A., Rao, P. S., Sturman, J. A., Boles, T. H., Fu, M. X., ve Baynes, J. (1995). Taurine ameliorates chronic streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, 269(3 38-3). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.269.3.f429>
- Tsuchitani, M., Sato, J., ve Kokoshima, H. (2016). A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 29(3), 147-154. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0016>
- Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. (2022). *TEMĐ Diabetes Mellitus ve Komplikasyon larının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu-2022*.
- Uçkun, Z. (2013). Esansiyel Bir Komponent: Bor -Borun Günlük Alımı ve Fizyolojik Etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, Article 2.
- Waasdorp, M., Duitman, J., Florquin, S., ve Spek, C. A. (2016). Protease-activated receptor-1 deficiency protects against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33030>
- Waasdorp, M., Duitman, J. W., Florquin, S., ve Spek, C. A. (2018). Vorapaxar treatment reduces mesangial expansion in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Oncotarget*, 9(31), 21655-21662. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25069>

- Wang, H., Madhusudhan, T., He, T., Hummel, B., Schmidt, S., Vinnikov, I. A., Shahzad, K., Kashif, M., Muller-Krebs, S., Schwenger, V., Bierhaus, A., Rudofsky, G., Nawroth, P. P., ve Isermann, B. (2011). Low but sustained coagulation activation ameliorates glucose-induced podocyte apoptosis: Protective effect of factor V Leiden in diabetic nephropathy. *Blood*, 117(19), s5231-s5242. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314773>
- Weir, R. J., & Fisher, R. S. (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23(3), s351-s364. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(72\)90037-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(72)90037-3)
- Whyte, G. F., Vilar, R., ve Woscholski, R. (2013). Molecular recognition with boronic acids—Applications in chemical biology. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), s161-s174. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0099-0>
- Williams, B. M., Cliff, C. L., Lee, K., Squires, P. E., ve Hills, C. E. (2022). The Role of the NLRP3 Inflammasome in Mediating Glomerular and Tubular Injury in Diabetic Nephropathy. İçinde *Frontiers in Physiology* (13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.907504>
- Woods, W. G. (1994). *An introduction to boron: History, sources, uses, and chemistry—PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7889881/>
- Yan, L.-J., ve Wu, J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 8, 181. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>
- Zaidi, A., ve Green, L. (2022). Physiology of haemostasis. İçinde *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* (23, 2). <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2021.10.023>

- Zhang, C., Zhu, X., Li, L., Ma, T., Shi, M., Yang, Y., ve Fan, Q. (2019). A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 12. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S199802>
- Zhang, J., Liu, J., ve Qin, X. (2018). Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy. İçinde *Revista da Associacao Medica Brasileira* (64, 1). <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.01.85>



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Müge METİN ATALAY	
Program/Anabilim Dalı: Doktora Programı/Patoloji Anabilim Dalı	
Eğitim Bilgileri	
Doktora: 2017-2024 Doktora-Fırat Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Patoloji Anabilim Dalı	
Lisans: 2002-2007 Lisans-Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	
Araştırma Deneyimi	
1	“TS EN ISO / IEC 17025 Laboratuvar Akreditasyonu ve Dokümantasyon” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (25-26.02.2016)
2	“Ölçüm Belirsizliği” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (01.03.2016)
3	“Metod Validasyonu” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (29.12.2016)
4	“Veterinerlikte Moleküler Uygulamalar” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü-Qiagen (03-06.01.2017).
5	“Veteriner Hekimlikte Proje Nasıl Hazırlanır” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (03.03.2017).
6	“ELİSA Temel Eğitimi ve Laboratuvar Uygulamaları” Diagen Biyotek Sist Sağ. Hiz.ve Otomasyonu San. Tic.A.Ş. (15-16.03.2017)
7	“Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (20-31.03.2017)
8	“Moleküler İdentifikasyon Teknikleri ve Primer Dizaynı” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (01-02.02.2018)
9	“Biyorisk Tanımlaması ve Değerlendirilmesi”, “Biyorisk Azaltma Stratejileri”, “İyi Laboratuvar Çalışma Uygulamaları”, “Kişisel Koruyucu Ekipman” ve “Dekontaminasyon” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (30.04.2018)
10	“Temel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Çalışma Esasları” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (03-04.05.2018).

11	“Leica DM 5500 Model Mikroskop ve LAS Otomatik Sayım Programı” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü-Leica Tek Çözümleri Dağ Ltd. Şti (22.05.2018)
12	“Laboratuvar ve İşletmelerde Biyogüvenlik Eğitimi” Fırat Üniversitesi (13-14.02.2019)
13	“TS EN ISO/IEC 17025:2017 ile Risk Yönetimi ve Fırsatlar” Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü (20.06.2019)
14	“Temel Laboratuvar Eğitimi” Fırat Üniversitesi (11-12.09.2019)
15	“Genel Metroloji ve Kalibrasyon” ve “Kalibrasyon Sertifikası Yorumlama” Kayzer Kalibrasyon Laboratuvarı (21.10.2021)
16	“Nekropsi Uygulamaları ve Marazi Madde Gönderilmesi” Fırat Üniversitesi (16-17.05.2022)
17	“20th Applied Cell Culture And Molecular Biology Research Course” Atlas Biotechnology (09-21.05.2022).
İş Deneyimi	
1	2007-2009 Özel veteriner kliniği
2	2009-2011 Mazgirt İlçe Tarım Müdürlüğü
3	2011-2015 Tunceli İl Tarım Müdürlüğü
4	2015- Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Akademik Eserler Listesi	
No	Yazar(lar), Tarih, Eser Adı, Eser künyesi
1	Irehan B, Sonmez A, Metin Atalay M, Aysel Itik Ekinci A, Figen Celik F, Nalan Durmus N, Ciftci AT, Simsek S (2022). “Investigation of Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Tritrichomonas foetus in abortions of cattle, sheep and goats in Turkey: Analysis by real-time PCR, conventional PCR and histopathological methods” Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 89, 101867.
2	Metin Atalay M, Çevik A, Eröksüz H, Karabulut B, Akdeniz İncili C. “Deneyisel Diyabet Modelinde Borik Asit’ in NLRP3 İnflamazomu Üzerine Etkinliğinin Araştırılması”. XI. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, II. Uluslararası Patoloji Kongresi, 04-08 Eylül 2023, Erzurum/Türkiye (Sözlü Bildiri)

3	Timurkaan N, Ekinci E, İncili Akdeniz C, Atalay M, Polat E, Kara E. “Bir Tavukta Timoma Olgusu” XI. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, II. Uluslararası Patoloji Kongresi, 04-08 Eylül 2023, Erzurum/Türkiye (Poster)
----------	--

