

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
β- BLOKERLERİN BÖBREK DOKUSUNA ETKİLERİNİN
YAPISAL DÜZEYDE İNCELENMESİ

Dr. Hilal GÖKTÜRK

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Belgin CAN

ANKARA

2012

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
β- BLOKERLERİN BÖBREK DOKUSUNA ETKİLERİNİN
YAPISAL DÜZEYDE İNCELENMESİ

Dr. Hilal GÖKTÜRK

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Belgin CAN

ANKARA

2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embryoloji Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

*Derzypel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda B-blokerlerin
Böbrek Dokusuna Etkilerinin Yapısal Düzeyde İncelenmesi* başlıklı,
Dr. *Hilal GÖKÇÜRK*'e ait bu çalışma aşağıdaki jüri
tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: *03/ 07/ 2012*

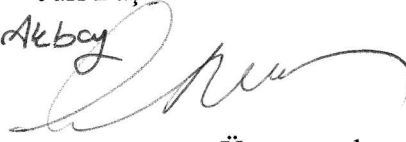
Ünvanı, Adı, Soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embryoloji Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Caner Akbay



Ünvanı, adı, soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embryoloji Anabilim/Bilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Belgin Can

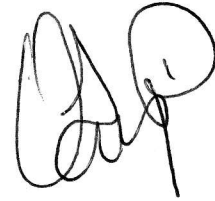
Belgin Can

Ünvanı, adı, soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embryoloji Anabilim/Bilim Dalı

Üye *Prof. Dr. OYA EVİRGİN*



ÖNSÖZ

Diyabette kardiyovasküler hastalıklar en önemli ölüm nedenidir. Bunu önlemek amacıyla çeşitli kardiyolojik ilaçlar kullanılmaktadır. Sistemik bir hastalık olan diyabette diğer organ ve sistemlerin bu ilaçların kullanımına vereceği cevap çok önem taşımaktadır. Bazı antihipertansiflerin (Ör: Anjiyotensin converting enzim inhibitörleri-ACEI) kan basıncını düşürmenin yanısıra böbrek koruyucu bir etkilerinin de olduğu yapılan diğer çalışmalarla gösterilmiştir. Biz de bu çalışmada diyabetlilerde kardiyoprotektif bir ilaç grubu olan β -blokerlerin böbreklere etkisini araştırmayı amaçladık. Bu ilaç grubunun diyabetik nefropatiye olumlu etkisinin olup olmaması ilerde böbrek koruyucu amaçla kullanım seçeneğini değerlendirmemizi sağlayacaktır. En azından diyabetik nefropati üzerine olumsuz etkisinin var olup olmadığının belirlenmesi, kontrol altına alınamayan kan basıncı yüksekliği olan diyabetik hastaların kombine antihipertansiflerle tedavisine ışık tutacaktır diye düşünmekteyiz.

Bizleri iyi bir akademisyen olarak yetiştirmek için gerek iş hayatında gerekse sosyal yaşamda her anlamda bize örnek olan, uzmanlık eğitimim süresince bilgi, birikim ve yardımlarını benden esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan AKBAY' a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmalarım esnasında bilgi ve donanımını benden esirgemeyen, eğitimimde ve akademik hayata adım atışımda her zaman desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Belgin CAN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Göreve başlayışından uzmanlık eğitimimin tamamlandığı bu günlere gelene dek bilgi paylaşımları, destek ve anlayışlarıyla bana her zaman yardımcı olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Cengiz Güven' e, Sayın Prof. Dr. Nurşen Saraç' a, Sayın Prof. Dr. Alp Can' a, Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli' ye, Sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu' na, Sayın Prof. Dr. Oya Evirgen' e, Sayın Doç. Dr. Sevim Aydın' a, Sayın Yard. Doç. Dr. Deniz Billur' a, kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın Uzm. Dr. Ferda Topal Çelikkan' a ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum için mutluluk duyduğum ve laboratuvarda yardımlarını benden esirgemeyen A.Ü.T.F Cebeci Yardımla Üreme Merkezi Laboratuvarı sorumlu embriyoloğu Sayın Uzm. Dr. Sinan Özkavukçu' ya teşekkür ederim.

Deneyimlerim ve gözlemlerim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Belma Turan ve Araş. Gör. Erkan Tuncay' a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar uygulamaları sırasında bilgi ve deneyimimin artmasına içten katkıları olan Nezihe Akçakaya, Hüseyin Solmaz, Erdoğan Çalışkan, Remzi Ata' ya, günlük iş koşuşturması sırasında her türlü konuda yardımcı olarak çalışmamızı kolaylaştıran İlkay Bektaş ve Abdülkerim Dilbaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yalnızca iş arkadaşı olarak yardımcı olmakla kalmayıp yaşamın her safhasında destek ve varlıklarını yanımda hissetmekten büyük mutluluk duyduğum Uzm. Bio. E. Nazlı Hayırlı' ya, Bio. Şule Kızıl' a, Vet. Hek. Masoud Afshani' ye, Dr. Zeynep Gülhan'a, Uzm. Bio. Deniz Balcı' ya ve Gülay Koç'a, ayrıca bu süreç içerisinde birlikte çalışmış olmaktan büyük keyif aldığım Dr. İpek Tanyıldızı ve Dr. Özge Turgay' a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim biricik annem Şenay GÖKTÜRK' e, çok sevgili babam Ethem GÖKTÜRK' e ve kıymetli kardeşlerim Serhat ve Alper GÖKTÜRK' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sizler iyi ki varsınız.

Dr. Hilal GÖKTÜRK

Ankara-2012

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Böbrek Embriyolojisi	2
2.1.1. Pronefroz	2
2.1.2. Mezonefroz	3
2.1.3. Metanefroz	4
2.1.4. Böbrek Gelişiminin Moleküler Düzenlenmesi	7
2.2. Üriner Sisteme Genel Bakış	8
2.2.1. Böbreğin Genel Yapısı	9
2.2.1.1. Kapsül	10
2.2.1.2. Korteks ve Medulla	10
2.2.1.3. Böbrek Lob ve Lobülleri	12
2.2.1.4. Nefron	13
2.2.1.4.1. Nefronun Genel Yapısı	13
2.2.1.4.2. Nefronun Tübülüsleri	14
2.2.1.4.3. Nefron Tipleri	17
2.2.1.5. Toplayıcı Tübülüsler ve Kanallar	17
2.2.1.6. Podositler	18
2.2.1.7. Süzücü Bariyer	18
2.2.1.8. Mezangiyum	21
2.2.1.9. Jukstaglomerüler Aygıt Yapısı	21
2.2.1.10. Böbrek Ara Dokusu	22
2.2.1.11. Böbreğin Damar Yapılar	22

2.2.1.12. Böbreğin Lenfatik Dolaşımı	24
2.2.1.13. Böbreğin Sinirsel Uyarılması	24
2.3. Diyabetes Mellitus (DM)	24
2.3.1. Diyabetin Dünyadaki ve Türkiye’deki Sıklığı	25
2.3.2. DM Sınıflaması	25
2.4. Diyabetik Nefropati	27
2.4.1. Diyabetik Nefropatide Işık Mikroskopik Bulgular	28
2.4.2. Diyabetik Nefropatide Elektron Mikroskopik Bulgular	29
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	31
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi	31
3.2. Işık Mikroskobu (IM) İçin Yapılan Çalışmalar	33
3.2.1. Hematoksilen –Eozin (H-E) Boyama Protokolü	33
3.2.2. Masson’ un Trikróm (MT) Boyası Boyama Protokolü	34
3.2.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü	34
3.2.4. Periyodik Asit – Silver Metenamin (PA-SM) Boyama Protokolü	35
3.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İçin Yapılan Çalışmalar	36
3.3.1. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü	36
3.3.2. İnce Kesit Boyama Protokolü	37
3.4. Morfometrik Değerlendirme	37
3.4.1. IM ile Yapılan Morfometrik Ölçümler	38
3.4.2. TEM ile Yapılan Morfometrik Ölçümler	38
3.5. İstatistiksel Analiz	39
4.BULGULAR	40
4.1. Deney Başlangıç ve Sonundaki Vücut Ağırlıkları ve Kan Şeker Düzeylerinin Karşılaştırılması	40
4.2. IM ile Elde Edilen Bulgular	42
4.2.1. H-E Boyası IM Bulguları	42
4.2.1.1. Kontrol Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları	42
4.2.1.2. DM Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları	46
4.2.1.2. DM+ Timolol (DM +T) Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları	48
4.2.2. MT Boyası IM Bulguları	51

4.2.2.1. Kontrol Grubuna Ait MT Boyası Bulguları	51
4.2.2.2. DM Grubuna Ait MT Boyası Bulguları	52
4.2.2.3. DM+T Grubuna Ait MT Boyası Bulguları	54
4.2.3. PAS Boyası IM Bulguları	56
4.2.3.1. Kontrol Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları	56
4.2.3.2. DM Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları	59
4.2.3.3. DM+T Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları	60
4.2.4. PA-SM Boyası IM Bulguları	62
4.2.4.1. Kontrol Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları	62
4.2.4.2. DM Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları	65
4.2.4.3. DM+T Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları	67
4.2.5. Yarı İnce Kesitler IM Bulguları	69
4.2.5.1. Kontrol Grubu Yarı İnce Kesit Bulguları	69
4.2.5.2. DM Grubu Yarı İnce Kesit Bulguları	72
4.2.5.3. DM+T Grubu Yarı İnce Kesit Bulguları	73
4.2.6. Işık Mikroskopunda Yapılan Ölçümler ve Değerlendirmeleri	74
4.3. TEM ile Elde Edilen Bulgular	75
4.3.1. Kontrol Grubuna Ait TEM Bulguları	75
4.3.2. DM Grubuna Ait TEM Bulguları	83
4.3.3. DM + T Grubuna Ait TEM Bulguları	89
4.3.4. TEM ile Glomerül Bazal Membran Kalınlığı Ölçüm Sonuçları	96
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR	104
ÖZET	106
SUMMARY	107
KAYNAKLAR	108
EK 1	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BMP7:	Bone Morphogenetic Factor 7
CFU-E:	Colony Factor Unit - Erythroid
CVS:	Cardiovascular System
dk:	Dakika
DM:	Diyabetes Mellitus
DM + T:	DM + Timolol
DN:	Diyabetik Nefropati
EPO:	Eritropoietin
FGF2:	Fibroblast Growth Factor 2
GBM:	Glomerül Bazal Membranı
GDNF:	Glial-derived Neurotrophic Factor
GH:	Büyüme Hormonu (Growth Hormon)
HGF:	Hepatosit Büyüme Faktörü
H⁺:	Hidrojen
HCO₃⁻:	Bikarbonat
IM:	Işık Mikroskobu
i.p:	İntraperitoneal
JG:	Jukstaglomerüler
kg:	Kilogram
M:	Molar

maks:	Maksimum
MET:	HGFR' yi kodlayan protein
mg:	Miligram
µm:	Mikrometre
min:	Minimum
mm³:	Milimetre küp
MODY:	Maturity-onset Diabetes of the Young
MT:	Masson'un Trikróm Boyası
NaOH:	Sodyum hidroksit
nm:	Nanometre
OsO₄:	Osmiyum tetroksit
PAS:	Periyodik Asit Schiff
PA-SM:	Periyodik Asit – Silver Metenamin
PAX2:	Paired box gene 2
PTH:	Parathormon
RET:	GNFR-α protein ailesinin tirozin kinaz reseptörü
std:	Standart
STZ:	Streptozotosin
TEM:	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TGF-β:	Transforming Growth Factor - β
TURDEP:	“The Turkish Diabetes Epidemiology” çalışması
WHO:	World Health Organization

WNT-4: Wingless type MMTV integration site family member-4

WNT-6: Wingless type MMTV integration site family member - 6

WNT-9B: Wingless type MMTV integration site family member- 9B

WT1: Wilms tumor protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1.1 Üriner sistem gelişiminin erken aşamaları. A. Ara mezodermin nefrotomlar, mezonefroz ve metanefrozu şekillendirmek üzere dallanması. B. İyi gelişmiş mezonefrik tübülüs ve ilişkili damar yapısı. C. Mezonefroz oluşumunda kaudal ilerleme ve ilkel böbreğin kraniyal segmentlerinin dejenerasyonu (Bruce M. Carlson. Human Embryology of Developmental Biology' den alınmıştır).

Şekil 2.1.2.1 5 haftalık embriyonda mezonefrik sistem boşaltım tübülüsü oluşumunun şematik olarak gösterilmesi (Thomas W Sadler. Langman' s Medical Embryology' den alınmıştır).

Şekil 2.1.3.1 Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi (Thomas W Sadler. Langman' s Medical Embryology' den alınmıştır) .

Şekil 2.1.3.2 A – C. Böbreklerin pelvisten erişkindeki son seviyelerine göçü. D. Böbreklerin pelvis dışına göçünün aşamaları (Bruce M. Carlson. Human Embryology of Developmental Biology' den alınmıştır).

Şekil 2.2.1.2.1 Böbrek dokusuna ait genel görünüm. G: Glomerül, p: proksimal tübülüs, d: distal tübülüs, P : Bowman kapsülü pariyetal epiteli, M: makula densa, yıldız: Bowman aralığı. Hematoksilen- Eozin boyası (Luiz Carlos Junqueira, Temel Histoloji Text & Atlas' tan alınmıştır).

Şekil 2.2.1.4.2.1 Nefronun genel görünümünün şematik hali (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji' den alınmıştır).

Şekil 2.2.1.7.1 Süzülme bariyerini meydana getiren yapıların şematik görünümü. (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji' den alınmıştır).

Şekil 2.2.1.11.1 Böbrek damar yapılarının genel görünümü (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji' den alınmıştır).

Şekil 3.1.1 *Sakrifiye edilen sıçanlarda karın orta hattı açılarak abdomen boşluğunun her iki yanında yer alan böbreklere (ok) ulaşıldı.*

Şekil 4.1.1 *Kontrol, DM ve DM+T gruplarının vücut ağırlıklarındaki değişimin % olarak karşılaştırma grafiği. Kontrol grubunda vücut ağırlığı %58 artmışken DM grubunda %18' lik bir artış gözlemlendi, DM+T grubunda ise bu artış ortalama %8 civarındaydı.*

Şekil 4.1.2 *Her üç deney grubuna ait kan şekeri düzeylerinin % olarak değişim grafiği. Deney başlangıç değerlerine göre kontrol grubunda %72' lik bir artış gözlenirken DM grubunda %350, DM+T grubunda ise %348' lik bir artış hesaplandı.*

Şekil 4.2.1.1.1 *Kontrol grubuna ait böbrek dokusu kesit alanında normal görünümde böbrek cisimcikleri (ok başı), düzgün Bowman aralığı (yıldız), proksimal (p) ve distal tübülüsler (d) görülmekte. Boya: H-E. Bar: 10 µm*

Şekil 4.2.1.1.2 *Kontrol grubuna ait böbrek cisimciği ve makula densa (kuyruksuz ok) yapısı. Korunmuş Bowman aralığı (yıldız), Pariyetal epitel hücreleri (şimşek) ve proksimal tübülüsler (p) de izlenmekte. Boya: H-E. Bar: 2,5 µm*

Şekil 4.2.1.1.3 *Kontrol grubu kesiti. Damar kutbunda arteriyol içerisinde eritrositler (tik), proksimal tübülüsler (p) ve distal tübülüsler (d) görülmekte. Boya: H-E. Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.1.2.1 *DM grubuna ait böbrek dokusu kesiti. Daralmış Bowman aralığı (kuyruklu ok), şeffaf görümlü tübülüs hücreleri (karo), dilate tübülüsler (sinek), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Boya: H-E. Bar: 10 µm*

Şekil 4.2.1.2.2 *DM grubunda genişlemiş glomerül sınırları (kuyruklu ok), glomerülde ve intersitisyumda staz yapan eritrositler (ondüle ok), şeffaf hücreler (karo), pProksimal (p) ve distal tübülüs hücreleri (d). Boya: H-E. Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.1.2.3 *DM grubuna ait kesit alanı. Hipertrofiye uğramış glomerül sınırı (kuyruklu ok), glomerül kapiller damarları içinde staz yapmış eritrositler (e) ve şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: H-E. Bar: 2,5 μ m*

Şekil 4.2.1.3.1 *DM+T grubuna ait böbrek dokusunda genel görünüm. Şeffaf hücreli tübülüs epiteli (karo), Bowman aralığı kapanmış glomerül (kuyruklu ok), proksimal (p) ve distal tübülüsler (d), staz yapmış eritrositler (ondüle ok), dilate tübülüsler (sinek) Boya: H-E. Bar: 10 μ m*

Şekil 4.2.1.3.2 *DM+T grubuna ait bir kesitteki böbrek cisimciği, makula densa (kuyruksuz ok), şeffaf hücreli tübülüs (karo), Bowman aralığı (yıldız), proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya: H-E. Bar: 5 μ m*

Şekil 4.2.1.3.3 *DM+T grubunun böbrek cisimciği kesiti. Şeffaf tübülüs hücreleri (karo), glomerül yumağı içinde eritrosit stazı (ondüle ok), proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya: H-E. Bar: 5 μ m*

Şekil 4.2.2.1.1 *Kontrol grubu MT boyaması. Bowman kapsülünün dış yaprağı (şimşek), bazalde koyu çizgilenme gösteren proksimal tübülüsler (p) Boya: MT, Bar: 2,5 μ m*

Şekil 4.2.2.1.2 *A: MT boyaması kontrol grubu genel görünümü. Damar çevresindeki ve glomerül içerisindeki bağ dokusu elemanları mavi renkte gözlenmekte. Bar: 1 μ m B: Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok) ve proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya M-T. Bar: 10 μ m*

Şekil 4.2.2.2.1 *DM grubuna ait MT boyanmış bir kesit. Kalınlaşmış Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok). İntersitisyel dokuda fibrozis (kalın ok), glomerül içerisinde staz yapan eritrositler (ondüle ok) Boya: MT, Bar: 5 μ m*

Şekil 4.2.2.2.2 *DM oluşturulmuş grupların kesitinde glomerül içi mezangiyum bölgesine uyan boyanma artışı (kvrık ok). Asidofilik boyanmış proksimal tübülüs hücreleri (p), staz yapan eritrositler (ondüle ok). Boya: MT. Bar: 5 μ m*

Şekil 4.2.2.3.1A ve B: *DM+T grubu MT boyaması. Kalınlaşmış Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok), glomerül içi ve intersitisyel alanda eritrosit stazı (ondüle ok), intersitisyel alan (kalın ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: MT, A: Bar: 10 µm, B: Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.2.3.2 *DM+T grubu. Glomerül içerisinde mezangiyum hücreleri ve bunların matrikslerine uyumlu bölgelerde mavi boyanma artışı (kıvrık ok), damar içerisinde staz yapan eritrositler (ondüle ok), damar kutbunda makula densa (kuyruksuz ok) ve şeffaf hücreler (karo). Boya: MT, Bar: 2,5 µm*

Şekil 4.2.3.1.1 *Kontrol grubuna ait böbrek dokusu PAS boyaması. Böbrek cisimcikleri (ok başı) ve Bowman aralığı (yıldız), koyu boyanmış proksimal ve distal tübülüs bazal membranları görülmekte. Boya: PAS, Bar: 10 µm*

Şekil 4.2.3.1.2 *Kontrol grubu PAS boyaması. Böbrek cisimciği (ok başı), proksimal tübülüs (p) ve distal tübülüs (d). Sağdaki glomerüle ait arteriyol girişi de kesit alanında izlenmekte. Boya: PAS, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.3.1.3 *Kontrol grubuna ait tübülüs ve intersitisiyel kapiller kesitleri. Proksimal tübülüs epitel apikal yüzü(kar tanesi) ve tübülüs bazal membranları (küçük ok) PAS (+). Boya: PAS, Bar: 2,5 µm*

Şekil 4.2.3.2.1 *DM grubuna ait böbrek dokusu kesiti. GBM kalınlaşması (ok), dilate tübülüsler (sinek), şeffaf hücreli tübülüsler (karo). Boya: PAS, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.3.3.1 *DM+T grubuna ait kesitte böbrek cisimciğinde skleroze alanlar. Damar kutuplarında hiyalinozis (maça), proksimal tübülüs (p), dilate tübülüsler (sinek), dejenere olmuş tübülüs hücreleri (kare) ve boya almayarak şeffaf kalan tübülüs hücreleri (karo). Boya: PAS, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.3.3.2 *DM+T grubunda GBM' de kalınlaşma (ok), zayıf boyanma gösteren tübülüs bazal membranı (küçük ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PAS, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.4.1.1 *Kontrol grubuna ait normal böbrek dokusu görünümü. Boya: PA-SM, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.4.1.2 *Kontrol grubu PA-SM boyaması. İntersitisyel alanda membrana elastika internası belirgin arter (hilal). Boya: PA-SM, Bar: 10 µm*

Şekil 4.2.4.1.3 *PA-SM ile boyanmış kontrol grubu kesiti Boya: PA-SM, Bar: 2,5 µm*

Şekil 4.2.4.2.1 *DM grubunun PA-SM boyaması. Kalınlaşmış GBM (ok) ve tübülüs bazal membranların (küçük ok), makula densa hücreleri (kuyruksuz ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PA-SM, Bar: 10 µm*

Şekil 4.2.4.2.2A-B *DM grubunda PA-SM boyama yöntemi ile böbrek cisimciği ve proksimal (p) ve distal (d) tübülüs hücreleri, kalınlaşmış tübülüs bazal membranı (kuyruklu ok) ve kalınlaşmış GBM (ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo), bazal çizgilenmeleri belirgin proksimal tübülüsler (p). Boya: PA-SM, A: Bar: 5 µm, B: Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.4.3.1 *PA-SM boyası ile boyanmış DM+T grubu. Kalınlaşmış Bowman kapsülü bazal membranı ve tübülüs bazal membranları (kuyruğu büyük ok), korunmuş idrar aralığı mesafesi (yıldız), makula densa hücreleri (kuyruksuz ok) ve şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PA-SM. Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.4.3.2 *DM+T grubunda glomerülde yoğun boyanma (kuyruklu ok). Damar kutbunda eritrositler (tik), arteriyol hiyalinozisi (yaprak), kalınlaşmış tübülüs bazal membranı (küçük ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PA-SM, Bar: 2,5 µm*

Şekil 4.2.5.1.1 *Kontrol grubuna ait yarı ince kesit. Glomerül ve Bowman kapsülü pariyetal yaprağı (şimşek), proksimal tübülüsler (p ve distal tübülüsler (d). Boya: Toluidin mavisi/Azur II, Bar: 5 µm*

Şekil 4.2.5.1.2 Kontrol grubu yarı ince kesiti. Glomerül içi mezangiyum hücreleri (siyah ok), podositler (kırmızı ok), kapillere ait endotel hücreleri (yeşil ok) ve eritrositler (ondüle ok). Boya: Toluidin Mavisi/Azur II, Bar: 2,5 μ m

Şekil 4.2.5.1.3 Kontrol grubuna ait tübülüs yapılarının yarı ince kesiti. Proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), eritrosit dolu kapiller lümeni (ondüle ok). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 2,5 μ m

Şekil 4.2.5.2.1 DM grubuna ait yarı ince kesit. Proksimal tübülüsler ve distal tübülüslerde düzgün boyanma kaybolmuş. Dejeneratif tübülüs (sinek). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar:2,5 μ m

Şekil 4.2.5.2.2 DM grubunda düzgün morfolojik yapısını yitirmiş böbrek cisimciği (kalın kuyruklu ok), proksimal tübülüsler (p) ve distal tübülüsler (d). Distal tübülüslerin lümenlerinde yer yer boya kalıntılarının olduğu görüldü. Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 5 μ m

Şekil 4.2.5.3.1 DM+T grubuna ait yarı ince kesitte böbrek cisimciği, proksimal tübülüs yapıları (p) ve interstisyuma ait elemanlar izlenmekte. İnterstisyumda yer alan damar yapısının çevresindeki bağ dokusunda artış ve fibrozis (ok), Bowman aralığı (yıldız). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 5 μ m

Şekil 4.3.1.1 Kontrol grubuna ait glomerül kesitinin ince yapısı. İki kılcal damar lümeni arasında mezangiyum hücresi (M), kapiller damarlara ait lümenler (L) normal görünümde ve iki farklı lümeni döşeyen endotel hücresi (E) izlenmekte, Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x2784, Bar: 2500nm

Şekil 4.3.1.2 Kontrol grubuna ait bir görünüm. Podosit hücreleri (Po). Podosit ayakçıkları (ok), kapiller lümeni (L). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm

Şekil 4.3.1.3 A-B Kontrol grubunda podositler. Girintili çıkıntılı podosit çekirdeği (çiçek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, A: x4646, Bar: 2500nm; B: x7750, Bar: 1000nm.

Şekil 4.3.1.4 A-B: Kontrol grubuna ait lümen görünümeleri. Endotel hücresi (E), podositlerin ayaklı çıkıntıları (ok), düzgün fenestralar (ok başı). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, A:x6000, Bar: 1000nm, B: x7750, Bar: 1000nm

Şekil 4.3.1.5 Kontrol grubuna ait GBM ve podositlerin ilişkisi. Ayakçıklar arasında yarıklanma zarları (kıvrımlı ok), normal pencere yapılanması (ok başı). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x12930, Bar: 1000nm.

Şekil 4.3.1.6 A-B Kontrol grubuna ait proksimal tübülüs ince kesitleri. Yoğun mitokondriyonlar (m), bazal yüz katlanmaları (şimşek) ve apikal yüzde mikrovilluslar (kar tanesi). A: Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm. B: Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm.

Şekil 4.3.1.7 Kontrol grubuna ait distal tübülüs kesiti. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm

Şekil 4.3.1.8 Kontrol grubu ince kesitinde toplama borusu görünümü. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm

Şekil 4.3.2.1 DM grubuna ait glomerül ince kesiti. GBM' de kalınlaşma (kuyruklu ok), mezangiyum hücre matriksinde artış (yıldız), kılcal damar lümeninde eritrositler (e), nötrofil (n) ve platelet (hilal). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm.

Şekil 4.3.2.2 DM grubu böbrek süzücü bariyeri. Düzensiz görünümlü ayakçıklar (kuyruksuz ok), normal yapısını yitirmiş fenestralar (kalın ok), kalınlaşmış GBM (kuyruklu ok), kılcal damar lümeninde platelet (hilal). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x12930, Bar: 1000nm.

Şekil 4.3.2.3 *DM grubunda düzensiz podosit ayakçıkları (kuyruksuz ok), pencere aralıklarında düzensizleşme (kalın ok), GBM' da kalınlaşma (kuyruklu ok), mezangiyum hücresi çekirdeği (M) ve mezangiyum hücresi matriksinde artış (yıldız). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm*

Şekil 4.3.2.4 *DM grubuna ait bir kesitteki glomerülün Bowman kapsülünü de içeren alanı. Bowman kapsülü pariyetal epitelinin yassı hücre çekirdeği (sinek), kalınlaşmış ve lamellar yapıda Bowman epiteli bazal membranı (güneş), kalınlaşmış GBM (kuyruklu ok) ve sol alt köşede tüp komşuluğu izlenmekte. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm*

Şekil 4.3.2.5 *DM grubuna ait ince kesit. Mezangiyum hücre matriksi artışı (yıldız), lümende eritrosit (e), düzensiz podosit ayakçıkları (kuyruksuz ok). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm.*

Şekil 4.3.2.6 *DM grubuna ait distal tübülüs görünümü. Apikal yüzde kısa mikrovilluslar (ince fırça) ve vakuoller (kvrık ok). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm.*

Şekil 4.3.3.1 *DM+T grubuna ait ince kesit. Endotel hücresi (E), mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeninde eritrositler (e). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm.*

Şekil 4.3.3.2 *DM+T grubuna ait ince kesitte mezangiyum hücrelerinde ve matriksinde artış (yıldız), daralmış kapiller lümenlerinde eritrositler (e). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x2784, Bar: 2500nm.*

Şekil 4.3.3.3 *DM+T grubuna ait glomerül alanında kılcal damar lümeninde platellet (hilal), marjinal mikrotübül demeti (kalın ok), açık kanaliküler sistem (ince ok) ve sitoplazmada mitokondriyonların haricinde granuller (damla) x21560, Bar: 500 nm*

Şekil 4.3.3.4 *DM+T grubunda glomerül ve tübülüs komşuluğu izlenmekte. Podosit hücre çekirdeği (çiçek), kapiller içi eritrosit stazı (e), Bowman*

kapsülü dış yaprağı hücresi (sinek), Bowman kapsülü bazal membranı (güneş). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm.

Şekil 4.3.3.5 *DM+T grubunda ayaksız çıkıntıların GBM üzerindeki yerleşimi. Düzgün ayakçıklar (ok), düzensiz ayakçıklar (kuyruksuz ok), düzgün fenestra yapıları (ok başı), fenestralarda yer yer düzleşme (kalın ok) Boya: Uranilasetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm.*

Şekil 4.3.3.6 *A-B: A: DM+T grubunda proksimal tübülüs görünümü. Mitokondriyonlar (m), çekirdek (çiçek) ve bazal katlantılar (şimşek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm. B: Glomerül- proksimal tübülüs komşuluğu, Bowman kapsülü pariyetal epitel hücresi (sinek), tübülüs bazalinde miyoid hücre (karo), Bowman kapsülü bazal laminası (güneş). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm*

Şekil 4.3.3.7 *DM+T grubunda distal tübülüs kesiti. Çekirdek (asteriks), mitokondriya (m) ve bazal lamina (şimşek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm*

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1.1. *Kontrol, DM, DM+T gruplarına ait deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekeri düzeylerinin Kruskal- Wallis analiz testine göre sonuçları*

Tablo 4.2.6.1. *Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Glomerül Çapı ve Bowman Kapsülü Çaplarının Değerlendirilmesi*

Tablo 4.3.4.1. *Her üç gruptaki hayvanlara ait GBM ölçüm değerleri*

Tablo 4.3.4.2. *Kontrol ve Deney Gruplarına Ait GBM Kalınlığı Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi*

1.GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM) gelişimi, genetik yatkınlık ile ilişkili olabileceği gibi beslenme alışkanlıkları, çevresel koşullar, kişilerin yaşam tarzlarıyla da ilişkilidir ve beslenme alışkanlıklarının değişmesi ve insanların sedanter bir yaşam tarzını seçmeleri nedeniyle insidansı ve prevalansı gün geçtikçe artmaktadır. DM tüm organizmayı etkileyen sistemik bir hastalıktır ve akut komplikasyonlarının yanı sıra çok sayıda kronik komplikasyona da neden olmaktadır. Böbrek hastalıklarına bağlı morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden birisi de “diyabetik nefropati (DN)” dir. DN’ ye sıklıkla kan basıncı yüksekliği de eşlik etmektedir. Kan basıncını düşürmek amacıyla kullanılan bazı antihipertansiflerin kardiyolojik etkilerinin yanısıra böbrek koruyucu etkileri de vardır.

Biz de çalışmamızda seçici olmayan β -blokerlerden biri olan timololün böbrek dokusu üzerine olan morfolojik etkilerini ışık mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) düzeyinde inceleyerek göstermeyi amaçladık.

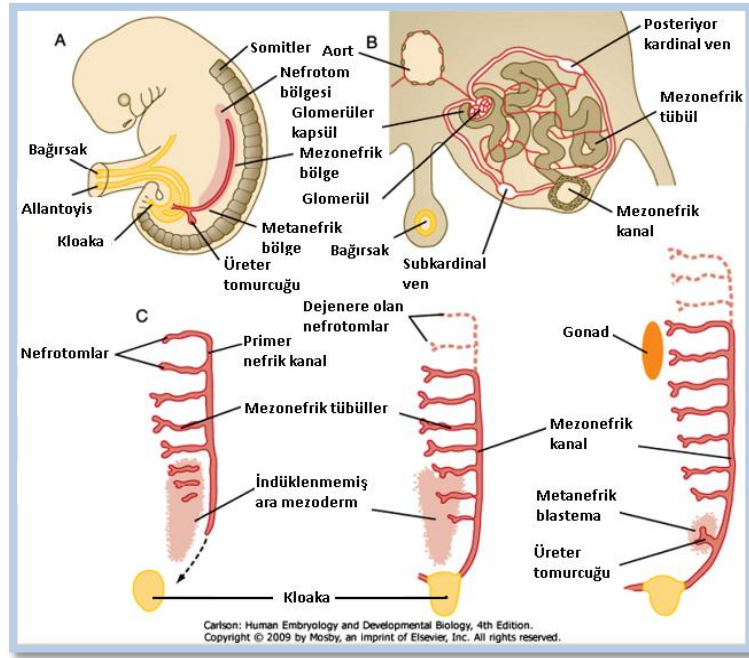
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Embriyolojisi

Ürogenital sistem, embriyonun dorsal vücut duvarından köken alan ara (intermediyer) mezodermden gelişir (1). Üriner sistem, gonadal gelişim başlamadan önce şekillenmeye başlar. Böbrek gelişimi ise, yapı ve fonksiyon bakımından aşağı omurgalılarıdaki böbreğe benzerlik gösteren, uzamış bir çift boşaltım organının şekillenmesiyle başlar (2). İnsanda intrauterin yaşamda 3 böbrek sistemi kraniyalden kaudale doğru, peşpeşe meydana gelir; bunlar pronefroz, mezonefroz ve metanefrozdur (1).

2.1.1. Pronefroz

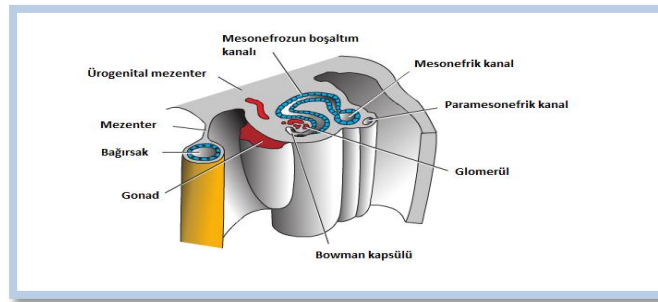
Üriner sistemin gelişmesi gebeliğin yaklaşık 22. gününde ara mezodermin ön kısmından farklılaşan epitel kordonlarının segmentler şeklinde düzenlenmesi ile birlikte başlar. *Nefrotom*lar olarak adlandırılan bu yapılar kloakaya doğru büyüyen bir çift primer nefrik (pronefrik) kanal ile yanlardan birbirlerine bağlanırlar (3).



Şekil 2.1.1.1 Üriner sistem gelişiminin erken aşamaları. A. Ara mezodermin nefrotomlar, mezonefroz ve metanefrozu şekillendirmek üzere dallanması. B. İyi gelişmiş mezonefrik tübülüs ve ilişkili damar yapısı. C. Mezonefroz oluşumunda kaudal ilerleme ve ilkel böbreğin kraniyal segmentlerinin dejenerasyonu (Bruce M. Carlson. Human Embryology of Developmental Biology’ den alınmıştır).

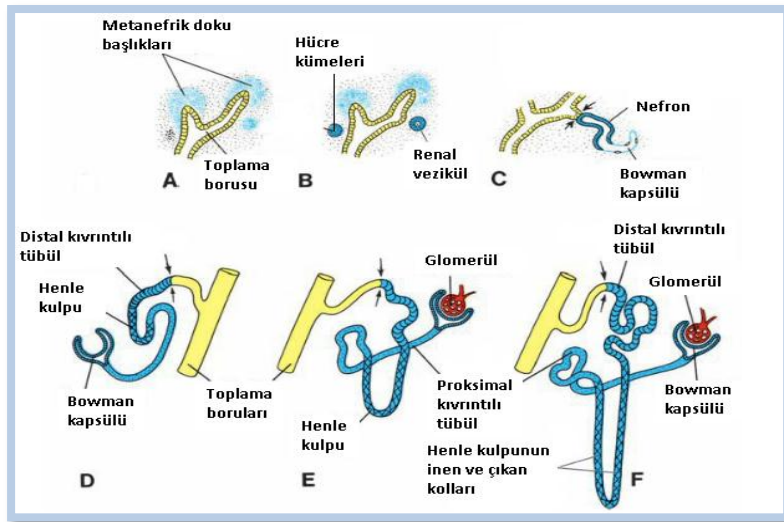
2.1.2. Mezonefroz

Mezonefroz ve mezonefrik kanallar üst torasik ve lumbal segmentlerin ara mezoderminden gelişir. Gelişimin 4. haftasında pronefrik sistemlerin gerilemesi sırasında “mezonefrik tübülüsler” adı verilen mezonefrozun ilk boşaltım tübülüsleri oluşmaya başlar. Mezonefrik tübülüsler hızlıca uzar ve S şeklinde düzenlenmeleriyle ve buraya kılcıl damarların ulaşmasıyla mediyal uçta glomerül oluşur. Glomerülün etrafındaki tübülüslerin Bowman kapsülüne farklılaşmasıyla bu iki yapı birlikte renal cisimciği oluşturur (2).



Üreter tomurcuğunun metanefrik dokuya penetrasyonu sonucu distal ucu üzerinde bir başlık belirir. Tomurcuğun gelişmesiyle ilkel renal pelvis ve onun da kraniyal-kaudal parçalara ayrılması ile majör kaliksler oluşur. Her bir kaliks metanefrik dokuya penetre olarak 2 yeni dala ayrılır ve bu dalların da 12 kere ya da daha fazla sayıda dallanmasıyla tübülüslerin oluşumu sağlanır. 2. dereceden tübülüslerin ayrılmasıyla oluşan 3. ve 4. aşamadakiler renal pelvisin minör kalikslerini oluşturur. İleri gelişimin devamında 5. ve ardışık bölünmelerin toplama boruları uzayarak minör kalikte birleşir ve renal piramitleri oluşturur. Sonuçta üreter tomurcuğundan üreter, renal pelvis, majör ve minör kaliksler ve 1-3 milyon toplama borusu oluşur (2).

Yeni şekillenen her bir toplama borusunun distal ucu metanefrik doku başlığı ile çevrilir ve tübülüslerin uyarıcı etkisi altında metanefrik doku başlığındaki hücre kümeleri *renal vezikülü* oluşturur. Renal veziküller S şeklindeki tübülüslere dönüşürler ve S'nin bir cebine kılcacıkların girmesiyle bu yapı glomerüle farklılaşır. Glomerül ile birlikte bu tübülüsler boşaltım birimleri olan nefronları oluşturur. Her bir nefronun proksimal ucu da Bowman kapsülünü oluşturmak üzere farklılaşır. Distal kısım her bir toplama borusu ile açık bir bağlantı oluşturarak Bowman kapsülü ile toplama birimi arasında bir geçit oluşumunu sağlar (2).



Şekil 2.1.3.1 Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi (Thomas W Sadler. Langman' s Medical Embryology' den alınmıştır.) .

Boşaltım tübülüsünün uzaması proksimal kıvrıntılı tübülüs, Henle kulpu ve distal kıvrıntılı tübülüslerin oluşumu ile sonlanır (2).

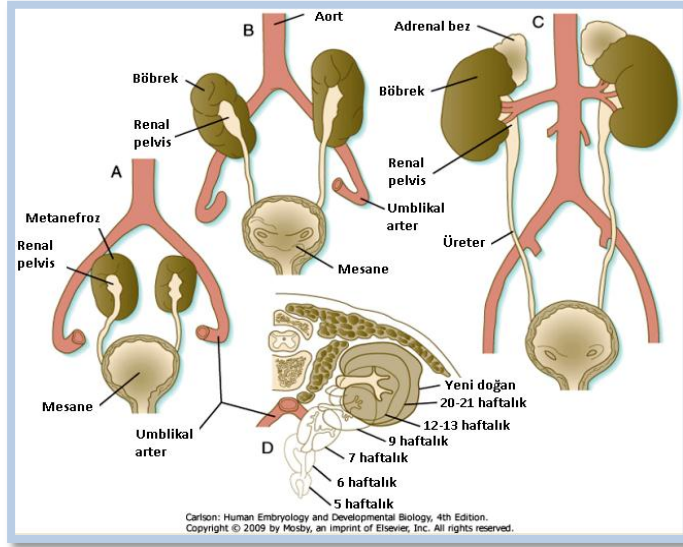
Sonuçta böbrek, boşaltım birimlerini oluşturan metanefrik mezoderm ve toplama sistemini oluşturan üreter tomurcuğu olmak üzere 2 ayrı kaynaktan gelişir. Doğuma kadar nefronlar oluşmaya devam ederler ve doğumla birlikte her bir böbrekte yaklaşık 1 milyon sayıya ulaşırlar. Doğumda böbrekler lobüllü görüntüyü kazanmışlardır fakat nefronların ileri gelişimlerinin devam etmesi sonucu bebeklik döneminde lobüllü yapı görülmez. Nefronlar bu dönemde sadece ileri gelişim gösterebilirler. Sayılarında herhangi bir artış gözlenmez.

10. haftada glomerüler kılcal damarların farklılaşmaya başlamasıyla birlikte idrar oluşumu da gebeliğin erken dönemlerinde başlar. Yaklaşık olarak 12. haftada metanefroz fonksiyonel olarak kalıcı böbreğe dönüşür. İdrar amniyotik boşluğa geçer ve amniyon sıvısı ile karışır. Fetal hayatta plasenta atık ürünlerin boşaltımını gerçekleştirdiği için böbrekler bundan sorumlu değildir (3).

Nefronlar farklılaşmaya devam ederken böbrek de giderek büyümeye devam eder. Dallanan kanal sistemleri daha geniş ve daha karmaşık bir hale gelerek böbreğin kaliks sistemini ve pelvisini oluştururlar. Bu yapılar ultrafiltratı toplayıp üretere iletirler (4).

Böbrekler şekillerini almaya başladıklarında pelvik bölgenin derinlerinde yerleşim gösterirler. Erken fetüs döneminde belirgin bir kayma hareketi ile abdominal bölgeye yerleşirler. Bu da embriyonun kaudal bölgesinin belirgin bir genişleme göstermesi ve böbreklerin buraya göçü ile gerçekleşir. Böbreğin abdominal bölgeye doğru hareketinde 2 eşzamanlı bileşen vardır. Bunlar; L4'ten L1/T12 omurlarına kaudo-kraniyal yönde kayma ve her iki yana yer değiştirmedir. Bu değişikliklerle birlikte her bir böbrek, kraniyal kutbunu bir başlık şeklinde örtecek olan adrenal bez ile bağlantı kurar. Göç devam ederken, yaklaşık olarak gebeliğin 9. haftasında, böbrekler 90°'lik rotasyon gösterirler ve sonuçta pelvisin orta hattında karşı karşıya gelirler (4).

Böbrek aortun distal ucundan kanlanmaya başladıktan sonra abdominal aortun kraniyal arter dalları böbreğe ulaşır. Bu primordiyal arterler renal arterleri oluşturur. Kaudal arter dalları ise kaybolur (3).



Şekil 2.1.3.2 A – C. Böbreklerin pelvisten erişkindeki son seviyelerine göçü. D. Böbreklerin pelvis dışına göçünün aşamaları (Bruce M. Carlson. Human Embriology of Developmental Biology’ den alınmıştır).

2.1.4. Böbrek Gelişiminin Moleküler Düzenlenmesi

Birçok organda olduğu gibi böbreklerin farklılaşmasında da epitel - mezenkim etkileşimi gereklidir. Mezenkimde sentezlenen transkripsiyon faktörü WT1 ile metanefrik dokunun üreter tomurcuğunun uyarısına cevap vermesi sağlanır. Ayrıca WT1, mezenkim tarafından, üreter tomurcuğunun dallanmasını ve gelişimini uyarmasını sağlayan, GDNF (glial-derived neurotrophic factor) ve HGF (hepatocyte growth factor) gibi faktörlerin üretimini kontrol altında tutar. RET ve MET gibi tirozin kinaz reseptörleri, üreter tomurcuğunun epitel hücrelerinden sentezlenerek epitel – mezenkim sinyal yollarını meydana getirirler. Üreter tomurcuğu FGF2 (fibroblast growth factor 2) ve BMP7 (bone morphogenetic protein 7) gibi büyüme

faktörleri ile mezenkimi uyarak apoptozu önler. Üreter tomurcuğundan, metanefrik mezodermde PAX2 ve WNT4 artışını sağlayan WNT9B ve WNT6 salınması mezenkimin nefron oluşumu için epitele dönüşmesine neden olur. WNT4 mezenkimin yoğunlaşıp epitele dönüşerek tübülüsleri oluşturması esnasında görev alırken PAX2 mezenkimin tübülüs oluşumu için yoğunlaşmasını düzenler (2).

Bu etkileşimler sonucunda ekstraselüler matrikste değişiklikler gerçekleşir. Fibronektin, tip I kollajen ve tip III kollajen bazal lamina için karakteristik olan laminin ve tip IV kollajen ile yer değiştirir. Mezenkim – epitel dönüşümü içingerekli olan sindecan ve E-kadherin gibi adezyon molekülleri sentezlenir (2).

2.2. Üriner Sisteme Genel Bakış

Üriner sistem bir çift böbrek, böbreklerden mesaneye uzanan bir çift üreter, mesane ve mesaneyi vücut dışına açan tek üretradan oluşur (5). Bu sistem vücut dengesinin (*homeostaz*) devamına katkıda bulunur (6). Böbrekler vücudun sıvı düzeyini ve elektrolit dengesini korur ve metabolik artıkların uzaklaştırılmasını sağlar. Ekstraselüler sıvı hacmini ve bileşenlerini ayarlamada ve bu düzeyleri sürdürmede önemli bir rol oynar. Vücut sıvıları çok asidik olduğunda hidrojen (H^+) iyonu salgılayarak, çok bazik olduğunda ise bikarbonat (HCO_3^-) salgılayarak asit-baz dengesinin sağlanmasında çok önemli yere sahiptir (5).

Böbrekler fazla sayıda damar içerir, kardiyak kan çıkışının yaklaşık %25'ini alırlar. Kanın süzülmesiyle ortaya çıkan ultrafiltrattan tübülüs hücrelerinin seçici emiciliği ve bazı maddeleri de salgılaması ile idrarı oluştururlar. Son halini alan idrar, depolanacağı ve dışarı verileceği idrar torbasına (mesane) üreterler tarafından iletilir (5). İki böbrek birlikte dakikada yaklaşık 125 ml süzülme ürünü üretir; bu miktar içinden 124 ml' si organda emilir ve yalnızca 1 ml' si idrar olarak üreterlere salgılanır. 24 saatte yaklaşık olarak toplam 1500ml idrar oluşur (6). İdrar içerdiği su ve elektrolitlerin yanı sıra atık ürünleri (üre, ürik asit, kreatinin) ve yıkım ürünlerini de içerir (5).

Böbrek aynı zamanda endokrin bir organ olarak da işlev görür. Böbreğin endokrin aktiviteleri;

1) Eritropoetin (EPO) salınımı: Glikoprotein yapıda bir hormon olan eritropoetin sentez ve salınımı gerçekleşir. EPO, azalmış kan oksijen basıncına bağlı olarak kemik iliğini uyararak alyuvar yapımını artırır. EPO renal korteksteki peritübüler damarların endotel hücreleri tarafından salınır (5). Ve kemik iliğinde Coloni Forming Unit- Erythroid (CFU-E) hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşir (7). Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda anemi tedavisi için rekombinant EPO kullanılır (5).

2) Renin Salınımı: Asitproteaz olan reninin sentez ve salınımı meydana gelir. Kan hacmine ve kan basıncı kontrolüne etkili bir hormondur. Jukstaglomerüler (JG) hücreler tarafından üretilir ve dolaşımdaki anjiotensinojeni anjiotensin I'e dönüştürür (5).

3) 1- α hidroksilaz enzimi Salınımı: Karaciğerde üretilen bir steroid prekürsörü olan 25-OH vitamin D₃ hidroksilasyon ile hormonal olarak aktif olan 1,25-(OH)₂ vitamin D₃' e dönüşür. Bu basamak primer olarak paratiroid bezinin hormonu olan parathormon (PTH) tarafından düzenlenmektedir. PTH, 1 α hidroksilaz enziminin aktivitesini uyarır ve aktif hormon üretimini artırır (5).

2.2.1. Böbreğin Genel Yapısı

Böbrekler arka karın duvarında, omurganın her iki tarafında, retroperitoneal yerleşimli, büyük, kırmızı, fasülye benzeri şekilli organlardır. Sağ böbrek biraz daha aşağıda olmak üzere T12-L3 vertebralar arasında uzanırlar. 10cm x 6,5cm x3cm boyutlarındadırlar. Her bir böbreğin üst kutbunda renal fasyaya ve perirenal yağ dokusu içine gömülü adrenal bez yer alır. Böbreğin mediyal tarafı konkavdır ve derin vertikal bir yarık içerir (5). Bu yarık, üreter, venler ve lenf damarlarının çıktığı, arterler ve sinirlerin girdiği hilus adını alır. Hilustan içeri doğru böbreğin orta kısmında, böbrek parankimi ile kuşatılmış yassı bir boşluk vardır. Bu boşluğa böbrek

boşluğu (sinüs renalis) adı verilir. Böbrek boşluğunda yağ dokusu içerisinde damarlar, sinirler, üreterin böbrek boşluğu içinde yaptığı genişleme ile oluşan böbrek pelvisi (renal pelvis) ve kaliksler bulunur (8). Böbrek pelvisi iki ya da üç büyük majör kalikse bölünmüştür. Her majör kaliksten birkaç küçük minör kaliks dallanır (6). Her bir minör kaliks böbrek papillası denen medulla piramitlerinin uç kısmını silindirik şeklinde sarar (8). Her papillanın uç bölümü toplama borularının açılması nedeni ile deliklidir. Papillaların bu uç bölümlerine area cribrosa denir (7).

2.2.1.1. Kapsül

Böbreğin yüzeyi bağ dokudan meydana gelen bir kapsül ile örtülmüştür. Kapsül iki tabakadan oluşmaktadır.

- 1) Kollajen lifleri ve fibroblastların yoğun olduğu dış tabaka
- 2) Miyofibroblastlar gibi hücresel bileşenlerin yoğun olduğu iç tabaka

Miyofibroblastların kasılabilirliği sonucu böbrek hacmi ve basıncı değişerek böbrek fonksiyonlarına etkide bulunabilir ancak spesifik görevi tam olarak bilinmemektedir.

Kapsül hilumdan içeri girerek pelvik sinüsü saran bağ dokusunu meydana getirir, kaliksleri ve renal pelvisi örten bağ dokusuyla da devamlılık gösterir (5).

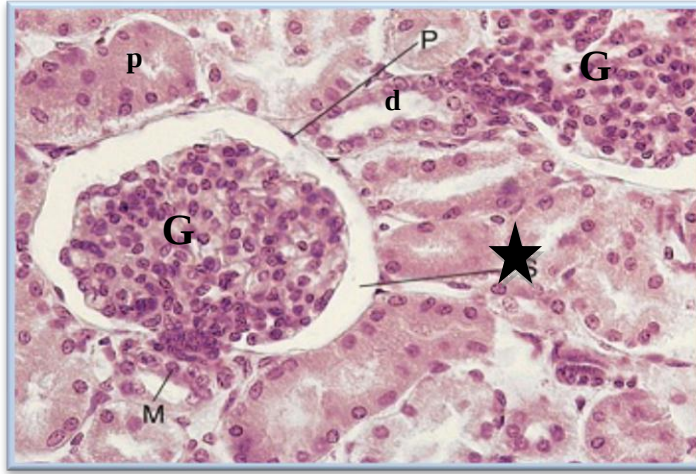
2.2.1.2. Korteks ve Medulla

Transvers olarak ikiye ayrılmış olan taze böbrek dokusu çıplak gözle incelendiğinde iki bölgeden meydana geldiği görülür (5).

Korteks kapsül altında devamlı bir tabaka oluşturan ve koyu renkte gözlenen dış kısımdır. Kırmızımsı kahve renkte tanecikli görünüme sahiptir. Medulla ise daha

soluk gözlenen iç kısım olarak tanımlanır. Kortekse göre daha düzgün gözlenen medulla 8-20 arasında değişen sayıda medulla piramitleri denen koni şeklinde yapılardan ibarettir (8). Korteks ve medulla arasında renk farklılığı bu bölgelerin kanlanma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Böbreğe gelen kanın %90-95'i korteksten geçerken medulladan %5-10'u geçmektedir (5).

Korteks, renal cisimcikler ve bunlarla ilişkili tübülüslerle karakterizedir. Renal cisimciklerle birlikte nefronu oluşturan kıvrıntılı ve düz tübülüsler, toplayıcı kanallar ve zengin bir damar ağından oluşur (Şekil 2.2.1.2.1).



Şekil 2.2.1.2.1 Böbrek dokusuna ait genel görünüm. G: Glomerül, p: proksimal tübülüs, d: distal tübülüs, P : Bowman kapsülü pariyetal epiteli, M: makula densa, yıldız: Bowman aralığı. Hematoksilen- Eozin boyası (Luiz Carlos JUNQUEIRA JC. Temel Histoloji Text & Atlas' tan alınmıştır).

Renal cisimcikler çıplak gözle de görülebilen küresel yapılardır. Nefronun başlangıç kısmını meydana getirirler ve içlerinde glomerül denilen damar ağı da bulunur. Nefron böbreğin temel fonksiyonel birimidir (5).

Böbrek yüzeyine dik bir açıyla kesi yapıldığında medulladan çıkan ışınsal çizgilenmeler görülebilir. Bu çizgilenmeler Ferrein'in medullar uzantıları olarak isimlendirilir ve yaklaşık 400-500 adet bulunan bu ışınsal çizgiler medulladan kortekse doğru uzanmaktadır. Medullar uzantılar düz tübülüsler ve bunların etrafındaki toplayıcı kanallardan oluşmaktadır. Medullar uzantıların arasında bulunan korteks bölümleri ise kortikal labirentler adını alır ve renal cisimcikleri, kıvrıntılı tübülüsleri ve toplayıcı tübülüsleri içermektedir. Her bir nefron ve toplayıcı tübülüs üriniferöz tübülüsü meydana getirir (5). Üriniferöz tübülüs böbreğin parankimasını oluşturur (8).

Medulla düz tübülüsler, toplayıcı kanallar ve vasa recta adını alan özel bir kapiller ağı ile karakterizedir. Düz tübülüsler ve toplayıcı kanallar korteksten medullaya doğru yol alırlar. Bunlara vasa recta denilen ve tübülüslere paralel seyreden kapiller ağı eşlik eder. Bu damarlar idrar konsantrasyonunu düzenleyen karşıt akışlı değişim sisteminin damarsal bölümünü oluştururlar.

Medulladaki tübülüsler yerleşimleri ve uzunluk farklılıklarından dolayı piramit denilen konik yapıları meydana getirirler. İnsan böbreğinde genellikle 8-12 adet piramit bulunur, bu sayı 18'e kadar çıkabilir. Piramitlerin bazal yüzü kortekse komşu iken apikal yüzleri renal sinüse açılır. Her bir piramit dış medulla ve iç medulla olmak üzere iki bölümden oluşur. Dış medulla ise iç ve dış şerit olarak iki bölgeye ayrılır (5). Medulla piramitleri korteks dokusunun medullaya yaptığı uzantılarla birbirinden ayrılmıştır. Piramitler arasındaki korteks dokusuna renal sütun (Bertini kolonları) adı verilmektedir (8).

2.2.1.3. Böbrek Lob ve Lobülleri

Bir böbrekteki lobların sayısı medullar piramitlerin sayısı ile aynıdır. Bir medullar piramit ve onu çevreleyen böbrek kolonunun yarısı bir lobu oluşturur. Fetal böbrekte bu loblu organizasyon daha belirgindir. Her lob böbrek yüzeyinde konveks bir şişkinlik şeklinde görülür ancak doğumdan sonra bu konveks yapılar kaybolur. Her bir insan böbreği 8 ila 18 arasında lob içermektedir. Bu yapısından dolayı insan

böbreğine multilobar denmektedir. Bazı hayvanların böbrekleri ise içerdikleri tek piramit nedeniyle tek lob içerirler ve unilobar olarak adlandırılmaktadır (5).

Bir böbrek lobülü ise bir toplayıcı kanal ve bu kanalın drene ettiği tüm nefronları ifade etmektedir. Bir lobülün merkezi ayırt edilebilirken lobüller birbirlerinden bağ dokusu septa ile ayrılmamıştır. Lobül kavramı önemli bir fizyolojik temele dayanmaktadır. Lobülü meydana getiren toplayıcı kanal ve buna açılan nefronlar renal salgı ünitesini oluşturmaktadır ve bu bir bezin sekretuar ünitesine eşdeğerdir (5).

2.2.1.4. Nefron

Böbreğin yapı ve görev birimidir ve geçtiği bölgeye göre düz veya kıvrıntılı seyreden uzun bir borucuktur (8). Her bir insan böbreği yaklaşık 2 milyon nefron içermektedir. Nefronlar idrar üretiminden sorumludurlar ve diğer bezlerin salgı kısımlarına karşılık gelirler. Toplayıcı kanallar idrarın son konsantrasyonuna ulaşmasından sorumludur ve salgı ürününün konsantrasyonunu ayarlayan ekzokrin bez salgı kanalları ile analogtur.

Tipik ekzokrin bezlerde salgı birimleri ile boşaltım kanalları aynı epitelden köken alırken nefronlar ve onlara ait toplayıcı kanallar farklı kaynaklardan köken alırlar ve daha sonra birleşirler (5).

2.2.1.4.1. Nefronun Genel Yapısı

Her nefron genişlemiş bir bölüm olan böbrek cisimciği ve tübülüslerden oluşmaktadır (6). Nefronun başlangıç kısmı 10 ila 20 adet kapiller halkanın yumak yapması ve Bowman kapsülü ile sarılmasıyla oluşan glomerülden meydana gelir (5). Bowman kapsülü çift yapraklı bir zardır ve glomerülü çevreleyerek nefronun birinci

parçası olan böbrek (malpighi) cisimciğini meydana getirir (8). Bowman kapsülü glomerüler ultrafiltratın ilk oluştuğu yerdir (5). Kapsülün iç tabakası viseral tabaka adını alır ve glomerülün kapillerini içine alır. Dış tabakası ise böbrek cisimciğinin en dış sınırını oluşturur ve Bowman kapsülünün pariyetal tabakasını meydana getirir. Pariyetal tabaka ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur (6). Glomerüler kapiler afferent arteriyol ile kanlandırılır ve efferent arteriyol ile derene edilir. Daha sonra efferent arteriyol böbrek tübülüslerini kanlandırmak üzere dallanarak yeni bir kapiller ağ oluşturur (5).

Afferent ve efferent arteriyollerin Bowman kapsülünün pariyetal yaprağına giriş çıkış yaptığı yere damar kutbu denir. Damar kutbunun tam karşısında böbrek cisimciğinin idrar kutbu yer alır ve burada proksimal tübülüsün kıvrıntılı parçası yer alır (5). İdrar kutbunda epitel, proksimal tübülüs için tipik olan tek katlı prizmatik ya da tek katlı kübik epitele değişir (6).

Bowman kapsülünden sonra nefronun diğer kısımları şu şekilde sıralanır;

- Proksimal kalın parça
 - Kıvrıntılı proksimal tübülüs
 - Düz proksimal tübülüs
- İnce parça
- Distal kalın parça
 - Distal düz tübülüs
 - Distal kıvrıntılı tübülüs

2.2.1.4.2. Nefronun Tübülüsleri

Nefronun tübüler bölümleri yerleşimlerine (proksimal, distal), şekillerine (düz, kıvrıntılı) ve duvar kalınlığına (ince, kalın) göre isimlendirilir.

Bowman kapsülünden başlayarak nefron aşağıdaki tübülüslerden oluşur.

1) Proksimal kıvrıntılı tübülüs: idrar kutbundan başlar (5). Distal kıvrıntılı tübülüslerden daha uzundur bu yüzden korteks içindeki böbrek cisimciklerinin yanında daha sık görülür (6). Kıvrıntılı bir yol izledikten sonra medullar ışınsal uzantılara girerek proksimal düz tübülüs olarak devam ederler.

2) Proksimal düz tübülüs: Henle kulpunun kalın inen kolu olarak da adlandırılır. Medullaya iner.

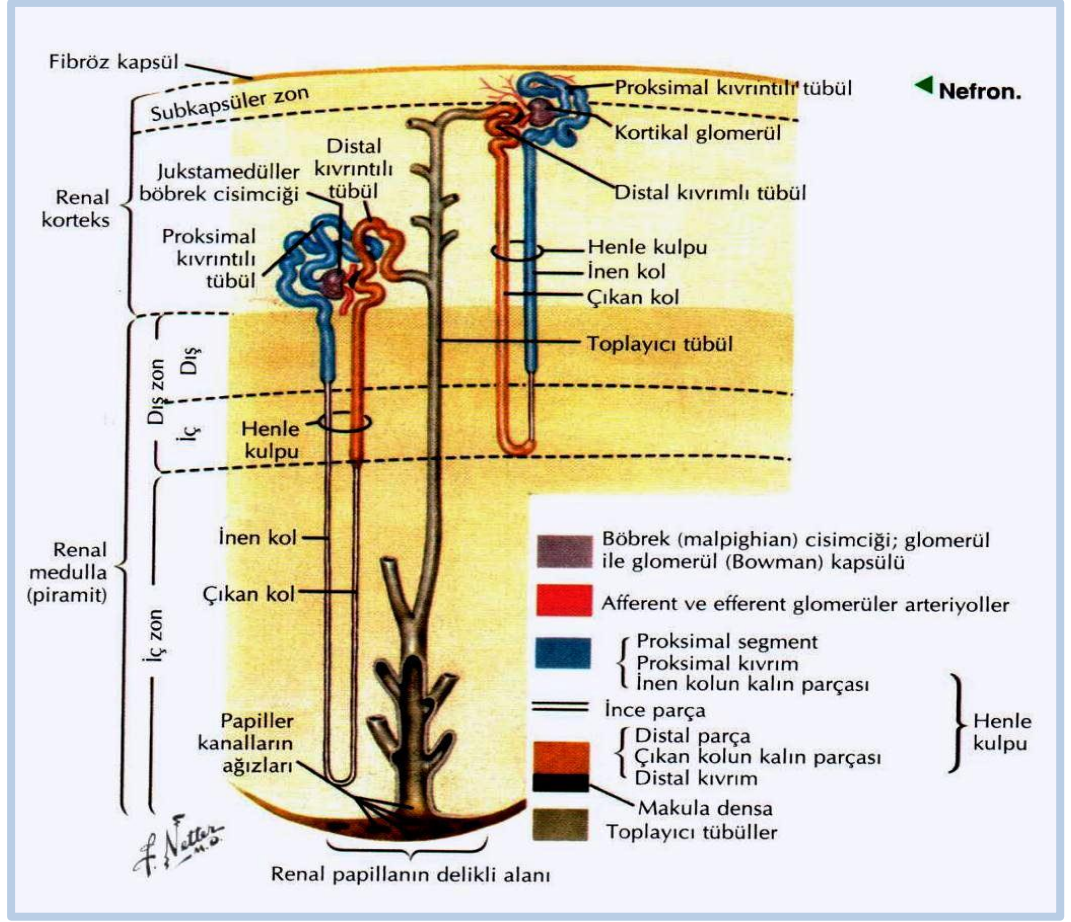
3) İnen ince kol: Proksimal düz tübülüsün medulladaki devamıdır. U şeklinde bir dönüş yaparak kortekse doğru yönelir.

4) Çıkan ince kol: U dönüşünden sonra gelen kısmın aldığı isimdir.

5) Distal düz tübülüs: Henle kulpunun çıkan kalın kolu olarak da adlandırılmaktadır. İnen ince kolun devamıdır ve medulla boyunca ilerler. Kortekse medulla uzantısı içinde girer ve kendi böbrek cisimciğinin yakınına ulaşır. Burada köken aldığı glomerülün damar kutbuyla yakın ilişkiye girer. Afferent arteriyole yakın olan epitel hücreleri değişerek makula densayı meydana getirirler.

6) Distal kıvrıntılı tübülüs: proksimal kıvrıntılıya göre daha az dönüşlüdür. Son kısımda medullar uzantıda yer alan toplayıcı kanala toplayıcı tübülüs aracılığı ile bağlanır (5) .

Proksimal düz tübülüs, inen ince kol, çıkan ince kol ve distal düz tübülüsün hepsine Henle kulpu denmektedir (5) (Şekil 2.2.1.4.2.1).



Şekil 2.2.1.4.2.1 Nefronun genel görünümünün şematik hali (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji' den alınmıştır).

2.2.1.4.3. Nefron Tipleri

Böbrek cisimciklerinin korteksteeki yerleşimlerine göre farklı nefron tipleri tanımlanmıştır.

a) Subkapsüler/Kortikal nefronlar; böbrek cisimcikleri korteksin dıştaki kısmına yerleşmiş nefronlardır. Sadece medullanın dış kısmına kadar uzanabilen Henle kulpları vardır.

b) Jukstamedüller nefronlar; toplam nefronların 1/8'ini oluşturmaktadır. Böbrek cisimcikleri medullar piramitin taban kısmına çok yakın komşuluktadır. Uzun bir Henle kulpları ve medullar piramitin iç bölgelerine kadar uzanan uzun çıkan ince kolları vardır (5).

Bütün nefronlar süzme, emilim ve salgılama işlemlerinde rol alırlar. Ancak jukstamedüller nefronların medulla intersitisyumunda hipertonic gradyanı sağlama konusunda özel bir önemi vardır, medulla intersitisyumundaki hipertonic ortam böbreğin hipertonic idrar üretme yeteneğinin temelini oluşturur (6).

c) Ara/midkortikal nefronlar; korteksin orta kısımlarına yerleşmiş böbrek cisimciklerine sahiptir. Henle kulpları orta uzunluktadır (5).

2.2.1.5. Toplayıcı Tübülüsler ve Kanallar

Toplayıcı tübülüsler kortikal labirentte başlarlar medullar ışınal uzantılara girerek burada toplayıcı kanallarla birleşirler. Korteksteeki toplayıcı kanallar kortikal toplama borusu, medullaya geçtiklerinde ise medullar toplama borusu olarak adlandırılırlar.

Bu kanallar piramidin apeksine doğru ilerleyerek orada daha geniş olup (yaklaşık 200 mikron) papiller kanallar/Bertini' nin kanalları olarak adlandırılan ve minör kalikse açılan kanallarla birleşirler. Bu kanalların açıklıklarını içeren

papilladaki alana area cribrosa denilmektedir (5). Toplayıcı kanalın epiteli arka hipofiz tarafından salgılanan vasopresin ya da antidiüretik hormona tepki verir (6).

Özet olarak; böbrek parankiminin büyük bölümünü nefron oluşturmaktadır. Böbrek cisimciği, proksimal ve distal kıvrıntılı tübülüsler kortikal labirentleri meydana getirirler. Düz proksimal ve distal tübülüs ile, inen ve çıkan ince kolun kortekste yer alan bölümleri medullar uzantıların büyük kısmını oluşturmaktadır. Henle kulpunun ince inen ve çıkan kolları ise her zaman medullada yer alır (5).

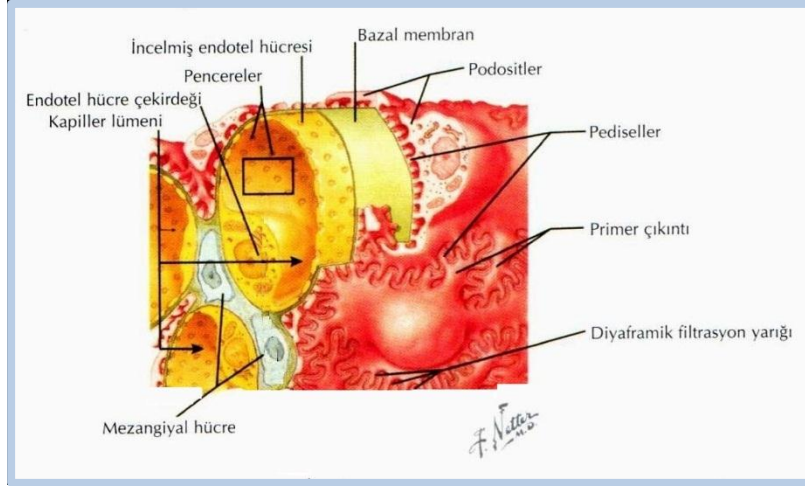
2.2.1.6. Podositler

Embriyonik gelişim döneminde pariyetal epitel fazla değişmezken visseral epitel büyük ölçüde değişime uğrar. İç tabaka hücrelerinden sitoplazmik uzantılar uzandığından bu hücrelere podosit (ayaklı hücreler) denir. Her bir birincil uzantı ayakçık (*pedisel*) denilen ikincil uzantılar oluşturur ve glomerül kapillerlerini sararlar. İkincil uzantılar 25 nm'lik sabit uzaklık ile bazal lamina ile doğrudan temastadırlar. Podositlerin hücre gövdeleri ve birincil uzantıları bazal laminaya değmez (6). Komşu podositlerin pediselleri birbirleri arasına girerek aralarında 20 – 25 nm genişliğinde olacak şekilde süzücü (*filtrasyon*) yarıkları oluşturur. Yarık membranı (*slit diyafram*) denilen ince non-membranöz diyafram filtrasyon yarıklarını örter (9). Komşu uzantıları bağlayan bu perde 6 – 10 nm kalınlığındadır. Podositlerin sitoplazmasında bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilamanlarından oluşan demetler bulunur (6). Aktin mikrofilamanları sayesinde podositler kasılabilir ve süzülme yarıklarını genişletebilirler (9).

2.2.1.7. Süzücü Bariyer

Böbrek cisimciklerinde kanın glomerül kapillerinden Bowman aralığına süzüldüğü süzücü bariyer üç kısımdan oluşur, bunlar pencereci glomerül kapiller

endoteli, arada bulunan ortak bazal membran ve Bowman kapsülünün iç yaprağını oluşturan podositlerdir (Şekil 2.2.1.7.1) (5).



Şekil 2.2.1.7.1 Süzücü bariyeri meydana getiren yapıların şematik görünümü (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji’ den alınmıştır).

Glomerül kapillerleri, 70 – 90 nm çapında diyaframsız pencereleri olan endotel ile döşelidir. Bu pencereler yüksek oranda geçirgendirler, vücuttaki diğer pencereli kapillerlerden tipik olarak daha geniş ve düzensizdirler (9). Endotel hücresinin çekirdeği kapiller kümesinin tabanındaki mezangiyuma yakın yerleşir (9), ve bu hücreler, suyun epitelden daha hızlı geçmesine olanak çok sayıda aquaporin – 1 su kanalına sahiptir (5).

Kapillerlerin çevresi endotel hücreleri ile podositlerin bazal laminalarının kaynaşmasıyla oluşan devamlı ve kalın bir bazal membran ile sarılıdır (6). Glomerüler bazal membranın (GBM) kapillerlerdeki kan ile idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir süzücü bariyer olduğu düşünülmektedir. Elektron mikroskopunda bu tabaka ortada elektron yoğun (lamina densa), her iki yanda da daha elektron geçirgen bir tabaka (lamina rara) şeklinde izlenir. Elektron geçirgen olan lamina rara, hücrelerin tutunmasına yardımcı olan fibronektin içerir (6).

Diyabetik nefropati (DN) gibi durumlarda özellikle lamina raradaki anyonik bölgeler belirgin olarak azalmıştır (5). Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan ve katyonik moleküllerin geçişini engelleyen heparansülfat içeren matriks içinde tip IV kollajen (özellikle $\alpha 3$, $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ zincirleri) ve laminin, nidojen ve entaktinin bulunduğu ağ şeklinde bir yapıdır (6). Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre görevi gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir (6) ve insanlarda 320 – 340 nm genişliğindedir (9).

Pediseller arasındaki süzülme yarıklarındaki yarık membranı 6 – 10 nm kalınlığında ve eşsiz bir filamentöz ağ yapısındadır. Bu ağ yapısı moleküllerin büyüklüğüne göre ultrafiltrata geçişlerini sınırlar (9). Nefrin, bu diyaframın önemli yapısal proteinlerindendir. Orta kısmı daha yoğun olan fermuar benzeri bir protein yapılanmasına sahiptir. Bu hücrelerarası protein yaprağı nefrin dışında Neph-1, Neph-2, P-kaderin, FAT-1 ve FAT-2 gibi adezyon moleküllerini de içerir. Bu membran, podositlerdeki aktin mikrofilyamanları ile bağlantıdadır. Aktin iskeleti, filtrasyon yarıklarının boyutunu, açıklığını ve geçirgenliğini düzenler (5).

Süzücü bariyeri temel olarak bu üç yapı oluşturmakla birlikte endotel hücrelerinin lümene bakan yüzeyini örten glikokaliks tabakası ve ayaklı çıkıntıları ile podositin hücre gövdesi arasında kalan aralığı ifade eden subpodosit boşluğu da seçici geçirgenlikte önemli rol oynamaktadır (5).

GBM, 70.000 dalton'dan ya da 3,6 nm'den daha büyük moleküllerin geçişine izin vermez, albümin de bu moleküllerden birisidir. İdrarda albümin saptanması filtrasyon bariyerinin etkinliğinin bozulduğu yönünde bir işarettir. Klinikte albüminüri ya da hematüri varlığı GBM'nın fizyolojik ve fonksiyonel olarak hasarlandığını gösterir.

2.2.1.8. Mezangiyum

Mezangiyumu, glomerül içi mezangiyum hücreleri ve bunları çevreleyen matriks meydana getirir. Böbrek cisimciğinin damar kutbuna yakın kısımlarında ve glomerüler kapillerin birbirlerine bağlandığı bölgelerde daha belirgindir (5). Bu hücreler bazal membranı destekler ve GBM bileşenlerinin korunmasına yardım etmek için fagositik bir rol üstlenirler (9). Bu hücreler sadece glomerül içinde değil, aynı zamanda jukstaglomerüler cismin bir bileşeni olarak glomerül dışında da bulunabilirler (Lacis hücreleri= Ekstraglomerüler mezangiyum hücreleri) (5).

Mezangiyum hücrelerinin belli başlı görevleri biriken debrisı fagosit ederek süzücü bariyeri açık tutmak, immün kompleksler gibi plazma proteinlerini endositoz yoluyla ortadan kaldırmak, ürettikleri mezangiyum matriksi ile podositlere yapısal destek sağlamak, glomerül hasarına cevapta rol alan önemli moleküller olan interlökin-1 (IL-1), prostoglandin E₂ (PGE₂) ve platelet ilişkili büyüme faktörü (PDGF) salgılamak ve kasılabilirlik özellikleri sayesinde artmış kan basıncına karşı verilen glomerül cevabında rol almak olarak sıralanabilir (5, 9). Klinikte GBM’da protein birikimi olan hastalıklarda mezangiyum hücrelerinde aşırı proliferasyon saptanmıştır. IgA nefropatisi, membranoproliferatif glomerülonefrit, lupus nefriti ve diyabetik nefropati bu hastalıklara örnek olarak verilebilir (5).

2.2.1.9. Jukstaglomerüler Aygıtın Yapısı

Jukstaglomerüler (JG) aygıt makula densa, JG hücreler ve ekstra- glomerüler mezangiyum hücrelerinden meydana gelir.

Distal tübülüsün çıkan kalın kolu böbrek korteksine döndüğünde kendi böbrek cisimciğinin damar kutbu ile temas eder (9). Işık mikroskobu ile incelendiğinde buradaki distal tübülüs hücrelerinin sıkı paketlenmiş, diğer hücelere göre daha dar ve daha uzun oldukları görülür. Bu hücrelerin çekirdekleri daha koyu boyanarak,

daha kalabalık ve üst üste binmiş gibi göründüklerinden makula densa adını almışlardır (5).

Aynı bölgede afferent arteriyolün düz kas hücreleri de değişime uğrar. Salgı granülleri içerirler ve çekirdekleri küresel şekil alır. Bu JG hücrelerin salgı veziküllerini ışık mikroskobu ile gösterebilmek için özel boyama yöntemleri kullanmak gereklidir (5). Bu hücreler renin hormonunu dolaşıma verirler. Renin, sistemik arteriyel kan basıncını düzenler ve sodyum (Na^+) iyon konsantrasyonunu etkiler. Ayrıca renin – anjiyotensin sistemi aracılığıyla glomerül filtrasyon hızının kontrolü üzerine de etkilidirler (9).

2.2.1.10. Böbrek Ara Dokusu

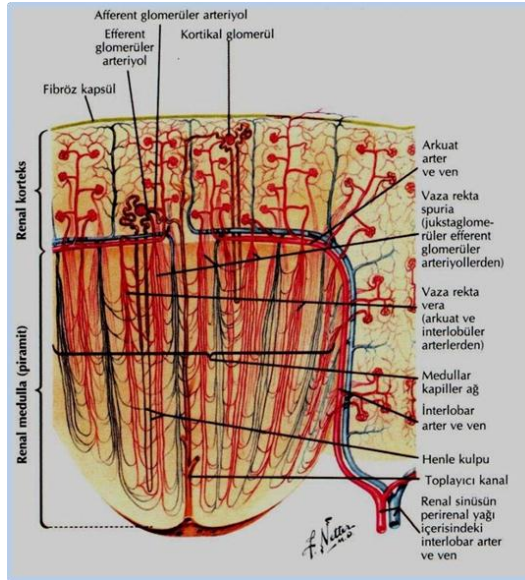
Böbrek intersitisyumu, idrar tübülüsleri ile kan ve lenf damarları arasındaki boşluğa verilen isimdir. Kortekste çok dar bir alan kaplarken medullada genişler. Fibroblastlar, kollajen lifler ve medullada yüksek oranda su tutan proteoglikandan zengin ara madde içeren az miktarda bağ dokusu içerir. Medullada bu bölgede ara hücreler denen salgı yapıcı hücreler de bulunur. Bunlar sitoplazmalarında yağ damlacıkları içerir ve prostoglandin ve prostosiklin sentezinde görev alırlar (6).

2.2.1.11. Böbreğin Damar Yapıları

Böbrekler kan damarları açısından çok zengindir ve kardiyak kan çıkışının %25'ini almaktadırlar. Kan damarları, arteriyel kanı doğrudan böbrek cisimciklerindeki glomerüle ve renal tübülüslerin çevresine yönlendirecek şekilde düzenlenmişlerdir.

Aortadan direkt ayrılan renal arter hilumdan böbreğe giriş yapar, interlobar arterlere dallanır. İnterlobar arterler, kanı kortikomedüller sınırdaki arkuat arterler

aracılığıyla glomerüle dağıtır. Kan, daha sonra böbrek parankimine ışınal olarak (böbrek kapsülüne dik) yayılan interlobüler arterlere iletilir. Bu arterler, bir medüller ışın ve bitişiğindeki kortikal labirentten oluşan renal lobüllerin sınırını çizerler (6). Kan, böbrek cisimciklerini kanlandıran afferent arteriyole geçer. Bu bölgedeki kapiller ağ hem afferent hem de efferent arteriyol içerdiği için vücuttaki özel damar yapılarındandır. Afferent arteriyol, glomerül içerisindeki pencere kapillere dallanır. Efferent arteriyol aracılığıyla glomerülü terk eden damar yapısı bir miktar su ve eriyiği geri almak için kortikal renal tübülüslerin çevresindeki peritübüler kapiller ağı meydana getirir. Ayrıca, jukstamedüller nefronların efferent arteriyollerinden vaza rekta denilen kapiller döngüler çıkar ve Medulla içerisinde uzanırlar. İnen damar aralıksız tip kapiller özelliği gösterirken çıkan damarın endoteli pencere kapillere benzer. Vaza rekta, kortikomedüller sınırda arkuat venlere boşalır. Korteks ve medulladan venöz dönüş interlobüler venlere olur ve arterlerin seyrinin aksi yönde venöz damarlar seyreder. Hilusta renal vene dökülen kan daha sonra vena kava inferior aracılığıyla kalbe taşınır (Şekil 2.2.1.11.1) (9).



Şekil 2.2.1.11.1 Böbrek damar yapılarının genel görünümü (W. K. Ovalle, Netter Temel Histoloji’ den alınmıştır).

2.2.1.12. Böbreğin Lenfatik Dolaşımı

Böbrekler iki büyük lenfatik damar ağı içermektedir. Bunlardan birisi korteksin daha dış kısımlarında bulunan ve kapsüldeki geniş lenfatik damarlarla birleşen ağıdır. Diğeri ise böbreğin daha derin kısımlarının lenfini toplayarak renal sinüsteki daha geniş lenfatik damarlara getirir. Bu iki ağ arasında çok sayıda anastomoz vardır (5).

2.2.1.13. Böbreğin Sinirsel Uyarılması

Renal pleksusu oluşturan lifler daha çok otonomik sinir sisteminin sempatik dallarından köken almaktadırlar. Uyarılmaları, damar düz kaslarının kasılmasına yol açar. Glomerüle gelen afferent arteriyollerin kasılması filtrasyon hızını azaltır ve idrar oluşumunu baskılar. Glomerülden çıkan efferent arteriyollerin kasılması ise kanın glomerül içerisinde göllenmesini sağlayarak filtrasyon hızını ve buna bağlı olarak idrar üretimini artırır. Sempatik uyarının kaybı artmış üriner çıkışa yol açar.

Normal böbrek fonksiyonu için dışarıdan bir sinir kaynağına ihtiyaç olmadığı kanıtlanmıştır. Böbrek nakli esnasında sinir lifleri kesildiği halde, nakledilen böbrek normal fonksiyonlarına devam edebilmektedir (5).

2.3 Diyabetes Mellitus

DM, insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin, mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Klinik olarak polidipsi,

poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi klasik belirtiler ve hastalığa spesifik retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlar ile tanınabilir. Normalde kan glukoz düzeyi, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinden salgılanan insülin adlı hormonla düzenlenmektedir. İnsülin kan glukoz düzeyini düşürür. Diyabetli hastalarda insülin yokluğu veya yetersiz salınımı hiperglisemiye neden olur. Bu da artan glukozun idrarla bir miktar atılmasına yol açar. Yüksek glukoz düzeyleri zaman içerisinde çeşitli organların yapı ve fonksiyonlarında bozukluklara neden olur (10).

2.3.1 Diyabetin Dünyadaki ve Türkiye'deki Sıklığı

DM toplumda çok sık görülen bir hastalıktır. 2025 yılı için Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) öngörüsü, dünyadaki diyabetli sayısının 300 milyona ulaşacağı yönündedir. Bu sayının yüksekliği de, insanlığın nasıl bir risk altında bulunduğunu göstermektedir. DM ülkemizde de giderek artan bir insidans ile seyretmektedir. TURDEP (The Turkish Diabetes Epidemiology Study) yaptığı bir çalışmada Türkiye'de 20 yaş üzerindeki nüfusun %7.2'sinin diyabetik, %6.7'sinin ise glukoz intoleransı olduğunu saptanmıştır (11).

2.3.2 DM sınıflaması

DM, Amerikan Diyabet Birliği'nin sınıflandırmasına göre çeşitli alt gruplara ayrılmıştır:

1- Tip 1 DM: Pankreastan salgılanan endojen insülin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak gelişir. Herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. Tedavisinde mutlak insülin verilmesi gerekir.

2- Tip 2 DM: Toplumda en fazla görülen tiptir. Poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıkabilse de da çoğu zaman uzun sürebilen

asemptomatik bir dönemi mevcuttur. Bu yüzden tanı konulan hastaların çoğunluğunda kronik komplikasyonların geliştiği görülmüştür. Tedavisinde oral antidiyabetikler kullanılır.

3- Gestasyonel diyabet: Hamilelikler sırasında ortaya çıkan DM' dir.

4-Diğer spesifik diyabet tipleri:

a) β hücrelerinin genetik defektleri: MODY (maturity-onset diabetes of the young) ve mitokondriyal diyabet.

b) İnsülin etkisinde genetik defektler: İnsülin reseptör mutasyonları ile birlikte görülen hafif hiperglisemiden ağır diyabete kadar değişen metabolik bozukluklardır.

c) Endokrin pankreas hastalıkları: Pankreasa diffüz olarak zarar veren her türlü durumda diyabet gelişebilir. Ör: Pankreatit, travma, kistik fibrozis, hemakromatozis, enfeksiyon, pankreatektomi ve pankreas karsinomu gibi.

d) Endokrinopatiler: Büyüme hormonu (GH), kortizol, glukagon, epinefrin gibi bazı hormonlar insülinin etkisini antagonize ederler. Bu hormonların aşırı salgılanması sonucu gelişen Akromegali, Cushing sendromu, Glukoganoma ve Feokromositoma diyabete neden olabilir.

e) İlaç ve kimyasallara bağlı diyabet: Bazı ilaçlar β hücrelerinde kalıcı hasara neden olarak, bazıları ise insülin salgılanmasını bozarak diyabet gelişimine sebebiyet verebilir.

f) Enfeksiyonlar: Konjenital *Rubella*, *Coxsackievirus*, *Cytomegalovirus*, *Adenovirus* ve *kabakulak virüsleri* diyabet oluşumuna yol açabilir.

g) Diyabet ile ilişkili olabilen genetik hastalıklar: Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu gibi kromozom anomalilerinin olduğu hastalıklarda DM' un sıklığı da artar.

g) Malnutrisyonla ilgili DM: Bunun da iki tipi mevcuttur.

-Fibrokalküloz pankreatik diyabette; pankreasta fibrozis gelişimi ve ekzokrin kanallarda taş oluşumu vardır.

-Protein yoksunluğu diyabeti; beslenme bozukluğu olan genç erişkinlerde görülür (10), (12, 13).

2.4. Diyabetik nefropati

Diyabetli hastalarda, diyabetik nefropati (DN), önemli bir mortalite nedenidir. Gelişmiş ülkelerde hemodiyaliz ünitelerinde tedavi gören son dönem böbrek yetersizliği hastalarının 1/3'ünü diyabetikler oluşturur. Bu, gelişmiş ülkelerdeki son dönem böbrek yetersizliğinin en sık nedeninin diyabetik nefropati olduğu anlamına gelir. Avrupa ve Amerika'daki Tip-1 diyabetli hastaların % 30-50' sinde, Tip-2 diyabetlilerin % 5-15'inde diyabetik nefropati gelişir (14). Tip-1 ve tip-2 DM' nin en sık görülen mikrovasküler komplikasyonudur. Diyabetik bir hastada üç ila altı ay arasında en az iki idrar tahlilinde günlük 300 mg ve üzerinde albüminüri saptanması veya günlük 500 mg proteinüri saptanması ile diyabetik nefropati tanısı konur.

Uygun şekilde tedavi edilemeyen hastalarda zaman içerisinde böbrek fonksiyonları bozulur. Hipertansiyon genellikle bu sendroma eşlik eder.

DN; aşağıda belirtilen 5 evreden oluşmaktadır:

- 1- Hipertrofi ve hiperfiltrasyon dönemi: Devamlı hiperfiltrasyonun ve renal hipertrofinin ön plana çıktığı, fakat henüz albüminürinin normal sınırlarda olduğu zaman dilimidir. Hayvan modellerinde diyabetin daha başlangıç döneminde böbrekte protein sentezinin arttığı ve böbrek hacminin arttığı bildirilmiştir.
- 2- Sessiz dönem: Klinik belirti vermeyen kalıcı renal hipertrofi ve hiperfiltrasyonun gözleendiği devredir. Glomerül bazal membranında (GBM) kalınlaşma, mezangiyum hacminde artma gözlenir.
- 3- Mikroalbüminüri dönemi: İdrarla atılan günlük albümin miktarı 30-300 mg'a yükselmiştir. Bu evrede böbrekte GBM kalınlaşması, mezangiyumda artış gibi histolojik değişiklikler gözlenir.

- 4- Aşkar nefropati dönemi: Hastaların hemen hepsinde hipertansiyon ve idrarlarında 300 mg/gün üzerinde albümin vardır. Diyabetik nefropatide rastlanılan histopatolojik değişikliklerin çoğu bu evrede saptanır.
- 5- Son dönem böbrek yetmezliği: Giderek şiddetini arttıran ağır böbrek yetmezliği, üremi ve aşkar proteinüri gözlenir. Hemodiyaliz tedavisi başlanmalıdır (15).

İlk üç devre prelinik, son iki devre ise klinik belirtilerle seyreder. Hemodinamik değişiklikler ve glomerül hipertrofisi sıçanlarda streptozotosinle (STZ) oluşturulan deneysel diyabette de gösterilmiştir. İleri glikolizasyon son ürünlerinin artışı ile ilişkili metabolik defekte bağlı olarak GBM'da kalınlaşma (16) ve mezangiyal matriks artışı (17) meydana gelir. Glomerül hipertrofisi ile ilişkili hemodinamik etki de glomerül sklerozunun gelişiminde rol oynar (18). *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) diyabetik nefropati patogeneğinde merkezi bir rol üstlenmektedir. TGF-β' nın, hastalığın erken evrelerinde glomerül hipertrofisine, kronik fazda ise mezangiyal matriks birikimine yol açtığı gösterilmiştir (19). Mezangiyal hücre kültürleri ve hayvan deneylerinde de mezangiyal hücre genişlemesinde kilit rolün TGF-β' ya ait olduğu ortaya konmaktadır (20). TGF-β salınımını uyaran faktör, hastalığın erken evrelerinde hiperglisemi ve protein kinaz C iken, ileri evrelerde glikozile proteinler ve TGF-β' nın oto-indüksiyonu da söz konusu olabilmektedir (21). Spontan diyabetik ratlarda kısa süreli hipergliseminin dahi TGF-β ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Diyabetik hastaların böbreklerinde TGF-β miktarı yüksek olduğu, glomerüler TGF-β ekspresyonunun glisemik kontrol derecesiyle yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.4.1. Diyabetik Nefropatide Işık Mikroskopik Bulgular

Tip-1 ve Tip- 2 DN' li hastaların böbrek boyutları artmıştır ve genel olarak mikroskopik incelemelerinde aynı histolojik değişikliklere rastlanılır. Bunlar:

Glomerülün interkapiller nodüler lezyonu: Bu nodüller iyi sınırlanmış eozinofilik ve Periyodik Asit Schiff (PAS) pozitif yapılar olup glomerülün merkezine yerleşmişlerdir. Bu nodüllerin mezangiyumdan kaynaklandıkları bilinmektedir. Bu histolojik görünüm ağır proteinüri, hipertansiyon, böbrek yetmezliği gibi bulgularla beraber olur.

Diffüz glomerül lezyonları: Bu lezyon daha sık görülür. Kapiller kıvrımları da tutan mezangiyum matriksinde genişleme ve kapillerlerin duvarlarında kalınlaşma izlenir. Diffüz glomerül lezyonu ve nodüller birlikte görülebilir.

Eksudatif lezyon: Bowman kapsülü boşluğunda yer alan, yuvarlak, homojen, eozinofilik yapılar olup bazen kapiller kıvrımlarını çepeçevre sarmıştır, bazen de Bowman kapsülü boyunca yerleşiktirler.

Arteriye lezyon: Afferent ve efferent arteriyol tutulumu görülür. Arteriyollerde tüm damar duvarını tutan ve zamanla duvarın yerini alan hiyalinizasyon izlenir. Efferent arteriyoldeki lezyon diyabete özgüdür ve bazen saptanabilen ilk bulgudur.

Tübülüs ve intersitisyum lezyonları: İnsülinin kullanımının devreye girmesi ile azalmakla birlikte; aşırı glukozürlü hastalarda görülen kortikomedüller bölgedeki tübülüs hücrelerinde glikojen birikimi ile tanımlanan patolojik değişikliklere rastlanılır. Bu değişikliklere "Armani-Ebstein" lezyonu denir.

2.4.2. Diyabetik Nefropatide Elektron Mikroskopik Bulgular

Diyabette en erken görülen elektron mikroskopik bulgu, glomerül bazal membran kalınlaşması ve mezangiyum artışıdır. Bu değişiklikler hastalığın ilerlemesi ile daha belirgin olur (22, 23).

Tip-1 DM' in başlangıcından itibaren aylar içerisinde kapiller duvarda kalınlaşma izlenir. Nodüler böbrek hastalığında bazal membranda düzensiz kalınlaşmalar gözlenir. Diyabetik nefropatinin bütün evrelerinde elektron yoğun olmayan depolanma vardır. Glomerül filtrasyon değeri normalin % 20' sine ininceye

kadar ayaksı çıkıntılarda değişiklik görülmez. Daha sonra ayaksı çıkıntılarda yapışma ve genişleme görülür. Eksudatif lezyon EM’ de ince granüler elektron yoğun materyal olarak görülür. Tip-1 DM’ li hastalarda böbrek fonksiyonu ile böbrek morfolojisi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Böbreklerin büyük olması böbrek hasarının göstergesidir (24). İlerlemiş böbrek hastalıklarında glomerül bazal membran kalınlığı ile idrarla protein atılımı arasında ilişki gösterilmiştir. İdrarda albümin atılımı 30 mg/dk’ nın üstünde olan Tip-1 DN’ lilerde mezangiyum volümü belirgin olarak artmıştır.

Diyabetik nefropati (DN), son dönem böbrek yetersizliğinin ve dolayısıyla hemodiyaliz, periton diyalizi gibi hem hastaların yaşam kalitesini çok düşüren, hem de devlet açısından maliyeti oldukça yüksek olan işlemlerin DM’ de en sık nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durumda klinisyen tarafından diyabetli hastaların tedavileri düzenlenirken; hipergliseminin kontrolünün yanı sıra, uzun dönem komplikasyonlarının engellenmesi de göz önüne alınmalıdır. Çünkü kontrollü diyabetiklerde komplikasyonların gelişme oranı, kontrolsüz diyabetiklere göre daha düşüktür.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

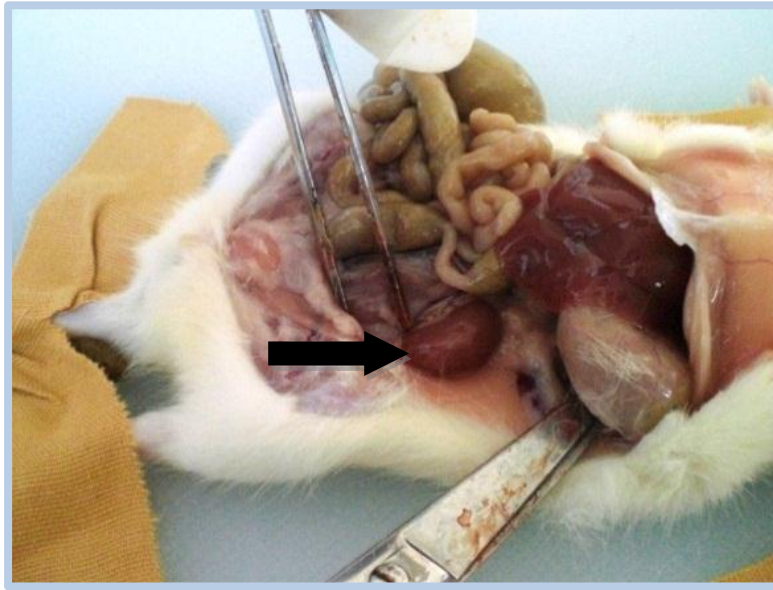
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi

Deney hayvanları üzerinde yaptığımız bu çalışma Ankara Üniversitesi Etik Kurulu' nun 23/03/2011 tarih ve 2011-108-403 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 21 adet, 3 aylık, erkek cinsiyetinde Wistar tipi beyaz sıçan kullanıldı. Hayvanların başlangıç vücut ağırlıkları 200-250 gr arasında değişmekteydi. Kan şekerleri ise 90-110 mg/dl arasında idi. Tüm hayvanlar aynı kaynaktan alınarak herhangi bir hastalıklarının olup olmadığının kontrolü ve çalışma ortamına adaptasyonlarının sağlanması için 1 hafta beklendi. Hayvanlar tüm çalışma boyunca Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD hayvan laboratuvarlarında kontrollü çevre şartlarında korundular. Deney süresince 3-4 hayvan bir kafeste olacak şekilde barındırılarak kısıtlama olmaksızın standart kemirici yemi ve su ile beslendiler. Deney başlangıcından itibaren sıçanların ağırlıkları ve kan şekerleri düzenli olarak ölçülerek gelişimleri takip edildi.

Deneyisel yöntem ile tip 1 DM oluşturmak istenen hayvanlara, daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen Streptozotosin (STZ, Sigma) uygulandı. STZ, pankreas β hücrelerinde reaktif oksijen radikalleri oluşturarak hasar meydana getirmektedir (25). Sitrat tamponu (0,1M , pH: 4,5) içerisinde çözdürülen STZ, 50 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara aynı stresi oluşturmak amacıyla yalnızca sitrat tamponu (0,1M , pH: 4,5) enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra hayvanların kuyruk venlerinden kan glukoz düzeyleri ölçüldü (Glucotrend, Roche). Kan glukoz konsantrasyonları 300 mg/dl (başlangıç değerlerinin yaklaşık 3 katı) ve üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek deneye dahil edildi. Sıçanlar enjeksiyondan sonra 12 hafta boyunca kan şekerleri düzenli aralıklarla ölçülerek takip edildiler. DM oluşturulan sıçanlar iki gruba ayrıldılar; bir grubun yalnızca düzenli takipleri yapıldı, başka herhangi bir işlem yapılmadı, bu grup Diyabet (DM) grubu olarak değerlendirildi. Diğer 7 hayvana ise her gün aynı saatte olacak şekilde 5

mg/kg/gün dozunda timolol gavaj yoluyla verildi, bu grup Diyabet+ Timolol (DM+T) grubu olarak değerlendirildi.

Planlanan deney süresi tamamlanınca, enjeksiyondan sonra 13. hafta içerisinde sıçanların kan şekeri düzeyleri ve ağırlıkları ölçülerek aşırı doz ketamin ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildiler. Karın orta hattı açılarak böbreklere ulaşıldı (Resim3.1.1). Kapsülü soyulan böbreğin bir yarısı transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemeleri için %2,5' luk glutaraldehit içerisine alındı, kalan yarısı ve diğer böbrek ışık mikroskobunda (IM) incelenmek üzere %10' luk tamponlu formaline alındı (pH: 7,2-7,4). Histolojik tespit, takip ve inceleme aşamalarının tümü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nda yapıldı.



Şekil 3.1.1 Sakrifiye edilen sıçanlarda karın orta hattı açılarak abdomen boşluğunun her iki yanında yer alan böbreklere (ok) ulaşıldı.

3.2. Işık Mikroskopisi İçin Yapılan Çalışmalar

Çalışma gruplarına ait böbrek dokularının dış kısmındaki kapsül, fiksatifin iç kısımlara daha iyi etki etmesi amacıyla soyuldu. Alınan dokular tespit amacıyla en az 1 hafta olmak koşuluyla, ortalama 15 gün, bir hafta ara ile değiştirilen %10' luk formalin içerisinde bekletildi. Fikse olan dokular rutin histolojik takip aşamalarına alındılar; öncelikle 15-20 dakika akan su altında yıkanan dokular daha sonra sırası ile ikişer değişim %75 ve %96' lık etanolde birer saat bekletildi. İkinci %96' lık etanolde bir gece beklenen dokular ertesi gün iki kere %100' lük alkolde birer saat süre ile dehidrate edildi. Suyu giderildikten sonra ksilen ile şeffaflandırılan dokular 60 °C' lik etüvde 4 saat inkübe edildi. Sıvı parafin infiltrasyonunu takiben doku örnekleri kesit yüzleri aşağıya gelecek şekilde sert parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklar buzdolabı alt rafında (+4 °C) kesit alınana kadar bekletildi. Kesim işlemine başlamadan önce -18°C 'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Sıcak su banyosundan lam üzerine alınan kesitler 60 °C' lik etüvde deparafinizasyon amacıyla 1 saat bekletildi.

Kesitler rutin ışık mikroskobu incelemeleri için Hematoksilen- Eozin ile, böbrek dokusunda meydana gelmiş olabilecek farklı yapı ve birikimleri incelemek amacı ile de Masson' un Trikrom boyası (MT), Periyodik Asit Schiff boyası (PAS), ve gümüş içeren bir boya olan Periyodik Asit Silver Metenamin (PA-SM) özel boyaları ile boyandı. Gözlemler Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobunda yapıldı ve fotoğraflandı.

3.2.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

- Ksilen ile parafini giderme
- Sırasıyla %100, %96, %75 etanol serisi
- Suda yıkama
- Hematoksilen (3 dk)
- Suda yıkama

- Eozin (1 dk)
- Suda yıkama
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapatma

3.2.2. Masson' un Trikrom (MT) Boyası Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Bouin solusyonu (56°C' de 1 saat)
- Soğutma işlemi (10 dk oda sıcaklığında bekleme)
- Akar suda sarı rengi gidene kadar yıkama
- Weigert' in demirli hematoksileni (10 dk)
- Akar suda yıkama (10 dk)
- %1' lik Biebrich Scarlet asit fuksin solusyonu (10 dk)
- Distile su
- Fosfomolibdik- fosfotungustik asit (10-15 dk)
- %2,5' luk anilin mavisi (5-10 dk)
- Distile su
- %1 asetik asit (3-5 dk)
- %96, %100 etanol
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapatma

3.2.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon

- Suda yıkama
- Periyodik asit solusyonu (10dk)
- Bolca distile suda yıkama
- Schiff solusyonu (30 dk)
- Çeşme suyunda yıkama (5 dk)
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapama

3.2.4. Periyodik Asit-Silver Metenamin (PA-SM) Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- %1 periyodik asit solusyonu (20 dk)
- Distile su ile yıkama
- Gümüş nitrat solusyonu (56°C' de 1,5-2 saat)
- Distile su
- %1 altın klorid (30 sn)
- Distile su
- Sodyum tiyosülfat (2 dk)
- Suda yıkama
- Heidenhein hematoksileni (1 dk)
- Suda yıkama
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.3. Elektron Mikroskobu İçin Yapılan Çalışmalar

Kontrol, DM ve DM+T gruplarına ait böbrek dokularından 1 mm³ hacmindeki bir parça %2,5' luk glutaraldehit içerisine alındı. TEM için tespit ve takip işlemleri aşağıdaki sıra ile uygulandı:

- 1.Tespit (ön tespit): 0,2M fosfat tamponu içerisinde %2,5 glutaraldehit ve %2 paraformaldehit (+4⁰ C' de, 2-3 saat)
- 1.Yıkama: 0,1M fosfat tamponunda (2x15 dk.)
- 2.Tespit: 0,1M fosfat tamponunda %1 OsO₄ (2-3 saat, karanlık ortamda)
- 2.Yıkama: 0,1M fosfat tamponunda (3x20 dk.)
- Distile su ile yıkama
- Blok Boyama: %70 etanolde %0,05 uranilasetat ve %1 fosfotungustik asit (2 saat, karanlık ortamda)
- Dehidratasyon: %70, %96, %100 alkol, propilenoksit
- 1:1 propilen/Araldite (1 saat)
- Araldite (2 saat)
- Gömme (Bloklama): Blok kalıbı içerisine böbrek dokuları kesit yüzü ayarlanarak konuldu, üzerine araldite eklendi.
- Polimerizasyon: Hazırlanan bloklar 80⁰ C' de, 1 gece süre ile tutuldu, sonrasında etüv kapatılarak bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

3.3.1. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

- Ultramikrotom ile 700- 1000 nm kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu.
- Distile su içinde Toluidin mavisi/Azur II boyası (%1 boraks, %1 toluidin mavisi, %1 Azur II) ile boyandı (50-60 °C ısıtıcıda boya kurutuldu)
- Distile su ile yıkandı.
- Kesitler tekrar ısıtıcıda bekletildi
- Kurutma ve soğutma işlemleri uygulandı.

- Ksilen ile şeffaflandırıldı.
- Entellanla kapatıldı.

Boyanan preparatlar kuruduktan sonra Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

3.3.2. İnce Kesit Boyama Protokolü

- Ultramikrotom ile 70-90 nm kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitler boyama setine yerleştirildi.
- Distile su (1-2 dk)
- %8' lik uranilasetat (45 dk)
- Distile su (1-2 dk)
- 0,1 N NaOH
- %0,7 kurşunsitrat + %0,9 sodyumsitrat solusyonu (20 dk)
- %0,1 N NaOH' da yıkama
- Distile su (1-2 dk)

Boyatarak hazırlanan gridler kurumaları için kurutma kağıdına alındı, daha sonra grid kutusuna yerleştirildi. İncelemeler LEO 906E marka TEM ile yapıldı, görüntülemeler Sharp eye CCD ve Image SP (Germany) dijital görüntüleme sistemi programı ile elde edildi.

3.4. Morfometrik Değerlendirme

Vücut ağırlığı ile kan şekeri düzeylerindeki başlangıç ve son değerleri arasındaki değişimler açısından gruplar arası farklılığı incelemek için, önceden sonraya yüzde değişim hesaplandı. Yüzde değişim= $((\text{son ölçüm}-\text{ilk ölçüm})/\text{ilk ölçüm})*100$ biçiminde hesaplandı.

3.4.1. Işıık Mikroskobu ile Yapılan Morfometrik Ölçümler

Glomerül çapları ve böbrek cisimciğı çaplarının karşılaştırılması için kontrol ve deney gruplarında her bir sıçandan hazırlanan kesitlerden birinde 10 glomerül rastgele seçildi, böylece bir grubu temsilen 70 glomerül (7 sıçan x10 glomerül) değerlendirildi. Glomerüllerin çapları ışık mikroskobunda x40 büyütmede oküler mikrometre kullanılarak ölçüldü. Her bir glomerülün çapı hesaplanırken birbirine dik olacak şekilde iki eksen de iki farklı çap ölçölüp ortalaması alındı. Aynı glomerüllere ait Bowman kapsülleri için de aynı ölçme metodu kullanıldı (26). Daha sonra elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi, gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal- Wallis analiz testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

3.4.2. TEM ile Yapılan Morofmetrik Ölçümler

Glomerül bazal membran kalınlığı endotelin iç kenarı ile epitel hücresinin iç kenarı arasındaki uzaklık ölçölerek hesaplanmaktadır (27). Çalışmamızda glomerül bazal membran kalınlığı, TEM ile x12930 büyütmede sharp eye ccd marka kamera ile çekilen elektromikrograflar üzerinde, dijital ortamda Image SP programı kullanılarak her bir deney hayvanına ait iki glomerülde 8 farklı bölgeden ölçüldü. Daha sonra bunların aritmetik ortalamaları alınarak bir hayvana ait ortalama GBM kalınlığı hesaplandı. Elde edilen verilerin medyan ve ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde değerlendirilmesinin ardından gruplar arası farklılığı değerlendirmek amacıyla Kruskal- Wallis analiz testi uygulandı ve p değerleri tespit edildi. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

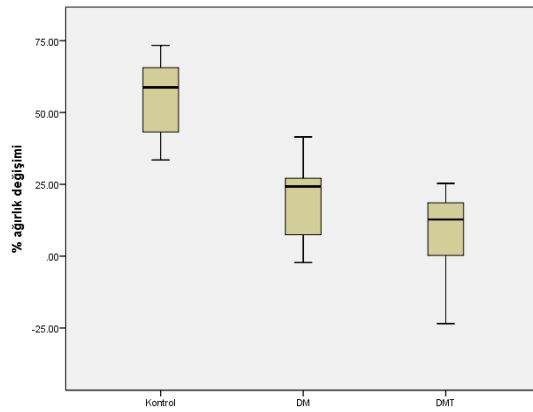
3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmaya ait tüm veriler ortanca (minimum-maksimum) ve ortalama±standart sapma biçiminde özetlendi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal- Wallis testi kullanıldı. Kruskal- Wallis testi sonucu anlamlı bulunduğunda, hangi grupların birbirinden farklı olduğunu anlamak için post-hoc testler uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Deney Başlangıç ve Sonundaki Vücut Ağırlıkları ve Kan Şeker Düzeylerinin Karşılaştırılması

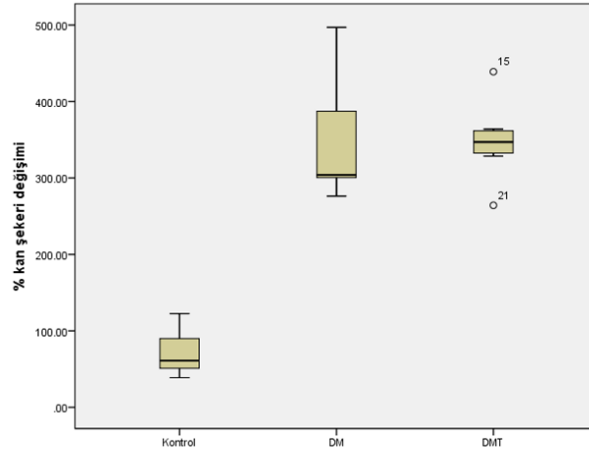
Çalışmaya alınan tüm hayvanların deney sonunda başlangıcına göre ağırlık kazandıkları görüldü ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun vücut ağırlığı artışının DM ve DM+T gruplarındaki artışa göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı (sırası ile $p=0,029$, $p=0,001$). STZ verilerek tip 1 DM geliştirilen her iki deney grubunda da az miktarda vücut ağırlığı artışı saptanırken bu iki grubun kendi aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1 Kontrol, DM ve DM+T gruplarının vücut ağırlıklarındaki değişimin % olarak karşılaştırma grafiği. Kontrol grubunda vücut ağırlığı %58 artmışken DM grubuna %18' lik bir artış gözlemlendi, DM+T grubunda ise bu artış ortalama %8 civarındaydı.

Kan şekerleri düzeylerine baktığımızda ise kontrol grubunda deney başlangıç ve sonuna ait kan şekeri düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmazken DM ve

DM+T gruplarında 12 haftanın sonunda kan şekerleri değerlerinde başlangıç değerlerine göre 3 kattan fazla artış gözlemlendi. Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki kan şekeri düzeyi farkı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.1.2 Her üç deney grubuna ait kan şekeri düzeylerinin % olarak değişim grafiği. Deney başlangıç değerlerine göre kontrol grubunda %72' lik bir artış gözlenirken DM grubunda %350, DM+T grubunda ise %348' lik bir artış hesaplandı.

Kontrol ve deney grupları arasında deney başlangıcında vücut ağırlığı ve kan şekeri düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p> 0,05$). Kontrol grubunda vücut ağırlığı deney başlangıcına göre %58 oranında artmışken DM grubunda %18 oranında bir artış gözlemlendi, DM+T grubunda ise bu artış oranı ortalama %8 civarındaydı. Kontrol grubu ile DM oluşturulmuş diğer iki grup arasında vücut ağırlıklarındaki değişim oranı istatistiksel olarak anlamlıydı. Kan şekeri düzeyindeki değişim incelendiğinde ise kontrol grubunda %72 oranında bir artış gözlenirken DM grubunda %350, DM+T grubunda ise %348 oranında bir artış olduğu görüldü. DM oluşturulmuş gruplar arasındaki fark kendi içlerinde anlamlı değilken her iki DM oluşturulmuş grubun kontrol grubuna göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1 Kontrol, DM, DM+T gruplarına ait deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekeri düzeylerinin Kruskal- Wallis analiz testine göre sonuçları

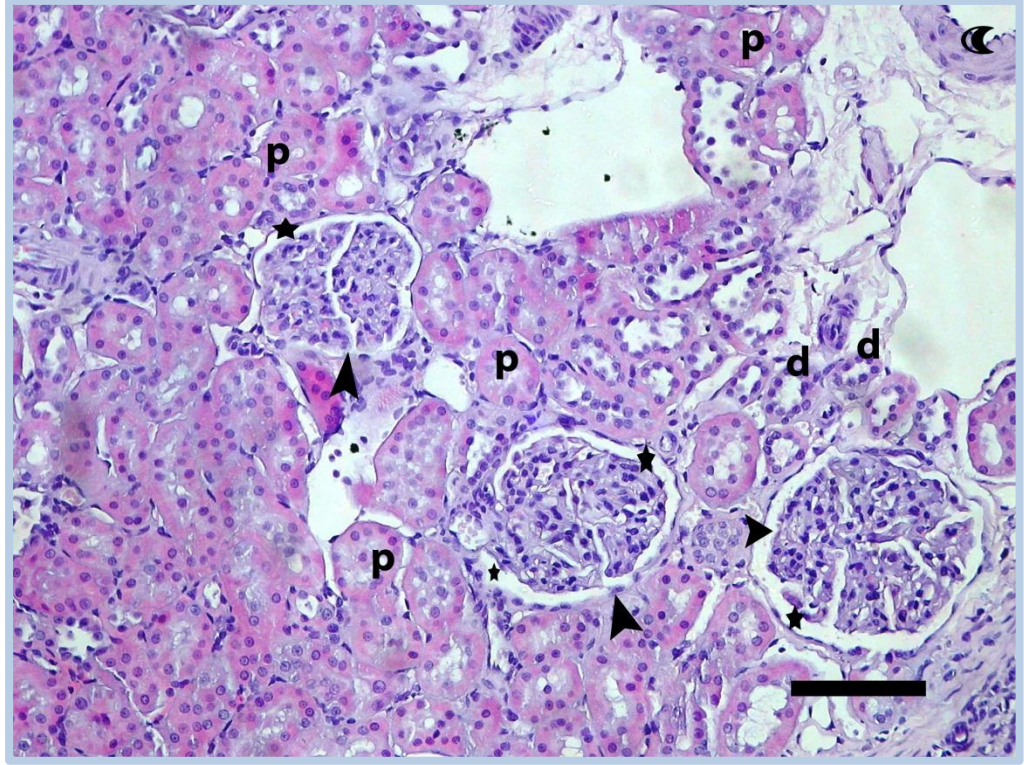
	Kontrol Grubu		DM Grubu		DM+T Grubu	
	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std
Ağırlık (Başlangıç)	230 (200-240)	227±13,08	224 (200-231)	220±11,88	225 (214-235)	225±6,4
Ağırlık (Son)	352 (303-390)	350±37,1	262 (219-300)	261,4±29,2	254 (176-282)	242,4±37,7
Ağırlık % Değişim	54		18,9		7,4	
Kan Şekeri (Başlangıç)	100 (95-105)	99,5±3,30	102 (90-110)	102,1±7,66	100 (95-105)	99,1±3,53
Kan Şekeri (Son)	163 (130-227)	171,5±33,64	441 (412-573)	456±55,4	450 (346-512)	444,2±49,5
Kan Şekeri % Değişim	72		350,3		348,3	

4.2 Işık Mikroskobu ile Elde Edilen Bulgular

4.2.1 Hematoksilen- Eozin Boyası Işık Mikroskobu Bulguları

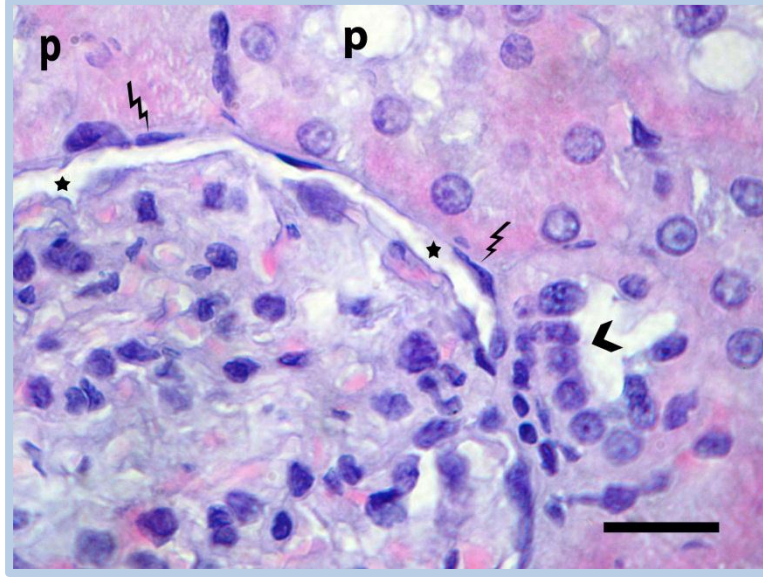
4.2.1.1 Kontrol Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları

Kontrol grubuna ait doku örneklerinin H-E boyamalarında böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübülüsler, intersitisyel alan değerlendirildi. Yapılan gözlemlerin sonucunda kontrol grubuna ait kesitlerde böbrek cisimcikleri normal görünümde izlendi (Şekil 4.2.1.1.1).



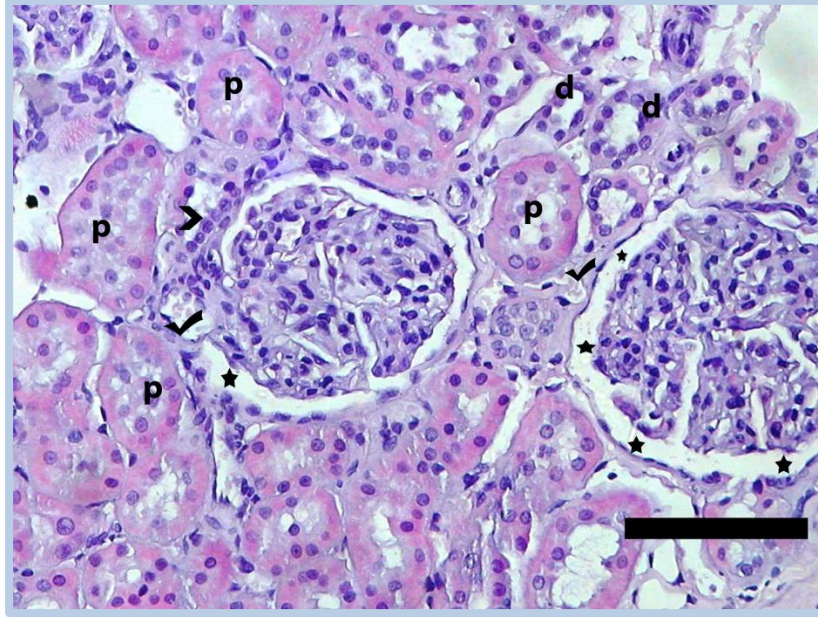
Şekil 4.2.1.1.1 Kontrol grubuna ait böbrek dokusu kesit alanında normal görünümde böbrek cisimcikleri (ok başı), düzgün Bowman aralığı (yıldız), proksimal (p) ve distal tübülüsler (d) görülmekte. Boya: H-E. Bar: 10 μ m

Yassı epitel hücrelerinin meydana getirdiği Bowman kapsülünün dış yaprağı ve içerisindeki glomerül yumağı normal görünümdeydi. Böbrek cisimciğinin damar kutbuna yaklaşan distal tübülüs hücrelerinin morfolojilerini değiştirerek meydana getirdikleri *makula densa* kesit alanına girdiği yerlerde normal olarak izlendi (Şekil 4.2.1.1.2).



Şekil 4.2.1.1.2 Kontrol grubuna ait böbrek cisimciği ve makula densa (kuyruksuz ok) yapısı. Korunmuş Bowman aralığı (yıldız), Pariyetal epitel hücreler (şimşek) ve kesit alanında proksimal tübülüsler (p) de izlenmekte. Boya: H-E. Bar: 2,5 μ m

Kontrol grubuna ait gözlenen böbrek cisimciklerinde, idrar aralığı da denilen Bowman kapsülünün dış yaprağı ile glomerül yumağını saran iç yaprağı arasındaki mesafe normal genişlikteydi. Asidofilik boyanan, yuvarlak ve merkezi çekirdekli proksimal tübülüslerin apikal yüzey farklanması olan mikrovillusları sebebiyle lümenleri dolu görünümdeydi. Kesit alanlarına daha az sayıda giren distal tübülüsler ise daha fazla sayıda çekirdeğin çevrelediği lümenleri ve daha bazofilik boyanmaları sebebiyle proksimal tübülüslerden kolaylıkla ayırt edilebilmekteydi (Şekil 4.2.1.1.3).

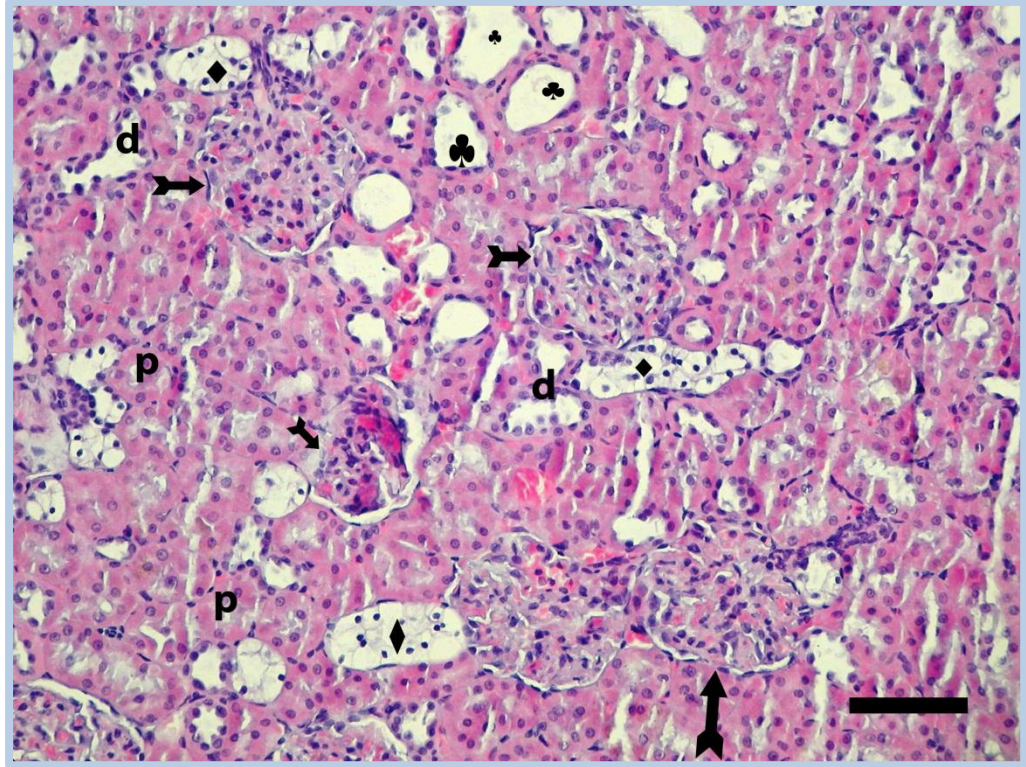


Şekil 4.2.1.1.3 Kontrol grubu kesiti. Damar kutbunda arteriyol içerisinde eritrositler (tik), proksimal tübülüsler (p) ve distal tübülüsler (d) görülmekte. Boya: H-E. Bar: 5 µm

Böbrek korteksinde, böbrek cisimciklerinin çevresinde proksimal tübülüsün lümenini çevreleyen epitel hücreleri yuvarlak ve merkezi çekirdekleri, asidofilik sitoplazmaları ile normal görünümdeydi. Apikal yüz farklanmaları olan mikrovillusları sebebiyle lümen iç sınırları çok belirgin değildi (Şekil 4.2.1.1.3). Distal tübülüs epitel hücrelerinin ise kesit yüzeyinde çekirdek sayısı daha fazla ve düzgün yerleşimli idi. Lümenlerinin daha geniş olması da proksimal tübülüslerden kolaylıkla ayırt edilmelerini sağladı (Şekil 4.2.1.1.3). Her iki tip tübülüs hücresi de bu grupta normal görünümdeydi.

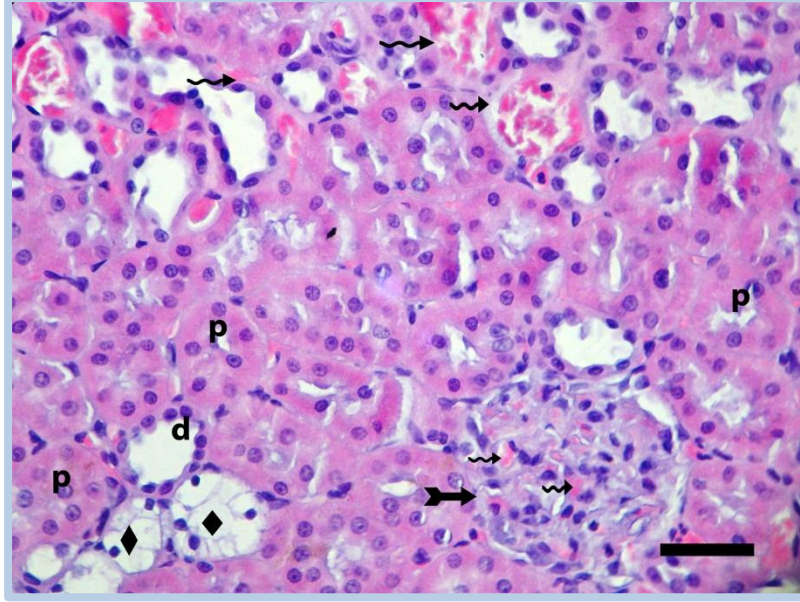
4.2.1.2 DM Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları

DM grubuna ait kesitlerin H-E boyamaları incelendiğinde, böbrek dokusu korteks alanında genel olarak glomerüllerin büyümüş şekilde gözlenmesi dikkati çekti. Glomerül yapılarının genişleyerek Bowman kapsülünün dış yaprağıyla neredeyse birleştikleri ve Bowman aralığının ileri derecede daralmasına yol açtıkları görüldü. Yer yer Bowman aralığının varlığını sürdürdüğü böbrek cisimciklerinin izlenmesine karşın glomerüllerin ileri derecede genişlediği böbrek cisimciği sayısı daha fazlaydı (Şekil 4.2.1.2.1).



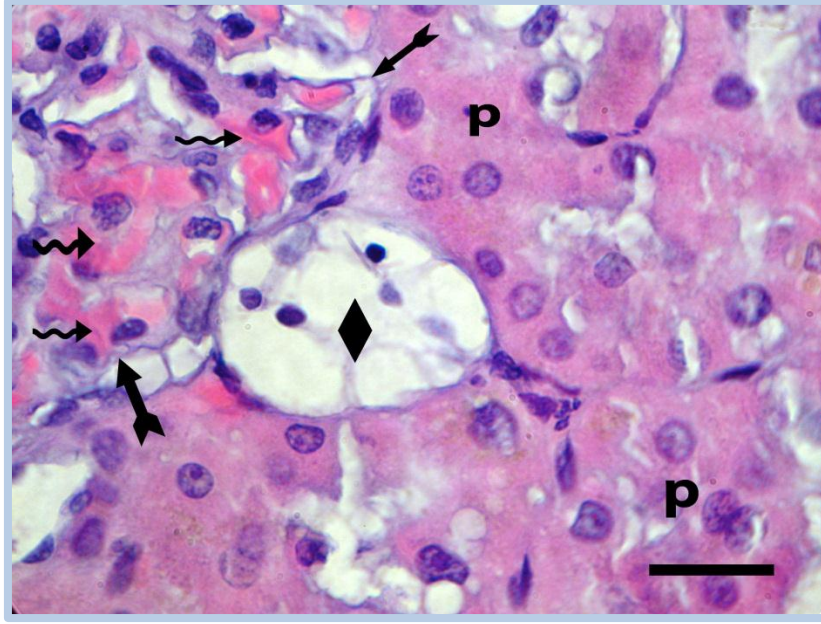
Şekil 4.2.1.2.1 DM grubuna ait böbrek dokusu kesiti. Daralmış Bowman aralığı (kuyruklu ok), şeffaf görünümlü tübülüs hücreleri (karo), dilate tübülüsler (sinek), proksimal tübülüs (p) ve distal tübülüs (d) Boya: H-E. Bar: 10 µm

DM grubuna ait kesitlerde hem glomerül kapiller damarlarının içerisinde hem de intersitisyumdaki damarların içerisinde eritrositlerin yoğun olduğu ve staz yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.2.1.2.1) (Şekil 4.2.1.2.2).



Şekil 4.2.1.2.2 DM grubunda genişlemiş glomerül sınırları (kuyruklu ok), glomerülde ve intersitisyumda staz yapan eritrositler (ondüle ok), şeffaf hücreler (karo), proksimal (p) ve distal tübülüs hücreleri (d). Boya: H-E. Bar: 5 μ m

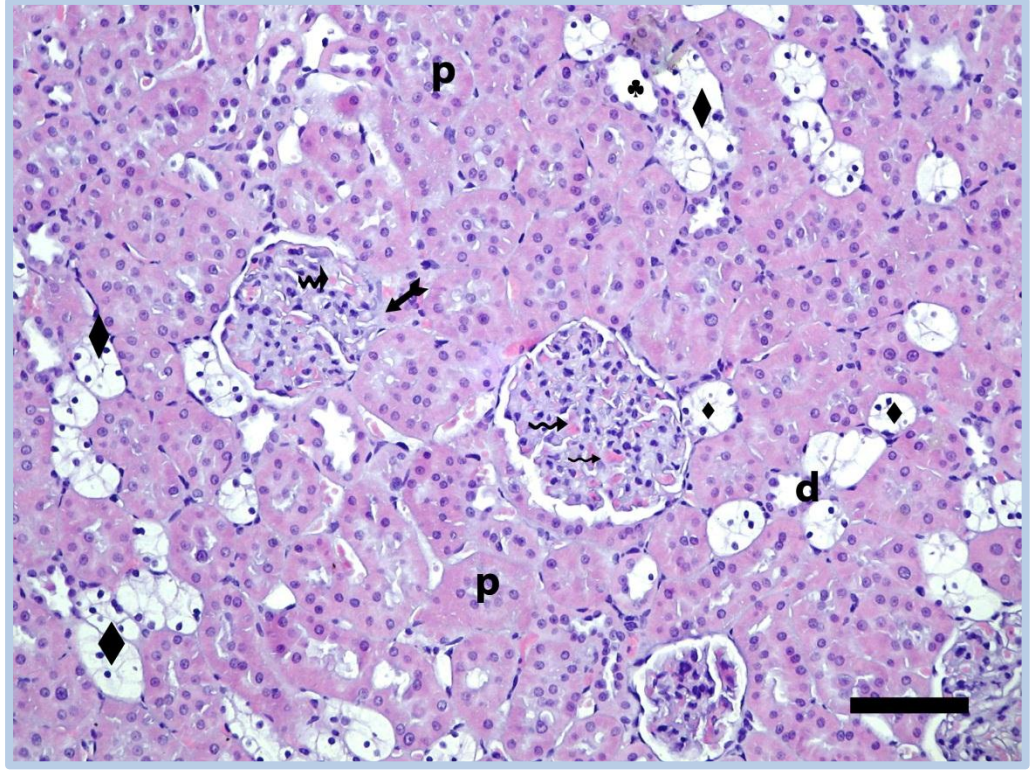
DM oluşturulan gruplarda kesit alanlarında bazı tübülüs hücrelerinin boya almayarak şeffaf göründükleri dikkati çekti (Şekil 4.2.1.2.2 ve Şekil 4.2.1.2.3). Yine DM oluşturulan grupta bazı distal tübülüslerde lümenin dilate olarak normalden geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.1.2.1).



Şekil 4.2.1.2.3 DM grubuna ait kesit alanı. Hipertrofiye uğramış glomerül sınırı (kuyruklu ok), glomerül kapiller damarları içinde staz yapmış eritrositler (e) ve şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: H-E. Bar: 2,5 μ m

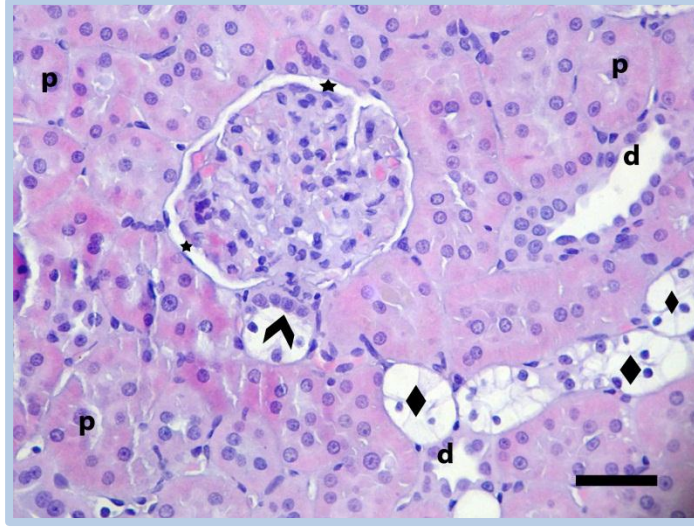
4.2.1.3 DM+T Grubuna Ait H-E Boyası Bulguları

DM+T grubuna ait kesitlerin H-E incelemelerinde glomerüllerde genişleme gözlemlendi ancak bu genişleme DM grubundaki kadar ileri boyutta değildi. Bowman kapsülünün dış yaprağı ile glomerül yumağı arasında, kontrol grubundakine kıyasla daha dar olmak üzere Bowman aralığının korunduğu izlendi (Şekil 4.2.1.3.1).



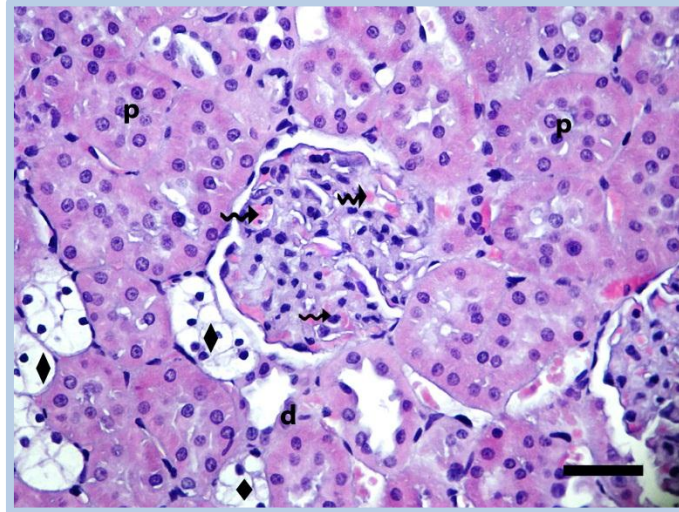
Şekil 4.2.1.3.1 DM+T grubuna ait böbrek dokusunda genel görünüm. Şeffaf hücreli tübülüs epiteli (karo), Bowman aralığı kapanmış glomerül (kuyruklu ok), proksimal (p) ve distal tübülüsler (d), staz yapmış eritrositler (ondüle ok), dilate tübülüsler (sinek) Boya: H-E. Bar: 10 μ m

STZ ile DM oluşturulduktan sonra her gün timolol uygulanan bu gruba ait kesitlerde de proksimal ve distal tübülüsler kontrol grubundakine benzer görünümdeydiler. Tübülüslerde dikkati çeken en önemli fark şeffaf hücreli tübülüs hücreleri idi. Şekil 4.2.1.3.2' de de görüldüğü gibi böbrek cisimciğinin damar kutbundaki makula densa hücrelerinin de ait olduğu tübülüsün diğer hücrelerinin şeffaf görünmesi bu tübülüslerin distal tübülüs olduğunu düşündürdü.



Şekil 4.2.1.3.2 DM+T grubuna ait bir kesitteki böbrek cisimciği, makula densa (kuyruksuz ok), şeffaf hücreli tübülüs (karo), Bowman aralığı (yıldız), proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya: H-E. Bar: 5 μ m

DM+T grubunda da DM grubundakine benzer şekilde eritrositlerin glomerül kapillerlerini yoğun şekilde doldurdukları görüldü (Şekil 4.2.1.3.3).

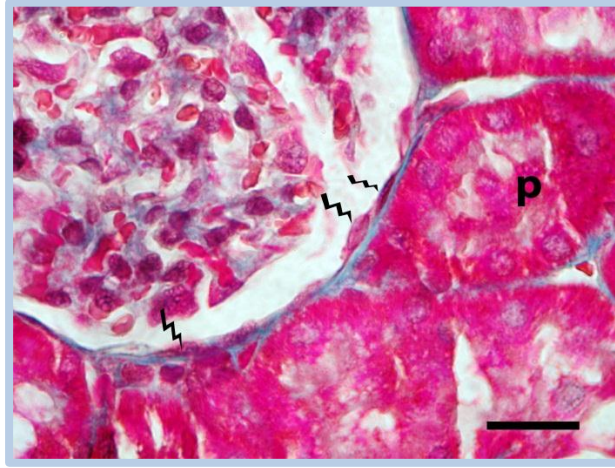


Şekil 4.2.1.3.3 DM+T grubunun böbrek cisimciği kesiti. Şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Glomerül yumağı içinde eritrosit stazı (ondüle ok), proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya: H-E. Bar: 5 μ m

4.2.2. Masson' un Trikrom Boyası Işıık Mikroskobu Bulguları

4.2.2.1 Kontrol Grubuna Ait MT Boyası Bulguları

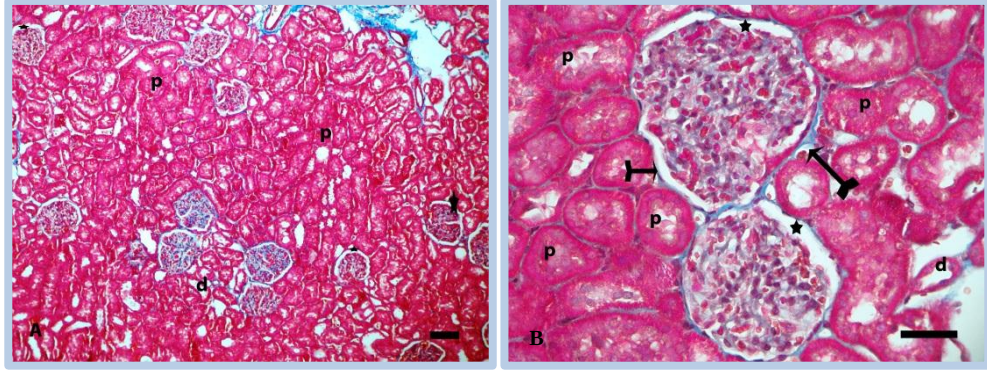
Böbrekte intersitisyel alandaki bağ dokusu yapılarının daha detaylı incelenebilmesi amacı ile kollajen lifleri mavi renkte boyayan Masson' un Trikrom boyası kullanıldı. Kontrol grubuna uygulanan boyama sonucunda Bowman kapsülünün dış yaprağı ince bir hat şeklinde mavi olarak gözlendi. Aynı zamanda bu boya proksimal tübülüs kıvrıntılı kısmındaki mitokondriyonları boyadığından bu hücrelerin bazale yakın kısımlarında koyu çizgilenme şeklinde görünüm elde edildi (Şekil 4.2.2.1.1).



Şekil 4.2.2.1.1 Kontrol grubu MT boyaması. Bowman kapsülünün dış yaprağı (şimşek). Bazalde koyu çizgilenme gösteren proksimal tübülüsler (p) Boya: MT, Bar: 2,5 μ m

Kontrol grubunda proksimal ve distal tübülüsler arasındaki interstisyel alanlar normal kalınlıkta izlendi (Şekil 4.2.2.1.2B). Ayrıca bu alana ait elemanlardan olan

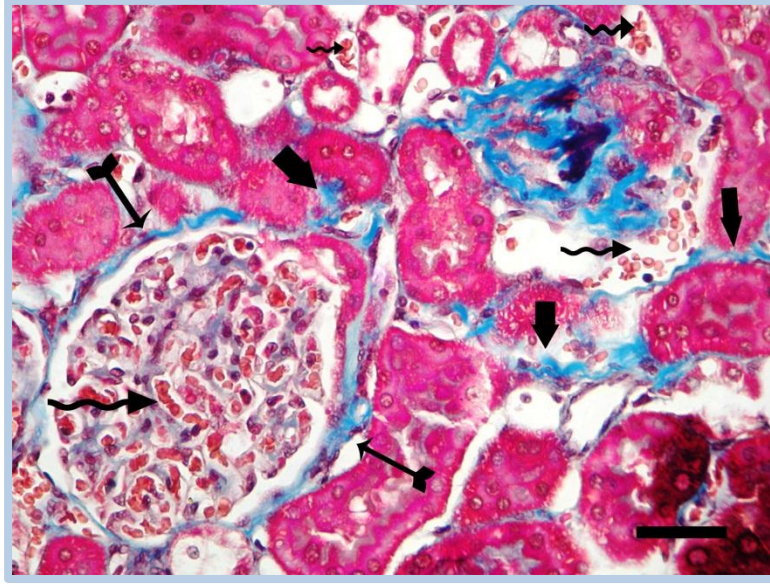
damarların çevresindeki kollajen lifler bu boyanın içeriğindeki anilin mavisi ile mavi renkte boyandı (Şekil 4.2.2.1.2A).



Şekil 4.2.2.1.2 A: MT boyaması kontrol grubu genel görünümü. Damar çevresindeki ve glomerül içerisindeki bağ dokusu elemanları mavi renkte gözlenmekte. Bar: 10 μ m B: Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok) ve proksimal (p) ve distal (d) tübülüsler. Boya M-T. Bar: 5 μ m

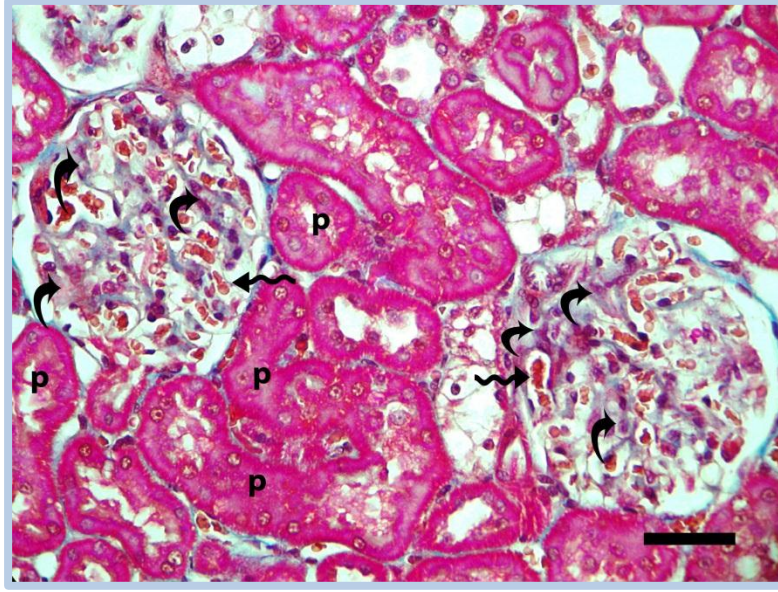
4.2.2.2 DM Grubuna Ait MT Boyası Bulguları

DM grubuna uygulanan MT boyası sonrasında yapılan incelemelerde Bowman kapsülünün dış yaprağında mavi boyanmanın daha fazla olduğu görüldü. Tübülüsler arası intersitisyum dokusundaki fibrozise bağlı olarak bu bölgelerde de mavi boyanma artışı olduğu izlendi. Proksimal tübülüslerdeki mitokondriyonlar DM grubunda da hücre bazalinde koyu çizgilenme şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.2.2.2.1).



Şekil 4.2.2.2.1 DM grubuna ait MT boyanmış bir kesit. Kalınlaşmış Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok), intersitisyel dokuda fibrozis (kalın ok), glomerül içerisinde staz yapan eritrositler (ondüle ok) Boya: MT, Bar: 5 μ m

Glomerül yumağı da bağ dokusu elemanları içerdiğinden, DM oluşturulan grupta bu alanda mavi-mor boyanmanın kontrol grubuna göre yer yer daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.2.2.2). Proksimal tübülüs hücreleri ise kontrol grubundakilerle benzer boyanma özelliği gösterdiler (Şekil 4.2.2.2.2).

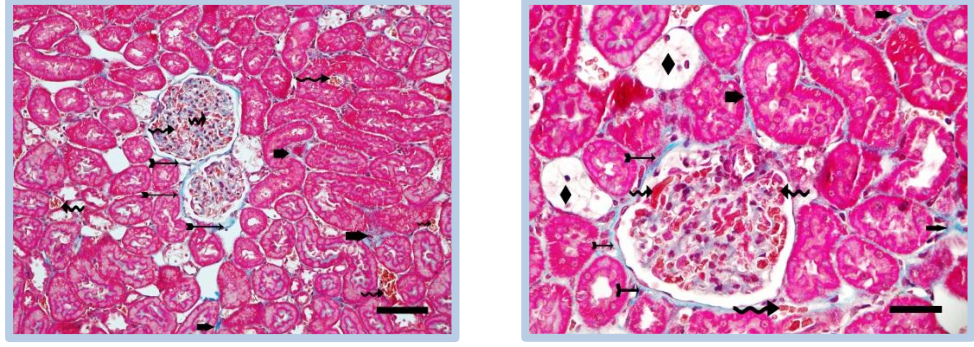


Şekil 4.2.2.2.2 DM oluşturulmuş grupların kesitinde glomerül içi mezangiyum bölgesine uyan boyanma artışı (kıvrık ok), asidofilik boyanmış proksimal tübülüs hücreleri (p), staz yapan eritrositler (ondüle ok). Boya: MT. Bar: 5 µm

H-E boyamasında gözlenen şeffaf tübülüs hücreleri DM grubunun MT boyamasında da izlendi (Şekil 4.2.2.2.2).

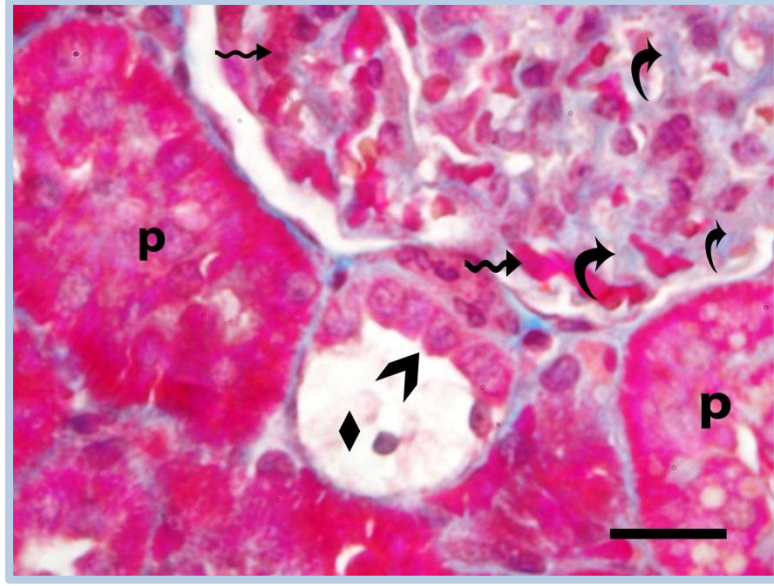
4.2.2.3 DM+T Grubuna Ait MT Boyası Bulguları

DM+T grubunda yapılan MT boyamasında da DM grubuna benzer şekilde Bowman kapsülünün çevresinde ve intersitisyumda fibroze bağlı olarak mavi boyanan alanlarda artış tespit edildi. H-E boyasında da gözlenen kapiller içi eritrosit stazı varlığı bu boyama ile de belgindi (Şekil 4.2.2.3.1).



Şekil 4.2.2.3.1A ve B: DM+T grubu MT boyaması. Kalınlaşmış Bowman kapsülü (kuyruğu büyük ok). Glomerül içi ve intersitisyel alanda eritrosit stazı (ondüle ok), intersitisyel alan (kalın ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: MT, A: Bar: 10 μ m, B: Bar: 5 μ m

Bu grupta böbrek cisimciğini oluşturan yapılardan biri olan glomerül içinde mezangiyum alanlarına denk gelen bölgelerde de mavi boyanma artışı görüldü (Şekil 4.2.2.3.2). Aynı kesitte böbrek cisimciğinin damar kutbunda morfolojik değişime uğrayarak makula densa adını alan hücreler ile bu hücrelerle aynı lümeni çevreleyen diğer hücreler izlendi. Makula densa hücrelerinin dışındaki hücreler boyayı almayarak şeffaf göründü (Şekil 4.2.2.3.2). Makula densenin lokalizasyonuna uymayan diğer alanlarda da proksimal tübülüslerin arasında yer yer şeffaf hücreli lümenlere rastlandı (Şekil 4.2.2.3.1A).



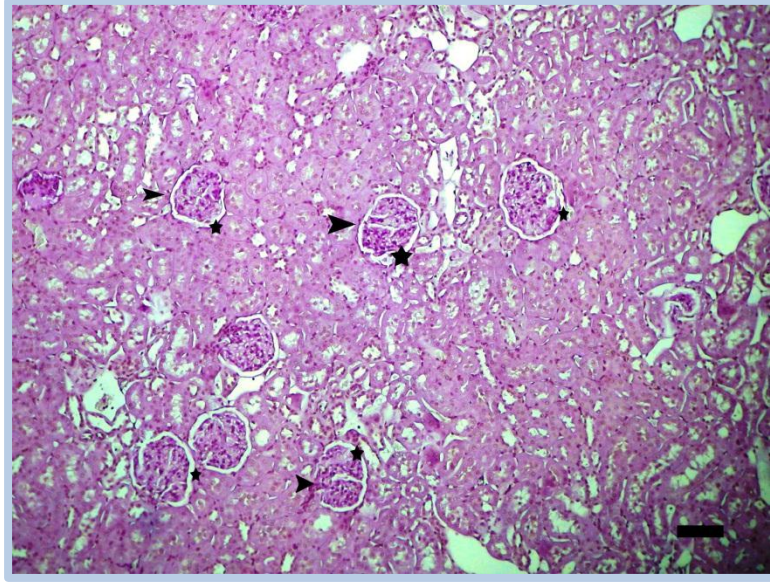
Şekil 4.2.2.3.2 DM+T grubu. Glomerül içerisinde mezangiyum hücreleri ve bunların matrikslerine uyumlu bölgelerde mavi boyanma artışı (kırık ok), damar içerisinde staz yapan eritrositler (ondüle ok), damar kutbunda makula densa (kuyruksuz ok) ve şeffaf hücreler (karo). Boya: MT, Bar: 2,5 μ m

DM+T grubunda da diğer iki gruba benzer olarak proksimal tübülüs bazal kısımları daha koyu asidofilik olarak izlendi (Şekil 4.2.2.3.2).

4.2.3 Periyodik Asit Schiff Boyası Işık Mikroskobu Bulguları

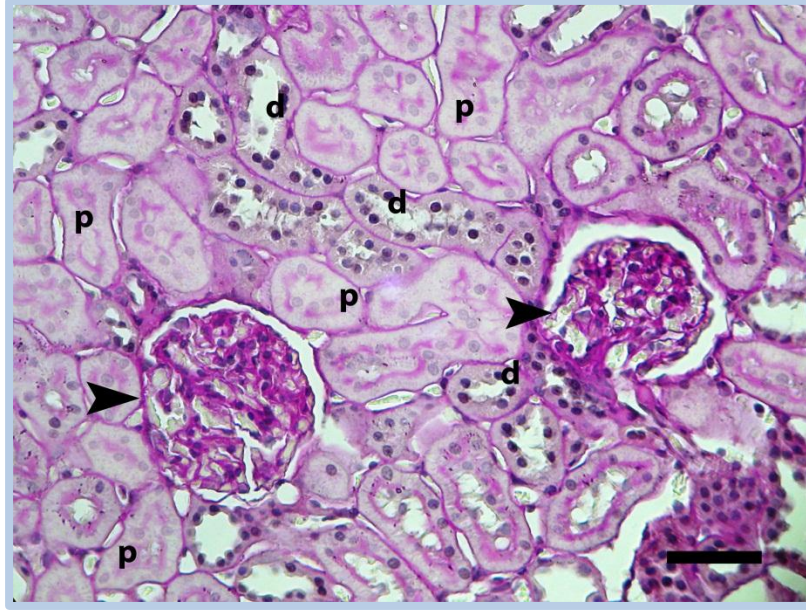
4.2.3.1 Kontrol Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları

Kontrol grubuna ait PAS boyamasında böbrek dokuları normal görünümdeydi. Bowman kapsülü, tübülüs hücrelerinin bazal membranları ve proksimal tübülüs fırçamsı kenarları boyanın glikojeni boyama özelliğinden dolayı (+) boyanmıştı (Şekil 4.2.3.1.1.).



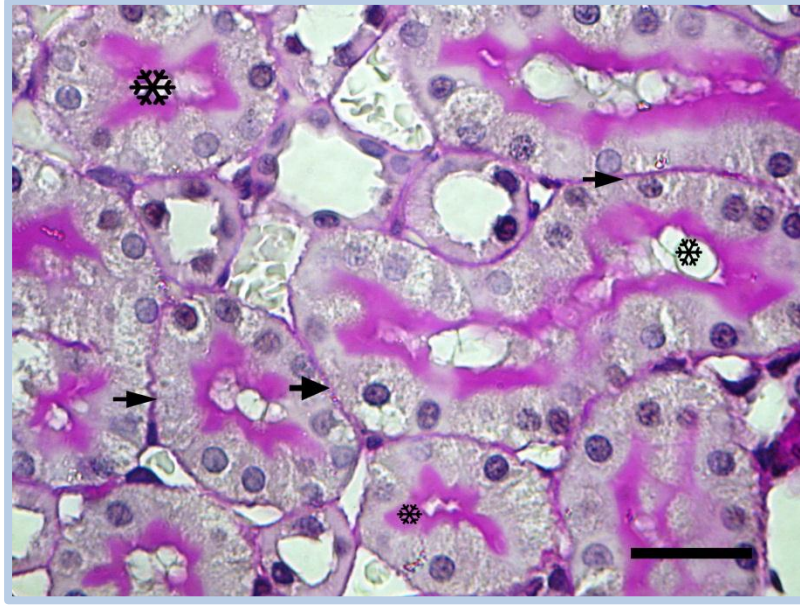
Şekil 4.2.3.1.1 Kontrol grubuna ait böbrek dokusu PAS boyaması. Böbrek cisimcikleri (ok başı) ve Bowman aralığı (yıldız). Koyu boyanmış proksimal ve distal tübülüs bazal membranları görülmekte. Boya: PAS, Bar: 10 μ m

Proksimal tübülüs ve distal tübülüslere ait bazal membranlar normal kalınlıkları ve kalemle çizilmiş gibi düzgün hatlarıyla tüm kesit alanlarında izlendi. Distal tübülüsler kesit alanına daha fazla sayıda giren çekirdekleri ile ayırt edildiler. Proksimal tübülüslerin lümenleri fırçamsı kenarları sebebiyle dolu görünümdeydi. (Şekil 4.2.3.1.2)



Şekil 4.2.3.1.2 Kontrol grubu PAS boyaması. Böbrek cisimciği (ok başı), proksimal tübülüs (p) ve distal tübülüs (d) ve sağdaki glomerüle ait arteriyol girişi de kesit alanında izlenmekte. Boya: PAS, Bar: 5 µm

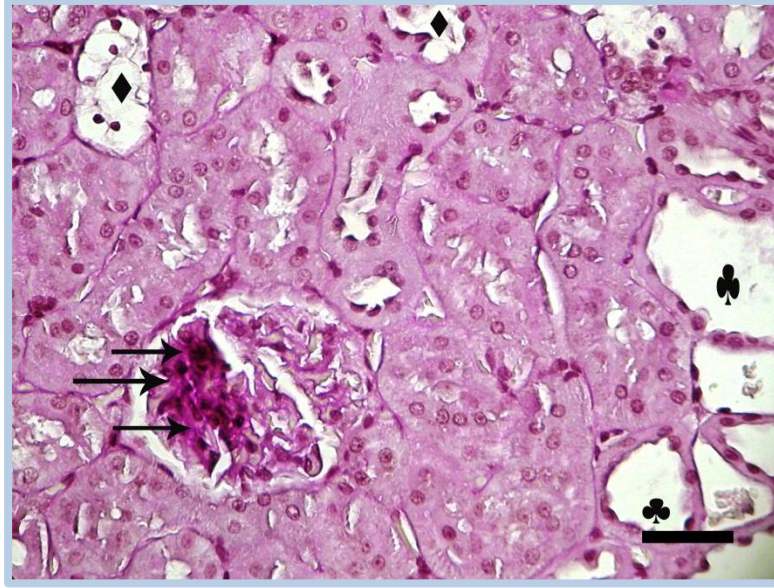
Kontrol grubunun PAS ile boyanmış kesitlerinde her iki tübülüse ve kapillerlere ait bazal membranlar daha koyu boyanma özelliği gösterdi. Proksimal tübülüs hücrelerinin apikal yüz farklanmaları olan mikrovilluslar ve üzerlerini örten glikoprotein yapıda tabakada da PAS (+) boyanma gözlendi (Şekil 4.2.3.1.2 ve Şekil 4.2.3.1.3).



Şekil 4.2.3.1.3 Kontrol grubuna ait tübülüs ve intersitisiyel kapiller kesitleri. Proksimal tübülüs epiteli apikal yüzü(kar tanesi) ve tübülüs bazal membranları (küçük ok) PAS (+). Boya: PAS, Bar: 2,5 µm

4.2.3.2 DM Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları

PAS ile boyanan DM grubuna ait kesitlerde glomerül yapılarının içindeki alanların yer yer daha koyu boyandığı izlendi. Birçok böbrek glomerülünde mezangiyumda artış ve sklerotik değişiklikler izlendi (Şekil 4.2.3.2.1).



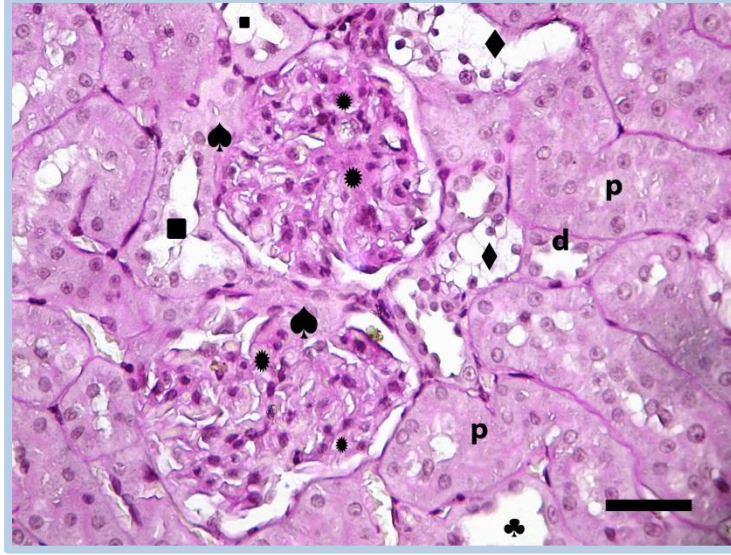
Şekil 4.2.3.2.1 DM grubuna ait böbrek dokusu kesiti. GBM kalınlaşması (ok), dilate tübülüsler (sinek), şeffaf hücreli tübülüsler (karo). Boya: PAS, Bar: 5 µm

DM grubunda, PAS özel boyaması yapıldığında proksimal ve distal tübülüs hücrelerinin bazal membranlarının kontrol grubundaki kadar net izlenemediği farkedildi. Yine proksimal tübülüslerin bazılarında belirgin dejeneratif değişiklikler izlendi. Proksimal tübülüslerde kontrol grubunda apikal yüzde glikokaliksin olduğu alanlara uyan kısımlardaki PAS(+) boyanmasının DM grubunda çok zayıf olduğu hatta yer yer hiç boyanma olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.3.2.1).

4.2.3.3 DM+T Grubuna Ait PAS Boyası Bulguları

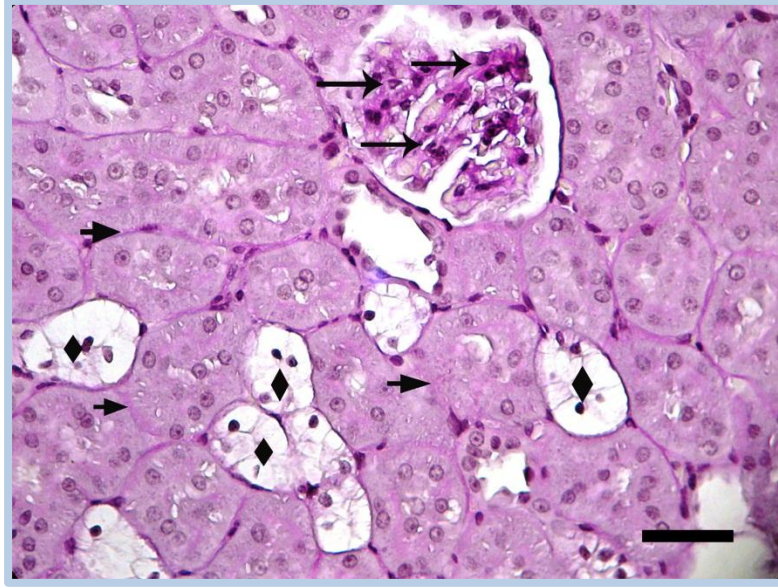
Timolol uygulanan DM' lu grubun böbrek dokusunda PAS ile yapılan boyama yalnızca DM geliştirilmiş olan grubun PAS boyamasına benzer özellikler taşımaktaydı. Bu grupta da glomerül içerisinde GBM kalınlaşmasına bağlı olduğunu düşündüğümüz koyu boyanma izlendi. Mezangiyum matriksindeki artış sebebiyle glomerül içerisinde skleroze alanlar görülmektedir. Bowman kapsülü pariyetal epitelindeki kalınlaşma bu boyama yönteminde de dikkati çekmekteydi. Bazı böbrek

cisimciklerinin damar kutuplarındaki arteriyollerde hiyalinozis gelişmesi sebebiyle bu bölgelerde de kalınlaşma görüldü (Şekil 4.2.3.3.1).



Şekil 4.2.3.3.1 DM+T grubuna ait kesitte böbrek cisimciğinde skleroze alanlar (daire), damar kutuplarında hiyalinozis (maça), proksimal tübülüs (p), dilate tübülüsler (sinek), dejenere olmuş tübülüs hücreleri (kare) ve boya almayarak şeffaf kalan tübülüs hücreleri (karo). Boya: PAS, Bar: 5 µm

DM+T grubunda distal ve proksimal tübülüs hücrelerinin bazal membranların kontrol grubundaki kadar düzgün boyanmadığı ancak yalnızca DM geliştirilen gruba göre sınırların daha belirgin olduğu izlendi. Proksimal tübülüslerin lümenine bakan yüzlerinde normalde gözlenen PAS(+) boyanma bu grupta da çoğu alanda izlenemedi. Boya almayan şeffaf hücrelerin oluşturduğu lümenler DM grubunda olduğu gibi bu grupta da yer aldı (Şekil 4.2.3.3.2).



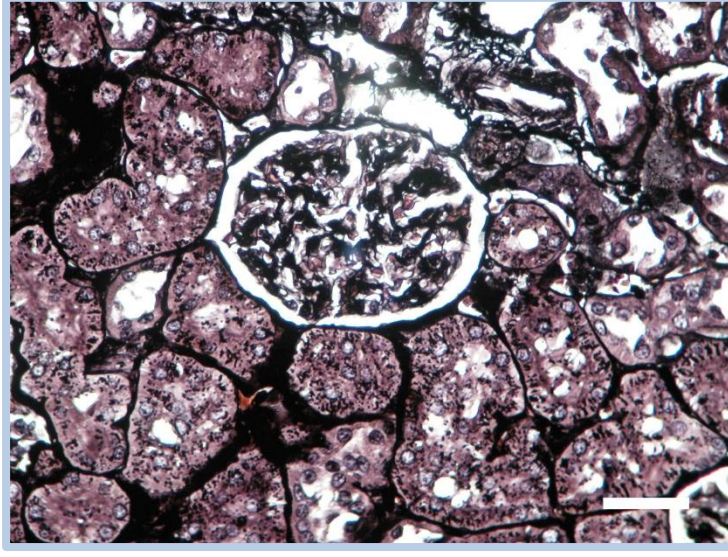
Şekil 4.2.3.3.2 DM+T grubunda GBM’ de kalınlaşma (ok), zayıf boyanma gösteren tübülüs bazal membranı (küçük ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PAS, Bar: 5 μ m

4.2.4 Periyodik Asit-Silver Metenamin Boyası Işık Mikroskobu Bulguları

4.2.4.1. Kontrol Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları

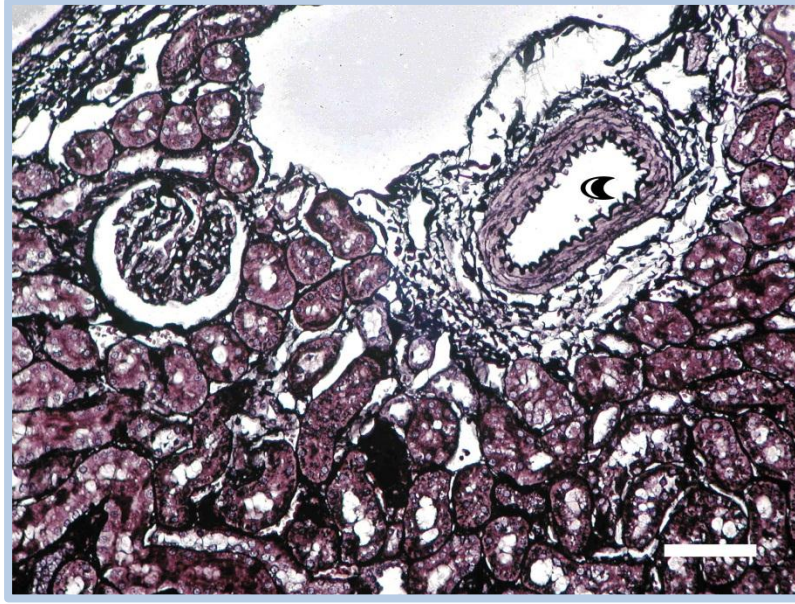
Gümüş çöktürme yöntemiyle yapılan bir boya olan PA-SM çalışmamızdaki doku örneklerine uygulayarak bu dokulardaki retikulum liflerinin yerleşimi ve varsa değişimleri, bazal membran yapılarının özellikleri ve devamlılığını gözlemlemeyi amaçladık.

Kontrol grubuna uygulanan PA-SM boyası ile böbrek cisimcikleri ile glomerüllere, Bowman kapsülü pariyetal epiteline, tübülüslere ve kapillerlere ait bazal membranların düzgün bir hat izlediği ve normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi. Bowman kapsülü pariyetal epiteli ile glomerül yumağı arasındaki mesafenin korunmuş olduğu bu boyama ile yapılan kesitlerde de açık bir şekilde görülmüyordu (Şekil 4.2.4.1.1).



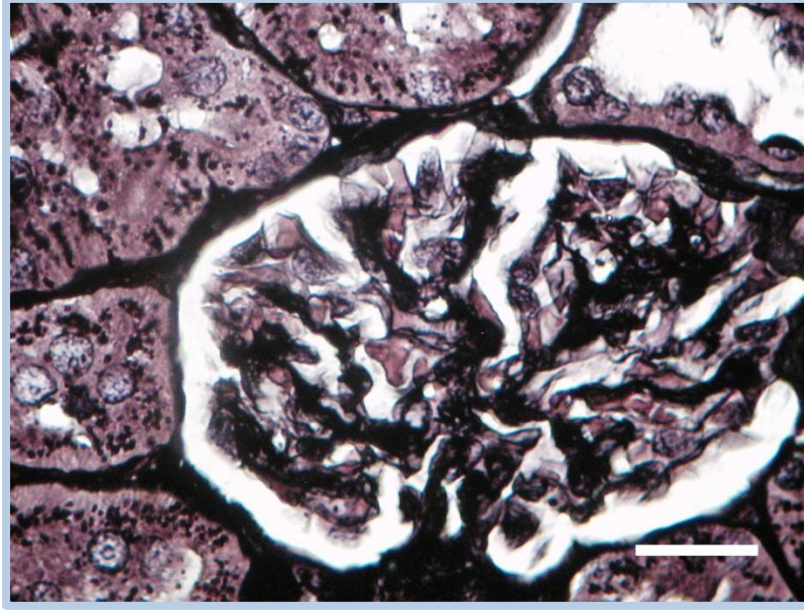
Şekil 4.2.4.1.1 Kontrol grubuna ait normal böbrek dokusu görünümü. Boya: PA-SM, Bar: 5 µm

Böbrek dokusunun intersitisyel alan elemanlarından olan damarlar kontrol grubunda normal görünümdeydiler, çevresindeki retikulum lifleri düzgün olarak izlenmekteydi. İntersitisyel alanın diğer bölgelerinde de kalınlık normal idi (Şekil 4.2.4.1.2).



Şekil 4.2.4.1.2 Kontrol grubu PA-SM boyaması. İntersitisyel alanda membrana elastika internası belirgin arter (hilal). Boya: PA-SM, Bar: 10 μ m

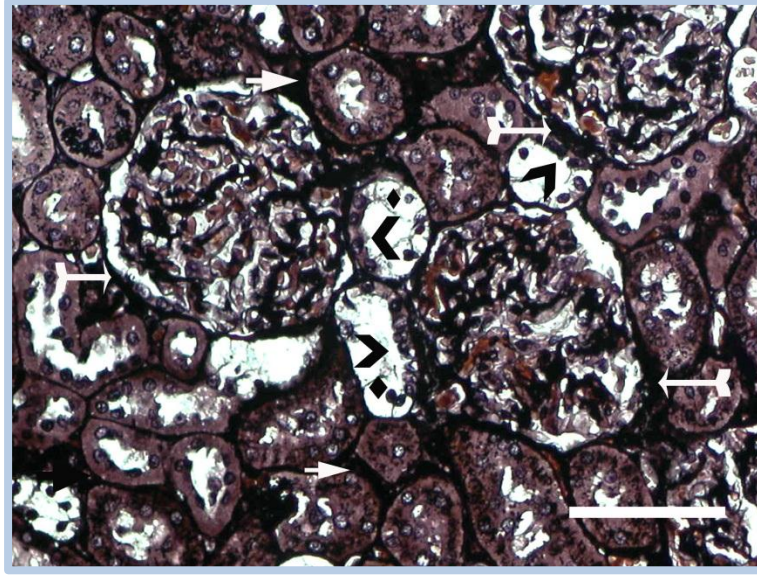
PA-SM boyası ile boyanan tübülüslele yakından baktığımızda proksimal ve distal tübülüslerin birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebildiği gözlemlendi. Proksimal tübülüsler sitoplazmalarındaki mitokondriyonların boyayı tutmaları ile bazal bölgelerinde çizgilenmelere sahipti (Şekil 4.2.4.1.3).



Şekil 4.2.4.1.3 PA-SM ile boyanmış kontrol grubu kesiti Boya: PA-SM, Bar: 2,5 μ m

4.2.4.2. DM Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları

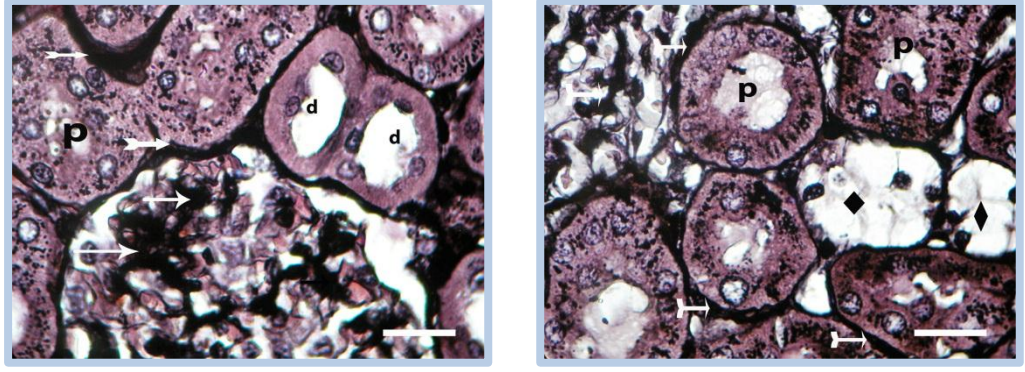
DM oluşturulan gruptan alınan kesitlerin PA-SM ile yapılan boyamasında glomerüllerde mezangiyum matriksine ve GBM' a uyan alanlar daha koyu boyandı. Böbrek cisimciğinin dış yaprak epitelinin ve GBM' nın belirgin olarak kalınlaştığı gözlemlendi. Glomerüllerin, bu hipertrofi sonucunda genişleyerek Bowman aralığını doldurduğu ve oblitere olan kapillerlerde eritrositlerin staza uğradığı görüldü (Şekil 4.2.4.2.1).



Şekil 4.2.4.2.1 DM grubunun PA-SM boyaması. Kalınlaşmış GBM (ok) ve tübülüs bazal membranların (küçük ok), makula densa hücreleri (kuyruksuz ok). Boya: PA-SM, Bar: 10 µm

Bowman kapsülünün pariyetal epitelindeki ve tübülüs hücrelerinin bazal membranlarındaki kalınlaşma bu boyama yöntemi ile daha belirgin şekilde görüldü. Ayrıca böbrek cisimciği içerisindeki glomerülde de GBM' ye uyan lokalizasyonlarda boya tutulumunun normalden fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.4.2.2A ve B).

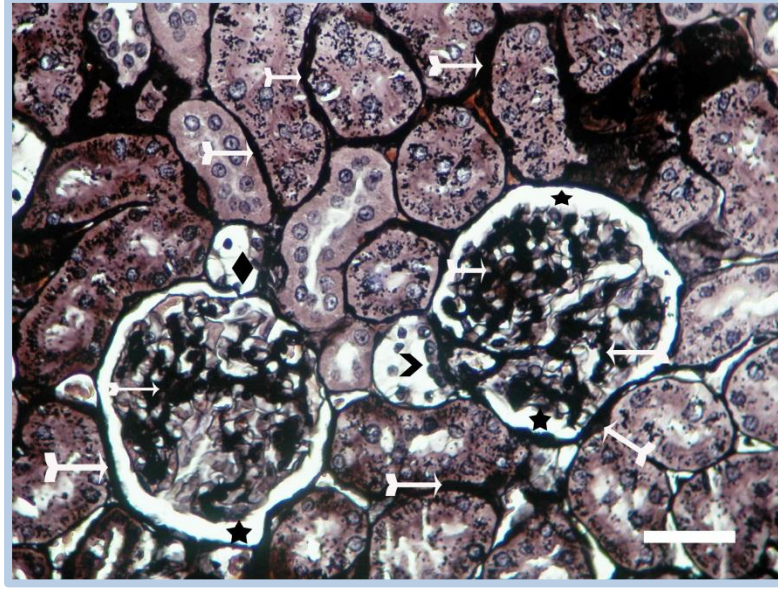
Proksimal tübülüslerin bazal yüzünde fonksiyonelliği artırmak amacıyla oluşan bazal katlantıların girintilerine tübülüs mitokondriyonları hücre uzun aksına paralel olarak yerleşir. Bu boyama yöntemi ile her üç grupta da proksimal tübülüs epitel hücrelerinde mitokondriyonların koyu çizgilenme şeklinde boyandığı görüldü. DM grubunda da bu çizgilenmeler normal görünümleriyle izlendiler (Şekil 4.2.4.2.2A-B). Normal görünümlü proksimal ve distal tübülüs hücrelerinin yanı sıra bu grupta kalınlaşmış bazal membranlarıyla şeffaf tübülüs hücreleri de izlendi (Şekil 4.2.4.2.2B).



Şekil 4.2.4.2.2A-B DM grubunda PA-SM boyama yöntemi ile böbrek cisimciği ve proksimal (p) ve distal (d) tübülüs hücreleri, kalınlaşmış tübülüs bazal membranı (kuyruklu ok) ve kalınlaşmış GBM (ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo), bazal çizgilenmeleri belirgin proksimal tübülüsler (p). Boya: PA-SM, A: Bar: 5 µm, B: Bar: 5 µm

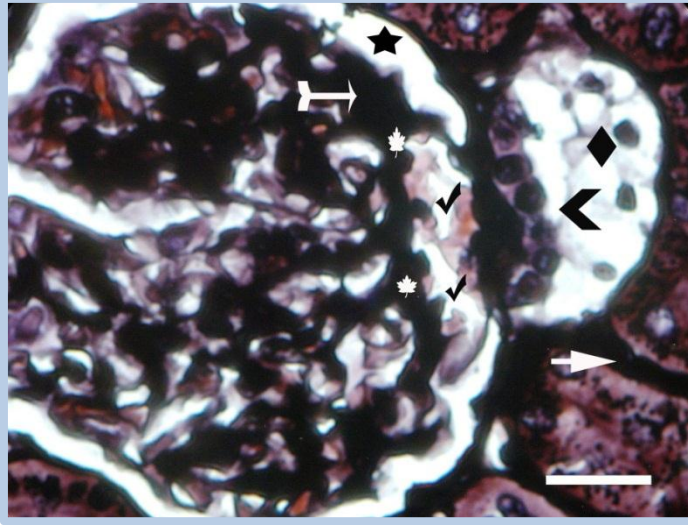
4.2.4.3. DM+T Grubuna Ait PA-SM Boyası Bulguları

DM+T grubunda gümüşleme yöntemiyle yapılan boyamadaki bulgular DM grubuna benzerdi. İnterstisyel alandaki bağ dokusunda artış ve fibrozis sebebiyle bu alanlarda koyu boyanma izlendi. Tübülüs bazal membranlarında ve GBM ile Bowman kapsülü pariyetal epitelinde kalınlaşma gözlemlendi (Şekil 4.2.4.3.1 ve şekil 4.2.4.3.2).



Şekil 4.2.4.3.1 PA-SM boyası ile boyanmış DM+T grubu. Kalınlaşmış Bowman kapsülü bazal membranı ve tübülüs bazal membranların (kuyruğu büyük ok), korunmuş Bowman aralığı mesafesi (yıldız), makula densa hücreleri (kuyruksuz ok) ve şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PA-SM. Bar: 5 μ m

Proksimal tübülüs epitel hücrelerinin bazal bölgesindeki düzgün çizgisel tarzdaki boyanma bu bölgede yoğun olarak bulunan mitokondriyonların göstergesiydi. Kontrol grubu ve DM grubunda da izlenen bu çizgisel boyanma DM+T grubunda da belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 4.2.4.3.1.ve şekil 4.2.4.3.2). Makula densa devamındaki şeffaf tübülüs hücreleri ve tamamen şeffaf olan hücrelerden oluşan tübülüsler bu grupta da izlendi (Şekil 4.2.4.3.2).



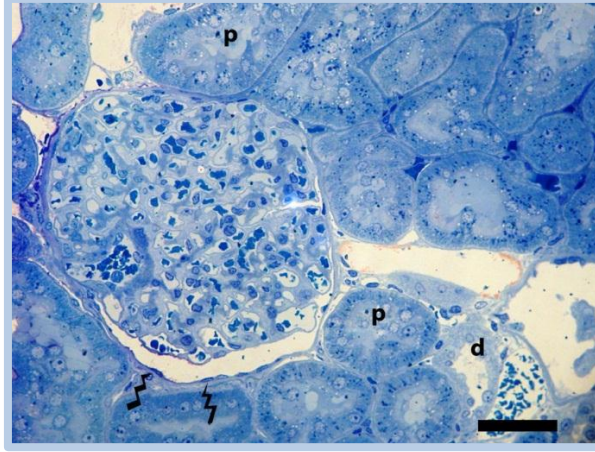
Şekil 4.2.4.3.2 DM+T grubunda glomerülde yoğun boyanma (kuyruklu ok), damar kutbunda eritrositler (tik), arteriyol hiyalinozisi (yaprak), kalınlaşmış tübülüs bazal membranı (küçük ok), şeffaf tübülüs hücreleri (karo). Boya: PA-SM, Bar: 2,5 μ m

4.2.5 Yarı İnce Kesitler Işık Mikroskobu Bulguları

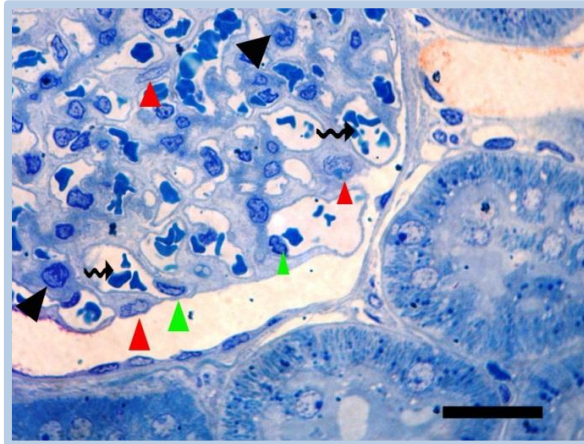
4.2.5.1 Kontrol Grubu Yarı İnce Kesit Bulguları

Kontrol grubu böbrek dokularındanelde edilen yarı ince kesitlerde böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübülüs hücreleri, intersitisyel alandaki damarlar düzgün ve normal olarak izlendi (Şekil 4.2.5.1.1). Böbrek cisimciğinde pariyetal epitel hücreleri, visseral epitel hücreleri (podositler), glomerül içi mezangiyum hücreleri, kapillerlere ait endotel hücreleri belirgin olarak seçiliyordu. Mezangiyum hücreleri daha bazofilik ve büyük çekirdekleri ile glomerül içi diğer yapılardan ayırt edildi. Podosit hücrelerinin çekirdekleri daha soluk ve girintili çıkıntılı olarak izlendi. Kapiller lümenleri normal görünümüne sahipti. Pariyetal yaprağa ait yassı epitel hücreleri düzgün sıralanım gösterdi. Proksimal tübülüs epitel hücrelerinin

çekirdekleri yuvarlak ve orta duruşlu, sitoplazmaları bazal yüzdeki yoğun katlantılar sebebiyle daha koyu renkte izlendi (Şekil 4.2.5.1.2).

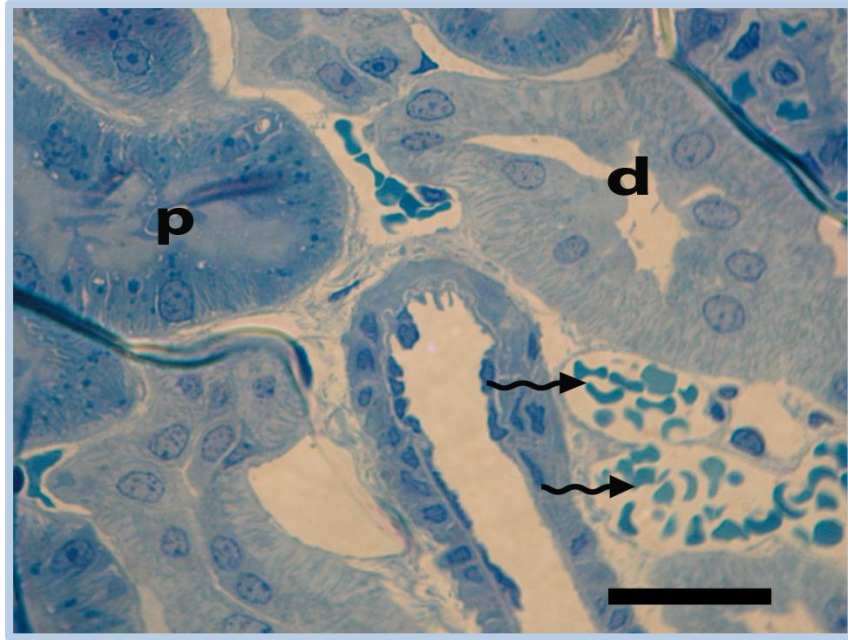


Şekil 4.2.5.1.1 Kontrol grubuna ait yarı ince kesit. Glomerül ve Bowman kapsülü pariyetal yaprağı (şimşek), proksimal tübülüsler (p) ve distal tübülüsler (d). Boya: Toluidin mavisi/Azur II, Bar: 5 μ m



Şekil 4.2.5.1.2 Kontrol grubu yarı ince kesiti. Glomerül içi mezangiyum hücreleri (siyah ok), podositler (kırmızı ok), kapillere ait endotel hücreleri (yeşil ok) ve eritrositler (ondüle ok). Boya: Toluidin Mavisi/Azur II, Bar: 2,5 μ m

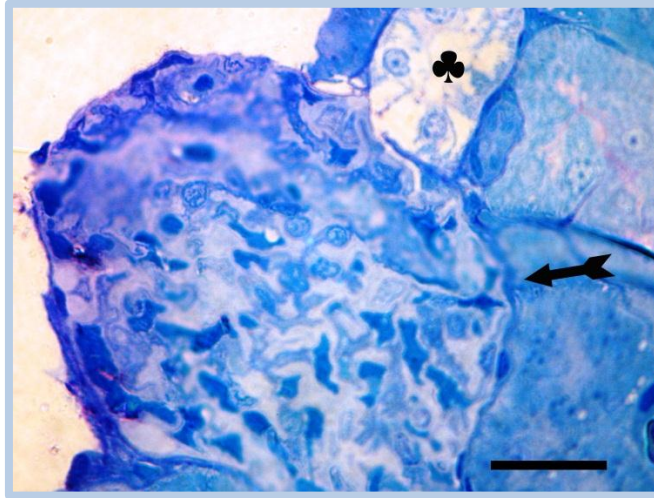
Toluidin mavisi-Azur II ile boyanan kontrol grubuna ait dokuların yarı ince kesitlerinde mikroskopik olarak proksimal ve distal tübülüsler de incelendi. Yarı ince kesitlerde de boyanma özellikleri nedeniyle bu iki farklı tip tübülüs kolayca ayırıldılar. Proksimal tübülüs hücreleri bazal katlanmaları sebebiyle daha bazofilik boyanırken distal tübülüslerde böyle boyanma daha zayıftı. Proksimal tübülüs hücrelerinin çekirdekleri orta duruşlu ve boyanma özelliği daha bazofilik iken distal tübülüs çekirdekleri apikale yakın bir yerleşimde ve daha soluk boyanmış olarak izlendi (Şekil 4.2.5.1.3).



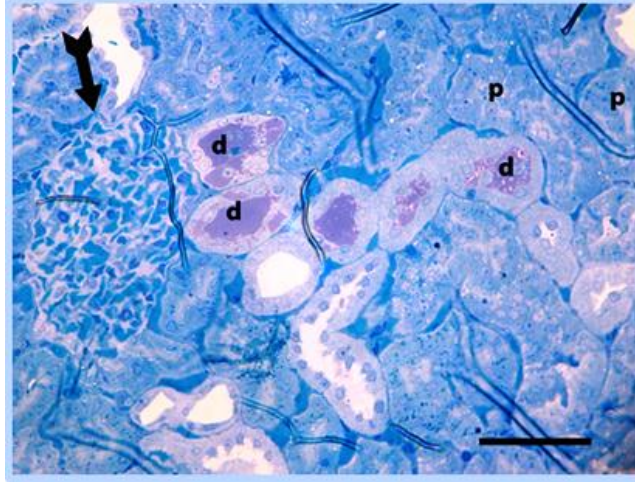
Şekil 4.2.5.1.3 Kontrol grubuna ait tübülüs yapılarının yarı ince kesiti. Proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), eritrosit dolu kapiller lümeni (ondüle ok). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 2,5 μ m

4.2.5.2 DM Grubu Yarı ince Kesit Bulguları

DM grubuna ait yarı ince kesitler incelendiğinde glomerüllerin hipertrofiye uğrayarak Bowman aralığını tamamen doldurduğu izlendi. Glomerül yapısında yer alan glomerül içi mezangiyum hücrelerinin sayıca ve boyut olarak arttıkları görüldü. Glomerül içerisinde diğer hücrelerin artışına bağlı olarak kapillerlerin yer yer oblitere olduğu ve eritrositlerin glomerül içerisinde göllendiği gözlemlendi. Proksimal ve distal tübülüs hücrelerindeki boyanmanın kontrol grubundaki kadar düzgün olmadığı görüldü (Şekil 4.2.5.2.1 ve şekil 4.2.5.2.2). Şeffaf tübülüs hücrelerine yarı ince kesitlerde bir yerde rastlandı, bu kesitlerde de diğer boyamalarda olduğu gibi boya almadıkları ve dejeneratif bir görünüm sergiledikleri görüldü (Şekil 4.2.5.2.1). İntersitisyum dokusunda artmış bağ dokusu, fibrozis ve kapiller içerisinde eritrosit stazı izlendi (Şekil 4.2.5.2.2).



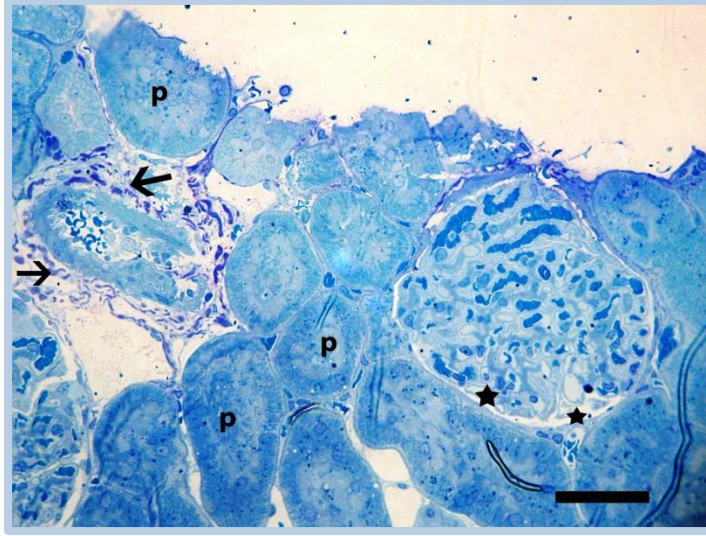
Şekil 4.2.5.2.1 DM grubuna ait yarı ince kesit. Proksimal tübülüsler ve distal tübülüslerde düzgün boyanma kaybolmuş, dejeneratif tübülüs (sinek). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 2,5 μ m



Şekil 4.2.5.2.2 DM grubunda düzgün morfolojik yapısını yitirmiş böbrek cisimciği (kalın kuyruklu ok), proksimal tübülüsler (p), distal tübülüsler (d). Distal tübülüslerin lümenlerinde yer yer boya kalıntılarının olduğu görüldü. Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 5 µm

4.2.5.3 DM+T Grubu Yarı ince Kesit Bulguları

DM+T grubuna ait yarı ince kesitler incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla daha fazla dejenere olduğu ancak DM grubuna kıyasla normale yakın bir görünüm sergilediği görüldü. Glomerül yapısı hipertrofiye olmuştu ancak Bowman kapsülünün dış yaprağına temas ederek idrar aralığını tamamen kapatacak düzeyde değildi. Glomerüllerin içerisinde artmış mezangiyum matriks alanı izlendi. Glomerül içi hücre sayıları da artmış görünümdeydi ve kapillerlerde yoğun miktarda eritrosit göze çarpıyordu. Bowman kapsülünün çevresi ve interstiyum alanlarının kalınlaştığı belirlendi. Proksimal tübülüslerde bazal sitoplazmadaki koyu boyanma bu grupta da belirgindi (Şekil 4.2.5.3.1).



Şekil 4.2.5.3.1 DM+T grubuna ait yarı ince kesitte böbrek cisimciği, proksimal tübülüs yapıları (p) ve interstisyuma ait elemanlar izlenmekte. İnterstisyumda yer alan damar yapısının çevresindeki bağ dokusunda artış ve fibrozis (ok), Bowman aralığı (yıldız). Boya: Toluidin mavisi/AzurII, Bar: 5 μ m

4.2.6 Işık Mikroskobunda Yapılan Ölçümler ve Değerlendirmeleri

Işık mikroskobu incelemelerinde DM ve DM+T gruplarında glomerüllerin çapı ve Bowman kapsülü çapı artmış şekilde görüldü. Bu artışın anlamlılığını değerlendirmek için oküler mikrometre yardımıyla yapılan ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi (Tablo 4.2.6.1).

Tablo 4.2.6.1 Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Glomerül Çapı ve Böbrek Cisimciği Çaplarının Değerlendirilmesi

	Glomerül Çapı		Böbrek Cisimciği Çapı	
	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std
Kontrol Grubu	90 (81-123)	93,14±13,77	102 (93-132)	105±12,42
DM Grubu	102 (92,5-120)	103,85±9,16	104,5 (96-127)	107,21±10,2
DM+T Grubu	105,5 (97-117,5)	107±7,9	105,5 (97-117,5)	107±7,92

Bu ölçümlerin değerlendirilmesi sonucunda glomerül çapının artışı kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında anlamlı bulundu (Kontrol Grubu-DM Grubu için $p=0,016$, Kontrol Grubu ve DM+T Grubu için $p=0,039$). DM Grubu ve DM+T grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında $p> 0,05$ olduğundan fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Böbrek cisimciği çapındaki artışın karşılaştırılmasında ise her üç grup arasında da anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

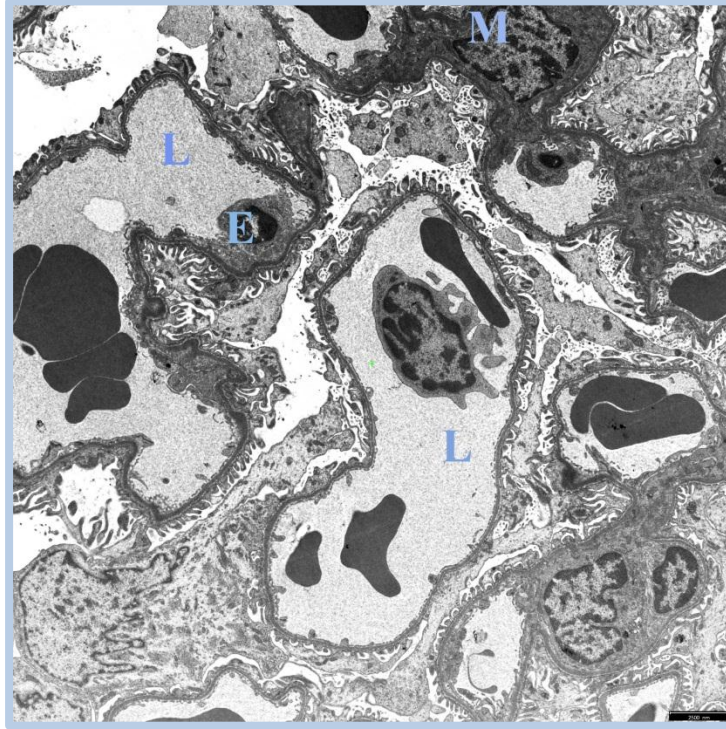
4.3 Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Elde Edilen Bulgular

4.3.1 Kontrol Grubuna Ait TEM Bulguları

Kontrol grubuna ait böbrek dokularında yapılan ince yapı değerlendirmesinde glomerüller, Bowman kapsülünün dış yaprağı, kılcıl damar yapıları ve tübülüs hücreleri değerlendirildi.

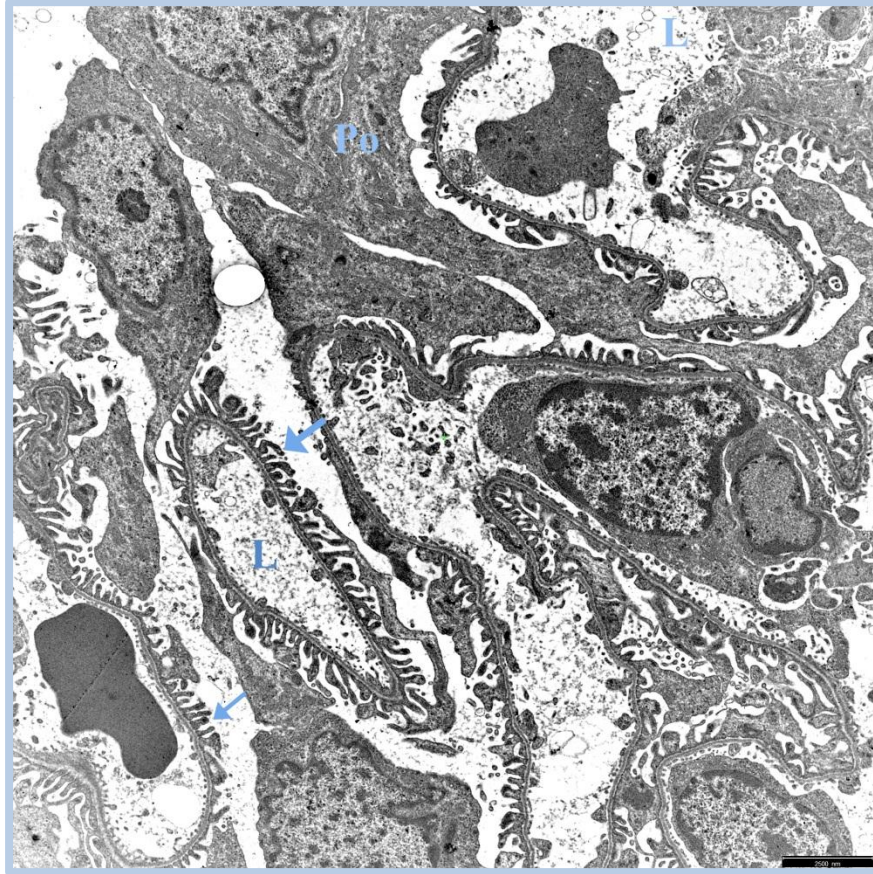
Glomerüller incelendiğinde süzücü zarı meydana getiren Bowman kapsülünün iç yaprağını oluşturan podositler, bu podositlerin ayakları çıkıntıları ve bunların oturduğu

bazal lamina, kılcal damar endotel hücreleri ve bu damarlara ait pencere (*fenestra*) yapılarının normal morfolojide oldukları görüldü. Podosit hücresinin çekirdeği mezangiyum hücre çekirdeğine göre daha soluk ve daha fazla girintili çıkıntılı olarak ayırt edildi. Podositlerden uzanan ayakçıklar kapilleri saran bazal lamina üzerine düzgün bir şekilde ve eşit aralıklarla oturuyordu. Glomerüllerin kılcal damar komşuluklarında yer alan mezangiyum hücreleri de büyük ve oval/yuvarlak çekirdekleri ile izlenmekteydi. Kesit alanındaki kapillerlerin yapısı düzgündü, lümenleri normal genişlikteydi ve bazı yerlerde kana ait şekilli elemanlar gözlemlendi (Şekil 4.3.1.1).



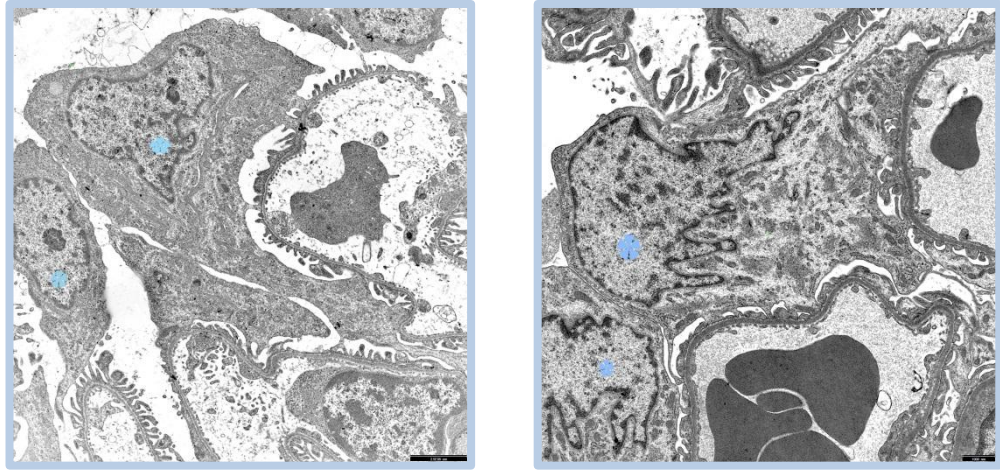
Şekil 4.3.1.1 Kontrol grubuna ait glomerül kesitinin ince yapısı. İki kılcal damar lümeni arasında mezangiyum hücresi (M), kapiller damarlara ait lümenler (L) normal görünümde, iki farklı lümeni döşeyen endotel hücresi (E) izlenmekte, Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x2784, Bar: 2500nm

Bir podosit birden fazla kılcal damar bazal laminası üzerine ayaklı çıkıntılarını gönderebilmektedir. Kontrol grubunda yaptığımız incelemelerde bunun çok güzel örnekleri izlendi. Bowman aralığının visseral yaprağını oluşturan hücreler olan podositler çevrelerindeki kapillerleri ayakçık (*pedisel*) denilen sitoplazmik uzantıları ile düzgün sıralı olarak ve belirli aralıklarla sarmaktaydılar. Podositler ve kapillerlerin bazal laminalarının kaynaşması ile oluşan glomerül bazal membranının, kesit alanlarının her yerinde düzgün bir hat çizdiği, bütünlüğünü ve kalınlığını koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.1.2).



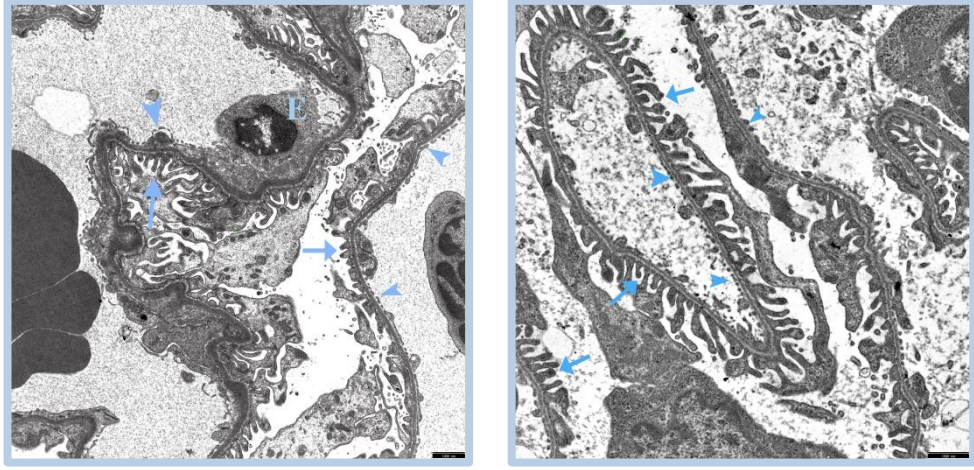
Şekil 4.3.1.2 Kontrol grubuna ait bir görünüm. Podosit hücreleri (Po), podosit ayakçıkları (ok), kapiller lümeni (L). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm

Kontrol grubuna ait tüm kesitlerde podositler normal görünümdeydi. Açık renk görünümlü, iri, girintili çıkıntılı çekirdekleri ve organelden zengin sitoplazmaları ile dikkati çektiler. Kılcal damarların çevresi tam olarak podositlerin ayakçıkları tarafından sarılmıştı. Kılcal damarın iç yüzünde de endotel hücresinin sitoplazmasının belirli aralıklarla kesintiye uğrayarak madde geçişini kolaylaştırdığı pencere yapıları yer almaktaydı. Kontrol grubuna ait kesitlerde süzücü bariyer yapıları normal görünümde izlendiler (Şekil 4.3.1.3 A- B).



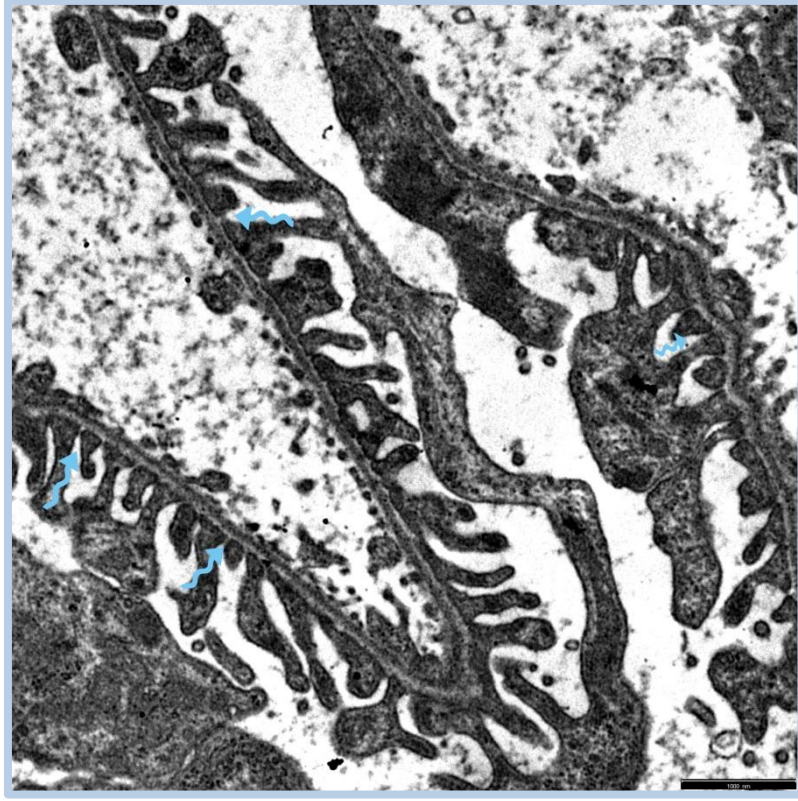
Şekil 4.3.1.3 A-B Kontrol grubunda podositler. Girintili çıkıntılı podosit çekirdeği (çiçek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, A: x4646, Bar: 2500nm; B: x7750, Bar: 1000nm.

Kontrol grubu ince kesitlerimizde süzücü bariyerin diğer bir bileşeni olan endotel hücrelerinin yapısı normal olarak gözlemlendi. Kılcal damar lümeninde endotel tarafındaki pencere yapılarının düzgün oluşu da kontrol grubunun özelliklerinden biriydi (Şekil 4.3.1.4 A-B).



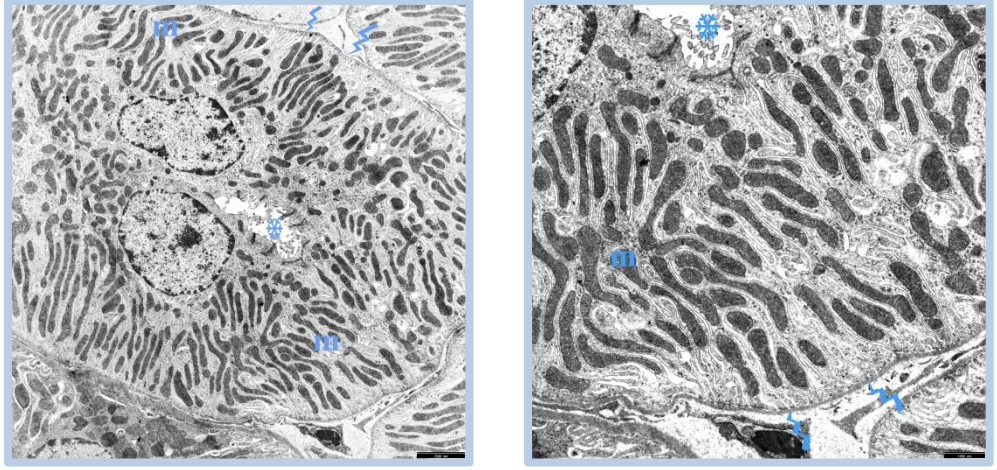
Şekil 4.3.1.4 A-B: Kontrol grubuna ait lümen görünümleri. Endotel hücresi (E), podositlerin ayaklı çıkıntıları (ok), düzgün fenestralar (ok başı). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, A:x6000, Bar: 1000nm, B: x7750, Bar: 1000nm.

GBM' ye daha yakından baktığımızda ayakçıkların düzgün bir şekilde ve aralarında eşit boşluklar bırakacak mesafede sıralandıkları gözlemlendi. Kontrol grubunda bu yarıklanmalar arasında nefrin proteinlerinin oluşturduğu diyaframlar da ince birer hat şeklinde izlendiler (Şekil 4.3.1.5).



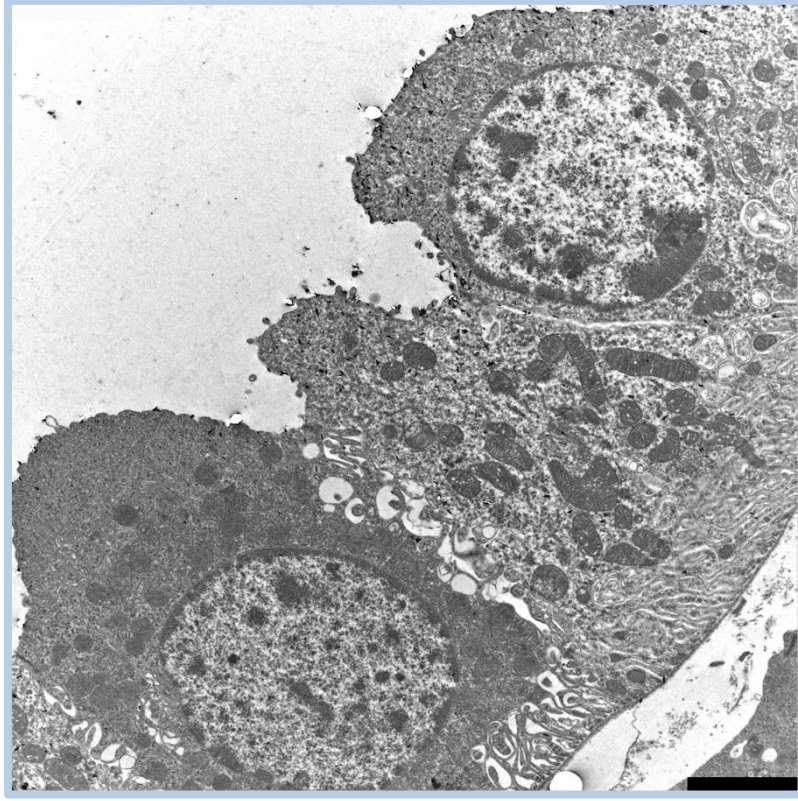
Şekil 4.3.1.5 Kontrol grubuna ait GBM ve podositlerin ilişkisi. Ayakçıklar arasında yarıklanma zarları (kıvrımlı ok), normal pencere yapılanması (ok başı). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x12930, Bar: 1000nm.

Kontrol grubuna ait tübülüs kesitlerinde proksimal tübülüslerde bazal yüzde yüzey katlanmaları gözlemlendi. Bu yüzey katlanmalarının arasına mitokondriyonlar hücre uzun eksenine paralel olacak şekilde yerleşmişlerdi. Tübülüs hücrelerinin çekirdekleri yuvarlak şekilli ve ökromatin özellikteydi. Proksimal tübülüslerde görülen bazal yüz katlantıları, bu kıvrımların arasına girmiş mitokondriyonlar, çekirdek yapısı ve apikal yüzde emilim alanını arttırıcı oluşumlar olan mikrovilluslar diğer tübülüs hücrelerinden ve toplama borularından kolaylıkla ayırt edilmelerini sağladı (Şekil 4.3.1.6A-B).



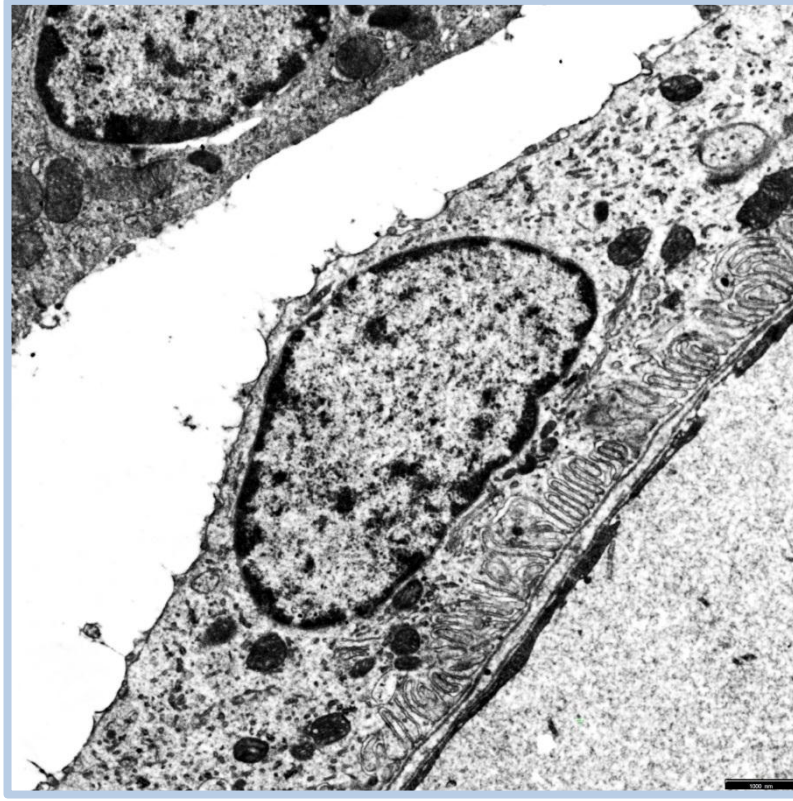
Şekil 4.3.1.6 A-B Kontrol grubuna ait proksimal tübülüs ince kesitleri. Yoğun mitokondriyonlar (m), bazal yüz katlanmaları (şimşek) ve apikal yüzde mikrovilluslar (kar tanesi). A: Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm. B: Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm.

Kontrol grubu kesitlerinde distal tübülüs hücreleri de incelendi. Distal tübülüs hücrelerinin mitokondriyonları proksimal tübülüslerdeki kadar spesifik bir yerleşim göstermemektedir ve sayıları da onlara oranla daha azdır. Kunt, kısa ve az sayıda mikrovillus yapıları yer yer izlendi. Bazal yüz katlantılarına distal tübülüs hücreleri de sahipti. Çekirdekleri iri, yuvarlak, ökromatin özellikte ve genel olarak apikal kısma yakın duruşluydu (Şekil 4.3.1.7).



Şekil 4.3.1.7 Kontrol grubuna ait distal tübülüs kesiti. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm

Toplama borularına ait görünüm ise proksimal ve distal tübülüs hücrelerinden oldukça farklıydı. Bu grup hücreler daha az miktarda sitoplazma içerikleri, girintili-çıkıntılı oval ve orta duruşlu, ökromatin özellikte çekirdekleri, mitokondriyonları ve diğer hücre içi organelleri daha az sayıda içermeleri ve uzun şekilli lümenlerinin her iki yanına düzgün bir şekilde sıralanmaları ile ayırt edildiler (Şekil 4.3.1.8).

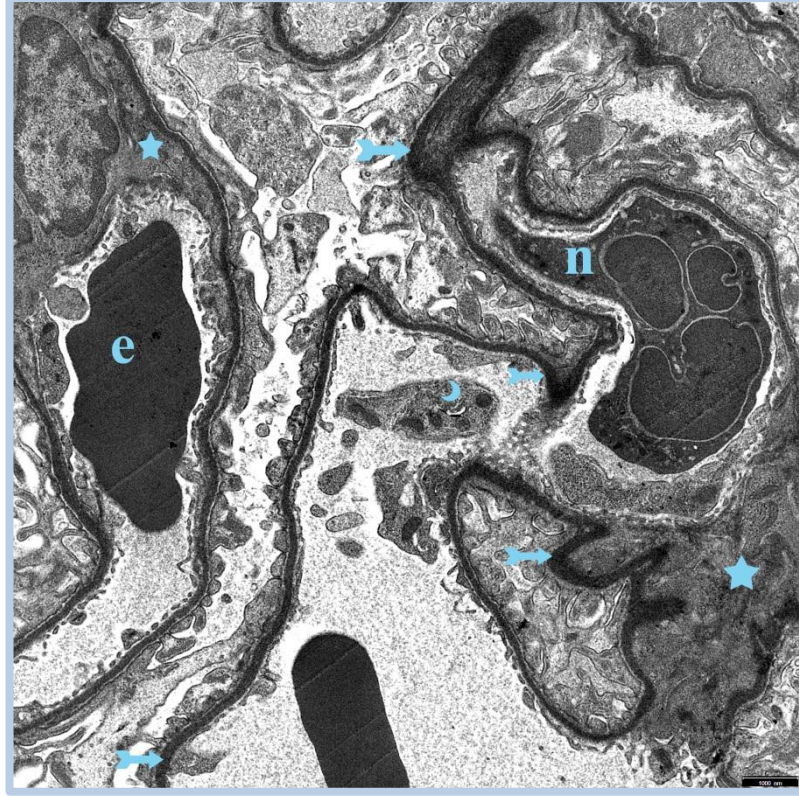


Şekil 4.3.1.8: Kontrol grubu ince kesitinde toplama borusu görünümü. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm.

4.3.2 DM Grubuna Ait TEM Bulguları

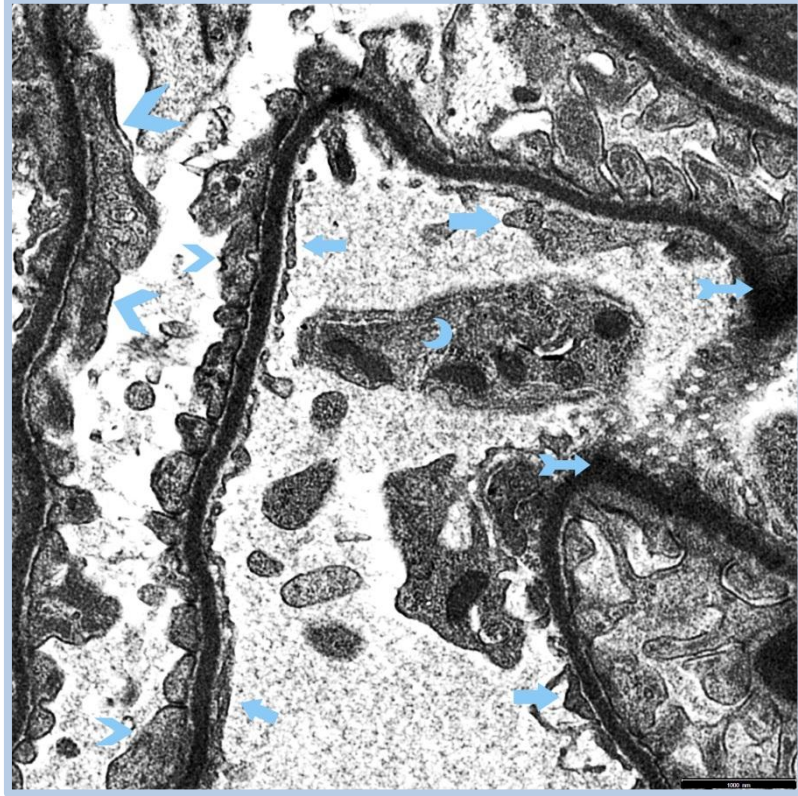
STZ indüksiyonu ile DM geliştirilen deney grubuna ait ince kesitlerin TEM ile incelenmesi sonucunda belirgin morfolojik değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda GBM’ de düzgün şekilde ve eşit aralıklarla izlenen ayaklı çıkıntıların DM grubunda bozulmuş olduğu gözlemlendi. GBM üzerine oturan ayaklı çıkıntılarda genişleme ve birleşmeler vardı. Süzücü bariyerinin diğer bir bileşeni olan kılcal damar pencere aralıklarının da yer yer normal görünümünü yitirdikleri izlendi. GBM kalınlığı diffüz olarak artmıştı ancak bazı bölgelerde normale göre çok ince bir yapı sergilemekteydi. Böylece süzücü bariyerin her üç bileşeninde de yapısal değişiklik meydana geldiği görüldü. Bu bariyer bozulmasının yanısıra lümen içerisinde kanın şekilli elemanları olan eritrositler çok fazla sayıdaydı ve yer yer

lümeni tamamen doldurmaktaydılar. Yine lümende inflamatuvar hücrelerden olan n trofile rastlandı. Kanın pıhtılaşmasında rol alan kan plateletleri de bazı alanlarda izlendi ( ekil 4.3.2.1).

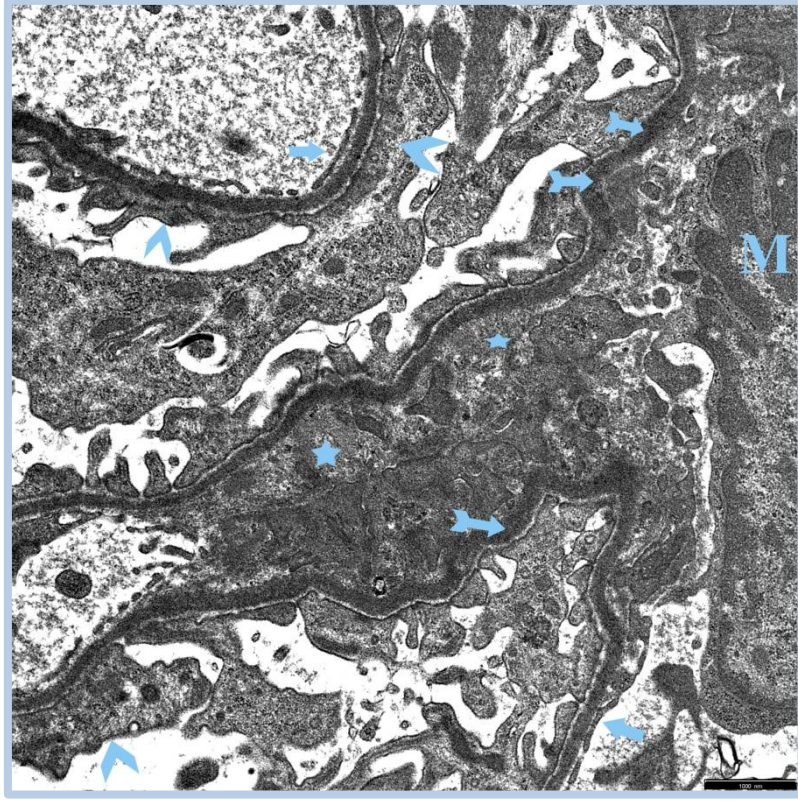


Şekil 4.3.2.1 DM grubuna ait glomerül ince kesiti. GBM’ de kalınlaşma (kuyruklu ok), mezangiyum hücre matriksinde artış (yıldız), kılcal damar lümeninde eritrositler (e), nötrofil (n) ve platelet (hilal). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm.

Ayaksı çıkıntıların yer yer genişleyerek birbirleriyle birleşmeleri sebebiyle aralarındaki nefrin proteinlerinin meydana getirdiği yarıklanma zarlarının kaybolduğu izlendi. Podositlerdeki bu değişimin yanısıra GBM’ nin yer yer ince yer yer de kalın olarak seyretmesi ultrafiltratı s zen bariyerin tümüyle bozulmaya uğradığını göstermekteydi ( ekil 4.3.2.2 ve  ekil 4.3.2.3).

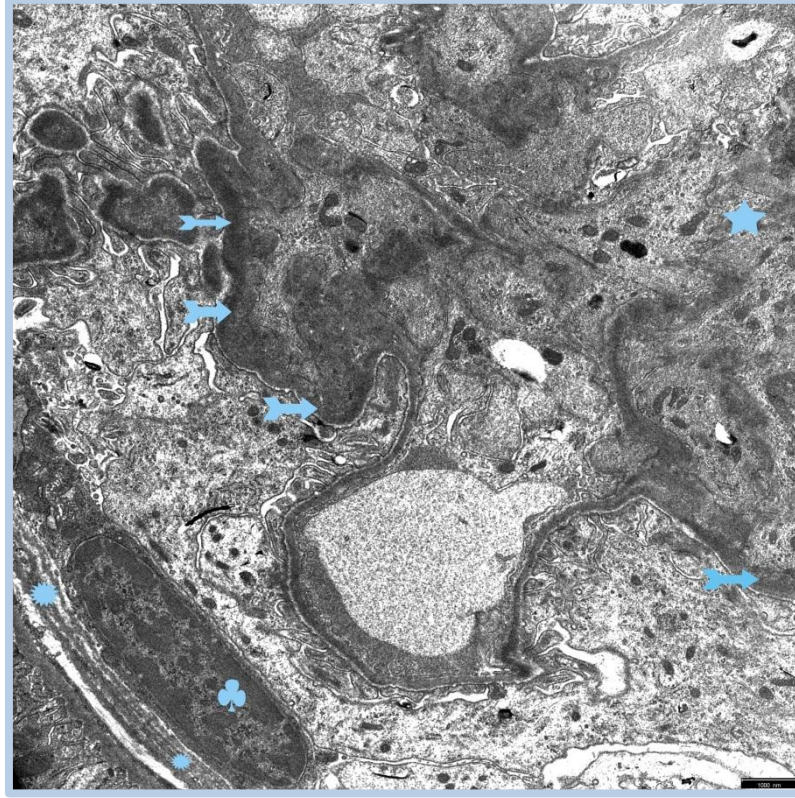


Şekil 4.3.2.2 DM grubu böbrek süzücü bariyeri. Düzensiz görünümlü ayakçıklar (kuyuksuz ok), normal yapısını yitirmiş fenestralar (kalın ok), kalınlaşmış GBM (kuyruklu ok), kılcal damar lümeninde platelet (hilal). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x12930, Bar: 1000nm.



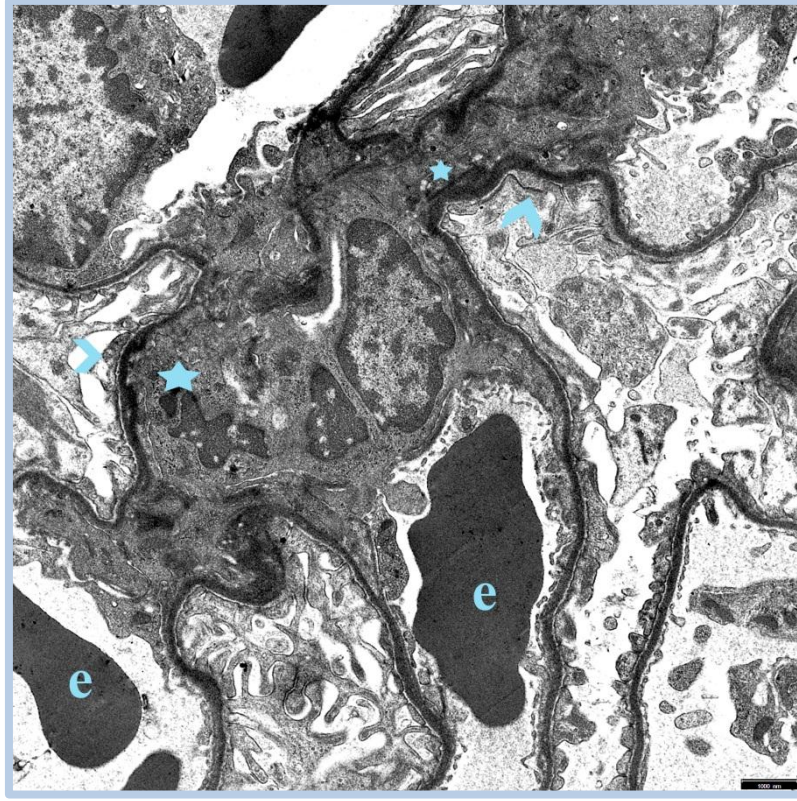
Şekil 4.3.2.3 DM grubunda düzensiz podosit ayakçıkları (kuyruksuz ok). Pencere aralıklarında düzensizleşme (kalın ok), GBM’ da kalınlaşma (kuyruklu ok), mezangiyum hücresi çekirdeği (M) ve mezangiyum hücresi matriksinde artış (yıldız). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm.

DM grubuna ait ışık mikroskobu incelemelerinde çoğu glomerülün hipertrofiye uğrayarak Bowman boşluğunu tamamen kapattığını gözlemlemiştik. Bu değişikliği TEM incelemelerinde de izledik. Hipertrofiye uğrayan glomerül yapısına uyacak şekilde glomerül ince kesitlerinde hücre kalabalığı gözlenmekte idi. Pariyetal epitel hücresi ve Bowman kapsülünü izlediğimiz bir alanda glomerül hücrelerinden podositlerin hipertrofiye uğradığını ve hücre içi organellerin yoğunluğunda artış olduğunu, ayaksız çıkıntılarının genişlediğini, mezangiyum matriksinin de arttığını ve glomerül içi bu yapıların neredeyse kapsüle temas edecek şekilde yerleştiklerini gördük (Şekil 4.3.2.4).



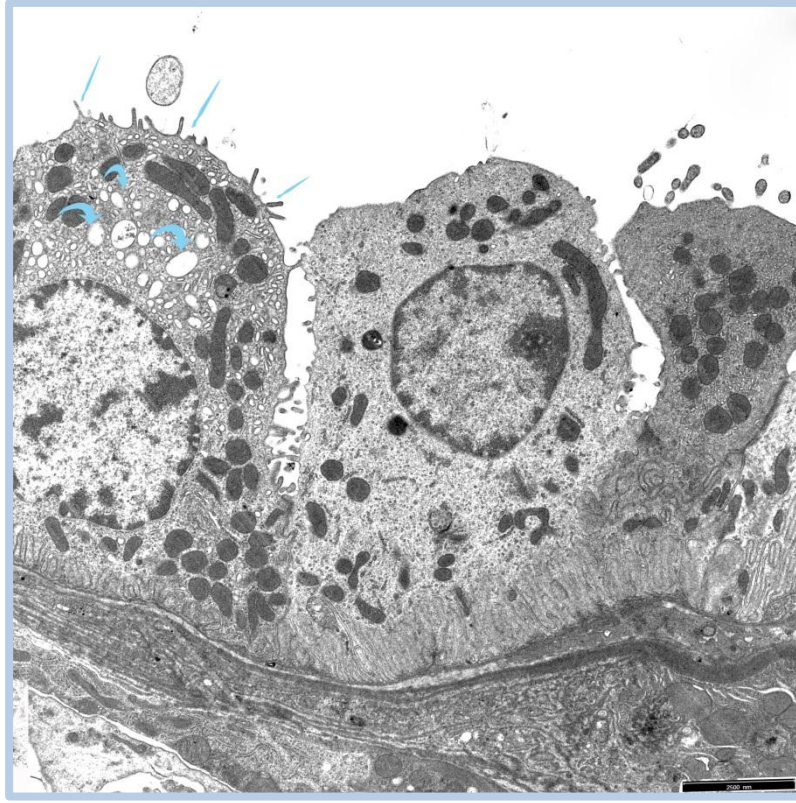
Şekil 4.3.2.4 DM grubuna ait bir kesitteki glomerülün Bowman kapsülünü de içeren alanı. Bowman kapsülü pariyetal epitelinin yassı hücre çekirdeği (sinek), kalınlaşmış ve lamellar yapıda Bowman epiteli bazal membranı (güneş), kalınlaşmış GBM (kuyruklu ok) ve sol alt köşede tüp komşuluğu izlenmekte. Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm.

DM grubunda mezangiyum hücrelerinde sayıca ve hacimce artış olduğunu ışık mikroskobu ile yaptığımız yarı ince kesit incelemelerinde görmüştük. Bu alanların ince kesitlerini değerlendirdiğimizde artmış olan matriksi daha belirgin izledik. Hipertrofiye olan mezangiyum hücresi sitoplazmasının zaman zaman kılcak damar lümenini daraltarak, eritrositlerin staza uğramasına sebep olduğu görüldü (Şekil 4.3.2.5).



Şekil 4.3.2.5 DM grubuna ait ince kesit. Mezangiyum hücre matriksi artışı (yıldız), lümende eritrosit (e), düzensiz podosit ayakçıkları (kuyruksuz ok). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x6000, Bar: 1000nm.

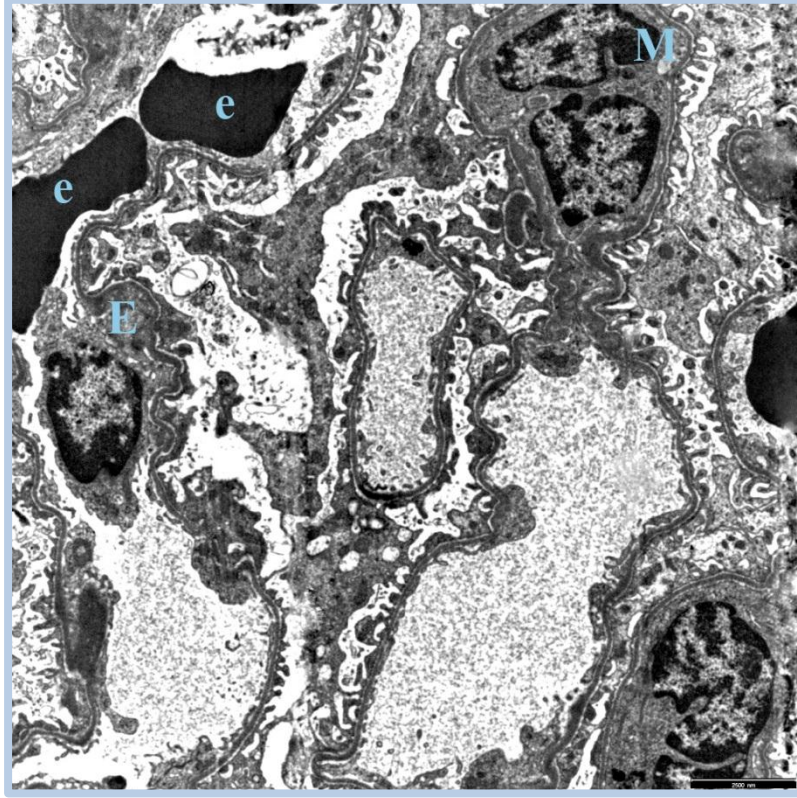
DM grubu distal tübülüs hücreleri de kesitlerde incelendi. Kontrol grubundakilere benzer şekilde bu gruba ait distal tübülüs hücreleri de yuvarlak ve ökromatin özellikle çekirdekleriyle gözlendi. Bazal katlantılar proksimal tübülüslere oranla daha kısa gözlenirken sitoplazmada mitokondriyonlar her alana dağılmış halde bulunuyordu. Apikal yüzey farklanması olan mikrovilluslar çok az sayıda ve kısa olarak izlendi. Bazı distal tübülüs hücrelerinde apikale yakın alanda veziküller görüldü (Şekil 4.3.2.6).



Şekil 4.3.2.6 DM grubuna ait distal tübülüs görünümü. Apikal yüzde kısa mikrovilluslar (ince fırça) ve vakuoller (kivrık ok). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm.

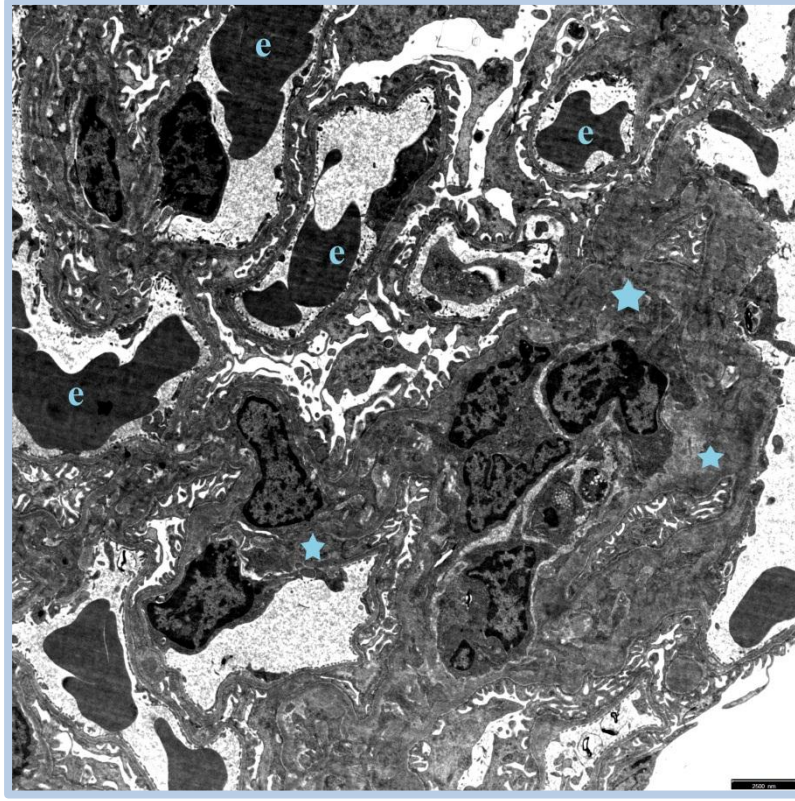
4.3.3 DM+T Grubu TEM Bulguları

DM+T grubu kesitleri ile yapılan elektron mikroskobu değerlendirmesinde GBM diffüz olarak kalınlaşmış şekilde izlendi. Podositlerin sitoplazmasındaki artıştan dolayı Bowman aralığı daralmış olarak görüldü. Podosit ayakçıklarının GBM üzerine bazı alanlarda düzgün şekilde otururken bazı alanlarda genişleyerek komşu aralıklar arasındaki yarıklanmaları kapattıkları dikkati çekti. Mezangiyum hücreleri normale göre genişlemiş olarak değerlendirildi. Endotel hücrelerinin düzgün aralıklarla seyreden pencereli yapısı kontrol grubuna yakın görünümdeydi (Şekil 4.3.3.1).

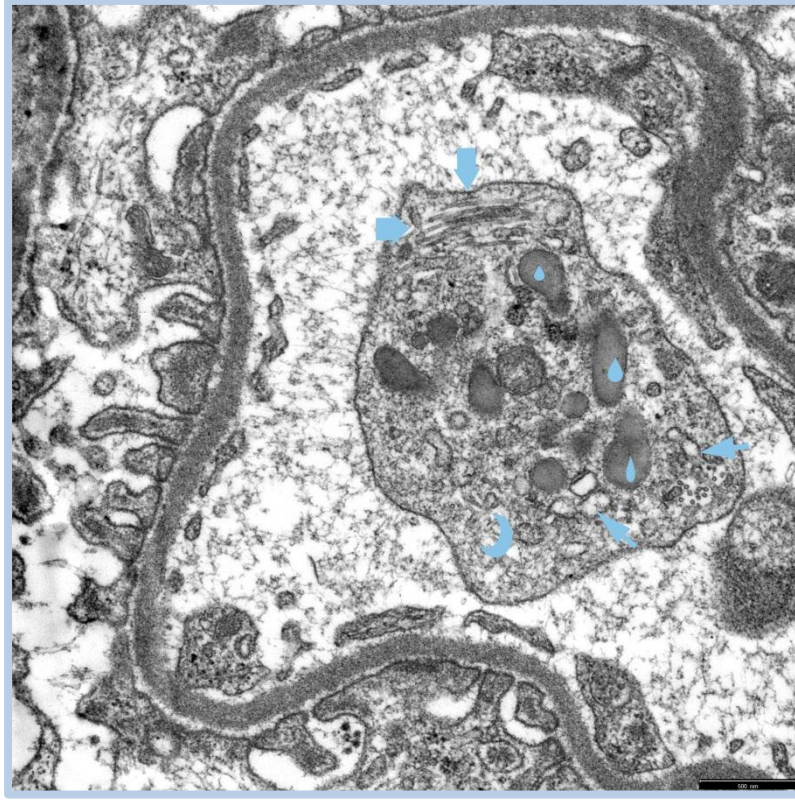


Şekil 4.3.3.1 DM+T grubuna ait ince kesit. Endotel hücresi (E), mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeninde eritrositler (e). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm.

Artan mezangiyum matriksinin kapiller lümen alanını DM grubunda olduğu gibi daralttığı izlendi. Çalışmamızda DM geliştirilen her iki gruba ait daralan kapiller lümenlerinde eritrosit stazı belirgin şekilde gözlemlendi (Şekil 4.3.3.2). DM grubunda olduğu gibi DM+T grubunda da lümen içerisinde plateletler de görüldü (Şekil 4.3.3.3).

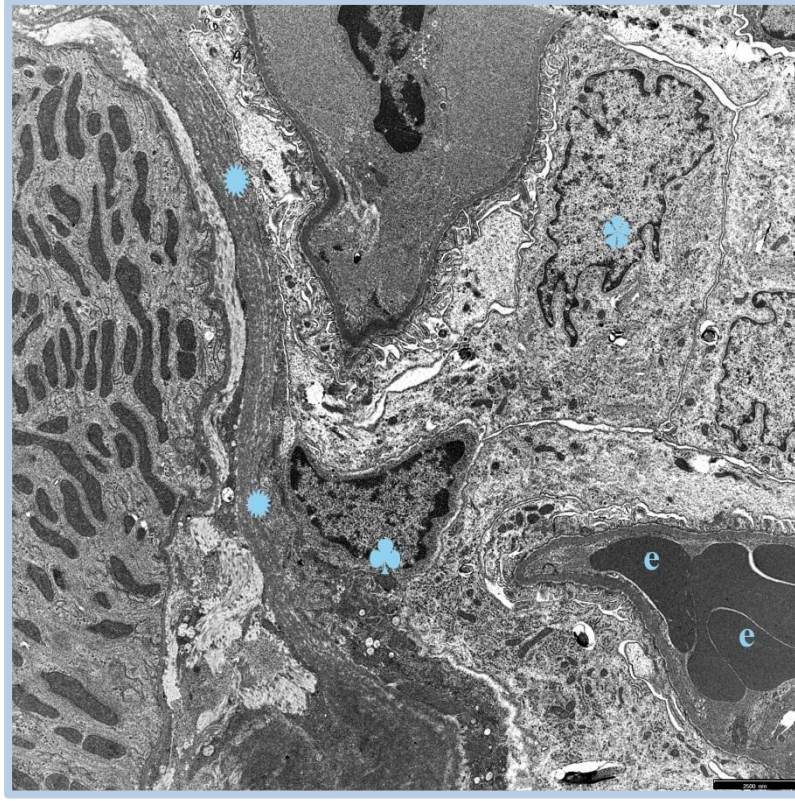


Şekil 4.3.3.2 İnce kesitte mezangiyum hücrelerinde ve matriksinde artış (yıldız), daralmış kapiller lümenlerinde eritrositler (e). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x2784, Bar: 2500nm.



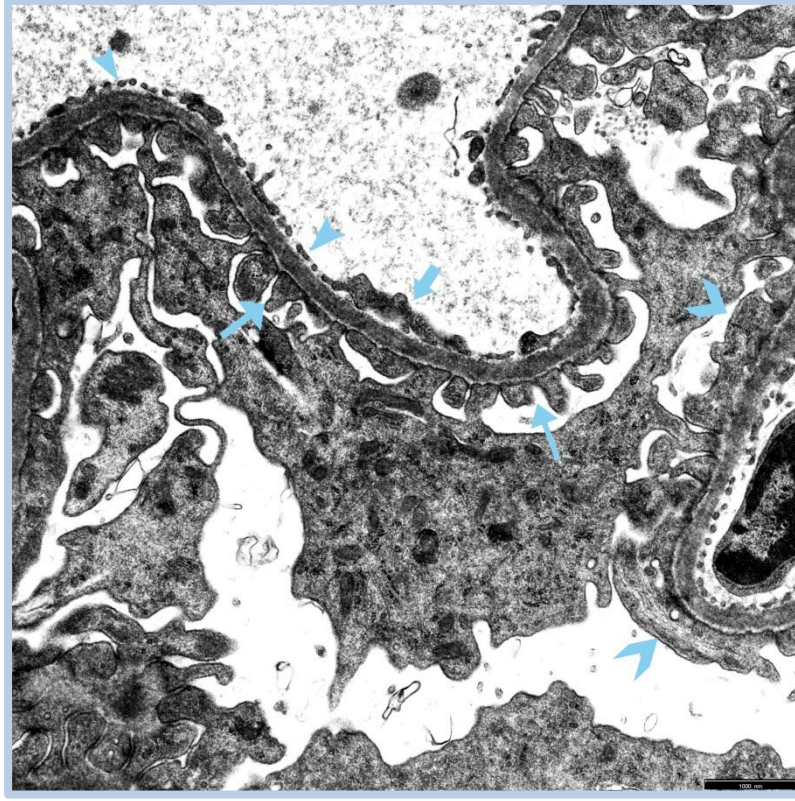
Şekil 4.3.3.3 DM+T grubuna ait glomerül alanında kılcal damar lümeninde platellet (hilal), marjinal mikrotübül demeti (kalın ok), açık kanaliküler sistem (ince ok) ve sitoplazmada mitokondriyonların haricinde granuller (damla) x21560, Bar: 500 nm

DM+T grubuna ait ışık mikroskobu incelemelerinde Bowman aralığının kontrol grubuna göre daha dar olduğunu ancak DM grubuna göre daha geniş olduğunu gözlemlemiştik. İnce kesitlerimizde de bu bulguya rastladık. Bazı glomerüllerde genişleyen podosit sitoplazması nedeniyle DM grubundakine benzer şekilde, GBM ile pariyetal yaprak arası neredeyse tamamen kapanmış olarak görüldü. Bowman kapsülünün bazal laminası da kalınlaşmış olarak izlendi (Şekil 4.3.3.4).



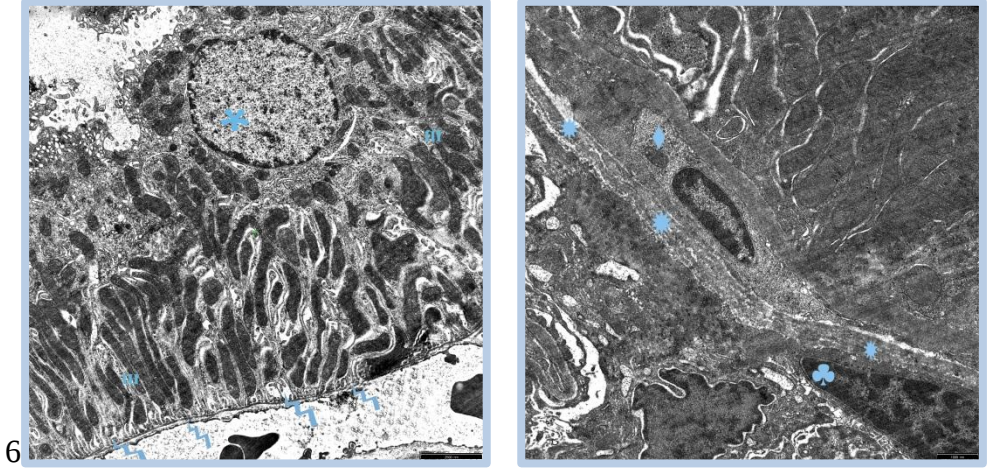
Şekil 4.3.3.4 Glomerül ve tübülüs komşuluğu izlenmekte. Podosit hücre çekirdeği (çiçek), kapiller içi eritrosit stazı (e), Bowman kapsülü dış yaprağı hücresi (sinek), Bowman kapsülü bazal membranı (güneş). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x3597, Bar: 2500nm.

Bu gruba ait kesitlerde podositlerin ayaklı çıkıntılarının GBM üzerine genellikle düzgün şekilde ve eşit aralıklarla yerleştiği gözlemlendi ancak DM grubunda da görülen ayaklı çıkıntılardaki genişleme ve birleşme yer yer bu grupta da izlendi (Şekil 4.3.3.5).

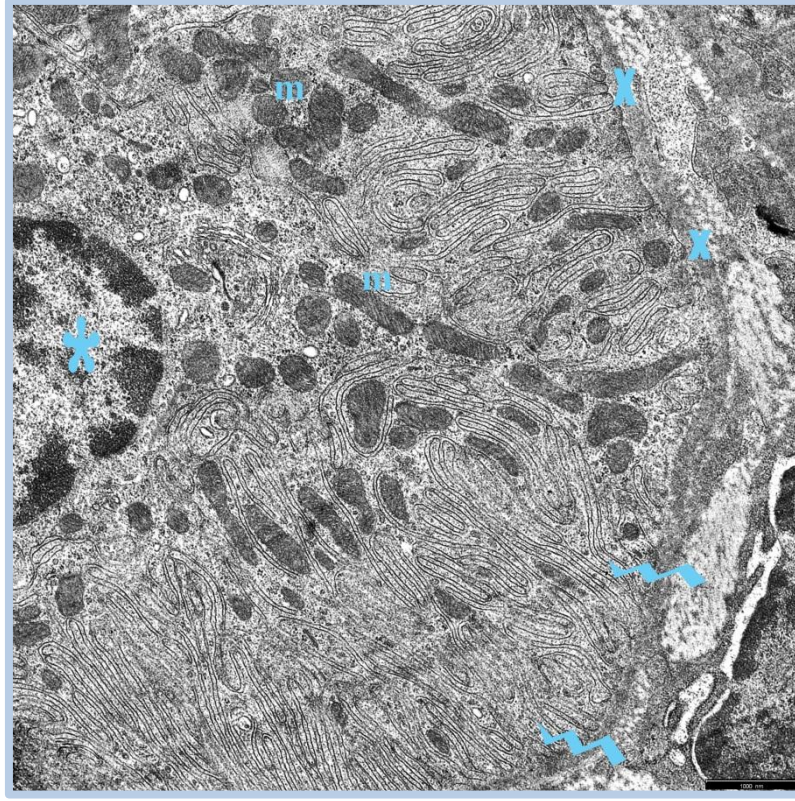


Şekil 4.3.3.5 DM+T grubunda ayaklı çıkıntılarının GBM üzerindeki yerleşimi. Düzgün ayakçıklar (ok), düzensiz ayakçıklar (kuyruksuz ok), düzgün fenestra yapıları (ok başı), fenestralarda yer yer düzleşme (kalın ok) Boya: Uranilasetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm.

Timolol uygulanan gruba ait kesitlerde tübülüs hücreleri de incelendi. Proksimal tübülüse ait kesitlerde epitel hücrelerinin diğer gruplardakilerle benzer özellikler taşıdıkları görüldü. Apikale yakın yuvarlak çekirdekleri ve mikrovilluslarıyla diğer tübülüs hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebildiler (Şekil 4.3.3.6-A). Bazal yüz katlantıları ve bunların içerisinde hücre uzun eksenine paralel yerleşen mitokondriyonları belirgindi (Şekil 4.3.3.6-B). Distal tübülüs hücrelerinde de bazal yüz girintili çıkıntılı bir morfoloji sergilemekle birlikte mitokondriyonlarının daha az sayıda olduğu ve bu girintilere fazla girmedikleri gözlemlendi (Şekil 4.3.3.7).



Şekil 4.3.3.6 A-B : A: DM+T grubunda proksimal tübülüs görünümü. Mitokondriyonlar (m), çekirdek (asteriks) ve bazal katlantılar (şimşek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x4646, Bar: 2500nm. B: Glomerül- proksimal tübülüs komşuluğu, Bowman kapsülü pariyetal epitel hücresi (sinek), tübülüs bazalinde miyoid hücre (karo), Bowman kapsülü bazal laminası (güneş). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x7750, Bar: 1000nm.



Şekil 4.3.3.7 DM+T grubunda distal tübülüs kesiti. Çekirdek (asteriks), mitokondriya (m) ve bazal lamina (x), bazal yüz katlantıları (şimşek). Boya: Uranil asetat-kurşun sitrat, x10000, Bar: 1000nm.

4.3.4. TEM ile Glomerül Bazal Membran Kalınlığı Ölçüm Sonuçları

Süzücü bariyerin böbrek fonksiyonlarındaki önemi bilindiğinden bu bölge özellikle incelenerek GBM kalınlığı ölçümleri yapıldı. Her üç gruptaki hayvanlara ait x12930 büyütmede yapılan ölçümlerin (Tablo 4.3.4.1) aritmetik ortalamalarının alınmasının ardından sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.3.4.2).

Tablo 4.3.4.1 Kontrol ve Deney Gruplarındaki Hayvanlara ait GBM Ölçüm Değerleri

Hayvan no:	Kontrol Grubu (nm)	DM Grubu (nm)	DM+T Grubu (nm)
1	99,09	200	143,7
2	105,06	158,7	182,4
3	133,46	161,46	186,09
4	110,03	158,6	243,07
5	87,16	158,5	159,1
6	125,32	297,7	198,91
7	108,92	142,5	206,82

Tablo 4.3.4.2 Kontrol ve Deney Gruplarına Ait GBM Kalınlığı Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	Kontrol Grubu		DM Grubu		DM+T Grubu	
	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std	Medyan (min-maks)	Ortalama±Std
GBM Kalınlığı	108,9 (87,16-133,46)	109,86±15,5	158,7 (142,5-297,7)	182,4±53,7	186 (143,7-243)	188,5±32,4

Kruskal- Wallis testi sonrası yapılan post-hoc testler ile gruplararası anlamlılık karşılaştırıldı. Buna göre Kontrol ve DM grubu ile Kontrol ve DM+T grubu arasındaki GBM kalınlığı açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırası ile $p= 0,013$ ve $p= 0,001$). DM ve DM+T grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

İnsülin bağımlı DM (Tip 1 DM) olan hastalarının %40' ında proteinüri, glomerül filtrasyon hızında azalma, artmış kan basıncı ile karakterize olan diyabetik nefropati gelişmektedir. Yapılan çalışmalar proteinürisi olan diyabetik hastalarda ölüm oranının proteinürisi olmayanlara göre çok daha fazla olduğunu göstermiştir, bu da diyabetin komplikasyonlarından birisi olan nefropatinin önemini vurgulamaktadır (28). DM, glomerüllerde ve mezangiyum hücrelerinde skleroz oluşturarak hasar yaratır. Böbrek dokusu üzerinde DM' un yaptığı hasarlar, deney hayvanları üzerinde, STZ, alloxan vb. çeşitli diyabet yapıcı ajanlar kullanılarak gösterilmiştir (29, 30). Çalışmamızda 50 mg/kg olmak üzere STZ i.p. yol ile sıçanlara verildi. 1 hafta sonra kan glukoz düzeyleri ölçülerek >300 mg/dl olanlar diyabet kabul edildi.

Diyabette kalbin mekanik aktivitesi kardiyomiyopatiye bağlı olarak azalır, β -bloker kullanımıyla, azalan sol ventrikül içi basınç normale gelir ve yavaşlayan kasılma- gevşeme fonksiyonları düzenlenir. Beta-blokerler ile tedaviden en çok yararlanan hastalar, daha önce miyokard infarktüsü geçirmiş olanlardır. Beta blokerlerin her ne kadar diyabetik hastalarda glukoz toleransı ve lipid profili üzerine olumsuz etkileri ve hipoglisemik semptomları maskeleyici özellikleri olsa da MI geçirmiş olan hipertansif veya kan basıncı normal hastalarda, uzun dönemdeki kardiyovasküler faydaları nedeniyle bir kontrendikasyon yoksa betablokerler ilk tercih edilecek ilaç olmalıdır (31, 32). Metoprolol Controlled Release/Extended Release Randomized Intervention Trial in Chronic Heart Failure (MERIT-HF) çalışmasında hafif-orta kalp yetersizliği (New York Heart Association (NYHA) sınıf II-III) bulunan, diüretik, ACEI ve digoksin kullanan hastalara ek olarak verilen metoprololün morbidite ve mortaliteyi azalttığı saptanmıştır (33). Yapılan bir başka çalışmada seçici olmayan β - blokerler karşılaştırılmış (timolol-propranolol), timololün ventrikül içi basınç yanıtlarında pozitif inotropik etkisi olduğu gösterilmiştir (34). Bizim çalışmamızda da tip 1 DM oluşturduktan sonra 12 hafta boyunca, 5 mg/kg/gün dozunda, gavaj yoluyla timolol uygulayarak sıçan böbrek dokusu üzerine etkilerini ışık mikroskobu ve TEM ile değerlendirdik.

Çam ve ark. (35) ve Aksoy ve ark. (36) 4 ve 6 haftalık deney sonunda diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olduğunu bildirmişlerdir (30). Biz de çalışmamızda deney başlangıcı ve sonunda yaptığımız vücut ağırlığı ölçümlerini değerlendirdiğimizde, ağırlık artışının azlığı bakımından DM oluşturulan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulduk. DM ve DM+T grupları arasındaki fark ise anlamlı değildi. Bu durum, timololün, DM' un katabolizan etkisine durdurucu bir etkisinin olmadığını düşündürdü.

“Diyabetik nefropati” terimi, diyabetik hastaların böbreklerinde sıklıkla görülen lezyonların tümü için kullanılmaktadır (37). DN böbrekte glomerülleri, tübülüsleri, intersitisyum alanı ve kan damarlarını etkilemektedir (38). Biz de bu çalışmada ışık mikroskobu ve TEM' de DN' ye bağlı olarak böbrek cisimcikleri, tübülüsler, intersitisyel alan ve damarlarda meydana gelen değişimleri ve seçici olmayan bir β - bloker olan timolol kullanımının bu değişimler üzerindeki etkilerini inceledik.

Diyabetik nefropatinin erken döneminde; glomerül ve tübülüslerde hipertrofi, tübüler vakuolizasyon, glomerül ve tübülüs bazal membranlarında kalınlaşma, arteriyollerde hiyalinozis, glomerüllerde mezangiyum matriksi ve hücre artışı gibi histopatolojik değişikliklerin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (39-41). GBM' nin yaygın olarak kalınlaşması proteinüriden bağımsız olarak tüm diyabetiklerde gözlenmektedir ve diyabetik mikroanjiyopatinin bileşenlerinden birisidir (37, 42). Biz de çalışmamızda DM oluşturulan her iki grupta da glomerül ve tübülüs bazal membranlarında diffüz kalınlaşma ve arteriyollerde hiyalinozis gözlemledik. Özellikle MT, PAS ve PA-SM boyaları ile bu kalınlaşmalar belirgin olarak gösterildi. TEM ile yapılan incelemelerde de glomerül bazal membranları her deney hayvanı için ölçülerek aritmetik ortalamaları alındı ve gruplar arası farklılık değerlendirildi. GBM kalınlığı DM ve DM+T gruplarında kontrole göre anlamlı artış gösterdi ancak birbirleriyle karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Diyabetik nefropatide yapısal değişiklikler böbreğin bütün bölümlerini kapsamakla birlikte, en karakteristik değişikliklerin glomerüllerde gözlemlendiği saptanmıştır (41). Glomerüllerdeki genişleme mezangiyum hücrelerinin sayıca ve

hacimce artışına, podosit hipertrofisine ve GBM kalınlaşmasına bağlanmaktadır (42). Biz de çalışmamızda ışık mikroskobu incelemelerinde, kontrol grubunda normal genişlikte izlediğimiz Bowman aralığının, DM grubunda glomerül hipertrofisine bağlı olarak daralmış olduğunu gözledik. DM+T grubunda da glomerül bir miktar genişlemiş bulundu ancak kontrol grubundaki kadar geniş olmasa da Bowman aralığı izlenmekteydi. TEM incelemelerinde de DM oluşturulmuş grupların böbrek cisimciklerinde hipertrofiye uğramış glomerül yapıları ve pariyetal epitel hücreleri arasında Bowman aralığının iyice kapandığı gözlemlendi. Oküler mikrometre kullanılarak yapılan glomerül çapı ve böbrek cisimciği çapı ölçümleri sonucunda DM ve DM+T grubu glomerül çaplarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Böbrek cisimciği çapındaki artış ise her üç grup arasında da anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Glomerül çapındaki artışa rağmen böbrek cisimciği çapının artmaması DM oluşturulan gruplarda Bowman kapsülü içerisinde sayıca ve hacimce artan hücrelerin sıkışmasının ve hücre yoğunluğunun artmasının sebebi olduğu düşünüldü.

GBM kalınlaşmasının ardından DN' de TEM' de ortaya çıkan diğer bir bulgu mezangiyum matriksinin artışı ve hücrelerinin şişmesine bağlı olarak ortaya çıkan mezangiyum bölgesindeki genişlemedir (42). Bu genişleme glomerül filtrasyon hızının (GFR) azalmasına yol açan en önemli sebeplerdendir (30) . Mezangiyum genişledikçe çevresindeki kapillerlerin lümenini ve buna bağlı olarak da filtrasyon alanını daraltmaktadır (43). Çalışmamızda dallanan sitoplazmik uzantılarındaki aktin filamanları ile glomerüler yapının desteklenmesini sağlayan mezangiyum hücreleri, kromatinden yoğun çekirdekleri ve az sayıda hücreiçi organel içermeleri ile diğer glomerül içi hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebildiler. DM ve DM+T gruplarında glomerül kılcal damar ağı içerisine yerleşmiş olarak çok sayıda mezangiyum hücrelerine rastlandı. Mezangiyum matriksi içerisine gömülü mezangiyum hücrelerinin artmış kromatin yoğunluğu olan girintili çıkıntılı çekirdekleri vardı. Sitoplazma hücre dışı matrikse benzer elektron-yoğun görünümdeydi, bu nedenle hücre içindeki organeller belirgin şekilde ayırt edilemedi. Bu yoğun matriks artışının çevre kapiller lümenleri üzerine baskı yapması sebebiyle kapiller lümenlerinin daraldığı ve bu daralmanın eritrositlerin bu bölgelerde staz yapmasına sebep olduğu görüldü.

Podositler DN' de meydana gelen proteinürinin patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Podositlerin ayaksı çıkıntılarında oluşan genişlemeler proteinüri ile seyreden hastalıkların karakteristik morfolojik bulgularındandır (44). Çalışmamızda, kontrol grubunda bazal lamina üzerinde düzgün şekilde ve eşit aralıklarla tutunan podosit ayakçıklarının DM grubunda genişleyerek birbirleriyle birleştiği ve bazal lamina üzerinde yayıldığı görüldü. Bu birleşim nedeniyle filtrasyon aralıkları izlenemedi. DM+T grubuna ait kesitlerde podositlerin ayaksı çıkıntılarının genellikle kontrol grubundaki gibi yerleştiği gözlemlendi ancak DM grubunda da görülen genişleme ve birleşmeler yer yer bu grupta da izlendi. Yarıklanma diyaframını oluşturan nefrin ve podosin proteinleri süzücü bariyerin görevini iyi yapmasında çok önemli role sahiptir. Ayaksı çıkıntıların düzgün sıralanım yapılarını korumalarının bu iki proteinin varlığına bağlı olduğu yapılan diğer çalışmalarda gösterilmiştir (45). Çalışmamızda kontrol grubunda bu yarıklandılar arasında nefrin ve podosin proteinlerinin oluşturduğu diyaframlar ince birer hat şeklinde izlendiler ancak DM grubunda ayakçıkların birleşmeleri nedeniyle bu diyafram izlenemedi. DM+T grubunda ise sadece ayakçıkların düzgün yerleşim gösterdiği alanlarda izlendi.

Filtrasyon bariyerini podositlerin ayaksı çıkıntıları, ortak bazal lamina ve diyafram içermeyen pencereci glomerül endoteli oluşturmaktadır (46). Bazı böbrek hastalıklarında olduğu gibi, DN' de bu süzücü bariyerin hasar görmesi nedeniyle bariyerden bol miktarda protein geçişi söz konusudur (47). Çalışmamızda kontrol grubunda düzgün aralıklarla seyreden pencereci yapının DM grubunda daha fazla olmak üzere DM ve DM+T gruplarımızda yer yer kapanma ve düzensizlik göstererek bozulduğunu tespit ettik. Bu DN alanında yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bir bulgu idi.

İnflamatuvar süreç ve immün hücreler DN gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Hem insan böbrek biyopsilerinde hem de hayvan deney modellerinde glomerül ve interstisyum dokusunun monosit-makrofajlar ve aktive olmuş T lenfositlerle infiltre olduğu görülmüştür. Bununla birlikte akut-faz reaktanlarının serum düzeyleri ve kanda nötrofil sayısı da artmış olarak bulunmuştur. DN aynı zamanda böbrek süzücü bariyerinin fonksiyonunu kaybetmesi sebebiyle albüminüri ile seyredebilir, albüminüri hastalarda kanın pıhtılaşmasında rol alan platelet

agregasyonu da daha sık oranda izlenir (48). Biz de çalışmamızda DM grubuna ait ince kesitlerin TEM ile değerlendirilmesi sırasında glomerül içi kapiller lümeninde inflamatuvar kan hücrelerinden olan nötrofil hücrelerini gözlemledik. Ayrıca DM ve DM+T gruplarımızda ince yapı değerlendirmeleri sırasında kapiller lümeni içerisinde plateletlere de rastladık.

Tübülüsler ve interstisyum, DN' de tübüler hücre vakuolizasyonu ve tübülointerstisyel fibrozisi de içeren pek çok yapısal değişiklik gösterebilirler (49). Çalışmamızda DM ve DM+T gruplarında meydana gelen tübülüs bazal membranlarında kalınlaşma, ışık mikroskobu ile özellikle MT, PAS ve PA-SM boyamaları ile gösterildi. Yine ışık mikroskobu incelemelerinde özellikle DM grubunda dilate tübülüsler izlendi. TEM incelemesinde DM grubunda, distal tübülüslerdeki vakuolizasyon artışı dışında kontrol ve diyabet grupları arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Kan glukozu düzeyi 500 mg/dl üzerinde olan ve masif glukozürili hastalarda tübülüs epitel hücrelerinin glikojen depolamasıyla meydana gelen Armani-Ebstein lezyonları bulunabilir (48). Kontrol altına alınamayan glukozürili hastalarda, tübüler epitelde glukozun reabsorbe edilerek glikojen olarak depolandığı bilinmektedir (50). Günümüzde Armani-Ebstein lezyonlarının bir hastalık belirtisi olmaktan çok, tübüler sıvıda yüksek yoğunluktaki glukozun geri emilimi sonucu glikojen birikiminin bir işareti olduğu saptanmıştır (15). Çalışmamızda H-E ve diğer özel boyalar ile yapılan ışık mikroskobu incelemelerinde, DM grubuna ve DM+T grubuna ait her kesitte Armani-Ebstein lezyonları olarak adlandırılan, şeffaf hücrelerden oluşmuş böbrek tübülüsleri görüldü, ancak bu lezyonlara TEM incelemelerinde rastlanmadı.

Çalışmamızda kontrol, DM ve DM geliştirilen hayvanlarda seçici olmayan bir β - bloker olan timololün etkisi karşılaştırıldı. Glomerüller, tübülüsler, interstisyel alan ve damarlar diyabetik nefropatide meydana gelen lezyonlar ve β - blokerin DN lezyonları üzerine olan etkileri ışık mikroskobu ve TEM ile değerlendirildi. DM geliştirilen gruplarda glomerüllerde hipertrofi, bazal membranlarda kalınlaşma, mezangiyum hücrelerinde sayıca ve hacimce artış, kapillerlerde eritrosit stazı ve bazı tübülüs hücrelerinde şeffaf görünüm izlendi. Timolol uygulanan grupta da bu

değişiklikler izlenmekle birlikte sadece DM geliştirilen gruba göre bulgular daha hafif şiddetteydi.

Sonuç olarak kontrol, DM ve DM geliştirilen sıçanlarda seçici olmayan bir β -bloker olan timololün etkisini karşılaştırmak amacıyla yaptığımız ve deneysel olarak DM geliştirdiğimiz her iki grubumuzda da ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu düzeyinde diyabetik nefropati bulgularına rastladığımız çalışmamızda timolol kullanımının DN üzerine olumsuz etkisinin olmadığı, hatta diyabetik nefropati lezyonlarının ilerlemesini yavaşlattığı/ durdurduğu gözlenmiştir. Ancak çalışma grubumuzun sınırlı olması ve hayvan deney modelleri ile insan metabolizmasının zaman zaman farklı tepkiler vermesi gözününe alınacak olursa bu alanda yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu ihtiyacı değerlendirirken DM' un günümüzde bireylerin en az %10' unda bulunduğu ve kardiyovasküler mortalitenin diyabetik olmayanlara göre diyabetli erkeklerde 2-3 kat, diyabetli kadınlarda 3-5 kat artmasının (31, 51) göz önünde bulundurulmasının faydalı olacağına inanmaktayız.

6. SONUÇLAR

Kontrol, DM ve DM geliştirilen sıçanlarda seçici olmayan bir β - bloker olan timololün etkisini karşılaştırmayı düşündüğümüz çalışmamızda elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

- Deney gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her ikisinde de glomerüllerde hipertrofi gözlemlendi. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
- GBM kalınlaşması ışık mikroskopunda farklı boyama yöntemleri ile gösterildi. TEM incelemesinde yapılan GBM ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi anlamlı idi.
- Hiperglisemi sonucunda meydana gelen hiperaktivite nedeniyle podosit sitoplazmasında artan organellerin varlığı, podositlerde hipertrofi şeklinde gözlemlendi. İnceyapı değerlendirmesinde DM grubunda podositlerin ayakçıklarının düzleşerek birbirleriyle birleşmesi ve aralarındaki yarıklanma zarlarının kaybı izlenirken, DM+T grubunda ayakçık kaybının bazı yerlerle sınırlı olması timololün DN gelişimini yavaşlattığını düşündürdü.
- DN tanısında karakteristik olarak değerlendirilen mezangiyum hücre ve matriksinde artış, glomerüllerde diffüz ve nodüler skleroz, GBM, Bowman membranı ve tübülüs bazal membranlarında kalınlaşma, interstisyel alanda fibrozis, arteriyoller hiyalinozis bulguları bizim çalışmamızda da saptadığımız bulgulardandı.
- Mezangiyum matriks artışının kapiller lümenlerinde daralmaya ve bu alanlarda eritrositlerin stazına yol açtığı her iki deney grubumuzda da gözlemlendi.
- Kontrol grubunda görülmeyen inflamatuvar hücrelerden nötrofillere ve kanın pıhtılaşmasında rol alan plateletlere DM geliştirilen her iki grupta da TEM incelemeleri sırasında rastlandı.
- DM ve DM+T gruplarında şeffaf tübülüs hücreleri görüldü. Bu hücrelerin, tübülüs epitel hücrelerinin glikojen depolamasıyla meydana gelen Armani-Ebstein lezyonları olduğu düşünüldü.

- TEM incelemeleri sonucunda DN' de değişikliklerin daha çok glomerüllerde meydana geldiği görüldü. Tübülüsler bazal membran kalınlaşması ve sitoplazmalarındaki vakuolizasyon dışında kontrol grubuna benzer görünümdeydi.
- DM grubundaki pek çok bulgu DM+T grubunda da olmakla birlikte timolol uygulanan grupta glomerül çapının artışı, podosit hipertrofisi ve ayakçıklarındaki düzensizleşme gibi bulgular daha az oranda izlendi.

Elde ettiğimiz tüm bu bulguların sonucunda timolol kullanımının, DM' un böbreklerde yol açtığı hasarın ilerlemesini durduğu/yavaşlattığı kanısına vardık.

Özet

Deneyssel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda β - Blokerlerin Böbrek Dokusuna Etkilerinin Yapısal Düzeyde İncelenmesi

Diyabetes Mellitus pek çok doku ve organı ilgilendiren sistemik bir endokrin hastalıktır. DM' un uzun dönem komplikasyonlarından birisi de yapısal olarak glomerüllerde hipertrofi, mezangiyumda genişleme, bazal membranlarda kalınlaşma ve fibrozis ile arteriyollerde hiyalinozis ile karakterize diyabetik nefropatidir. DN, son dönem böbrek yetmezliğinin en önde gelen sebebidir ve bu nedenle yüksek insidanslı bir hastalık olan DM ve bunun komplikasyonlarından olan DN ile ilgili yapılacak olan çalışmalar çok kıymetlidir. Hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi pek çok kardiyovasküler hastalık DM' a eşlik edebilmektedir ve bu hastalıklara yönelik uygulanacak tedavinin böbrekler üzerine etkileri de önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda i.p. olarak 50 mg/kg dozunda verilen STZ ile tip 1 DM indüklenen sıçanlarda seçici olmayan bir β -bloker olan timololün böbrek yapısı üzerine etkileri ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik düzeyde incelenerek değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunda DM' un yol açtığı hasar ve timololün bu hasar üzerine olası olumlu/olumsuz etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

DM indüklenen grupta IM düzeyinde glomerüllerde hipertrofi, mezangiyumda genişleme, GBM, Bowman kapsülü ve tübüler bazal membranlarda kalınlaşma ve fibrozis, arteriyollerin duvarında hiyalinozis, tübülüs epitel hücrelerinde glikojen birikimi izlendi. Transmisyon elektron mikroskopunda ise podositlerde hipertrofi ve hücre içi organel artışı, podosit ayakçıklarında yayılma ve birleşmeler, filtrasyon yarıklarının kapanması ve aralarındaki süzücü zarın ortadan kalkması, mezangiyum hücre sayısında ve matriksinde artış, GBM' da kalınlaşma, Bowman kapsülü pariyetal epitel ve bazal laminasında kalınlaşma, kılcal damar lümeninde eritrosit stazı ve inflamatuvar hücre varlığı, aynı zamanda kapillerlerde platelet varlığı, distal tübülüs hücrelerinde vakuolizasyon saptandı. Timolol verilen DM grubunda da bu yapısal değişiklikler gözlenmekle birlikte özellikle glomerül ile ilgili bulgular daha hafif düzeyde idi.

Sonuç olarak diyabetin böbreklerde meydana getirdiği hasar üzerine timololün yavaşlatıcı/ durdurucu etkisi olduğu bu bulgular eşliğinde ince yapı düzeyinde gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Diyabetik nefropati, timolol, transmisyon elektron mikroskobu, ince yapı

Summary

The Structural Analysis of the Effects of β -Blockers on the Renal Tissues of Rats with Experimental Diabetes Mellitus

DM is an endocrine disease which effects so many tissues and organs. One of DM' s long-term complications is diabetic nephropathy which is characterized by glomerular hypertrophy, widening of mesangium, fibrosis and thickening of GBM and arteriolar hyalinosis. DN is a leading cause of end term renal insufficiency; thus conducting research studies on DM , which is a highly prevailing endocrine disease in the world, and DN, one of the complications of DM, is of great value. As there are so many diseases of cardiovascular system (CVS) co-existing with DM, such as hypertension and heart failure, the effects of medication of CVS diseases on renal tissue is highly significant.

In this study, the effects of thimolol, a non-selective β -blocker, on the structure of kidneys of rats which were induced with a 50 mg/kg dose of STZ to form Type 1 DM were analyzed and assessed with light and electron microscopes. The damage formed by DM on the renal tissue and the positive and negative response of thimolol to this damage were aimed to be demonstrated.

In the DM induced group glomerular hypertrophy, mesangium expansion, thickening of GBM, Bowman capsule and tubular basal membranes and fibrosis, arteriolar hyalinosis, accumulation of glucogen in epithelial cells of tubules were observed under light microscope. Additionally, under transmission electron microscope, increase in the number of intracellular organelles and hypertrophy of podocytes, effacement and fusion of podocyte foot processes, disappearing of filtration gaps and slit-diaphragms, rise in the number of mesangium cells and their matrix, thickening in GBM and parietal epithelial of Bowman' s capsules and basal laminae, erithrocyte stasis and inflamatuary cells and platelets seen simultaneously in capillary lumens, vacuolisation in distal tubular cells were observed.

Similar structural changes were also observed in the thimolol administered DM group; however, the findings particularly related to glomerulus were mild.

As a result the fact that thimolol has a slowing or halting effect on the damage given by diabetes to renal tissue was shown at ultrastructural level in the light of these findings.

Key words: Diabetic nephropathy, thimolol, transmission electron microscopy, ultrastructure

6. KAYNAKLAR

1. Keith L. Moore, T. Persaud. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi 2ed. Dalak H, Nobel Tıp Kitabevi; 2008.
2. Sadler TW. Langman' s Medical Embryology. 11 ed. 2010. 235- 40 p.
3. Keith L. Moore Tp. Before We' re Born. 7 ed. 2008.
4. Carlson BM. Human Embryology of Developmental Biology. 4. ed2009.
5. Ross MH, Pawlina W. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011. xviii, 974 p. p.
6. Luiz Carlos Junquiera JC. Temel Histoloji Text & Atlas. 11 ed: Nobel Tıp Kitabevi; 2006.
7. Esrefoglu M. Özel Histoloji. 1 ed: Medipres; 2009.
8. Edt: Tekelioglu M., Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme: ANTIP A.Ş. Yayınları; 2002.
9. William K. Ovalle PCN. Üriner Sistem. In: Sevdâ Müftüoğlu FK, Pergin Atilla, editor. Netter Temel Histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. p. 353-72.
10. Yenigün M AY. Her yönüyle Diabetes Mellitus. 2. baskı ed: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001. 3-6, 51-62, 383-9, 285-513 p.
11. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results

of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes care. 2002;25(9):1551-6. Epub 2002/08/28.

12. Association AD. Diabetes Care. 2004.
13. Satman I SH. Diabetes Mellitus ve İlgili Sorunların Tedavisi. 4. baskı ed2004. 5-7 p.
14. Choi YE, Ahn SK, Lee WT, Lee JE, Park SH, Yoon BB, et al. Soybeans ameliorate diabetic nephropathy in rats. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2010;7(4):433-40. Epub 2008/10/29.
15. Büyükdevrim SA BM, Davutoğlu M. Diyabetik Nefropati, Klinik, Moleküler Patogenez, Klasik ve Moleküler Tedavi. 1. ed: Turgut Yayıncılık; 2005. 84-9, 114-28, 481-5 p.
16. Pugliese G, Ricci C, Iacobini C, Menini S, Fioretto P, Ferrandi M, et al. Glomerular barrier dysfunction in glomerulosclerosis- resistant Milan rats with experimental diabetes: the role of renal haemodynamics. The Journal of pathology. 2007;213(2):210-8. Epub 2007/09/05.
17. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. Seminars in nephrology. 2007;27(2):195-207. Epub 2007/04/10.
18. Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Muller CA, Muller GA. The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis. Pathology, research and practice. 1991;187(2-3):251-9. Epub 1991/03/01.
19. Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. The American journal of physiology. 1994;267(6 Pt 2):F1094-01. Epub 1994/12/01.

20. Tang L, Lv F, Liu S, Zhang S. [Effect of berberine on expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen proteins in mesangial cells of diabetic rats with nephropathy]. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*. 2011;36(24):3494-7. Epub 2012/03/01.
21. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66. Epub 1998/05/30.
22. Farquar A MM. The role of fibrin deposition in diabetic glomerulosclerosis: A light, electron and immunofluorescence microscopy study. *J Clin Pathol*. 1972;25:657-67.
23. Kimmelsteil P KO, Beres J. Studies on renal biopsy specimen, with the aid of the electron microscope:I. Glomeruli in diabetes. *Am J Clin Pathol*. 1962;38:270-96.
24. Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes & metabolism*. 2000;26 Suppl 4:8-14. Epub 2000/08/03.
25. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2007;12(3):261-6. Epub 2007/05/15.
26. Tarladacalisir YT, Kanter M, Uygun M. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. *Renal failure*. 2008;30(1):1-8. Epub 2008/01/17.
27. Das AK, Pickett TM, Tungekar MF. Glomerular basement membrane thickness - a comparison of two methods of measurement in patients with unexplained haematuria. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1996;11(7):1256-60. Epub 1996/07/01.

28. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(4):1143-55. Epub 1984/10/01.
29. Ozturk Y, Aydin S. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin on calcium responsiveness of the rat vas deferens. *Life sciences*. 2006;78(10):1084-90. Epub 2005/09/13.
30. Sargın AK. Böbrek Mezangiyum Hücrelerinin Normal ve Deney Koşulları Altında Yapı Özelliklerinin İncelenmesi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2009.
31. Johnstone MT NR. Diabetes mellitus and heart disease. In: Pickup JC WG, editor. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Philadelphia: : Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 975- 98.
32. Isik S, Delibasi T, Berker D, Aydin Y, Guler S. [Management of diabetes in cardiac diseases]. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology*. 2009;9(3):238-47. Epub 2009/06/13. Kalp hastalıklarında diyabet yönetimi.
33. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*. 1999;353(9169):2001-7. Epub 1999/06/22.
34. Tuncay E, Seymen AA, Sam P, Gurdal H, Turan B. Effects of beta-adrenergic receptor blockers on cardiac function: a comparative study in male versus female rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87(4):310-7. Epub 2009/04/17.
35. Kurcer Z, Parlakpınar H, Vardi N, Tasdemir S, Iraz M, Fadillioglu E, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal*,

German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. 2007;115(6):365-71. Epub 2007/08/19.

36. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function*. 2003;21(2):121-5. Epub 2003/05/09.
37. Kumar V, Robbins SL. *The Kidney. Pathologic Basis Of Disease*. 7 ed: Elsevier & Saunders; 2005. p. 990 - 2.
38. Jan A. Bruijn AHC, Robert B. Colvin. Diabetic Nephropathy. In: Fogo AB, editor. *Fundamentals of Renal Pathology*. USA: Springer; 2006. p. 132-41.
39. Cortes P, Dumler F, Goldman J, Levin NW. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes*. 1987;36(1):80-7. Epub 1987/01/01.
40. Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, et al. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2000;43(1):91-100. Epub 2000/02/09.
41. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blantz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney international*. 1991;39(6):1176-83. Epub 1991/06/01.
42. Maarten W. Taal GMC, Philip A. Marsden, Karl Skorecki, Alan S.L. Yu, and, Brenner BM. Diabetic Nephropathy. *Brenner & Rector's The Kidney*. 9 ed: Elsevier & Saunders; 2012. p. 1411 - 54.
43. Michele Dalla Vestra PF. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. *International Congress Series*. 2002;1253:163 - 9.

44. Lahdenkari AT, Lounatmaa K, Patrakka J, Holmberg C, Wartiovaara J, Kestila M, et al. Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(10):2611-8. Epub 2004/10/07.
45. Mandache E, Penescu M. Nanostructural features of diabetic podocytopathy. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2012;53(1):23-7. Epub 2012/03/08.
46. Guven C. İdrar Üretme ve Boşaltma Sistemi. In: Tekelioğlu M, editor. *Özel Histoloji: İnce Yapı ve Gelişme*. 1 ed: ANTIP A.Ş. Yayınları; 2002. p. 191 - 213.
47. Stevens A. Lj. Urinary System. In: j. SAL, editor. *Histology*. Hong Kong: Mosby Year Book Europe; 1993. p. 271 - 96.
48. Jürgen Floege RJJ, and John Feehally. Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Natural History of Diabetic Nephropathy. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4 ed: Elsevier & Saunders; 2010. p. 359 - 76.
49. Ziyadeh FN. Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease. *Kidney international Supplement*. 1996;54:S10-3. Epub 1996/05/01.
50. Kumar V, Robbins SL. *Temel Patoloji*. 6 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.
51. Ozgen Z. Ateroskleroz patogenezi. Erol C, editor. Ankara: Nobel yayınevi; 2004. 1-20 p.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

23/03/2011

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :23/03/2011
TOPLANTI NO :2011-108
DOSYA NO :2011-359
KARAR NO :2011-108-403

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Belgin Can'ın araştırma yürütücüsü olduğu ve Hilal Göktürk ile ortak çalışmaları olan "Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Beta Blokörlerin Böbrek Dokusuna Etkilerinin Yapısal Düzeyde İncelenmesi" başlıklı çalışmaları 23/02/2011 tarih ve 2011-106-396 sayılı kararımızda uygun bulunan hayvanlar üzerinde yapılacağı anlaşılmıştır. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR
23/03/2011


Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

