



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**STREPTOZOTOSİN ile DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ALAMANDİNİN BÖBREK ÜZERİNE ETKİLERİ**

Zeynep Ece BULUT

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aslı KANDİL**

Şubat, 2024

İSTANBUL

Bu alışma, 29.02.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Aslı KANDİL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa Koray GÜMÜŐTAŐ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaőa
Cerrahpaőa Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2023-39489 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Lisans son sınıfta bana böbrek ve renin angiotensin sistemini sevdiren ve bunu yüksek lisansa taşımamı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, karşılaştığım her soruna çözüm bulup beni motive eden, her konuda farklı ve çok yönlü düşünmemi sağlayan, beni destekleyip her zaman her anlamda yanımda olan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Aslı KANDİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde deneysel çalışmalar konusunda yardımcı olan, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Huri DEDEAKAYOĞULLARI'na çok teşekkür ederim.

Tezimin hayvan deneyi kısmında yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ayşegül KAPUCU ve Dr. Biyolog Deniz EROL KUTUCU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda desteğini esirgemeyen ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı'nı bize açan değerli hocalarım Doç. Dr. Savaş ÜSTÜNOVA ve Öğr. Gör. Aysu KILIÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve tezim boyunca bana desteğini esirgemeyen, her anlamda yanımda olan, pozitifliği ile bana iyi enerji veren laboratuvar ortağım, güzel kalpli tatlı arkadaşım Biyolog Berna ÇOLAK'a çok teşekkür ederim.

Beni koşulsuz seven, okutup, büyüten ve iyi bir insan olmam için yetiştiren, eğitim aşkını aşılayan, her zaman yanımda olup destek veren canım annem Hatun BULUT'a, canım babam Ayhan BULUT'a ve canım kardeşim Ali Başar BULUT'a teşekkür ederim.

Şubat 2024

Zeynep Ece BULUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	10
3.1. DENEY PROTOKOLÜ	10
3.2. KAN PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ	11
3.3. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR	11
3.4. WESTERN BLOT ANALİZİ	13
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. KAN PARAMETRE BULGULARI.....	17
4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR	18
4.3. WESTERN BLOT ANALİZ BULGULARI	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR.....	47
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Renin angiotensin sistemindeki klasik ve karşı düzenleyici yollar. Ang: Angiotensin; ACE: Angiotensin dönüştürücü enzim; NEP: Nötral endopeptidaz; AT1R: Angiotensin tip 1 reseptörü, AT2R: Angiotensin tip 2 reseptörü, MrgD: Mas ile ilişkili reseptör D, MasR: Mas reseptörü (Kanugula ve diğ., 2023).....7
- Şekil 4.1:** Deney gruplarına ait kan glikoz değerleri [STZ uygulaması öncesi (-2. gün), STZ uygulamasından 48 saat sonra (deney başlangıcı (1. gün), 7, 14 ve 21 gün sonra]. *** $p < 0,001$: Kontrol grubuna göre anlamlılık. &&& $p < 0,001$: STZ uygulaması öncesine (-2. gün) ait ölçülen değerlere göre anlamlılık.....15
- Şekil 4.2:** Deney gruplarına ait vücut ağırlık değerleri [STZ uygulaması öncesi (-2. gün), STZ uygulamasından 48 saat sonra (deney başlangıcı (1. gün), 7, 14 ve 21 gün sonra]. *** $p < 0,001$: Kontrol grubuna göre anlamlılık. & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$: STZ uygulaması öncesine (-2. gün) ait ölçülen değerlere göre anlamlılık.....16
- Şekil 4.2.1:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde Ang II (Angiotensin II) değerleri. *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. (DA) Diyabet+Alamandin ve (A) Alamandin grubu.....19
- Şekil 4.2.2:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde Ang (1-7) (Angiotensin (1-7)) değerleri. (K) Kontrol, (D) Diyabet, (DA) Diyabet+Alamandin ve (A) Alamandin grubu.....20
- Şekil 4.2.3:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde ACE2 (Angiotensin dönüştürücü enzim 2) değerleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....21
- Şekil 4.2.4:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde TOS (total oksidan kapasite) değerleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ## $p < 0,01$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....23
- Şekil 4.2.5:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde TAS (total antioksidan kapasite) değerleri. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. # $p < 0,05$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....24
- Şekil 4.2.6:** Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde OSI (oksidatif stres indeksi) değerleri. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....25

Şekil 4.2.7: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde KIM-1 (böbrek hasar molekülü-1) değerleri. ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ###p<0,001 Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....	27
Şekil 4.2.8: Deney gruplarına serum örneklerinde BUN (kan üre azotu) ve kreatinin değerleri. ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ###p<0,001 Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.	29
Şekil 4.2.9: Deney gruplarına ait idrar örneklerinde total protein değerleri. **p<0,01: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. #p<0,05: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....	30
Şekil 4.3.1: Deney gruplarına ait doku örneklerinde renin, ACE (Angiotensin dönüştürücü enzim), Ang I (Angiotensin I) ve Ang II (Angiotensin II) protein seviyeleri ve protein bandları. **p<0,01, ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. ++p<0,01, +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ##p<0,01, ###p<0,001: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....	32
Şekil 4.3.2: Deney gruplarına ait doku örneklerinde ACE2 (Angiotensin dönüştürücü enzim 2) ve Ang (1-7) (Angiotensin (1-7)) protein seviyeleri ve protein bandları. **p<0,01, ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ###p<0,001 Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.	33
Şekil 4.3.3: Deney gruplarına ait doku örneklerinde MPO (miyeloperoksidaz) protein seviyeleri ve protein bandları. ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ###p<0,001: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.....	34

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1.1: Deney gruplarına ait hayvanların kan örneklerinde ölçülen pH, ctHb, cK ⁺ , cCa ⁺² , cCl ⁻ , cLac, ctBil ve cHCO ₃ ⁻ değerleri. *p<0,05, ***p<0,001: Kontrol grubuna göre anlamlılık. ⁺ p<0,05, ⁺⁺ p<0,01: Diyabet grubuna göre anlamlılık. [#] p<0,05, ^{##} p<0,01: Diyabet+Alamandin grubuna göre anlamlılık	17
--	----

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
®	: Tescilli marka
°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
Bil	: Bilirubin
Ca ⁺²	: Kalsiyum
Cl ⁻	: Klor
dk	: Dakika
dL	: Desilitre
Equiv.	: Equivalent
g	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Hb	: Hemoglobin
HCO ₃ ⁻	: Bikarbonat
I	: Roma Rakamı 1
II	: Roma Rakamı 2
K ⁺	: Potasyum
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
Lac	: Laktat
m ²	: Metrekare
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mmHg	: Milimetre cıva
mmol	: Milimol
mV	: Milivolt
n	: Birey sayısı
Na ⁺	: Sodyum

ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
pg	: Pikogram
pmol	: Pikomol
prot	: Protein
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
™	: Ticari marka
α	: Alfa
β	: Beta
μm	: Mikrometre
μmol	: Mikromol

Kısaltmalar

Açıklama

2K1C	: İki böbrek bir klips
ACE	: Angiotensin dönüştürücü enzim
ACE2	: Angiotensin dönüştürücü enzim 2
Ang	: Angiotensin
AT1R	: Angiotensin tip 1 reseptörü
AT2R	: Angiotensin tip 2 reseptörü
AT4	: Angiotensin tip 4 reseptörü
BCA	: Bikinkoninik asit yöntemi
BSA	: Sığır serum albumin
BUN	: Kan üre azotu
c	: Konsantrasyon
ct	: Total konsantrasyon
DM	: <i>Diabetes mellitus</i>
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent analiz
eNOS	: Endoteliyal nitrik oksit sentaz
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GAPDH	: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
GFH	: Glomerular filtrasyon hızı
GPCR	: G-protein bağlı reseptör
HbA1c	: Hemogloblin A1c

HOMA-IR	: İnsülin direnci için homeostatik model değerlendirmesi
HRP	: Bayır Turpu Peroksidaz/ Horseradish peroksidaz
I/R	: İskemi/reperfüzyon
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmunglobulin
IL	: İnterlökin
IRAP	: İnsülinle düzenlenen aminopeptidaz
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
JNK	: C-Jun N-terminal kinaz
KIM-1	: Böbrek hasar molekülü-1
LPS	: Lipopolisakkarid
MasR	: Mas reseptörü
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
MrgD	: Mas ile ilişkili reseptör D
MrgE	: Mas ile ilişkili reseptör E
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NEP	: Nötral endopeptidaz
NGAL	: Nötrofil jelatinazla ilişkili lipokalin
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
Nox4	: NADPH oksidaz 4
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PKC	: Protein kinaz C
PVDF	: Poliviniliden diflorid
RAS	: Renin angiotensin sistemi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SGLT2	: Sodyum-glikoz ortak taşıyıcısı 2
SOD	: Süperoksit dismutaz
STZ	: Streptozotosin
T1DM	: Tip 1 <i>Diabetes mellitus</i>

T2DM	: Tip 2 <i>Diabetes mellitus</i>
TAS	: Total antioksidan kapasite
TBS-T	: Tris tamponlu salin-Tween 20
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
TNF-β	: Tümör nekroz faktör- β
TOS	: Total oksidan kapasite



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STREPTOZOTOSİN ile DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ALAMANDİNİN BÖBREK ÜZERİNE ETKİLERİ

Zeynep Ece BULUT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aslı KANDİL

Renin angiotensin sistemi (RAS)'nin, diyabetin patofizyolojisinde kritik bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, RAS'ın yeni bir üyesi olan alamandinin diyabetteki etkileri ve bu etkilerinin genel mekanizmaları hala belirsizdir. Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabette, alamandinin böbrek üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, 32 adet erkek Sprague-Dawley sıçan, kontrol, diyabet, diyabet+alamandin ile alamandin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. STZ (60 mg/kg) uygulanarak diyabet oluşturulan hayvanlara 21 gün boyunca alamandin (50 µg/kg/gün) intraperitoneal (ip) olarak uygulanmıştır. Deney boyunca kan glikoz düzeyleri ile vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Deney sonunda 24 saatlik idrar toplandıktan sonra deney hayvanlarından analizler için kan ve doku örnekleri alınmıştır. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Diyabetik hayvanlarda, kan glikoz değerleri yüksek seyrederken vücut ağırlıklarının azaldığı tespit edilmiştir. Elektrolit dengesinde ve kan pH'sında ciddi değişikliklerin olmamasına karşın serum kreatinin, serum kan üre azotu (BUN), idrar total protein seviyeleri ve böbrek hasar molekülü-1 (KIM-1) seviyeleri diyabetik hayvanlarda artmıştır. Bu bulgulara ek olarak, RAS'ın unsurları olan renin, angiotensin (Ang) I, Ang II, angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve ACE2 ile miyeloperoksidaz (MPO) protein seviyelerinin arttığı ve oksidatif stresin meydana geldiği belirlenmiştir. Alamandin uygulamasının diyabetik hayvanlarda kan glikoz değerleri,

vücut ağırlıkları ve kan parametreleri üzerinde ciddi bir etkisinin olmadığı ancak Ang I, Ang II, ACE, ACE2 seviyelerini düşürdüğü ve oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, böbrek hasarının belirteci olan KIM-1 ve lökosit infiltrasyon göstergesi olan MPO değerlerinin diyabetik hayvanlarda alamandin uygulaması ile azaldığı buna paralel olarak serum BUN, serum kreatinin ve idrar total protein seviyelerinin de azaldığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, STZ ile oluşturulan diyabette RAS'ın aktive olduğunu, bunun da böbrek hasarı, böbrek disfonksiyonu, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili olabileceğini ve alamandinin bu etkileri hafiflettiğini göstermiştir. Bizim sonuçlarımız, alamandinin STZ ile oluşturulan diyabetteki potansiyel terapötik etkilerinin oksidatif stres ve RAS ile ilişkili olabileceğini işaret etmiştir.

Şubat 2024, 74. sayfa.

Anahtar kelimeler: Alamandin, diyabet, böbrek

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECTS OF ALMANDINE ON THE KIDNEY IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Zeynep Ece BULUT

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ash KANDİL

The renin angiotensin system (RAS) is known to have a critical role in the pathophysiology of diabetes. However, the effects of alamandine, a novel member of the RAS, in diabetes and the general mechanisms of its effects remain unclear. This study was aimed to evaluate the effects of alamandine on the kidney in streptozotocin (STZ)-induced diabetes.

In this study, 32 male Sprague-Dawley rats were used and divided into 4 groups as control, diabetes, diabetes+alamandine and alamandine. Diabetes was induced by STZ (60 mg/kg) administration and alamandine (50 µg/kg/day) was administered intraperitoneally (ip) for 21 days. The blood glucose levels and body weights of animals were measured during the experiment. Urine was collected for 24 hours, then blood and kidney tissue were obtained from animals for analysis. The data were statistically analyzed.

It was detected that the blood glucose levels increased and body weight decreased in diabetic animals. Electrolyte balance and blood pH did not change in diabetic animals. Serum creatinine, serum blood urea nitrogen (BUN), urine total protein levels, and kidney injury molecule-1 (KIM-1) levels were determined to increase in diabetic animals. Additionally, it was found to increase the levels of compounds of the renin-angiotensin system (RAS) such as renin, angiotensin (Ang) I, Ang II, angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2, and myeloperoxidase (MPO) levels, to occur oxidative stress.

It has been observed that alamandine administration did not change blood glucose levels, body weight and blood parameters. However, it reduced Ang I, Ang II, ACE, ACE2 levels and oxidative stress in diabetic animals. Furthermore, alamandine administration in diabetic animals resulted in decreased KIM-1 levels, a marker of kidney injury, and MPO, an indicator of leukocyte infiltration, and also serum BUN, serum creatinine and urine total protein levels.

In conclusion, these results demonstrated that RAS activation is involved with renal damage, renal dysfunction, oxidative stress and inflammation in STZ-induced diabetes, and also alamandine attenuates these effects occurring in diabetes. Our results indicate that the potential therapeutic effects of alamandine may be associated with oxidative stress and RAS in STZ-induced diabetes.

February 2024, 74 pages.

Keywords: Alamandin, diabetes, kidney



1. GİRİŞ

Bu çalışmada alamandinin, STZ ile oluşturulan diyabetik hayvanların böbrekleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde *Diabetes mellitus* (DM), diyabetin böbrek üzerindeki etkileri, RAS ve bu sistemin diyabet ile oksidatif stresle olan ilişkisine değinilmiş, ayrıca alamandinin fizyolojik özellikleri hakkında bilgiler verilmiştir.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde deney hayvanları, deney grupları ve protokolü, hayvanlardan alınan örneklerde yapılan kan parametre ölçümleri, biyokimyasal analizler ve Western blot yöntemi ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Ayrıca bu bölümde verilerin istatistiksel analiz yöntemi verilmiştir.

Tezin “Bulgular” bölümünde yapılan analizlerden elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildikten sonra sonuçlar şekil veya tablo olarak verilmiştir ve ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde, tez konusu ile ilgili çalışmalara ayrıntılı bir şekilde yer verilmiş, elde edilen bulgular bu çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve bir sonuca varılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Diabetes mellitus (DM), kronik olarak kan glikoz düzeyinin yüksek olması yani hiperglisemi ile nitelenen metabolik bir hastalıktır (American Diabetes Association, 2013; World Health Organization (WHO), 1999). International Diabetes Federation'ın 2021'de yayınladığı baskının bulguları, diyabetin 21. yüzyılın hızla büyüyen sağlıkla ilgili küresel acil durumlarından biri olduğunu desteklemektedir. 2030 yılında 643 milyon kişinin diyabet hastası olacağı ve bu sayının 2045 yılında 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Diyabete bağlı doğrudan yapılan sağlık harcamalarının hâlihazırda bir trilyon dolara yakın olduğu ve bu sayının 2030 yılına kadar aşılacağı rapor edilmiştir (IDF Diabetes Atlas, 2021). DM, insülin üretiminde eksikliğin veya insülin direncinin oluşması sonucunda meydana gelir, yaygın olarak tip 1 (T1DM) ile tip 2 (T2DM) olmak üzere kategorize edilmektedir (American Diabetes Association, 2013; Ramachandran ve diğ. 2024; World Health Organization (WHO), 1999). Diyabetin monogenik diyabet, gestasyonel (gebelik) diyabet ve yetişkinlerde gizli otoimmün diyabet gibi klinik olarak alt tipleri de mevcuttur (American Diabetes Association, 2013; Ramachandran ve diğ. 2024; World Health Organization (WHO), 1999). İnsüline bağımlı diyabet olarak da bilinen T1DM, insülin üreten pankreas beta (β) hücrelerinin kronik otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır (American Diabetes Association, 2013; Ramachandran ve diğ. 2024; World Health Organization (WHO), 1999). T1DM'li bir bireyin pankreasında Langerhans adacıkları histolojik olarak analiz edildiğinde makrofajlar, T ve B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler dendritik hücreler ve adacık reaktif otoantikorları olmak üzere çeşitli bağışıklık sisteminin unsurları tespit edilmiştir (Sharma ve Alonso, 2014). T1DM gelişme potensiyeli, otoantijenlerin salınmasına yol açan β hücre devinimi veya hasarı ile ilişkilidir. β hücresi otoantijenleri, antijen sunan hücreler ile yardımcı T hücrelerine sunulur. Bununla birlikte oluşan otoantikorlar ve aktive olan T hücreleri, β hücrelerinin otoantijenlerine karşı yönelenerek antijenlerle karşılaşır, hasara ve dolayısıyla β hücrelerinin ölümüne sebep olur (American Diabetes Association, 2013; Ramachandran ve diğ. 2024; Roep ve Peakman, 2012). T2DM esas olarak insülin direnci ile bağlantılıdır (American Diabetes Association, 2013; Ramachandran ve diğ. 2024; Roep ve Peakman, 2012), büyük ölçüde sağlıksız beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı alışkanlıklarının neden olduğu obeziteden kaynaklanır. İnsülin duyarlılığındaki dalgalanmalar karbonhidrat ağırlıklı besinlerin alınımına, fiziksel aktiviteye ve strese bağlı olarak değişkenlik gösterir (Tan ve diğ. 2019).

Diyabetin uzun vadeli etkileri içinde böbrek yetmezliğine sebep olabilen nefropati, görme kaybıyla birlikte retinopati ve periferik nöropati bulunmaktadır. Diyabetli bireylerde aterosklerotik kardiyovasküler, periferik arteriyal ve serebrovasküler hastalık insidansı yüksek olmakla birlikte bu bireylerde sıklıkla hipertansiyon ve metabolizmada anormallikler görülür (American Diabetes Association, 2013; Lim ve Taylor, 2024; World Health Organization (WHO), 1999). Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarındaki düzensizliklerin temel nedeni insülinin hedef dokular üzerindeki etkisinin yetersiz olmasıdır (World Health Organization (WHO), 1999; American Diabetes Association, 2013;). Diyabetik ketoasidoz ve hiperozmolar hiperglisemik durum diyabetin en ciddi iki akut metabolik komplikasyonudur. Kontrolsüz hiperglisemi, metabolik asidoz ve keton konsantrasyonunun artması hayatı tehdit eden diyabetik ketoasidoza neden olmaktadır. Hiperozmolar hiperglisemik durum, belirgin ketoasidozun yokluğunda şiddetli hiperglisemi, hiperozmolarite ve dehidrasyon ile karakterize edilmektedir (American Diabetes Association, 2013; Lim ve Taylor, 2024; World Health Organization (WHO), 1999).

Normal fizyolojik koşullar altında, kan glikoz düzeyleri dar sınırlar içinde tutulur ve nadiren 3,5-8,0 mmol/L (63-144 mg/dL) aralığının dışına çıkar. Glikozun homeostazının sıkı bir şekilde düzenlenmesi gereklidir çünkü bazı dokular özellikle de beyin, enerji kaynağı olarak glikoza oldukça bağımlıdır (Holt, 2024). Böbrek, glikoz homeostazisinde üç önemli role sahiptir. İlk olarak böbrek glukoneogenez ile glikozun dolaşıma geçmesini sağlar. İkinci olarak, böbrek kendi enerji ihtiyacı olan glikozu dolaşımdan sağlar. Böbreğin glikoz homeostazisinde sonuncu ve en önemli rolü ise glomerular filtrasyondan sonra filtre edilen glikozun geri emiliminin yapılmasıdır (Alsahli ve Gerich, 2017). Böbrekler günlük olarak glukoneogenez yoluyla 15-55 g glikoz üretir ve 25-35 g glikozu metabolize eder. Normal fizyolojik koşullarda böbrekler, günde 125 ml/dk/1,73 m² glomerular filtrasyon hızı (GFH) ile 180 litre plazmayı ve yaklaşık olarak 160-180 g glikozu filtre eder (Alsahli ve Gerich, 2017; Vallon, 2015). Filtrelenen bu glikozun %99'undan fazlası başta proksimal tübül olmak üzere böbrek tübülleri tarafından geri emilerek dolaşıma katılır. Bu sebeple oluşan idrar glikoz içermez (Alsahli ve Gerich, 2017; Vallon, 2015). Plazmada glikoz seviyeleri arttıkça glomerular filtrattaki glikoz miktarı ve filtre edilen glikozun geri emilimi, maksimum geri emilme kapasitesi aşıldıkça doğrusal olarak artar (Alsahli ve Gerich, 2017; Holt, 2024). Maksimum geri emilim kapasitesi olan glikozun renal eşiğine, dolaşımdaki glikoz konsantrasyonu ~11 mmol/L olduğunda ulaşılır (Alsahli ve Gerich, 2017; Holt, 2024). Plazmadaki glikoz konsantrasyonunun glikozun böbrek tübüllerinde

geri emilim eşiğini ve tübüllere gelen glikoz miktarının maksimum geri emilim kapasitesini aşması sonucu idrarda glikoz görülür ve bu glikozüri olarak adlandırılır (Alsahli ve Gerich, 2017, Lim ve Taylor, 2024). Glikozun aşırı emilimi, glikoz taşıyıcılarının anlatımının uyarılmasına ve proksimal tübüllerde aktif taşımada artışa neden olur (Vallon, 2015). Bu durum, böbrek korteksinde ve dış medullada oksijen talebini büyük ölçüde artırıp kısmi iskemiye neden olarak nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve KIM-1 gibi hücresel hasar belirteçlerinin anlatımını artırır (Vallon, 2015; Zeni ve diğ. 2017). Sodyum-glikoz ortak taşıyıcısı 2 (SGLT2), glikozu sodyumla birlikte taşıdığından proksimal tübüldeki sodyum geri emilimi büyük ölçüde artırır. Bu da distal tübüle ve makula densaya ulaşan sodyum klorür konsantrasyonunu azaltır (Vallon, 2015). Makula densadaki düşük sodyum klorür konsantrasyonu, tübüloglomerular geri bildirim mekanizmasını devre dışı bırakır ve afferent arteriyolde dilatasyonu uyarır (Anders ve diğ. 2016; Vallon, 2015). Aynı zamanda renin salgılanması, efferent arteriyolde vazokonstriksiyona neden olur. Bu hemodinamik etkilerin sonucunda, GFH ve glomerular hipertansiyonda artış meydana gelir. Glomerular hipertrofi gelişimini takiben glomerular basınç düşer ancak glomerular hiperfiltrasyon devam eder (Anders ve diğ. 2016; Vallon ve Komers, 2011).

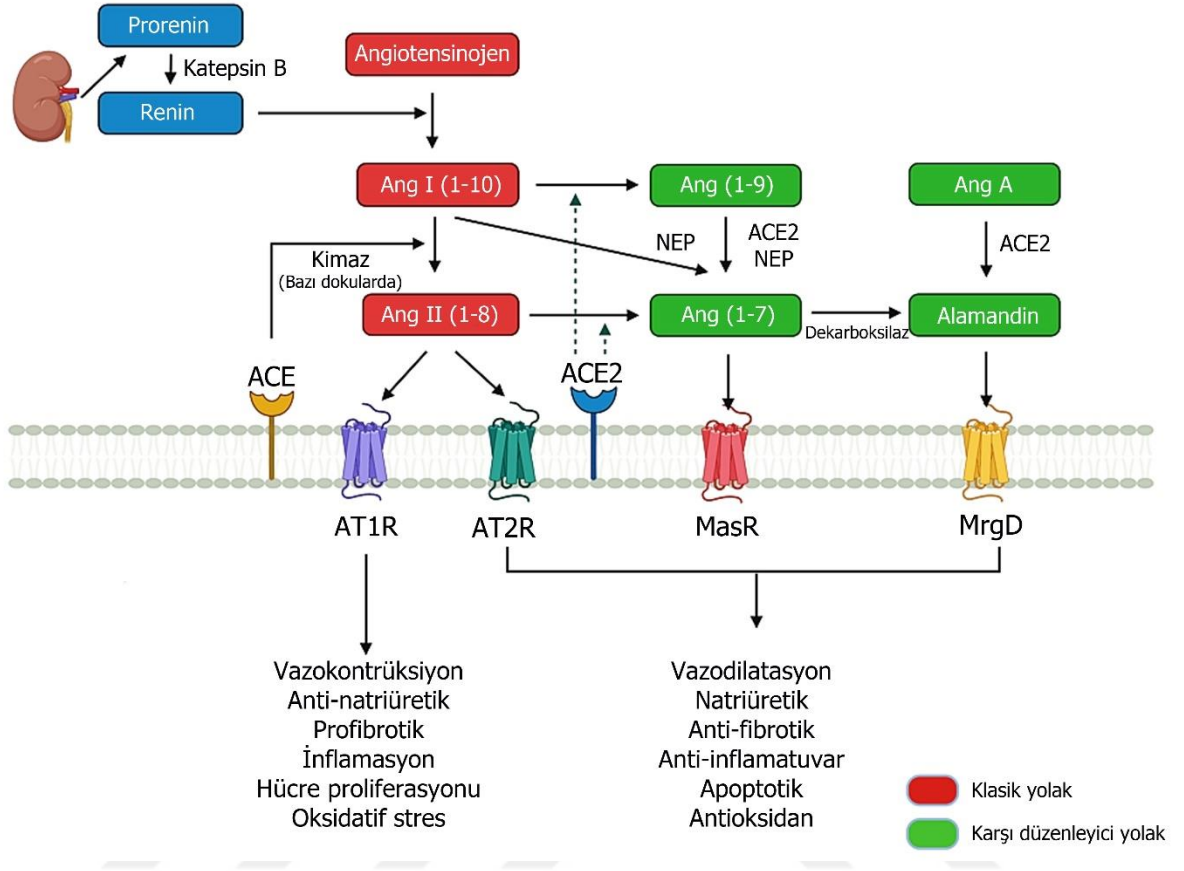
Diyabete bağlı olarak meydana gelen böbrek hasarına ve fonksiyon bozukluklarına sahip hastaların sayısı son zamanlarda oldukça artmaktadır. Böbrek yetmezliğine bağlı gerçekleşen ölümlerin çoğu diyabetle ilişkilendirilmektedir. Diyabet hastalarının %20 ile %40'ında nefropati gelişmektedir (Tokgöz, 2019). Diyabetik nefropati, renal replasman tedavisinin başlatılmasının yaygın bir nedenidir. Mevcut yöntemler ile tedavi edilen diyabetli bir bireyin, son dönem böbrek hastalığına yakalanma riski azalıyor gibi görünse de dünya çapında diyabet prevalansının artmasına paralel olarak renal replasman tedavisinin gerekliliği de artmaktadır (Barnard-Kelly ve Holt, 2024). Diyabetle ilişkili böbrek hastalığının patogenezinde metabolik, hemodinamik, büyüme faktörleri/sitokinler ve hücre içi faktörler olmak üzere dört önemli etken tanımlanmaktadır (Flyvbjerg, 2024). Diyabete bağlı olarak gelişen hipergliseminin ve hemodinamik düzensizliklerin, inflamasyona, oksidatif strese ve fibrozise yol açtığı belirtilmiştir (Barnard-Kelly ve Holt, 2024; Mezzano ve diğ. 2003; Mori ve diğ. 2014; Tokgöz, 2019). Bu değişikliklere ek olarak diyabette RAS'ın da aktive olduğu görülmüştür (He ve diğ. 2015; Leehey ve diğ. 2008; Ma ve diğ. 2014; Mezzano ve diğ. 2003; Mori ve diğ. 2014; Oudit ve diğ. 2006; Tikellis ve diğ. 2012; Tokgöz, 2019; Tonon ve diğ. 2022; Yamaleyeva ve diğ. 2012; Wang ve diğ. 2019).

Diyabetik nefropatinin gelişimi ve ilerlemesinde oksidatif stresin önemi büyüktür (Donate-Correa ve diğ. 2020; Mezzano ve diğ. 2003; Mori ve diğ. 2014; Mori ve diğ. 2021). Normal şartlarda, reaktif oksijen türleri (ROT) ve antioksidan savunma mekanizması arasında bir denge bulunur. Bu dengenin bozulmasıyla oluşan oksidatif stres, diyabet dâhil olmak üzere birçok patofizyolojik olayda rol alır (Baynes, 1991). Kronik hiperglisemi antioksidan kapasiteyi azaltırken oksidatif stresi ve ROT üretimini teşvik ederek doku hasarına, inflamatuvar araçlar ile sitokinlerin salınımına neden olur (Butkowski ve Jelinek, 2017; Donate-Correa ve diğ. 2020; Jin ve diğ. 2023; Mezzano ve diğ. 2003; Mori ve diğ. 2014; Mori ve diğ. 2021; Wellen ve Hotamisligil, 2005). Diyabette oksidatif stresin artmasına katkıda bulunan mekanizmalar içerisinde glikozilasyonun artması ile enerji metabolizmasındaki, sorbitol yolu aktivitesindeki, inflamatuvar araçların seviyelerindeki ve antioksidan sistemdeki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres bulunmaktadır (Baynes, 1991). Diyabette böbreklerde ROT üretiminde en önemli rolü oynayan enzimlerden biri izoform nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (Nox) 4'tür (Wang ve diğ. 2023). Ancak diğer olası nedenler arasında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, sorbitol/poliol yolu boyunca akış, proteinler ve amino asitler üzerindeki serbest amino gruplarının glikasyonu, ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), mitokondriyal elektron taşıma zinciri enzimleri, siklooksigenaz ve lipoksigenaz bulunur (Elmarakby ve diğ. 2003; Forbes ve diğ. 2008).

Diyabette görülen hiperglisemi ile birlikte böbreklerde distal tübülde sodyum klorür içeriği azalır. Bu durum jukstaglomerular aygıt düzeyinde düşük etkili dolaşım hacmi uyarısı olarak algılanır ve afferent arteriyolde vazodilatör etkide rol oynayan adenosin üretiminin inhibisyonu uyarılır (Cherney ve diğ. 2014). Buna eşlik eden ve Ang II düzeylerinin artmasına neden olan RAS'ın aktivasyonu, efferent arteriyolün vazokonstriksiyonuna ve bunun sonucunda da böbrek perfüzyonu ile glomerular hiperfiltrasyonda artışa sebep olur. Hiperglisemi, renovasküler ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir rol oynayan angiotensin tip 1 reseptörü (AT1R)'nün sentezini uyarır (Castañeda ve diğ. 2021). Mezangiyal hücrelerde ve podositlerde, yüksek glikoz seviyeleri tarafından uyarılan AT1R anlatımı, transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β , vasküler endoteliyal büyüme faktörü ve interlökin (IL)-6 gibi profibrotik ve proinflamatuvar araçların hücre içi anlatımına katkıda bulunur. IL-6, hücre dışı matriks üretimiyle birlikte esas olarak proksimal tübülde hiperplazi ve hipertrofiye yol açar (Castañeda ve diğ. 2021). Yüksek glikoz, mezangiyal ve tübüler epitel hücrelerinde hücre içi ROT'un oluşumunu uyarır. Mezangiyal hücrelerde yüksek glikozun neden olduğu ROT, protein kinaz C (PKC), NADPH

oksidaz ve mitokondriyal elektron transfer zinciri kompleksi I'in inhibisyonu ile etkili bir şekilde bloke edilebilir. İleri glikolizasyon son ürünleri, TGF- β 1 ve Ang II de ROT oluşumunu uyarabilir ve diyabetik böbrekte yüksek glikozla aktiveleşen sinyal iletimini güçlendirebilir (Lee ve diğ. 2003). Aslında, yüksek glikozun mezangiyal hücrelerde renin ve Ang II sentezini uyardığı bilinmektedir. Ang II, glomerular kapiller basıncında ve geçirgenlikte (proteinüriye neden olur) artış, hücre proliferasyonu, makrofaj infiltrasyonu, inflamasyon, sitokinlerin ve hücre dışı matriksin sentezi gibi böbrek hasarının gelişimine katkıda bulunabilecek çeşitli etkilere sahip olabilmektedir (Loeffler ve Wolf, 2023).

RAS'ın arteriyal kan basıncının en önemli düzenleyicilerinden biri olduğu ve esas olarak inflamatuvar süreçlerin aracılık ettiği kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarında anahtar rol oynadığı iyi bilinmektedir (He ve diğ. 2015; Loeffler ve Wolf, 2023; Mezzano ve diğ. 2003; Kaschina ve Unger, 2003; Tokgöz, 2019). RAS'ın sadece bir endokrin sistem olarak değil aynı zamanda bir parakrin, otokrin ve intrakrin sistem olarak da fonksiyonel olduğu ifade edilmektedir (Puglisi ve diğ. 2021). Renin bir asırdan fazla bir süre önce keşfedilmiş, 1961'den itibaren klasik RAS yolu tanımlanmış (Taquini ve Taquini, 1961) olmasına karşın bu alandaki araştırmalar devam etmektedir ve yakın zamanda yeni bulgular ortaya konmuştur. Sistemik RAS, karaciğerden sentezlenen angiotensinojenin jukstaglomerular hücrelerden üretilen renin tarafından Ang I'e dönüştürülmesi ile başlar. ACE, Ang I'i Ang II'ye dönüştürürken ACE2, Ang II'yi Ang (1-7)'ye dönüştürür. ACE ve ACE2 aktivitesi arasındaki denge RAS'ın nihai etkisini belirler çünkü Ang II, vazokonstriksiyona ve proliferasyona neden olurken Ang (1-7) vazodilatasyona neden olur (Romaní-Pérez ve diğ. 2015). Ang II, AT1R ve angiotensin tip 2 reseptörü (AT2R) olmak üzere iki reseptör alt tipi aracılığıyla etkisini gösterir (Kaschina ve Unger, 2003). AT1R vazokonstriksiyon, aldosteron salınımı, sodyum ve su tutulması gibi klasik Ang II eylemlerine aracılık ederken AT2R, Ang II'nin AT1R aracılığıyla gerçekleşen eylemlerine zıt yönde etkiler gösterir ve AT1R'nin aşırı uyarılmasına karşı koruyucu bir mekanizmayı temsil edebilir (Kaschina ve Unger, 2003).



Şekil 2.1: Renin angiotensin sistemindeki klasik ve karşı düzenleyici yollar. Ang: Angiotensin; ACE: Angiotensin dönüştürücü enzim; NEP: Nötral endopeptidaz; AT1R: Angiotensin tip 1 reseptörü, AT2R: Angiotensin tip 2 reseptörü, MrgD: Mas ile ilişkili reseptör D, MasR: Mas reseptörü (Kanugula ve diğ., 2023).

RAS'ın klasik yolağına ek olarak farklı eksenlerin varlığı ifade edilmiştir (Martyniak ve Tomasik, 2022; Puglisi ve diğ. 2021; Zhuo ve diğ. 2013). Bunlardan biri ACE2/Ang (1-7)/Mas reseptör eksenidir (Moon, 2013). Ang (1-7) böbrek proksimal tübül hücrelerinde, afferent arteriyollerde, kardiyomiyositlerde ve nöronlarda anlatımı olan G proteinine bağlı Mas reseptörü (MasR)'ne bağlanarak bradikinin, prostaglandin ve endotelial nitrik oksit (NO) salınımı yoluyla vazodilatör etki gösterir. İkinci Ang IV/AT4/IRAP ekseninde, Ang II'nin A ve N aminopeptidazları ile metabolizasyonundan meydana gelen Ang IV, insülinle düzenlenen aminopeptidaz (IRAP) olarak tanımlanan angiotensin tip 4 (AT4) reseptörüne bağlanır. Bu eksenin kan basıncı ve böbrek üzerindeki etkileri hala belirsizdir. RAS'ın üçüncü eksenini ise Alamandin/MrgD'dir (Martyniak ve Tomasik, 2022; Puglisi ve diğ. 2021; Zhuo ve diğ. 2013).

Alamandin, kan basıncı ile sıvı ve elektrolit dengesinde rol oynayan RAS'ın yeni bir üyesidir. Bir heptapeptid olan alamandin 2013 yılında keşfedilmiştir (Lautner ve diğ. 2013). Alamandin,

bir oktapeptid olan angiotensin A (Ala1-Ang II)'nin (Jankowski ve diğ. 2007) ACE2 enzimi tarafından hidrolize edilmesiyle veya doğrudan Ang (1-7)'nin N-terminal aspartat amino asit kalıntısının dekarboksilasyonu ile oluşur. Alamandin, Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro amino asit dizisinden meydana gelir. Ang (1-7)'nin amino asit dizisinde, alamandinden farklı olarak alanin yerine aspartat amino asidi bulunur. Bu nedenle alamandin, Ang (1-7) ile benzer biyolojik özellikler gösterir (Lautner ve diğ. 2013).

Alamandin reseptörü, Mas ile ilişkili G-protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesi olan olan Mas ile ilişkili reseptör (Mrg)D'dir. Mrg'ler birçok farklı alt aileye sahip olmakla birlikte (Zhang ve diğ. 2005) yedi transmembran halkadan, bir N-terminal hücre dışı alandan ve bir C-terminal hücre içi alandan oluşur (Bockaert ve Pin, 1999). Transmembran ve hücre içi alanlar yüksek oranda korunduğundan dolayı bazı işlevleri paylaşabilir (Dong ve diğ. 2001) ve heterodimerler oluşturabilirler (Milasta ve diğ. 2006). Angiotensin sistemindeki peptidlerin Mrg reseptörleri ile etkileşime girdiği ifade edilmiştir. Ang (1-7)'nin MrgD reseptörünün zayıf bir agonisti olduğu da gösterilmiştir (Gembardt ve diğ. 2008). MrgD'nin dorsal kök spinal gangliyonlarındaki duyu nöronlarında (Dong ve diğ. 2001), endotelial NOS (eNOS) bulunan endotel hücrelerinde, arteriyel düz kas hücrelerinde ve aterosklerotik plaklarda anlatımı tespit edilmiştir (Habiyakare ve diğ. 2014). Bir çalışmada reseptörün membranda, kardiyomiyositlerin perinükleer ve nükleer bölgelerinde, fare beyninin kardiyovasküler merkezinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Oliveira ve diğ. 2019). Son zamanlarda MrgD'nin retinadaki nöronlarda, damar sisteminde ve pigment epitel hücrelerinde anlatımı olduğu rapor edilmiştir (Zhu ve diğ. 2020). Valenzuela ve diğ. (2021) sıçan ve maymun beyninde ACE2, Ang (1-7) ve alamandinin mitokondride oldukça yoğunlaştığını ve NO üretmek için yeni bir mitokondriyal MrgE'ye bağlandığını keşfetmiştir. Ayrıca araştırmacılar, kemirgenler ile primatların substantia nigra ve farklı beyin bölgelerindeki nöronlarında ve glia hücrelerinde MrgE anlatımının olduğunu bulmuşlardır. Bu yeni ACE2/MrgE/NO ekseninin, nöronlarda ve muhtemelen diğer hücrelerde oksidatif stresin mitokondriyal düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüştür (Valenzuela ve diğ. 2021).

Birçok çalışmada farklı dokularda alamandinin koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Zhu ve diğ. (2021), renal iskemi/reperfüzyon (I/R)'un indüklediği böbrek hasarında alamandinin etkilerini değerlendirdiklerinde, alamandinin oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak etkili olduğunu bulmuşlardır. Alamandinin sıçanlarda doksorubisinin neden olduğu

nefrotoksisitede ve kardiyotoksisitede antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik rollere sahip olduğu belirlenmiştir (Soltani Hekmat ve diğ. 2021a; Hekmat ve diğ. 2021b). Songür ve diğ. (2023), alamandinin sistemik ve renal koruyucu etkilerini uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) anlatımının azalması yoluyla hemodinamik ve vasküler fonksiyonlar üzerindeki etkilerini anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkiler meydana getirdiğini işaret etmişlerdir. Çeşitli hipertansiyon modellerinde alamandinin koruyucu etkilerinin olduğu saptanmıştır (Fernandes ve diğ. 2021; Gong ve diğ. 2022; Hekmat ve diğ. 2017; Hekmat ve diğ. 2023; Soares ve diğ. 2017; Tanrıverdi ve diğ. 2023; Yang ve diğ. 2020). Alamandinin, mitojenle aktive olan protein kinaz yolunu inhibe ederek Ang II'nin neden olduğu vasküler fibrozu (Yang ve diğ. 2020) ve sepsis ile ilişkili kalp fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği gösterilmiştir (Li ve diğ. 2018). Alamandinin antifibrotik etkisi, kollagen I, III ve fibronektin birikimini azaltmasına yönelik elde edilen bulgularla desteklenmiştir (Oudit ve diğ. 2006). Tüm bu özelliklere ek olarak alamandinin vazodilatasyon (Habiyakare ve diğ. 2014; Qaradakhı ve diğ. 2017; Uchiyama ve diğ. 2017), antitümöral (da Silva ve diğ. 2022), davranışın modülasyonu (Almeida-Santos ve diğ. 2021; Becari ve diğ. 2023) ve kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesi (Lautner ve diğ. 2013) gibi birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Alamandinin diyabet üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalardan elde edilen bilgilerin ışığında bu çalışmada, alamandinin STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanların böbrekleri üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY PROTOKOLÜ

Bu çalışmada, 32 adet 2,5 aylık Sprague Dawley ($387,60 \pm 33,98$ g) erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar, 12/12 saat aydınlık-karanlık periyodunda, %55 nem oranında ve 21-25 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Deney süresince hayvanlara *ad libitum* olarak standart pelet yem ve musluk suyu verildi. Çalışmada kullanılan hayvanlar, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve deneyler bu merkezde yapıldı.

Deneyde kullanılan hayvanlar 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (n=8): Sitrat tamponu çözeltisi (0,5 ml) intraperitoneal (ip) olarak uygulandıktan 48 saat sonra 0,5 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) 21 gün boyunca ip olarak uygulandı.

Diyabet (STZ) grubu (n=8): 60 mg/kg STZ (Sigma, S0130) ip olarak uygulandıktan 48 saat sonra 0,5 ml FTS 21 gün boyunca ip olarak uygulandı.

Diyabet + Alamandin grubu (n=8): 60 mg/kg STZ (Sigma, S0130) ip olarak uygulandıktan 48 saat sonra 50 µg/kg/gün alamandin (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. 002-10) 0,5 ml FTS'de çözündürülerek 21 gün boyunca ip olarak uygulandı.

Alamandin grubu (n=8): Sitrat tamponu çözeltisi (0,5 ml) ip olarak uygulandıktan 48 saat sonra 50 µg/kg/gün alamandin 0,5 ml FTS'de çözündürülerek 21 gün boyunca ip olarak uygulandı.

Hayvanların kan glikoz değerleri, STZ uygulanmasından önce ve STZ uygulandıktan 48 saat sonra glukometre (Accu-Chek®PerformaNano, Roche Diagnostic Turkey A.Ş.) ile ölçüldü. STZ uygulamasından 48 saat sonra kan glikoz değeri 180 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabet olarak kabul edildi. Alamandin, dozu 50 µg/kg/gün olacak şekilde 21 gün boyunca hayvanlara ip olarak uygulandı (Gong ve diğ., 2022). Deney başlangıcından itibaren 7, 14 ve 21. günlerde hayvanların kan glikoz değerleri ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Deneyin 20. gününde hayvanlar metabolik kafeslere yerleştirildi ve 24 saatlik idrarları toplandı. Daha sonra hayvanlara ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki hayvanların abdominal aortasından heparinli enjektörler ile alınan kan örneklerinde (0,5 ml)

kan gazı analizatörü (ABL90Flex kan gazı analizatörü, Radiometer, Danimarka) kullanılarak ölçümler yapıldı. Biyokimyasal analizler için kalpten kan örnekleri ile moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için böbreklerden doku örnekleri alındı.

3.2. KAN PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Hayvanların abdominal aortasından alınan kan örneklerinde **asit-baz parametreleri** pH, $c\text{HCO}_3^-$ (P,st) (standart bikarbonat); **oksimetre parametresi** ctHb (total hemoglobin konsantrasyonu); **elektrolit parametreleri** $c\text{K}^+$ (plazmadaki potasyum iyonlarının konsantrasyonu), $c\text{Na}^+$ (plazmadaki sodyum iyonlarının konsantrasyonu), $c\text{Ca}^{+2}$ (plazmadaki kalsiyum iyonlarının konsantrasyonu), $c\text{Cl}^-$ (plazmadaki klor iyonlarının konsantrasyonu); **metabolit parametreleri** cLac (plazmadaki L-Laktat konsantrasyonu) ve ctBil (plazmadaki total bilirubin konsantrasyonu) seviyeleri kan gazı analizatörü (ABL90Flex kan gazı analizatörü, Radiometer, Danimarka) ile ölçüldü.

3.3. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Deney sonunda alınan doku ve kan örneklerinde Ang II (E0655Ra, BT-LAB, China), Ang (1-7) (E1171Ra, BT-LAB, China), ACE2 (E0968Ra, BT-LAB, China), total oksidan kapasite (TOS) (RL0024, Rel Assay, Turkey), total antioksidan kapasite (TAS) (RL0017, Rel Assay, Turkey), ve KIM-1 (E0549Ra, BT-LAB, China) düzeyleri belirlendi. Ayrıca idrarda total protein, kanda ise BUN ve kreatinin düzeyleri otoanalizörde (cobas c 311, Roche, USA) belirlendi.

Böbrekten alınan parçalar, sıvı azota atıldıktan sonra biyokimyasal analizler yapılana kadar -80°C 'de saklandı. Analiz sırasında böbrek doku örnekleri, soğuk fosfat tamponunda (pH 7,4) homojenizatör (MM400 Mikserli Öğütücü, Retsch, Haan, Germany) ile homojenize edildi. Homojenatlar, 12.000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 12 dakika santrifüj (MIKRO 220R, Hettich, Tuttlingen, Germany) edildi ve süpernatantlar toplandı.

Kan örnekleri sarı kapaklı standart kan tüplerine alındıktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj (NF 1200, Nüve, Türkiye) edildi. Elde edilen serum örnekleri analiz yapılınca kadar -80°C 'de saklandı.

İdrar örnekleri ise 3000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım alınarak -20 °C'de saklandı.

Biyokimyasal analizler, böbrek dokusundan elde edilen süpernatantlarda ve serumda çalışmaya uygun kitler kullanılarak üretici firmanın verdiği talimatlara göre enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) yöntemi ile yapıldı. Çalışmaya başlanmadan önce tüm kitlerdeki reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Ardından stok çözeltisi kullanılarak sulandırılmış standartlar hazırlandı. Yıkama tamponu distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Mikroplağın standart kuyucuklarına 50 µl standart konuldu. Daha sonra standart içeren kuyucuklar hariç diğer kuyucuklara 40 µl örnekler eklendi. Örnek içeren kuyucuklara, kullanılan kitin antikoru (10 µl sıçan anti-KIM-1 antikoru, sıçan anti-ACE2 antikoru, sıçan anti-Ang (1-7) antikoru, anti-ANG-2 antikoru) yerleştirildi. Daha sonra kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi (Shaker&CO₂ Incubator, NB-203QS, N-Biotek, Republic of Korea). İnkübasyondan sonra mikrolaktaki kuyucuklar 200 µl yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandıktan sonra kuyucuklara 50 µl substrat solüsyonu A ve 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Mikroplağın üzeri kapatılarak 10 dakika 37 °C'de karanlıkta tutuldu. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve reaksiyon durduruldu. Mikroplak, 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (Thermo Scientific, Multiskan GO, UK) absorbans değerlerini elde etmek için okundu.

Böbrek dokusundan elde edilen süpernatantlarda ve serumda ayrıca TOS, TAS (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey) ve elde edilen değerlerle oksidatif stres indeksi (OSI) belirlendi. TOS ölçümü için örneklerden ve kitin içinden çıkan standartlardan 15 µl alınıp mikrolaktaki kuyucuklara yerleştirildi. Örneklerin yüklendiği kuyucuklara 100 µl R1 reaktifi eklendi ve 530 nm dalga boyunda ilk absorbans ölçümü (Thermo Scientific Multiskan FC, USA) yapıldı. Bu ölçümden sonra kuyucuklara 5 µl kitin içinde bulunan R2 reaktifi eklendi ve oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 530 nm dalga boyunda ikinci absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar, dokuda µmol H₂O₂ Equiv./g serumda ise µmol H₂O₂ Equiv./L olarak verildi.

TAS ölçümü için örneklerden ve kitin içinden çıkan standartlardan 6 µl alınıp mikrolaktaki kuyucuklara yerleştirildi. Örneklerin yüklendiği kuyucuklara 100 µl R1 reaktifi eklendi ve 660 nm dalga boyunda ilk absorbans ölçümü (Thermo Scientific Multiskan FC, USA) yapıldı. Bu ölçümden sonra kuyucuklara 15 µl R2 reaktifi eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübasyona

bırakıldı. Ardından 660 nm dalga boyunda ikinci absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar, dokuda mmol Trolox Equiv./g serumda ise mmol Trolox Equiv./L olarak verildi.

Oksidatif stres indeksi (OSI), TOS ve TAS değerleri belirlendikten sonra (TOS/TAS) x 100 formülü kullanılarak hesaplandı.

3.4. WESTERN BLOT ANALİZİ

Doku örneklerin protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile BCA assay kit (ThermoFisher, USA) kullanılarak belirlendi. Çalışılacak örnekler, oranları 1:10 olacak şekilde sulandırıldı. Sığır serum albumin (BSA) standartları (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0,0625 mg/ml) hazırlandı. Çalışma solüsyonu, A ve B reaktif oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra, örnekler ile standartlar (25 µl) ve çalışma solüsyonu (175 µl) mikroyağına yüklendi. Mikroplak, 30 dakika boyunca 37 °C’de karanlıkta tutuldu. Sonuçlar, mikroyağın 562 nm dalga boyunda okuyucuda (Thermo Scientific Microplate Reader, ABD) okunmasıyla belirlendi. Sonuçların hesaplanması lineer grafik çizilerek yapıldı ve örnekler 35 µg olacak şekilde sulandırıldı.

Jeldeki örnek kuyuları için örnek ve Laemmli örnek tamponu (2x) ependorf içine konulduktan sonra 5-10 dakika 95 °C’de inkübe edildikten sonra örnekler buz üstünde bekletildi. Jeller, kitin protokolüne göre (Bio-Rad TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit) hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve yürütme tamponu (1x) eklendi. Jele örnekler (17 µl) ve protein belirteci (6 µl) (BLUltra Prestained Protein Ladder, BIO-HELIX - PM001-0500) yüklendikten sonra Western blot (Biorad, USA) sisteminde 1 saat boyunca 120 mV akımda yürütüldü. Bu işlemten sonra jel sistemden çıkarılarak distile suda bekletildi. Transfer aşamasında poliviniliden diflorid (PVDF) membran, 30 saniye metanol içerisinde tutulduktan sonra PVDF membran sırasıyla 3 dakika distile suda ve 5 dakika transfer tamponunda tutularak hazırlandı. Transfer aşaması için kasetin en altına sünger, üstüne PVDF membran, jel ve sünger konularak 30 dakikalık transfer protokolü seçildi ve blotlama işlemi yapıldı. Daha sonra membran 37 °C’de 1 saat boyunca %5’lik BSA içeren TBS-T (Tris tamponlu salin-Tween 20) içerisinde çalkalayıcıda tutuldu ve sonra TBS-T ile 5 kere 5 dakika yıkandı. Bu işlemin ardından primer antikorlar %2,5’luk BSA içeren TBS-T ile 1:300 olacak şekilde hazırlandıktan sonra membranın üzerine yerleştirildi. Bu işlemler, her bir antikor [renin (ab180608, Abcam), Ang I (H-002-01, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.), Ang II (H002-12, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.), Ang (1-7) (H-002-24, Phoenix

Pharmaceuticals, Inc.), ACE (sc-20791, Santa Cruz) ACE2 (GTX15348, GeneTex), miyeloperoksidaz (MPO) (Thermo Fisher Scientific, RB-373-A)] için tekrar edildi. Primer antikör ile membran bir gece +4 °C’de inkübe edildikten sonra 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkandı. Daha sonra sekonder antikör (anti-rabbit IgG, Cell signaling Tech., ABD) %2,5’luk BSA içeren TBS-T ile 1:1000 oranında hazırlarak membran yerleştirildi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda tutuldu. Ardından membran 3 kere 10 dakika TBS-T ile yıkandı. Membranın görüntülenmesi amacıyla kitin içindeki (Western Blotting Luminol Reagent kit, Thermo Fisher, USA) 3 ml reaktiflerden alınarak hazırlanan karışım ile membran yaklaşık 1 dakika karanlık ortamda tutuldu (Hirano, 2012). Membrandaki bantların görüntüleme sisteminde (Vilbert Laurmart Fusion Fx5, Fransa) görüntüsü alındı ve değerlendirildi.

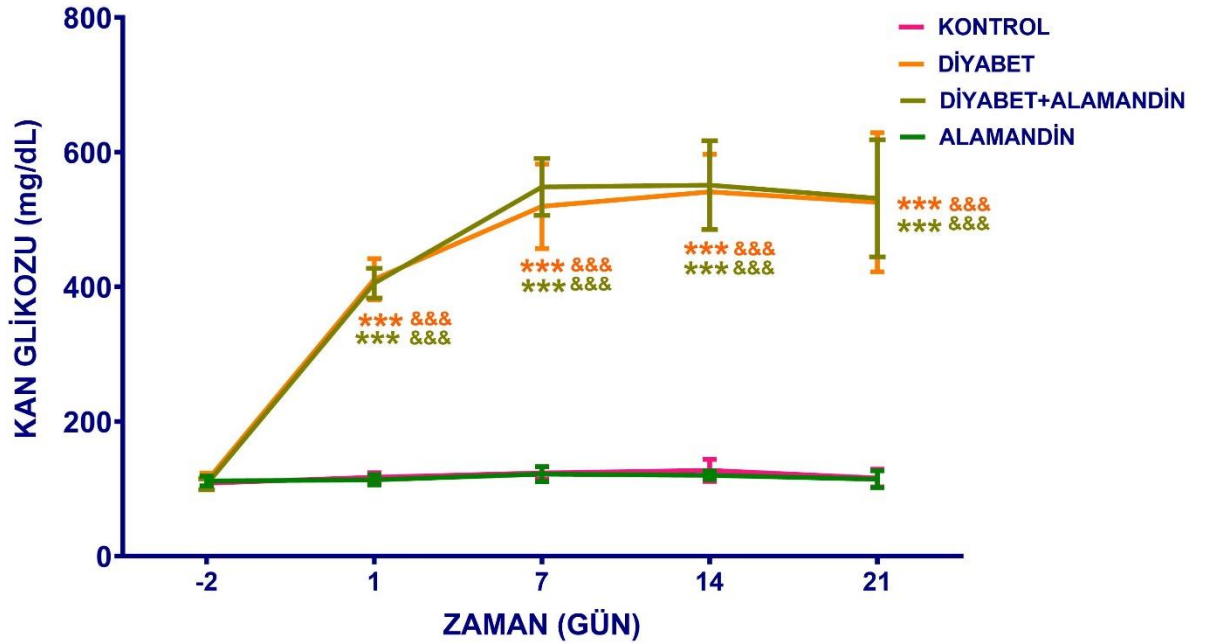
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmadan elde edilen veriler, Instat İstatiksel Paket Programı (GraphPad Prism 10.1.2, San Diego, CA, ABD) aracılığı ile analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Gruplarının dağılımının, normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Normal dağılım göstermeyen verilere Kruskal Wallis testi (parametrik olmayan test), normal dağılıma sahip verilere tek yönlü ANOVA uygulanarak Tukey testleri yapıldı. Kan glikozu ile vücut ağırlıklarına ait veriler çift yönlü ANOVA uygulanarak Benforroni’nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney gruplarına ait hayvanların STZ uygulanmasından önce (-2. gün) ve STZ uygulanmasından 48 saat, 7, 14 ve 21 gün sonra ölçülen kan glikoz seviyeleri değerlendirildi. Diyabet grubunun kan glikoz seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 7, 14 ve 21. gün olmak üzere 4 ölçüm noktasında da arttığı belirlendi ($p<0,001$). Alamandin uygulanan diyabet grubunda kan glikoz seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p<0,001$) ve diyabet grubuna göre değişmediği saptandı. Sadece alamandin uygulanan grupta ise kan glikoz seviyelerinin kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.1).

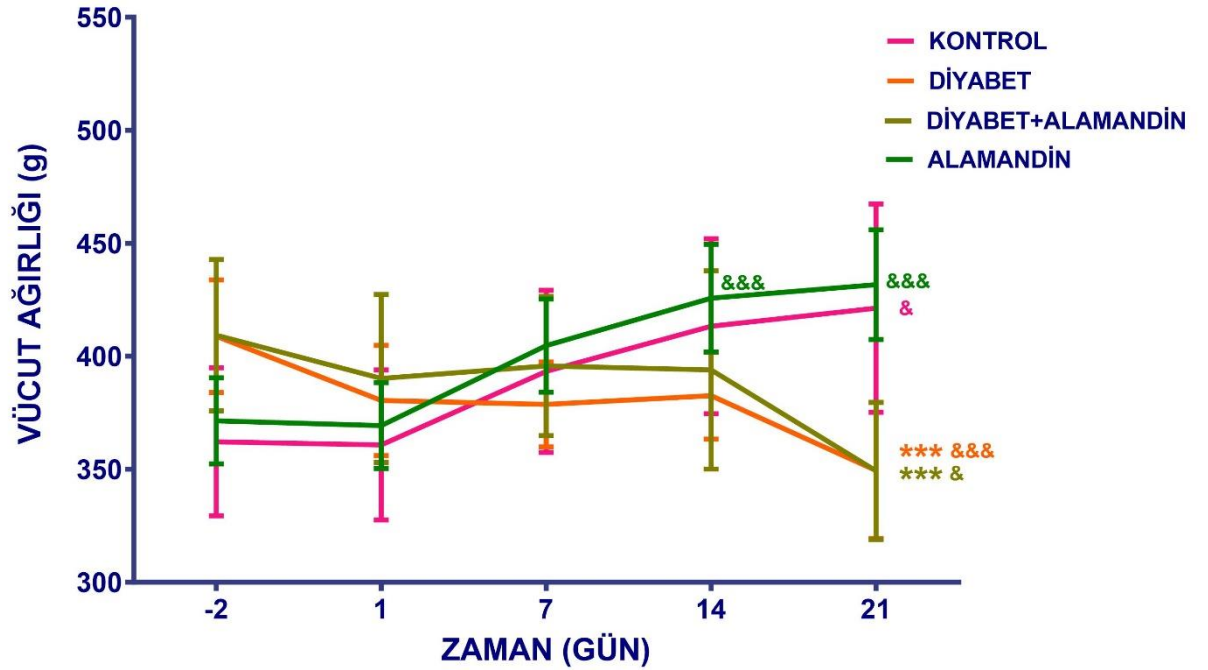
Her grubun deney boyunca ölçülen kan glikoz değerleri STZ uygulaması öncesinde yapılan ölçümlerle karşılaştırıldı. Diyabet ve Diyabet+Alamandin gruplarına ait kan glikoz değerlerinin deney boyunca ilk ölçülen değerlere göre arttığı ($p<0,001$) belirlendi. Kontrol ve alamandin gruplarında kan glikoz değerlerinin ise değişmediği tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Deney gruplarına ait kan glikoz değerleri [STZ uygulaması öncesi (-2. gün), STZ uygulamasından 48 saat sonra (deney başlangıcı (1. gün)), 7, 14 ve 21 gün sonra]. *** $p<0,001$: Kontrol grubuna göre anlamlılık. &&& $p<0,001$: STZ uygulaması öncesine (-2. gün) ait ölçülen değerlere göre anlamlılık.

Deney gruplarına ait hayvanların STZ uygulanmasından önce (-2. gün) ve STZ uygulanmasından 48 saat, 7, 14 ve 21 gün sonra ölçülen vücut ağırlıkları değerlendirildi. Diyabet ve Diyabet+Alamandin gruplarının vücut ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 21. günde azaldığı belirlendi ($p<0,001$). Sadece alamandin uygulanan grubun vücut ağırlıklarının kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2).

Her grubun deney boyunca ölçülen vücut ağırlıkları, STZ uygulaması öncesinde yapılan ölçümlerle karşılaştırıldı. Diyabet ve Diyabet+Alamandin gruplarına ait vücut ağırlıklarının deney sonunda STZ uygulamasından önce ölçülen değerlere göre azaldığı ($p<0,001$; $p<0,05$) belirlendi. Kontrol grubuna ait hayvanların vücut ağırlıklarının 21. günde ($p<0,05$), alamandin grubunun ise 14. ($p<0,001$) ve 21. ($p<0,001$) günde STZ uygulamasından önce ölçülen değerlere göre arttığı tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Deney gruplarına ait vücut ağırlık değerleri [STZ uygulaması öncesi (-2. gün), STZ uygulamasından 48 saat sonra (deney başlangıcı (1. gün)), 7, 14 ve 21 gün sonra]. *** $p<0,001$: Kontrol grubuna göre anlamlılık. & $p<0,05$, &&& $p<0,001$: STZ uygulaması öncesine (-2. gün) ait ölçülen değerlere göre anlamlılık.

4.1. KAN PARAMETRE BULGULARI

Deney gruplarına ait hayvanların deney sonunda abdominal aortadan alınan kan örneklerinde ölçülen pH, ctHb, cK⁺, cNa⁺, cCa²⁺, cCl⁻, cLac, ctBil ve cHCO₃⁻ değerleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Diyabet grubunda pH, ctHb, cK⁺, cNa⁺, cCa²⁺, cCl⁻, cLac, ctBil ve cHCO₃⁻ değerlerinin kontrole göre değişmediği ve kontrole benzer olduğu görüldü (Tablo 4.1.1). Diyabet+Alamandin grubunda kan örneklerindeki pH, ctHb, cK⁺, cCa²⁺, cLac, ctBil ve cHCO₃⁻ değerlerinin kontrol ve diyabet gruplarına benzer olduğu belirlendi. Bu gruba ait cNa⁺ değerinin kontrol grubuna göre (p<0,05), cCl⁻ değerinin ise kontrol (p<0,001) ve diyabet (p<0,05) gruplarına göre azaldığı saptandı. Sadece alamandin uygulanan grubun kan örneklerinde belirlenen cK⁺ değerlerinin kontrol (p<0,05) ve diyabet (p<0,01) gruplarına göre arttığı gözlemlendi. Buna ek olarak, alamandin grubunda cCl⁻ (p<0,01) ve cLac (p<0,01) değerlerinin Diyabet+Alamandin grubuna göre azaldığı belirlendi. Yine bu grupta cLac (p<0,01) değerlerinin diyabetik gruba göre azaldığı tespit edildi (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1: Deney gruplarına ait hayvanların kan örneklerinde ölçülen pH, ctHb, cK⁺, cCa²⁺, cLac, ctBil ve cHCO₃⁻ değerleri. *p<0,05, ***p<0,001: Kontrol grubuna göre anlamlılık. ⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,01: Diyabet grubuna göre anlamlılık. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01: Diyabet+Alamandin grubuna göre anlamlılık.

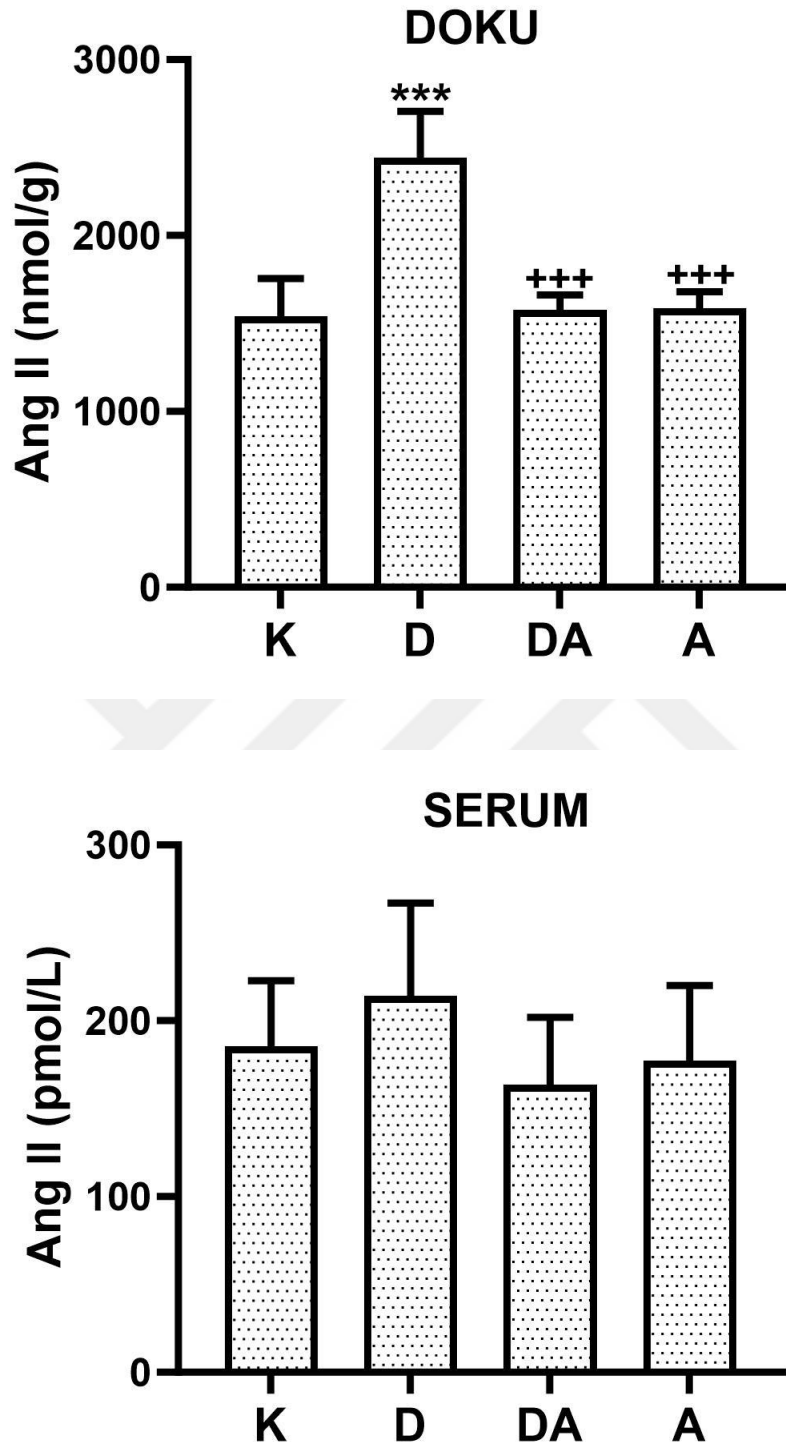
	Kontrol	Diyabet	Diyabet+ Alamandin	Alamandin
pH	7,385±0,019	7,347±0,043	7,366±0,023	7,377±0,031
ctHb (g/dl)	16,09±0,831	15,34±1,704	16,60±1,538	15,61±0,992
cK⁺ (mmol/L)	3,643±0,263	3,543±0,355	4,029±0,767	4,629±0,731 ^{***}
cNa⁺ (mmol/L)	146,1±3,288	145,0±3,559	140,1±4,598 [*]	142,9±3,579
cCa²⁺ (mmol/L)	1,143±0,195	1,034±0,093	1,201±0,154	1,190±0,157
cCl⁻ (mmol/L)	102,9±1,345	100,3±3,904	95,86±2,673 ^{***+}	101,9±2,116 ^{##}
cLac (mmol/L)	0,70±0,129	0,90±0,369	0,867±0,265	0,35±0,125 ^{++##}
ctBil (µmol/L)	31,43±2,992	29,00±5,598	28,29±6,775	29,14±4,981
cHCO₃⁻(P,st) (mmol/L)	26,34±0,820	25,34±1,514	26,69±1,706	26,26±1,196

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

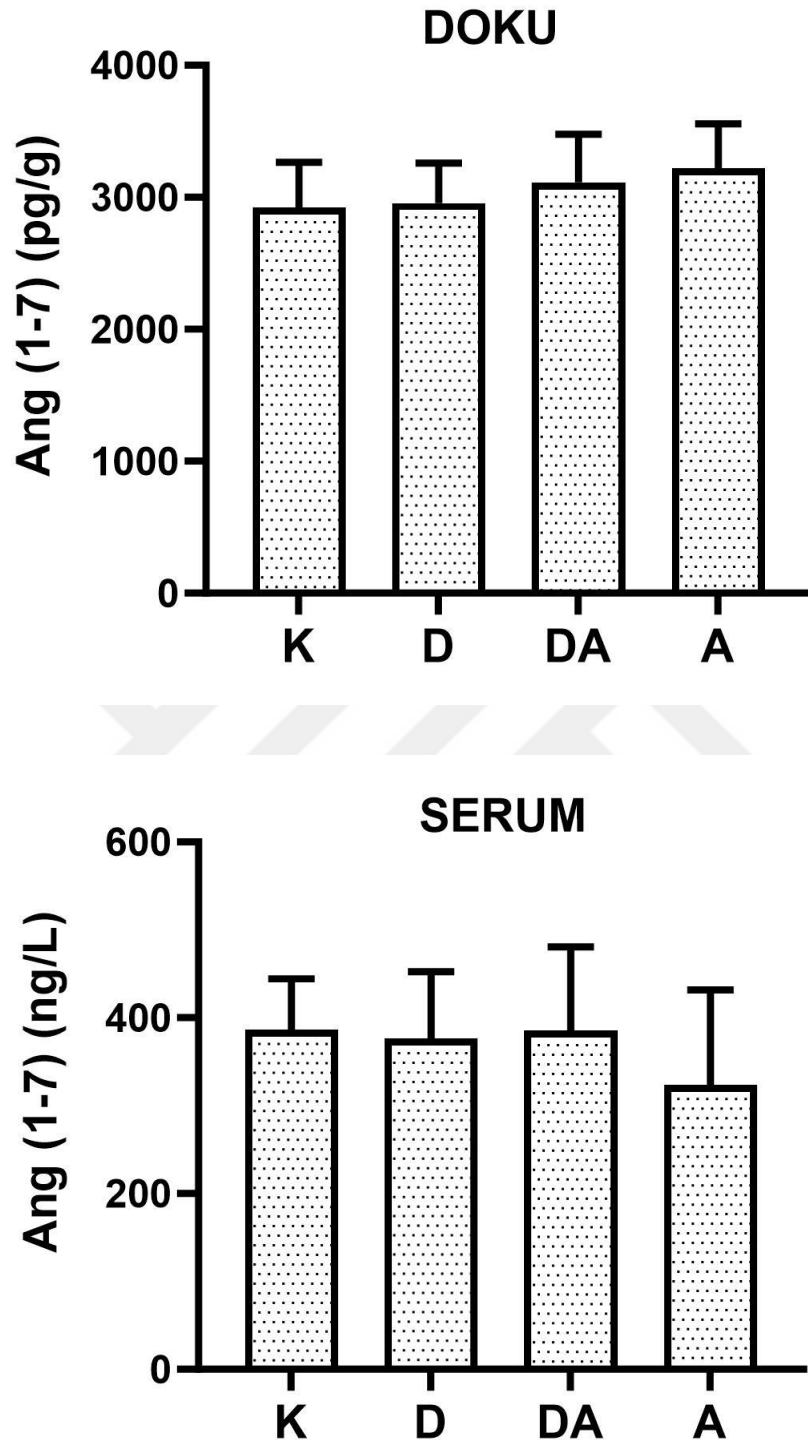
Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda Ang II seviyeleri incelendiğinde grupların arasında farklılıkların olduğu görüldü (Şekil 4.2.1). Diyabet grubunda Ang II seviyesinin dokuda kontrole göre arttığı saptandı ($p<0,001$). Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda dokuda Ang II seviyesini azalttığı ($p<0,001$) ve kontrole benzer olduğu tespit edildi. Alamandin grubunda dokudaki Ang II değerlerinin diyabet grubuna göre düşük ($p<0,001$) olduğu, ayrıca Diyabet+Alamandin ve kontrol grubuna benzer olduğu görüldü. Deney hayvanlarının serumlarındaki Ang II seviyeleri incelendiğinde diyabet grubunda arttığı alamandin uygulamasının ise azalttığı görüldü ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi (Şekil 4.2.1).

Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda Ang (1-7) seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıkların olmadığı tespit edildi (Şekil 4.2.2).

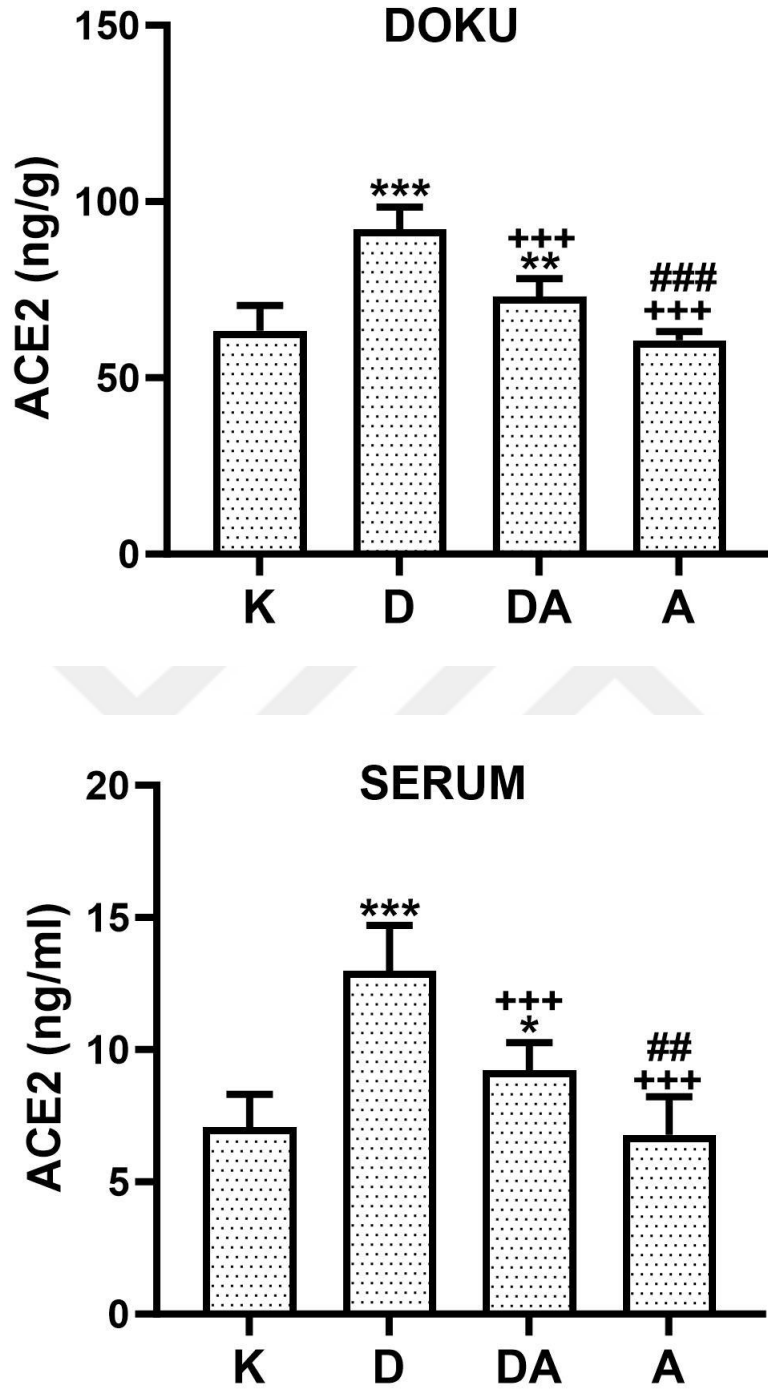
Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda ACE2 seviyeleri incelendiğinde grupların arasında farklılıkların olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.3). Diyabetik grupta hem dokuda hem serumda ACE2 değerlerinin kontrole göre arttığı saptandı ($p<0,001$). Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda ACE2 seviyesini azalttığı ($p<0,001$) ancak kontrole göre doku ve serumda bu değerlerin yüksek olduğu ($p<0,01$; $p<0,05$) belirlendi. Alamandin grubunda ACE2 değerlerinin hem dokuda hem serumda diyabet ($p<0,001$) ile Diyabet+Alamandin grubuna ($p<0,001$; $p<0,01$) göre düşük ve kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.1: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde Ang II (Angiotensin II) değerleri. *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. (DA) Diyabet+Alamandin ve (A) Alamandin grubu.



Şekil 4.2.2: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde Ang (1-7) (Angiotensin (1-7)) değerleri. (K) Kontrol, (D) Diyabet, (DA) Diyabet+Alamandin ve (A) Alamandin grubu.

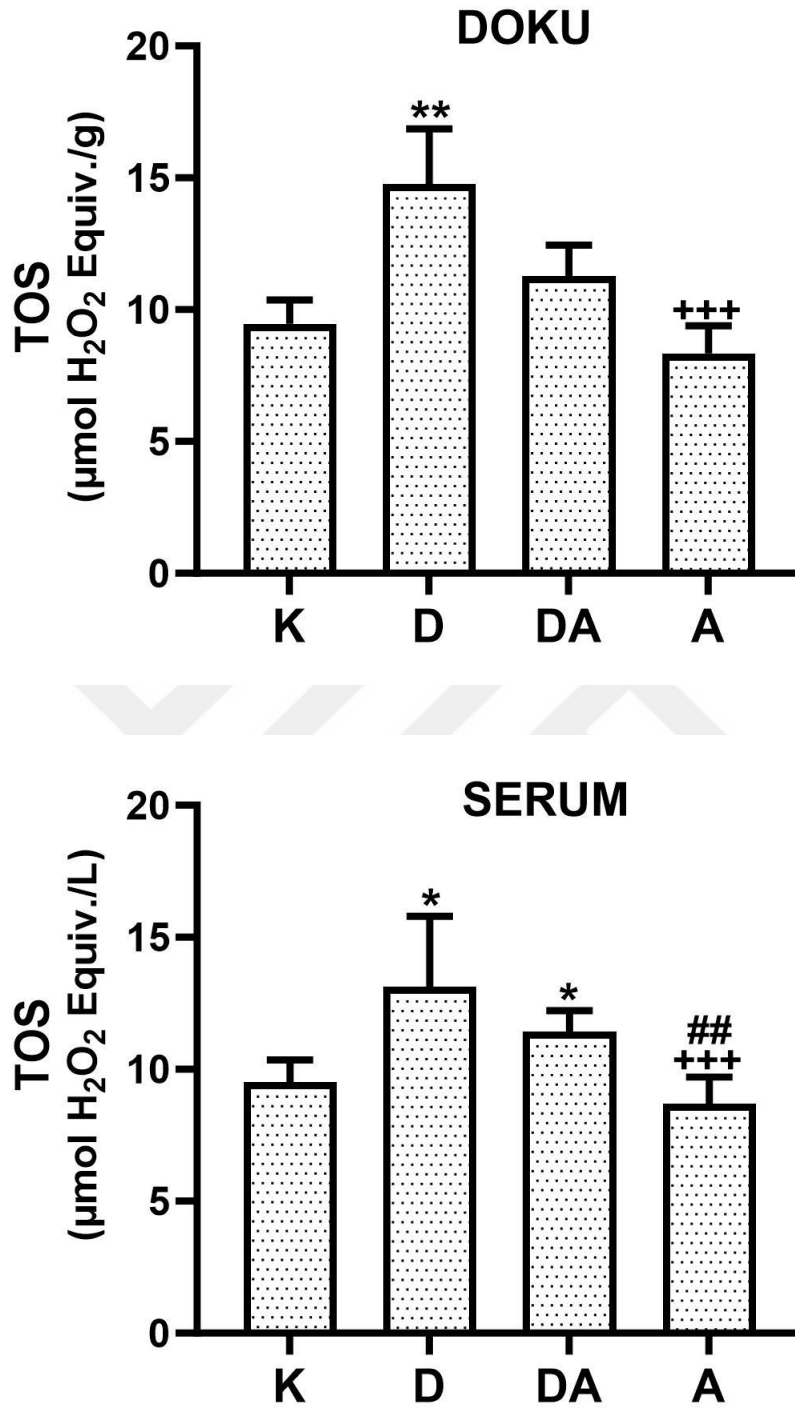


Şekil 4.2.3: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde ACE2 (Angiotensin dönüştürücü enzim 2) değerleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.

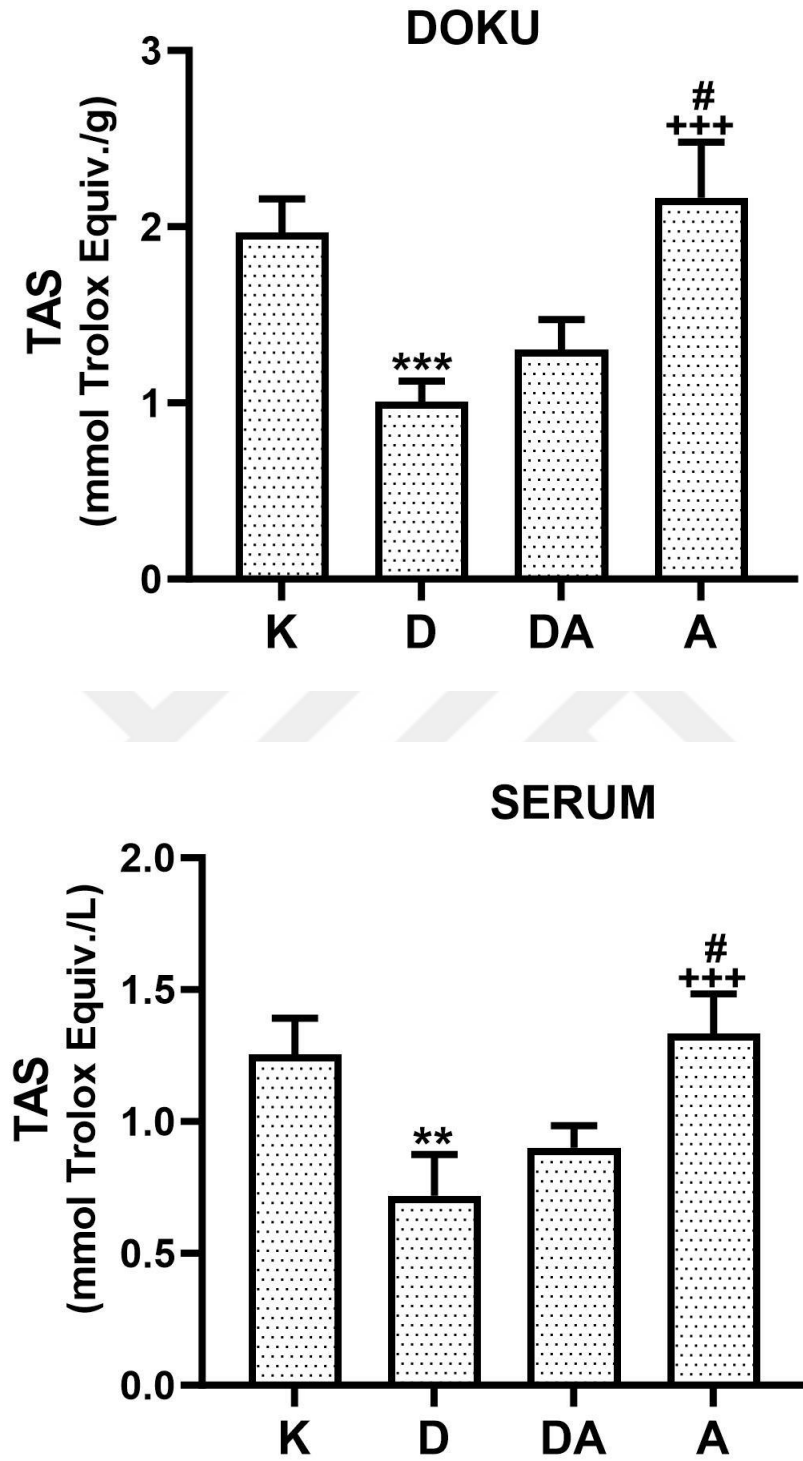
Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda TOS seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.4). Diyabet grubunda hem dokuda ($p<0,01$) hem de serumda ($p<0,05$) TOS değerlerinin kontrole göre arttığı görüldü. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda dokudaki TOS seviyesini azalttığı ve bu değerlerin kontrole benzer olduğu belirlendi. Ancak bu grubun serum örneklerinde TOS seviyesinin kontrole göre yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Alamandin grubunda TOS değerlerinin dokuda diyabet grubuna göre ($p<0,001$), serumda hem diyabet ($p<0,001$) hem de Diyabet+Alamandin grubuna ($p<0,01$) göre düşük olduğu ve kontrole benzer olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.4).

Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda TAS seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar belirlendi (Şekil.4.2.5). Diyabet grubunda dokuda ($p<0,001$) ve serumda ($p<0,01$) TAS değerlerinin kontrole göre azaldığı saptandı. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda TAS seviyesini kontrole yaklaştırdığı belirlendi. Alamandin grubunda TAS değerlerinin dokuda ve serumda hem diyabet ($p<0,001$) hem de Diyabet+Alamandin grubuna ($p<0,05$) göre yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.5).

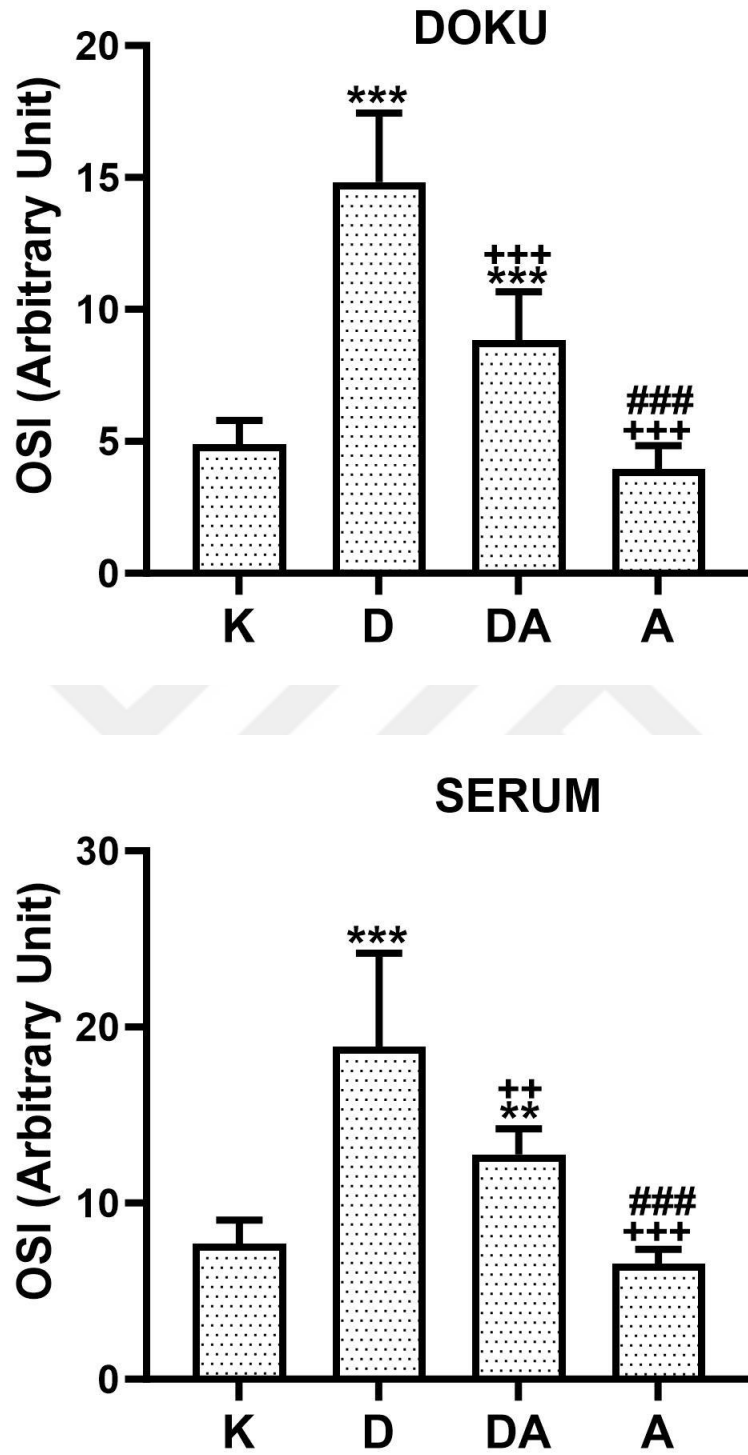
Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda OSI incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi (Şekil.4.2.6). Diyabet grubunda hem dokuda hem de serumda OSI değerlerinin kontrole göre arttığı ($p<0,001$) görüldü. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda hem dokuda ($p<0,001$) hem de serumda ($p<0,01$) OSI değerini azalttığı ancak kontrole göre yüksek olduğu ($p<0,001$; $p<0,01$) belirlendi. Alamandin grubunda OSI değerinin dokuda ve serumda diyabet ($p<0,001$) ve Diyabet+Alamandin grubuna ($p<0,001$) göre düşük olduğu ayrıca kontrole benzer olduğu saptandı (Şekil 4.2.6).



Şekil 4.2.4: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde TOS (total oksidan kapasite) değerleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ## $p < 0,01$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.



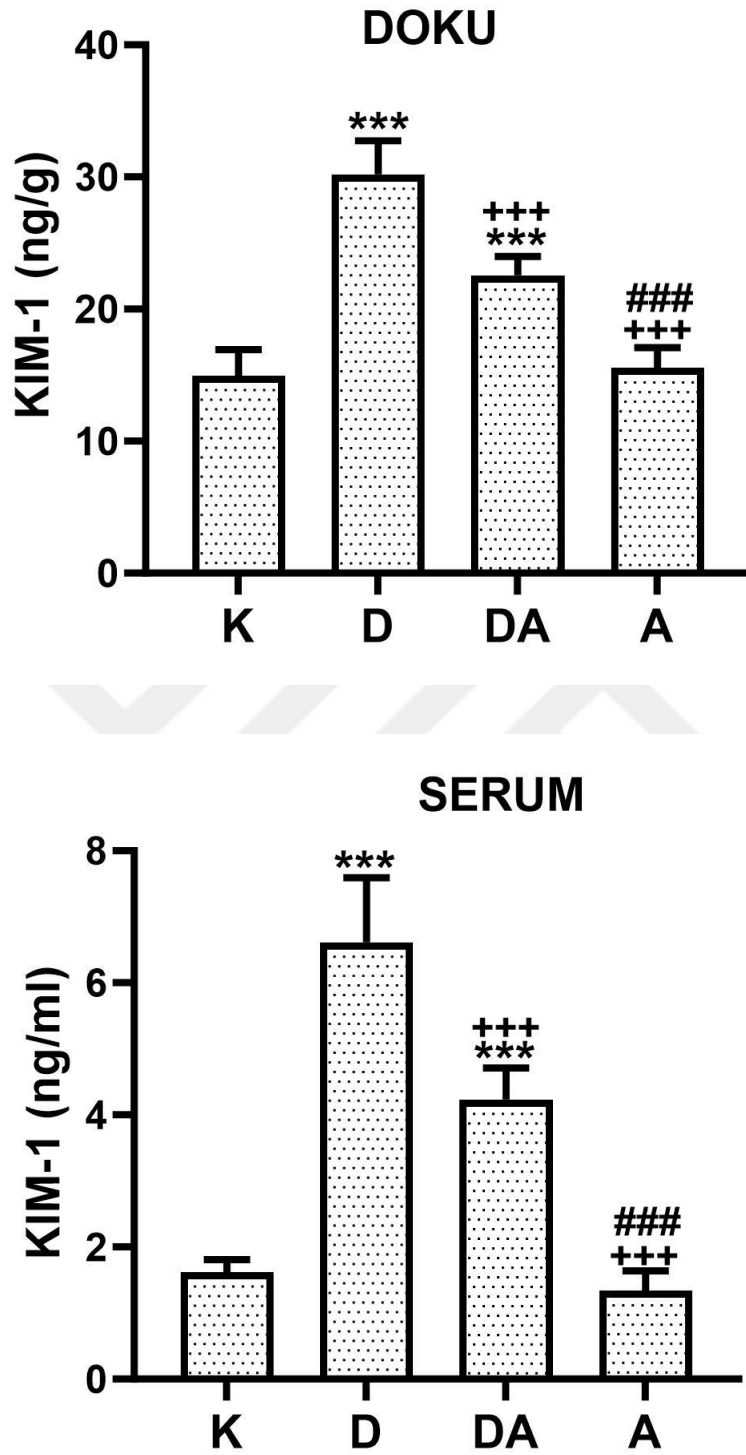
Şekil 4.2.5: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde TAS (total antioksidan kapasite) değerleri. **p<0,01, ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. #p<0,05: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.



Şekil 4.2.6: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde OSI (oksidatif stres indeksi) değerleri. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.

Deney hayvanlarının böbrek dokusunda ve serumunda KIM-1 seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar görüldü (Şekil 4.2.7). Diyabet grubunda hem dokuda ($p<0,001$) hem serumda ($p<0,001$) KIM-1 değerlerinin kontrole göre arttığı saptandı. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda dokuda ve serumda KIM-1 seviyesini azalttığı ($p<0,001$) ancak kontrole göre yüksek olduğu ($p<0,001$) tespit edildi. Alamandin grubunda KIM-1 değerlerinin dokuda ve serumda diyabet ($p<0,001$) ile Diyabet+Alamandin grubuna göre düşük ($p<0,001$) olduğu ve kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2.7).



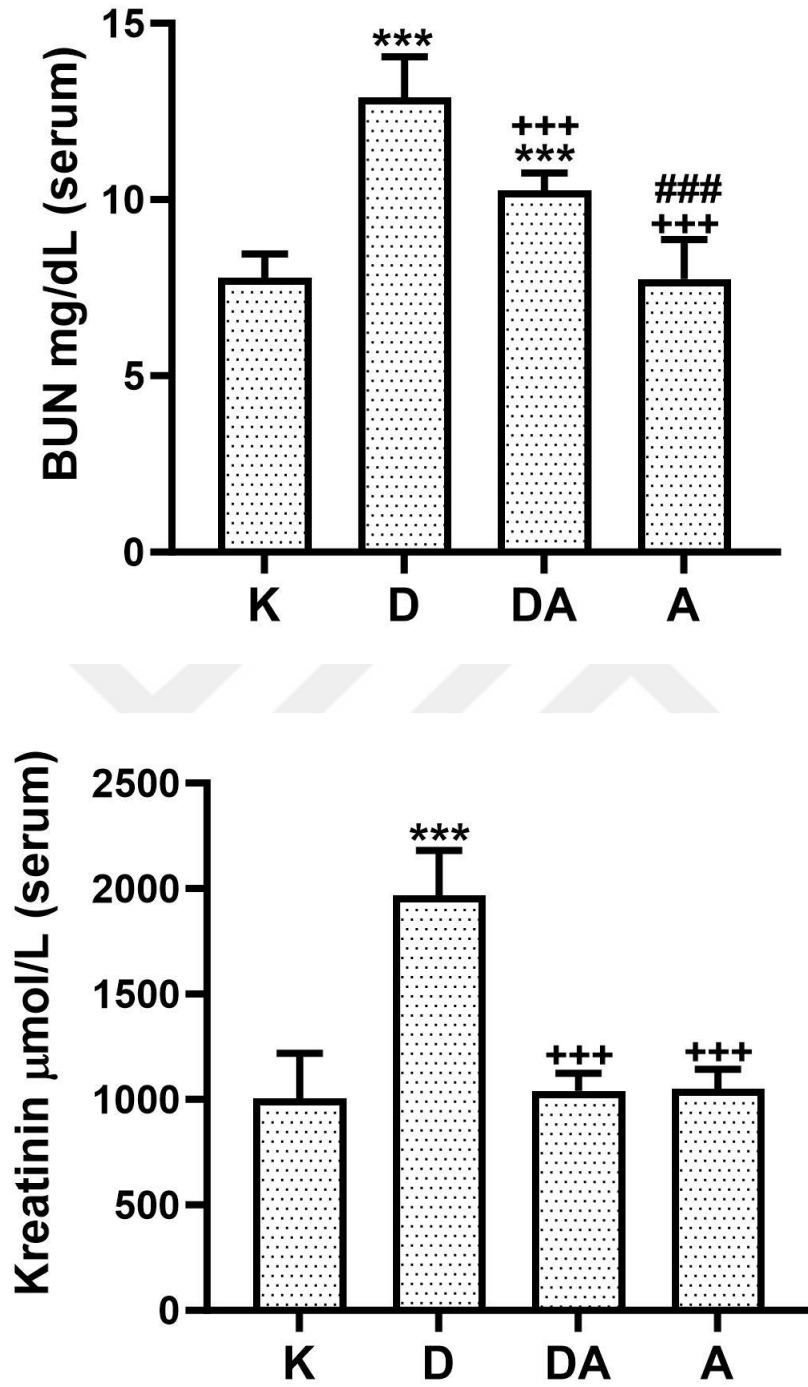


Şekil 4.2.7: Deney gruplarına ait doku ve serum örneklerinde KIM-1 (böbrek hasar molekülü-1) değerleri. *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ### $p < 0,001$ Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.

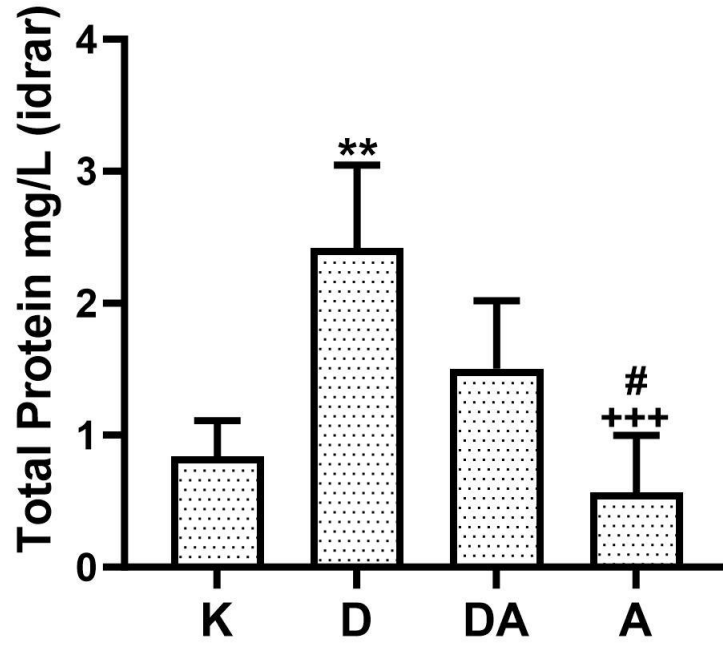
Deney hayvanlarının serum örneklerindeki BUN seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar saptandı (Şekil 4.2.8). Diyabet grubunda BUN değerlerinin kontrole göre arttığı ($p<0,001$) tespit edildi. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplarda BUN seviyelerini azalttığı ($p<0,001$) ancak kontrole göre yüksek olduğu ($p<0,001$) belirlendi. Alamandin grubunda BUN değerlerinin diyabet ($p<0,001$) ve Diyabet+Alamandin ($p<0,001$) gruplarına göre düşük olduğu ayrıca kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2.8).

Deney hayvanlarının serum kreatinin seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar görüldü (Şekil 4.2.8). Diyabet grubunda kreatinin değerlerinin kontrole göre arttığı ($p<0,001$) saptandı. Alamandin uygulamasının diyabetik gruplardaki kreatinin seviyesini azalttığı ($p<0,001$) ve kontrole benzer olduğu tespit edildi. Alamandin grubunda kreatinin değerlerinin diyabet grubuna göre düşük ($p<0,001$) ve kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2.8).

Deney hayvanlarının idrar örneklerinde total protein seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar görüldü (Şekil 4.2.9). Diyabet grubunda idrarda total protein değerlerinin kontrole göre arttığı ($p<0,01$) saptandı. Diyabet+Alamandin grubunda idrardaki total protein seviyelerinin kontrole benzer olduğu belirlendi. Alamandin grubunda total protein değerlerinin diyabet ($p<0,001$) ve Diyabet+Alamandin grubuna göre ($p<0,05$) düşük ve kontrole benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2.9).



Şekil 4.2.8: Deney gruplarına serum örneklerinde BUN (kan üre azotu) ve kreatinin değerleri. ***p<0,001: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++p<0,001: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ###p<0,001 Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.



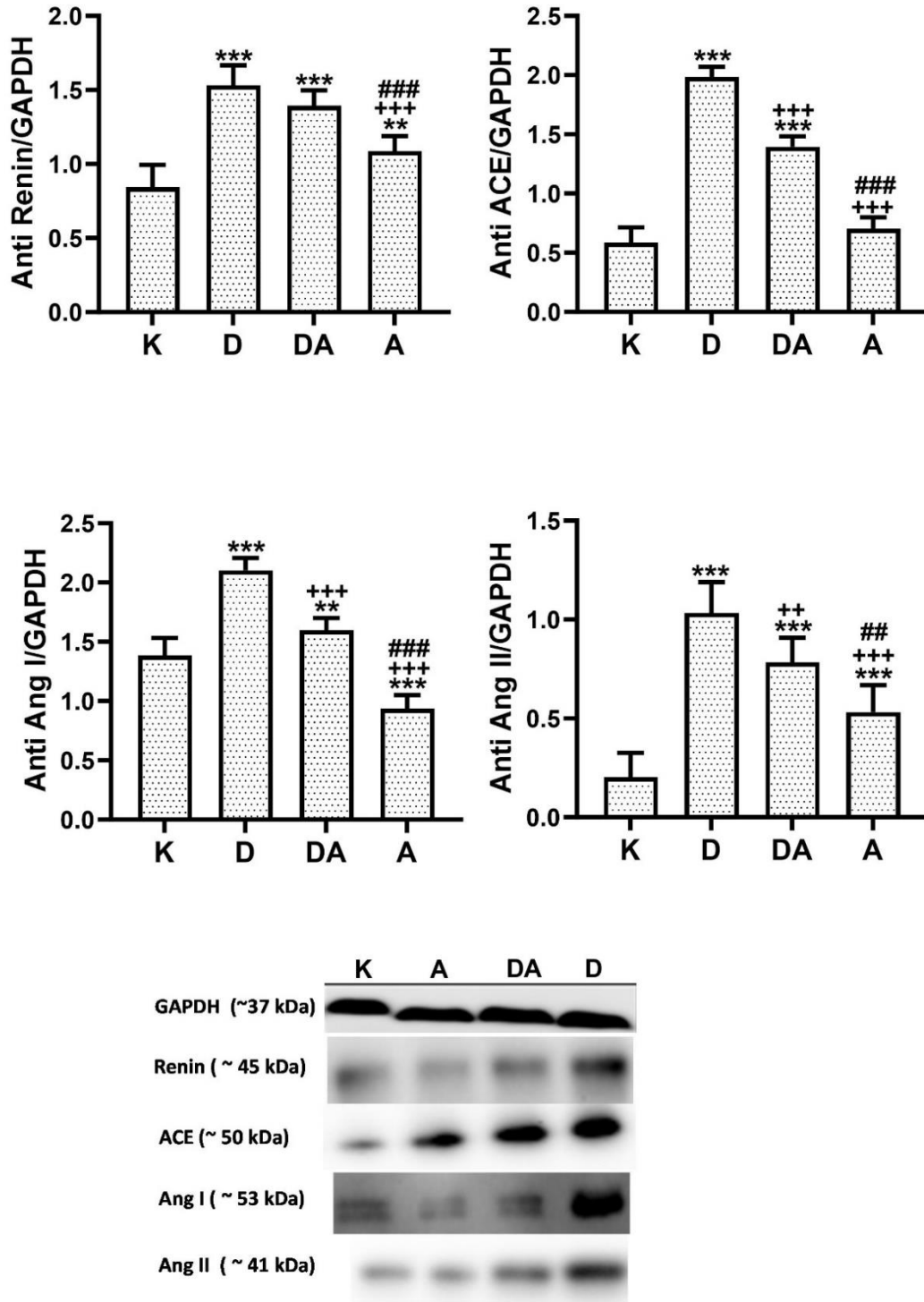
Şekil 4.2.9: Deney gruplarına ait idrar örneklerinde total protein değerleri. ** $p < 0,01$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. # $p < 0,05$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.

4.3. WESTERN BLOT ANALİZ BULGULARI

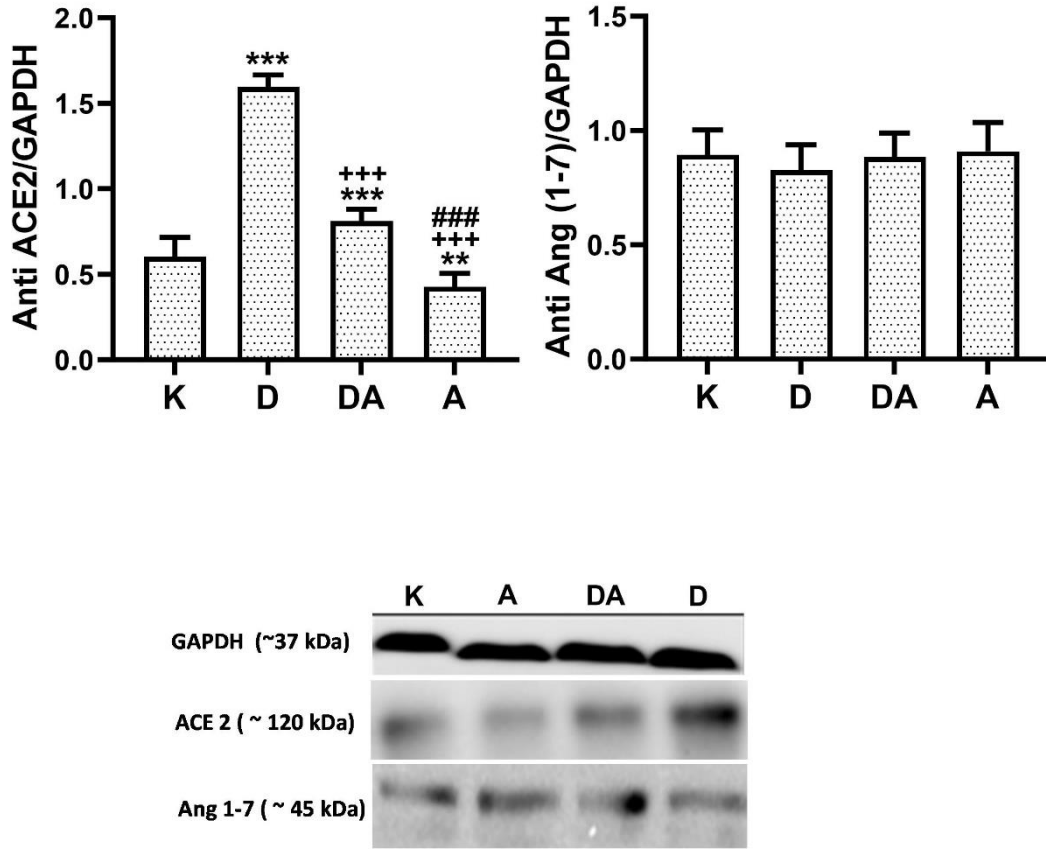
Deney hayvanlarından alınan böbrek örneklerinde RAS yolağında bulunan renin, Ang I, Ang II, ACE ve ACE2 unsurları ile lökosit infiltrasyonunun dolayısıyla inflamasyonun bir göstergesi olan MPO Western blot yöntemi ile incelendiğinde grupların arasında farklılıklar belirlendi (Şekil 4.3.1-4.3.3).

Diyabet grubunda renin ($p<0,001$), Ang I ($p<0,001$), Ang II ($p<0,001$), ACE ($p<0,001$) ve ACE2 ($p<0,001$) anlatımının kontrole göre arttığı saptandı (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2). Diyabet+Alamandin grubunda Ang I ($p<0,001$), Ang II ($p<0,01$), ACE ($p<0,001$) ve ACE2 ($p<0,001$) değerlerinin diyabet grubuna göre azaldığı ancak kontrole göre bu değerlerin yüksek olduğu (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$) saptandı (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2). Bu grupta renin değerlerinin diyabet grubuna göre değişmediği tespit edildi. Alamandin grubunda, kontrole göre renin ($p<0,01$) ve Ang II ($p<0,001$) değerlerinin yüksek, Ang I ($p<0,001$) ve ACE2 ($p<0,01$) değerlerinin düşük olduğu görüldü (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2). Yine bu grupta, renin, Ang I, Ang II, ACE ve ACE2 değerlerinin diyabet ($p<0,001$) ve Diyabet+Alamandin ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,001$) gruplarına göre düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2). Ang (1-7) seviyeleri incelendiğinde grupların arasında anlamlı farklılıklar görülmedi (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2).

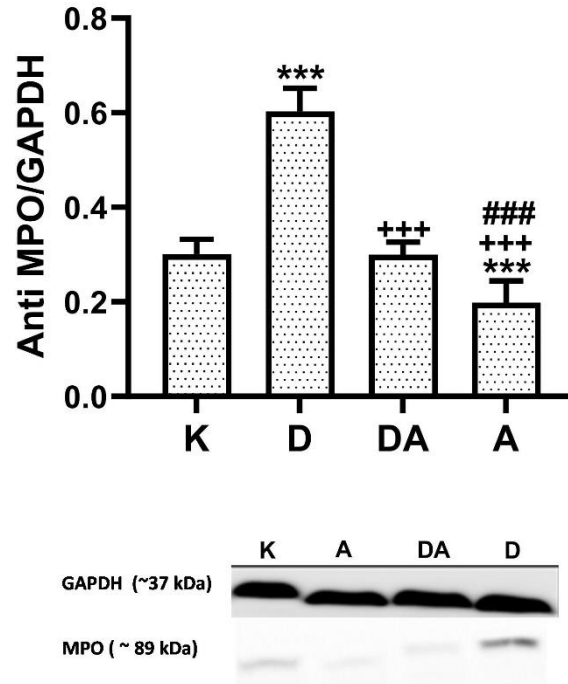
Deney gruplarının böbrek örneklerinde MPO seviyeleri değerlendirildiğinde diyabetik grupta arttığı ($p<0,001$), alamandin uygulamasının bu artışı önlediği ($p<0,001$) ve kontrol seviyesine düşürdüğü görüldü. Alamandin grubunda dokudaki MPO değerlerinin kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplara göre azaldığı ($p<0,001$) tespit edildi (Şekil 4.3.3).



Şekil 4.3.1: Deney gruplarına ait doku örneklerinde renin, ACE (Angiotensin dönüştürücü enzim), Ang I (Angiotensin I) ve Ang II (Angiotensin II) protein seviyeleri ve protein bandları. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandine (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandine grubu.



Şekil 4.3.2: Deney gruplarına ait doku örneklerinde ACE2 (Angiotensin dönüştürücü enzim 2) ve Ang (1-7) (Angiotensin (1-7)) protein seviyeleri ve protein bandları. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. *** $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ### $p < 0,001$ Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.



Şekil 4.3.3: Deney gruplarına ait doku örneklerinde MPO (mieloperoksidaz) protein seviyeleri ve protein bandları. *** $p < 0,001$: Kontrol (K) grubuna göre anlamlılık. +++ $p < 0,001$: Diyabet (D) grubuna göre anlamlılık. ### $p < 0,001$: Diyabet+Alamandin (DA) grubuna göre anlamlılık. (A) Alamandin grubu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

DM, küresel prevalansı ve insidansı giderek artan, insülin salınımı, insülinin etkisi veya her ikisinde oluşan kusurlar sebebiyle görülen hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Klinik semptomları poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, yorgunluk ve görme kusurlarını içermektedir. Diyabetik bireylerde, ciddi metabolik düzensizlikler ile birlikte ketoasidoz veya hiperozmolar ketotik olmayan koma da meydana gelebilir (American Diabetes Association, 2013; Lim ve Taylor, 2024; World Health Organization (WHO), 1999).

DM, uzun vadeli mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere farklı komplikasyonların gelişimi ile ilişkilendirilir. Mikrovasküler komplikasyonlar içerisinde retinopati, nefropati, periferik nöropati ile gastrointestinal ve kardiyovasküler semptomlar ile cinsel fonksiyon bozukluklarına neden olan otonom nöropati bulunmaktadır (American Diabetes Association, 2013; Lim ve Taylor, 2024; World Health Organization (WHO), 1999). Makrovasküler komplikasyonlar arasında aterosklerotik kardiyovasküler, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalıkların görülme sıklığının arttığı kardiyovasküler hastalıklar ile kalp yetmezliği yer alır (American Diabetes Association, 2013; Lim ve Taylor, 2024; World Health Organization (WHO), 1999).

DM ile ilişkili komplikasyonların gelişimi büyük ölçüde hipergliseminin derecesine ve süresine bağlıdır. Yüksek glikoz konsantrasyonları, böbrekte endotelial hücreler, düz kas hücreleri, mezangiyal hücreler, podositler, tübüler ve toplayıcı kanal sistemi hücreleri, inflamatuvar hücreler ve miyofibroblastlar dahil olmak üzere birçok hücre tipini etkileyen spesifik hücresel etkilere neden olur (Vallon ve Komers, 2011). Artan ve dalgalanan kan glikoz düzeyleri ile mikrovasküler komplikasyonların gelişimi arasında birçok farklı yolun aracı olarak rol oynadığı giderek daha belirgin hale gelmiştir (Flyvbjerg, 2024; Lim ve Taylor, 2024). Bizim çalışmamızda, T1DM'nin en sık kullanılan modellerinden biri olan STZ uygulamasıyla deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur (Vallon ve Komers, 2011). Bir β hücre toksini olan STZ, 24 ile 36 saat içinde β hücre yıkımına ve insülin salgılanmasındaki bozukluklara bağlı olarak diyabete yol açmaktadır. İnsülin tedavisi olmadan, STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda şiddetli hiperglisemi, dehidrasyon, yavaş kilo alımı ve buna karşılık gelen polidipsi ve hiperfaji gelişmektedir (Vallon ve Komers, 2011). Çalışmamızda, STZ uygulandıktan 48 saat sonra ölçülen kan glikoz değerlerinin artarak 280 mg/dl'nin üzerine çıktığı ve diyabetik

hipergliseminin meydana geldiği görülmüştür. Deney boyunca yedi gün aralıklarla yapılan ölçümlerde kan glikoz değerlerinin diyabetik bireylerde yüksek seyrettiği saptanmıştır. Buna ek olarak deney boyunca aynı zaman aralıklarında ölçülen vücut ağırlıklarının diyabetik bireylerde azaldığı ve belirgin kilo kaybının olduğu tespit edilmiştir.

Diyabetik nefropati, böbreklerin yapısında ve fonksiyonunda diyabete bağlı gelişen bozuklukları içermektedir. Diyabetik nefropati, kan basıncında artışın ve glomerular filtrasyon hızında azalmanın eşlik ettiği idrar albumin atılımında artış ve sonunda son dönem böbrek hastalığına neden olabilir (Barnard-Kelly ve Holt, 2024). Böbrek hastalıklarında böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için serumda kreatinin ve BUN, idrarda albumin ve total protein seviyeleri ölçülmektedir (Arıcı, 2019; Rossing ve Flyvbjerg, 2024). GFH azaldıkça serum kreatinin değerleri normal değerlerin üstüne çıkar (Arıcı, 2019). Böbrek kan akımı azaldığında böbrek tübüllerinden üre geri emilimi artar ve azalan GFH'ye karşın kanda yükselir. Protein metabolizmasının bir ürünü olan üre içindeki nitrojen ölçülerek BUN belirlenir. Bunlara ilaveten böbrek hasarına bağlı olarak glomerular bariyerin bozulması ya da tübüler hasar nedeniyle albumin ve diğer kan proteinlerinin idrarla kaybı meydana gelebilir (Arıcı, 2019). Diyabetik farelerde hiperglisemiye eşlik eden vücut ağırlığında önemli azalmalar ile birlikte idrar albuminindeki artışın diyabette böbrek fonksiyon bozukluğunun bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür (Zheng ve diğ. 2019). Yang ve diğ. (2017), hem STZ uygulanarak diyabet oluşturulan C57BL/6 farelerle hem de diyabetik nefropatisi olan hastalarla çalışmalar yapmıştır. Diyabetik farelerde vücut ağırlıklarının azaldığı ve kan glikoz değerlerinin, serum kreatinin, BUN, total trigliserid ile total kolesterol düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (Yang ve diğ. 2017). Diyabetik nefropati hastalarında ise kan glikoz ve hemoglobin A1c (HbA1c) düzeylerinde artışın yanı sıra 24 saatlik idrarda protein atılımının, serum kreatinin ve BUN seviyelerinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Yang ve diğ. 2017). STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan C57BL/6 farelerde vücut ağırlık kaybı ve hiperglisemi ile birlikte serumda kreatinin ve idrarda albumin düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2019).

Bizim çalışmamızda da böbrek fonksiyonları BUN, kreatinin ve total protein seviyeleri aracılığıyla değerlendirildiğinde diyabetik hayvanlarda, serumda BUN ve kreatinin, idrarda total protein seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Böbrekler vücudun elektrolit dengesinin ve kan pH'sının düzenlenmesinde de fonksiyonel olduğundan elektrolit dengesindeki bozuklukların şiddeti böbrek hasarının derecesini ve bireyin katabolik durumunu yansıtmaktadır. (Çalışkan

ve Yildiz, 2010). Bizim çalışmamızda da arteriyal kanda pH, K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , HCO_3^- ile laktat ve bilirubin gibi belirli kan parametrelerinin ölçümü yapılmıştır. Diyabetik bireylerde kan pH'sının, HCO_3^- seviyeleri ile laktat değerlerinin belirli sınırlar içinde kaldığı, anlamlı bir değişiklik göstermediği ve ciddi bir asidozun görülmediği, elektrolit düzeylerinde ise değişikliğin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, diyabetik bireylerde böbrek hasarının olup olmadığını belirlemek amacıyla akut ve kronik böbrek hasarını yansıtan bir belirteç olan KIM-1 (Sabbisetti ve diğ. 2014) düzeyleri değerlendirilmiştir. Elektrolit dengesinde ve kan pH'sında ciddi değişikliklerin olmamasına karşın serum BUN, serum kreatinin ve idrar total protein değerlerine ek olarak KIM-1 seviyelerinin diyabetik hayvanlarda artması, diyabette böbrek hasarı ve fonksiyon bozuklukları arasında bir bağlantının olabileceğini işaret etmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, diyabetik bireylerde yapılan çeşitli çalışmalarda da KIM-1 seviyelerinin arttığı ve bu artışın böbrek yapı ve fonksiyon bozukluğu ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (de Carvalho ve diğ. 2016; Mori ve diğ. 2021; Vaidya ve diğ. 2011). Albuminürisi normal veya hafif artmış olan T2DM hastaların idrarlarında artan KIM-1 ve NGAL düzeylerinin, böbrek hastalığının ilk safhalarında bile tübüler ve glomerular hasarı işaret ettiği ileri sürülmüştür (de Carvalho ve diğ. 2016). Albuminürisi 2 yıl içinde artan T1DM hastaların bazal idrar KIM-1 düzeyleri albuminürisi değişmeyen veya azalan diyabetli hastalarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür (Vaidya ve diğ. 2011). Diyabetik böbrek hastalığı olanlarda ve diyabetik KKAY farelerinde belirgin şekilde yüksek tübüler KIM-1 anlatımı ve böbrek fibrozisi ve/veya inflamasyonun boyutu arasında pozitif korelasyon olduğu ileri sürülmüştür (Mori ve diğ. 2021).

Diyabetik nefropati patogenezi sistemik ve intraglomerular basınçların artmasına, RAS ve endotelin yollarının aktivasyonuna, damar geçirgenliğinde artışa neden olan hemodinamik olayları ve ileri glikolizasyon ürünlerinin oluşumuna, oksidatif strese, nefrin atılımına ve podosit hasarına neden olan metabolik olayları içermektedir (Barnard-Kelly ve Holt, 2024; de Carvalho ve diğ. 2016; Mezzano ve diğ. 2003; Mori ve diğ. 2014; Tokgöz, 2019; Vallon ve Komers, 2011). Hemodinamik değişikliklerden kaynaklanan mekanik gerilimdeki artış belirli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımına aracılık etmektedir. Bu erken değişiklikler böbrek hipertrofisine ve albuminüriye yol açmaktadır. Bu da diyabetik nefropatide glomerular bazal membran kalınlaşması, mezangium genişlemesi ve glomeruloskleroz gibi morfolojik anormalliklere neden olmaktadır. Vasküler, glomerular ve tübüler lezyonlar diyabetik nefropati patolojisinin merkezinde yer almaktadır (Barnard-Kelly ve Holt, 2024; Mezzano ve diğ. 2003).

Nefropatinin önlenmesi glisemik kontrolün yanı sıra ciddi kan basıncı kontrolüne de dayanmaktadır. Nefropati mevcut olduğunda kan basıncı yönetimi temel dayanak noktasıdır (Barnard-Kelly ve Holt, 2024). RAS'ın ve dolayısıyla vazokonstriktör Ang II'nin etkilerinin engellenmesi altın standart bir tedavi yöntemidir ve yeni başlayan veya belirgin mikrovasküler komplikasyonların özellikle nefropati ve retinopatinin tedavisinde temel bir rol oynamaktadır (Flyvbjerg, 2024). Tercih edilen antihipertansif ilaçlar, böbrek kan akımı üzerinde spesifik etkileri olduğundan ACE inhibitörleri veya AT2R antagonistleridir (Barnard-Kelly ve Holt, 2024; Rossing ve Flyvbjerg, 2024). RAS inhibitörlerinin böbrek koruyucu etkileri böbrek arteriyollerinin vazodilatasyonu ile ilişkilidir. Efferent arteriyoldeki vazodilatasyon, afferent arteriyoldeki vazodilatasyondan daha büyük olduğundan özellikle glomerular hiperfiltrasyon ve hipertansiyon mevcut ise glomerular art yükü ve filtrasyon basıncı önemli ölçüde azalır (Anders ve diğ. 2016; Vallon ve Komers, 2011). RAS, neredeyse tüm kronik böbrek hastalığı türlerinde yüksek düzeyde aktive olduğundan, RAS inhibitörlerinin yalnızca diyabetik değil aynı zamanda diyabetik olmayan böbrek hastalıklarında da nefron koruyucu etkileri vardır. Aslında sıkı RAS inhibisyonu, diyabetik olmayan böbrek hastalıklarının gerilemesine katkıda bulunurken bu durum, diyabetik böbrek hastalığı olan bireylerde farklılık gösterir (Anders ve diğ. 2016; Vallon, 2015). Çünkü hiperglisemi, makula densesinin maruz kaldığı sodyum konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltır ve böylece tübüloglomerular geri bildirimi kalıcı olarak engeller, afferent arteriyolleri genişletir ve birçok hastada glomerular hiperfiltrasyona neden olur (Anders ve diğ. 2016; Vallon ve Komers, 2011). Bunların sonucunda diyabetik nefropati patofizyolojisinde bilinen etkilerinin dışında farklı rollerinin olabileceğinden dolayı RAS birçok araştırmaya konu olmuştur (Zeni ve diğ. 2017).

Böbrek hastalıklarının RAS yolağı ürünlerinin istenmeyen fonksiyonları ile ilişkili olduğuna, aşırı Ang II oluşumunun ve böbrekte AT1R'nin uyarılmasının, azalmış renal kan perfüzyonundan, hipoksiden ve ROT'un üretiminden kaynaklanan patofizyolojik etkiler ortaya çıkardığına dair ikna edici kanıtlar ileri sürülmüştür (He ve diğ. 2015; Holt ve Flyvbjerg, 2024; Mezzano ve diğ. 2003; Tokgöz, 2019; Tonon ve diğ. 2022; Loeffler ve Wolf, 2023). Birçok çalışmada, diyabetik nefropatide Ang II seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir (He ve diğ. 2015; Holt ve Flyvbjerg, 2024; Ma ve diğ. 2014; Mezzano ve diğ. 2003; Tokgöz, 2019; Tonon ve diğ. 2022). Diyabetik bireylerde, immünohistokimyasal olarak tübüler, interstisiyal ve fibroblast benzeri hücrelerde ACE ile Ang II anlatımının arttığı, bunun yüksek glikoz ve inflamatuvar araçlar ile birlikte tübüler hücreleri hedef alarak diyabette böbrek

fonksiyonlarının bozulmasına neden olduğu belirtilmiştir (Mezzano ve diğ. 2003). STZ ile oluşturulan diyabette, serumda Ang II seviyelerinin önemli ölçüde artış gösterdiği bildirilmiştir (He ve diğ. 2015).

ACE2/Ang (1-7)/Mas reseptör eksenini, RAS'ın yeni bir eksenini oluşturmaktadır. RAS'ın bu ekseninin çeşitli fonksiyonları keşfedilmeye başlansa da esas fonksiyonunun, klasik RAS'ın etkilerine karşı konulması ve RAS'ın koruyucu yolunun kritik düzenlenmesi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca katalitik işlevinden bağımsız olarak ACE2'nin patolojik önemi oldukça fazladır (Triebel ve Castrop, 2024). ACE2, Ang II'den Ang (1-7)'nin oluşumunu katalize eder ve oluşan Ang (1-7), Ang II'nin etkilerine zıt fonksiyonlar gösterir (Patel, 2015). Ang (1-7) MasR'ye bağlanarak anti-inflamatuvar, vazodilatör, antioksidan, antihipertansif ve anti-fibrotik ve anti-proliferatif etki gösterir (Ferrario ve diğ. 2005; Mori ve diğ. 2014). Ang (1-7)/MasR eksenini, glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynar (Santos ve diğ. 2008)

ACE2/Ang (1-7)/Mas reseptör ekseninin fonksiyonuna dair edinilen bilgiler arttıkça diyabette bu molekülün etkileri araştırılmaya başlamıştır. Santos ve diğ. (2014) uyarılabilir insülin direncine sahip yeni bir transgenik sıçan modelinde, Ang (1-7)'nin oral olarak uygulanmasının, hiperglisemik durumu tersine çevirdiği, insülin direncini iyileştirdiği ve plazma insülini ile diyabetik nefropatiyi azalttığı gösterilmiştir. Ang (1-7)'nin Mas reseptörü aracılığıyla STZ'nin neden olduğu diyabetik böbrek hasarını azalttığı bulunmuştur (Zhang ve diğ. 2015). Başka bir çalışmada, STZ ile oluşturulan diyabetik sıçan modelinde Ang (1-7)'nin, açlık kan glikozu ve insülin direnci için homeostatik model değerlendirmesi (HOMA-IR) değerleri ile serum Ang II düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu, açlık serum insülin düzeylerinde ise artışa neden olduğu bulunmuştur (He ve diğ. 2015). Diyabetik nefropatide Ang (1-7) uygulamasının ACE2 seviyelerinin yukarı regülasyonunu normale döndürdüğü, oksidatif stres, inflamasyon, fibroz ve lipotoksisitenin azaltılmasıyla bağlantılı olarak diyabetik nefropati üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (Mori ve diğ. 2014).

Diyabette, Ang (1-7) ile ilgili çalışmalara ek olarak ACE2/Ang (1-7)/Mas reseptör ekseninde yer alan ACE2 enzimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış ancak bu çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Birçok çalışma, diyabetik bireylerde ACE2 anlatımının ve aktivitesinin azaldığını rapor etmiştir. Tikellis ve diğ. (2012), erkek C57BL/6 farelerde diyabetin, kalpte ACE2 anlatımının ve aktivitesinin azalmasına, dolaşımdaki Ang II seviyelerinin yükselmesine ve kardiyak Ang (1-7) seviyelerinin azalmasına yol açtığını ifade etmişlerdir. C57BL/6

farelerde STZ ile meydana getirilen diyabette, böbrekte ACE2 anlatımındaki azalma ve Ang (1-7)'deki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Tikellis ve diğ. 2008). STZ uygulaması ile oluşan diyabetik sıçanlarda ACE2 protein seviyesinin ve aktivitesinin azaldığı, ACE protein anlatımının değişmediği bildirilmiştir (Leehey ve diğ. 2008). Diyabetik nefropatisi olan hastalarda böbrek dokusunda ACE2'nin azaldığı ve ACE'nin arttığı dolayısıyla (Mizui ve diğ. 2008; Reich ve diğ. 2008) ACE/ACE2 oranının arttığı, ortalama kan basıncı, açlık kan şekeri, serum kreatinin, proteinüri ve HbA1c değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Mizui ve diğ. 2008). T1DM hastalarında yüksek glikoz seviyeleri ile ilişkili olarak ACE anlatımının ve dolaşımdaki Ang II seviyelerinin yüksek, ACE2 anlatımının ise daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tonon ve diğ. 2022). Çözünebilir ACE2'nin T2DM hastalarında azaldığı ve yaş, cinsiyet ile obezite düzeylerinden etkilendiği ortaya konulmuştur (Elemam ve diğ. 2021). ACE2 geni delesyonunun, erkek farelerde Ang II'ye bağımlı glomerular hasarın gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Oudit ve diğ. 2006). STZ ile oluşturulan diyabetik farelerde kronik farmakolojik ACE2 inhibisyonunun, idrar albumin/kreatinin oranının ve ACE anlatımının artmasıyla bağlantılı olarak glomerular hasarın kötüleşmesine neden olduğu gösterilmiştir (Soler ve diğ. 2007). ACE2 delesyonu, diyabet gelişiminde yalnızca albuminürinin eşlik ettiği glomerulopatiyi değil aynı zamanda tübülointerstisyel hasarı ve sonunda gelişen böbrek fonksiyon bozukluğunu da içeren böbrek hasarına neden olduğu, Ang II'nin azalması ve Ang (1-7)'nin ACE2 aracılığı ile böbrek üzerinde koruyucu etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir (Shiota ve diğ. 2010).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak diyabetik bireylerde ACE2 anlatımının ve aktivitesinin arttığı ileri sürülmüştür. *db/db* ve STZ ile oluşturulan diyabetik farelerde ACE2 protein seviyesi ve aktivitesinin böbrek korteksinde arttığı belirlenmiştir (Wysocki ve diğ. 2006). ACE2 seviyeleri, obezite ve T2DM dahil olmak üzere COVID-19 ile bağlantılı olan bazı hasta gruplarında daha yüksek bulunmuştur (Emilsson ve diğ. 2020). Ma ve diğ. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada, STZ ile uyarılan böbrek hasarı sıçan modelinde, glikoz, üre nitrojeni, kreatinin ve protein seviyeleri ile Ang II, ACE2 ve ACE mRNA seviyeleri yüksek bulunmuştur. Genç *db/db* farelerde, böbrek korteksindeki tübüllerde ACE2 proteininin arttığı buna karşın ACE proteininin azaldığı belirlenmiştir (Ye ve diğ. 2004). mRen2.Lewis (mRen2) hipertansif sıçanlarda STZ uygulamasıyla oluşan diyabetin erken döneminde, dolaşımdaki ACE2'nin dişilerde dokuz kat ve erkeklerde üç kat arttığı, dolaşımdaki ACE ve Ang II'nin ise her iki diyabetik grupta yüksek olduğu bulunmuştur. Proteinürinin, albuminürinin ve angiotensinojen

atılımının diyabetik bireylerde benzer ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Yamaleyeva ve diğ. 2012). Diyabetik nefropatisi olan ve olmayan T1DM hastalarda ACE2 aktivitesinin değişip değişmediği incelendiğinde, ACE2 aktivitesi T1DM ve mikroalbuminürisi olan erkeklerde albuminürisi olmayan hastalara göre arttığı belirlenmiştir (Soro-Paavonen ve diğ. 2012).

Bizim çalışmamızda, diyabetik hayvanlarda böbrek dokusunda ve kanda RAS yolağının unsurları olan Ang II, Ang (1-7) ve ACE2 seviyeleri belirlenmiştir. Diyabetik bireylerde özellikle böbrek dokusunda Ang II seviyelerinin ciddi bir şekilde arttığı görülmüştür. Bunun yanında, diyabetik grupta hem dokuda hem serumda ACE2 seviyeleri artarken Ang (1-7) seviyelerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgulara ek olarak çalışmamızda, yine RAS'ın unsurları olan renin, Ang I, Ang II, ACE, ACE2 ve Ang (1-7) ile lökosit infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO proteinleri Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Diyabetik bireylerin böbrek dokusunda renin, Ang I, Ang II, ACE ve ACE2 değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde diyabet ile RAS'ın aktive olduğunu ve Ang II artışının böbrek hasarı ve fonksiyon bozuklukları ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, ACE2 değerlerinin artmasına karşın Ang (1-7) seviyelerinin değişmemesi, Ang II seviyelerinde ise artışın görülmesi ACE2'nin RAS'ın ACE2/Ang (1-7) /MasR eksenindeki rolünden farklı fonksiyonel özelliklerinin de olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte daha sonraki çalışmalarda böbrek dokusunda ACE2 enziminin aktivitesinin ölçülmesi ACE2'nin fonksiyonunun anlaşılmasına büyük katkı sağlayacaktır. RAS'a yönelik yapılan değerlendirmelere ek olarak RAS'ın oksidatif stres ve inflamasyon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda TAS ve TOS değerleri ile OSI belirlenmiştir. Diyabetle birlikte hem serumda hem de dokuda oksidatif stres belirteçlerinin ve inflamasyonun bir göstergesi olan MPO'nun dokuda anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Bunun yanında örneklerde inflamatuvar belirteçlerin ölçülebilmesi de bu bulguların desteklenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu sonuçlarımız, STZ ile oluşturulan diyabetik hayvanlarda RAS'ın aktive olduğu ve bunun da böbrek hasarı, böbrek disfonksiyonu, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızın temel amacı, RAS'ın yeni keşfedilen bir unsuru olan alamandinin diyabette etkili olup olamayacağının ve eğer etkileri söz konusu ise bunu RAS ve oksidatif stres aracılığıyla gerçekleştirip gerçekleştirmediğinin araştırılması olmuştur. Bu amaçla STZ uygulamasından sonra diyabetik hayvanlara birçok çalışmada kullanılan (Fernandes ve diğ. 2021; Hekmat ve

diğ. 2017; Soltani Hekmat ve diğ. 2021; Hekmat ve diğ. 2023; Liu ve diğ. 2018; Tanrıverdi ve diğ. 2023; Yang ve diğ. 2020; Yıldız ve diğ. 2023; Wang ve diğ. 2019; Zhu ve diğ. 2021) doz ve süre referans alınarak yirmi bir gün boyunca alamandin (50 µg/kg/gün) uygulanmıştır. Alamandin uygulamasının diyabetik hayvanlardaki kan glikoz değerleri ile vücut ağırlıkları üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı, kan parametrelerinden sadece klor değerlerinde bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Alamandinin, RAS unsurları ve oksidatif stres üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde Ang I, Ang II, ACE, ACE2 seviyelerini düşürdüğü ve oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır. Diyabetik hayvanlarda meydana gelen doku hasarının belirteci olan KIM-1 ve lökosit infiltrasyon göstergesi olan MPO değerlerinin alamandin uygulaması ile azaldığı buna paralel olarak serum BUN, serum kreatinin ve idrar total protein seviyelerinin de azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, alamandin uygulamasının diyabette meydana gelen etkilerin hafifletilmesine veya düzelmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

Alamandin, keşfedilmesiyle birlikte çok kısa sürede birçok araştırmaya konu olmuş ve çeşitli deneysel modellerde böbrek üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Renal I/R modeli ile yapılan bir çalışmada, iskemi öncesi 3 gün boyunca farklı dozlarda alamandin (5, 50, 500 veya 5000 µg/kg/gün) uygulamasının, I/R ile yükselen kreatinin, kan sistatin C ve BUN, TNF-α, IL-1β, IL-6 seviyelerini, oksidatif stres belirteci olan süperoksit seviyeleri ve inflamasyonun belirteçleri olan malondialdehit (MDA) ve NADPH oksidaz 1 seviyelerini azalttığı, azalmış süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin düzeldiği belirlenmiştir (Zhu ve diğ. 2021). Deneysel nefrotoksisite modelinde alamandinin koruyucu etkilere de sahip olduğu görülmüştür. Soltani Hekmat ve diğ. (2021)'nin sıçanlarda kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin ile oluşturdukları nefrotoksisitede 42 gün boyunca mini-ozmotik pompalar aracılığıyla alamandin (50 µg/kg/gün) uygulaması yaptıkları çalışmada, inflamatuvar sitokinler olan IL-1β ve IL-6, proinflamatuvar transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve böbrekteki profibrotik aracı olan TGF-β seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Bu hayvanlarda böbrek hasarının, BUN ve kreatinin seviyelerinin arttığı, idrar çıkışı azalırken su alımının da arttığı tespit edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak, antioksidan belirteçlerin azaldığı ve böbrek tübüllerinde ciddi hasarın olduğu belirlenmiştir. Alamandin uygulamasının tüm bu etkilerin düzelmesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Soltani Hekmat ve diğ. 2021). Metotreksat verildikten sonra 6 ve 10. günler arasında uygulanan alamandinin (50 µg/kg/gün, ip) oksidatif stres ile inflamasyonu baskıladığı, apoptoz ile nekroptozu azalttığı ve böbrek hasarını önemli ölçüde hafiflettiği belirlenmiştir (Yıldız ve diğ. 2023). Nefrotoksisite dışında, alamandinin

antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik aktiviteler yoluyla doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi de azalttığı aynı ekip tarafından ileri sürülmüştür (Hekmat ve diğ. 2021).

Endotoksemi ve sepsis modellerinde alamandinin böbrek üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Lipopolisakkarid (LPS) uygulaması ile oluşturulan endotoksemi modelinde, LPS uygulamasından 1 saat önce ve 1 saat sonra uygulanan alamandinin (500 µg/2 mL/kg, intravenöz (iv)) sistemik ve böbrek koruyucu etkilerini iNOS anlatımının azalmasıyla, hemodinamik ve vasküler fonksiyonlar üzerindeki etkilerini anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve anti-apoptotik yollarla meydana getirdiği ifade edilmiştir (Songür ve diğ. 2023). Hu ve diğ. (2021), farklı dozlarda alamandin (0,01 µm/kg, 0,1 µm/kg, 1,0 µm/kg, 10 µm/kg) uyguladıktan 1 saat sonra LPS uygulayarak oluşturdukları sepsis modelinde, hayvanlarda serum kreatinin, BUN ve sistatin C düzeyleri ile dokuda NGAL ve KIM-1 gibi böbrek hasar belirteçlerinin arttığı alamandin uygulanmasıyla bu değerlerin azaldığı belirlenmiştir (Hu ve diğ. 2021).

Deneysel hipertansiyon modellerinden biriyle yapılan çalışmada, alamandin uygulamasının Dahl SS sıçanlarında yüksek tuzlu diyetle indüklenen hipertansiyonu, böbrek fonksiyon bozukluğunu, böbrek fibrozisini ve apoptozu hafiflettiği, HK-2 hücrelerinde NaCl ile indüklenen oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (Gong ve diğ. 2022). Başka bir çalışmada, Ang II'nin neden olduğu hipertansiyonda alamandin (50 µg/kg) ve Mas reseptör antagonisti AVE0991 kombinasyonunun sistolik kan basıncını, oksidatif stresi, inflamasyonu ve vasküler cevapları düzelterek faydalı olabileceği rapor edilmiştir (Tanrıverdi ve diğ. 2023). C57BL/6J farelerinde Ang II uygulamasıyla oluşturulan hipertansiyon modelinde, 12 gün boyunca alamandin (50 µg/kg/gün) uygulamasının artan sistolik kan basıncını, diyastolik kan basıncını ve ortalama arter basıncını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Yang ve diğ. 2020). İki böbrek bir klips (2K1C) modeliyle oluşturulan hipertansif sıçanlarda, alamandinin (25 µg/kg, 50 µg/kg, 75 µg/kg, iv) bifazik hemodinamik etki meydana getirdiği, normal koşullarda alamandinin AT1R üzerinden etki ettiğini ancak hipertansiyon gibi patolojik durumlarda PD123319'a duyarlı reseptörler üzerindeki etkisinin AT1R üzerindeki etkisini maskeleyiği gösterilmiştir (Hekmat ve diğ. 2017). Alamandinin ve Ang (1-7)'nin normotansif ve hipertansif 2K1C sıçanların kaudal ventrolateral medullasına mikroenjeksiyonu ile oluşturulan kardiyovasküler etki mekanizmasında önemli farklılıklar gösterdiğine dair kanıtlar sunulmuştur (Soares ve diğ. 2017).

Monokrotalin ile oluşturulan pulmoner hipertansiyon modelinde, 21 gün boyunca mini-ozmotik pompalar aracılığıyla alamandin (50 mg/kg/gün) uygulamasının hemodinamik parametreleri, oksidatif stres belirteçlerini, inflamatuvar faktörleri ve elektrokardiyografik verileri önemli ölçüde iyileştirdiği, iNOS düzeylerini ve akciğer dokusundaki MrgD reseptörlerinin anlatım seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (Hekmat ve diğ. 2024). Pulmoner fibrozisin deneysel olarak oluşturulduğu hayvanlara 14 gün boyunca alamandin (50 µg/kg/gün) uygulandığında, kan basıncı ve kalp hızının otonom kontrolünü etkilemeden fibrozis gelişiminin zayıfladığı, solunum sistemi elastansının azaldığı ve kilo alımının korunduğu belirlenmiştir (Fernandes ve diğ. 2021)

Böbrek fonksiyonları dışında çeşitli modellerde, kardiyovasküler sistemin en önemli unsurlarından olan kardiyak fonksiyonlar üzerinde alamandinin etkilerine yönelik deneysel çalışmalar da yapılmıştır. 2K1C hipertansiyon sıçan modelinde, kalpte ACE2 mRNA anlatımının normal tansiyona sahip sıçanlara kıyasla hipertansif sıçanlarda arttığı, 2 haftalık alamandin infüzyonunun (600 µg/kg/gün) bunu normal değerlere geri döndürdüğü ancak bu değişikliklerin protein seviyesinde değil sadece mRNA seviyesinde görüldüğü belirtilmiştir (Hekmat ve diğ. 2019). Alamandinin, oksidatif stresin inhibisyonu yoluyla kardiyak fibrozisi hafifletebildiği gösterilmiştir (Hekmat ve diğ. 2019; Zhao ve diğ. 2022). Alamandinin uzun süreli hipertansiyona bağlı kardiyak fibrozis üzerindeki potansiyel terapötik etkileri yaşlı ve spontane hipertansif sıçan modelinde araştırıldığında, alamandinin (50 µg/kg/gün, ip, 6 hafta) kan basıncından bağımsız olarak kronik hipertansiyonun neden olduğu kardiyak disfonksiyonu ve fibrozisi hafifletebilen etkilere sahip antihipertansif bir peptid olduğu öne sürülmüştür (Wang ve diğ. 2019).

Alamandinin (50 µg/kg/gün) 6 hafta boyunca subkutan uygulamasının, hipertansiyonu ve kardiyak hipertrofiyi hafiflettiği ve sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Liu ve diğ. 2018). Bir çalışmada, MrgD aşırı anlatımının hipertrofi ve fibrozise yol açtığı, alamandin uygulamasının aşağı yönlü sinyal iletiminin inhibisyonu ile Ang II'nin neden olduğu kardiyak hipertrofiyi ve fibrozisi önemli ölçüde hafiflettiği belirlenmiştir (Zhao ve diğ. 2023). I/R hasarına karşı alamandinin kardiyoprotektif etkilerinin kısmen MrgD reseptörü aracılığıyla antioksidan ve anti-apoptotik enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Park ve diğ. 2018). Alamandin ön tedavisinin (20 mg/kg, iv) miyokardiyal I/R hasarının neden olduğu patolojik hasarı önemli ölçüde hafifletebildiği, inflamatuvar yanıtı inhibe edebildiği ve

olası mekanizmasının ise C-Jun N-terminal kinazı (JNK) fosforilasyonunun aktivasyonu ve NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu olduğu ileri sürülmüştür (Song ve diğ. 2019). Sepsiste, alamandinin (0,01 μ m/kg, 0,1 μ m/kg, 1,0 μ m/kg, 10 μ m/kg, iv) kalp fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği, bunun sonucunda kardiyak kontraktileiteyi arttırdığı, inflamasyonu, otofajiyi ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Li ve diğ. 2018).

Bu bahsedilen çalışmalara ek olarak diğer birçok sistemde alamandinin fonksiyonel rolleri olduğu belirlenmiştir. Alamandinin, vazodilatasyonu arttırmak ve protein kinaz A yolu üzerinden hiperhomosisteineminin uyardığı vasküler disfonksiyonu tersine çevirmek gibi kan damarları üzerinde faydalı etkileri teşvik edebileceği ve bu nedenle potansiyel olarak ateroskleroz gelişimini azaltabileceği ileri sürülmüştür (Qaradakhi ve diğ. 2017). Alamandin tedavisinin, nötrofil degranülasyonunu *in vitro* da azaltabildiği, *in vivo* olarak sistemik dolaşımda ve aorttan kökenli plaklarda aynı nötrofil granül enzimlerinin ortadan kaldırılmasıyla ilişkilendirildiği, ancak karotid arterlerde bu durumun söz konusu olmadığı sonucuna varılmıştır (da Silva ve diğ. 2017). Alamandin/MrgD ekseninin, aerobik glikoliz ve mitofajinin düzenlenmesi yoluyla TGF- β 1 aracılı fibroblast aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2023). Alamandinin doğrudan vazodilatasyon etkisine rağmen yağ dokusunda arteriosklerozu teşvik edebileceği ileri sürülmüştür (Uchiyama ve diğ. 2017). Yüksek glikoz diyetinin, farelerin hem kahverengi yağ dokusunda MrgD anlatımını hem de dolaşımdaki alamandin seviyesini azalttığı, bunun sonucunda da alamandin/MrgD ekseninin metabolizmanın düzenlenmesi için önemli olduğu ve kahverengi yağ dokusunun fonksiyonunda rol aldığı belirtilmiştir (Cerri ve diğ. 2023). Romatoid artrit sinoviyal fibroblastlarında alamandin, inflamatuvar sitokin anlatımını baskılayarak artrit gelişimini hafifletmiştir (Ding ve diğ. 2022). Alamandinin depresif davranışların modülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Almeida-Santos ve diğ., 2021; Becari ve diğ. 2023). Zhu ve diğ. (2020), alamandin/MrgD'nin retinada antioksidan ve anti-inflamatuvar etkiler sergileyen yeni bir RAS koruyucu eksenini temsil edebileceği ve çeşitli retina hastalıkları için önemli yeni bir terapötik hedef olabileceği fikrini ortaya atmışlardır. Tümör hücrelerinde alamandin/MrgD'nin antiproliferatif ve olası antitümöral etkisinin olabileceği vurgulanmıştır (da Silva ve diğ. 2022). Sonuç olarak alamandinin, böbrek işlevleri üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu ayrıca anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-apoptotik, antihipertansif, anti-fibrotik, kardiyoprotektif ve antitümöral etkilere sahip olduğuna dair kanıtlar ileri sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda STZ uygulanarak diyabet oluşturulan hayvanlarda hiperglisemi, oksidatif stres, böbrek hasarı, inflamasyon ve böbrek fonksiyonunda düzensizlikler ile birlikte RAS'ın aktive olduğu belirlenmiştir. Alamandinin 21 gün boyunca uygulanması sonucunda hiperglisemi ve kilo kaybından bağımsız olarak Ang II ve ACE2 düzeylerinin, böbrek hasarının ve oksidatif stresin azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular, STZ ile oluşturulan diyabette RAS'ın aktive olduğu bunun da böbrek hasarı, böbrek disfonksiyonu, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili olabileceği, alamandinin ise hem oksidatif stres hem de RAS yoluyla etkilerini sergileyebileceğini işaret etmiştir.



KAYNAKLAR

- Almeida-Santos, A. F., de Melo, L. A., Gonçalves, S. C. A., Oliveira Amaral, L. B., Santos, R. A. S., Campagnole-Santos, M. J. and Kangussu, L. M., 2021, Alamandine through MrgD receptor induces antidepressant-like effect in transgenic rats with low brain angiotensinogen, *Hormones and behavior*, 127, 104880.
- Alsahli, M. and Gerich, J. E., 2017, Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes, *Diabetes research and clinical practice*, 133, 1–9.
- American Diabetes Association (2013), Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care*, 36 Suppl 1(Suppl 1), S67–S74.
- Anders, H. J., Davis, J. M. and Thurau, K., 2016, Nephron protection in diabetic kidney disease, *The New England journal of medicine*, 375(21), 2096–2098.
- Arıcı, M., 2019, Tanı Yöntemleri, *Temel Nefroloji*, In: Yeniçerioğlu, Y. (ed.), Güngör, Ö. (ed.) ve Arıcı, M. (ed.), Kısım 2, Bölüm 2, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-975-277-778-1.
- Barnard-Kelly, K. D. and Holt, R. I., 2024, *The aims of diabetes care*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 25, John Wiley & Sons, UK, ISBN:9781119697428, 341-353.
- Baynes, J. W., 1991, Role of oxidative stress in development of complications in diabetes, *Diabetes*, 40(4), 405–412.
- Becari, L., Fonseca, M. L. A., Gonçalves, S. C. A., Bader, M., Santos, R. A. S., Campagnole-Santos, M. J. and Kangussu, L. M., 2023, Impact of genetic deletion of MrgD or Mas receptors in depressive-like behaviour in mice, *Acta neuropsychiatrica*, 35(1), 27–34.
- Bernardi, S., Michell, A., Zuolo, G., Candido, R. and Fabris, B., 2016, Update on RAAS modulation for the treatment of diabetic cardiovascular disease, *Journal of Diabetes Research*, 17.
- Bockaert, J. and Pin, J. P., 1999, Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, *The EMBO journal*, 18(7), 1723–1729.
- Butkowski, E. G. and Jelinek, H. F., 2017, Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammatory markers, *Redox report: communications in free radical research*, 22(6), 257–264.
- Calışkan, Y. and Yildiz, A., 2010, Electrolyte disturbances in renal failure, *Türkiye Klinikleri J Nephrol-Special Topics*, 3(1), 44-9.
- Castañeda, A. M., Dutra-Rufato, A., Juarez, M. J., Grosebacher, L., Gonzalez-Torres, H. and Musso, C. G., 2021, Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i): renal implications, *International urology and nephrology*, 53(2), 291–299.

- Cerri, G. C., Santos, S. H. S., Bader, M. and Santos, R. A. S., 2023, Brown adipose tissue transcriptome unveils an important role of the Beta-alanine/alamandine receptor, MrgD, in metabolism, *The Journal of nutritional biochemistry*, 114, 109268.
- Cherney, D. Z., Perkins, B. A., Soleymanlou, N., Maione, M., Lai, V., Lee, A., Fagan, N. M., Woerle, H. J., Johansen, O. E., Broedl, U. C. and von Eynatten, M., 2014, Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus, *Circulation*, 129(5), 587–597.
- Da Silva, A. R., Lenglet, S., Carbone, F., Burger, F., Roth, A., Liberale, L., Bonaventura, A., Dallegri, F., Stergiopulos, N., Santos, R. A., Mach, F., Fraga-Silva, R. A. and Montecucco, F., 2017, Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice, *European journal of clinical investigation*, 47(2), 117–128.
- da Silva, F. A., Rodrigues-Ribeiro, L., Melo-Braga, M. N., Passos-Silva, D. G., Sampaio, W. O., Gorshkov, V., Kjeldsen, F., Verano-Braga, T. and Santos, R. A. S., 2022, Phosphoproteomic studies of alamandine signaling in CHO-MrgD and human pancreatic carcinoma cells: An antiproliferative effect is unveiled, *Proteomics*, 22(17), e2100255.
- de Carvalho, J. A., Tatsch, E., Hausen, B. S., Bollick, Y. S., Moretto, M. B., Duarte, T., Duarte, M. M., Londero, S. W., Premaor, M. O., Comim, F. V., Delanghe, J. R. and Moresco, R. N., 2016, Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes, *Clinical biochemistry*, 49(3), 232–236.
- Ding, W., Miao, Z., Feng, X., Luo, A., Tan, W., Li, P. and Wang, F., 2022, Alamandine, a new member of the renin-angiotensin system (RAS), attenuates collagen-induced arthritis in mice via inhibiting cytokine secretion in synovial fibroblasts, *Peptides*, 154, 170816.
- Donate-Correa, J., Luis-Rodríguez, D., Martín-Núñez, E., Tagua, V. G., Hernández-Carballo, C., Ferri, C., Rodríguez-Rodríguez, A. E., Mora-Fernández, C. and Navarro-González, J. F., 2020, Inflammatory targets in diabetic nephropathy, *Journal of clinical medicine*, 9(2), 458.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M. J., Simon, M. I. and Anderson, D. J., 2001, A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons, *Cell*, 106(5), 619–632.
- Elemam, N. M., Hasswan, H., Aljaibaji, H. and Sulaiman, N., 2021, Circulating Soluble ACE2 and Upstream microRNA expressions in serum of type 2 diabetes mellitus patients, *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5263.
- Elmarakby, A. A., Williams, J. M. and Pollock, D. M., 2003, Targeting sources of superoxide and increasing nitric oxide bioavailability in hypertension. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 4(3), 282–290.
- Emilsson, V., Gudmundsson, E. F., Aspelund, T., Jonsson, B. G., Gudjonsson, A., Launer, L. J., Lamb, J. R., Gudmundsdottir, V., Jennings, L. L. and Gudnason, V., 2020, Serum levels of ACE2 are higher in patients with obesity and diabetes, *Obesity science & practice*, 7(2), 239–243.

- Fernandes, R. S., Dias, H. B., de Souza Jaques, W. A., Becker, T. and Rigatto, K., 2021, Assessment of Alamandine in pulmonary fibrosis and respiratory mechanics in rodents, *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, 2021, 9975315.
- Ferrario, C. M., Trask, A. J. and Jessup, J. A., 2005, Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289(6), H2281–H2290.
- Flyvbjerg, A., 2024, *Pathogenesis of microvascular complications*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 42, John Wiley & Sons, USA, ISBN:9781119697428, 341-353.
- Forbes, J. M., Coughlan, M. T. and Cooper, M. E., 2008, Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes, *Diabetes*, 57(6), 1446–1454.
- Gembardt, F., Grajewski, S., Vahl, M., Schultheiss, H. P. and Walther, T., 2008, Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family, *Molecular and cellular biochemistry*, 319(1-2), 115–123.
- Gong, J., Luo, M., Yong, Y., Zhong, S. and Li, P., 2022, Alamandine alleviates hypertension and renal damage via oxidative-stress attenuation in Dahl rats, *Cell death discovery*, 8(1), 22.
- Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M. L., Hayes, A. and Zulli, A., 2014, Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang (1-7), *International journal of experimental pathology*, 95(4), 290–295.
- He, J., Yang, Z., Yang, H., Wang, L., Wu, H., Fan, Y., Wang, W., Fan, X. and Li, X., 2015, Regulation of insulin sensitivity, insulin production, and pancreatic β cell survival by angiotensin-(1-7) in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Peptides*, 64, 49–54.
- Hekmat, A. S., Navabi, Z., Alipanah, H. and Javanmardi, K., 2021b, Alamandine significantly reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Human & experimental toxicology*, 40(10), 1781–1795.
- Hekmat, A. S., Zare, N., Moravej, A., Meshkibaf, M. H. and Javanmardi, K., 2019, Effect of prolonged infusion of alamandine on cardiovascular parameters and cardiac ACE2 expression in a rat model of renovascular hypertension, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 42(6), 960–967.
- Hirano, S., 2012, *Western blot analysis*, In: Reineke, J. (eds) Nanotoxicity, Methods in Molecular Biology, vol 926. Humana Press, Totowa, NJ.
- Holt, R. I. G., 2024, *Overview of glucose metabolism*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 6, John Wiley & Sons, UK, ISBN:9781119697428, 22-27.

- Hu, W., Gao, W., Miao, J., Xu, Z. and Sun, L., 2021, Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), alleviates sepsis-associated renal inflammation and apoptosis by inhibiting the PI3K/Ak and MAPK pathways, *Peptides*, 146, 170627.
- Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., Furkert, J., Oksche, A., Krause, E., Tran, T. N., Tepel, M., Schuchardt, M., Schlüter, H., Wiedon, A., Beyermann, M., Bader, M., Todiras, M., Zidek, W. and Jankowski, J., 2007, Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(2), 297–302.
- Jin, Q., Liu, T., Qiao, Y., Liu, D., Yang, L., Mao, H., Ma, F., Wang, Y., Peng, L. and Zhan, Y., 2023, Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols, *Frontiers in immunology*, 14, 1185317.
- Kanugula, A. K., Kaur, J., Batra, J., Ankireddypalli, A. R., and Velagapudi, R., 2023, Renin-angiotensin system: updated understanding and role in physiological and pathophysiological states, *Cureus*, 15(6), e40725.
- Kaschina, E. and Unger, T., 2003, Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function, *Blood pressure*, 12(2), 70–88.
- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., Ferreira, A., Alves, F., Martins, A., Raizada, M., Paula, R., Motta-Santos, D., Klempin, F., Pimenta, A., Alenina, N., Sinisterra, R., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J., Santos, R. A., 2013, Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system, *Circulation research*, 112(8), 1104–1111.
- Lee, H. B., Yu, M. R., Yang, Y., Jiang, Z. and Ha, H., 2003, Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(8 Suppl 3), S241–S245.
- Leehey, D. J., Singh, A. K., Bast, J. P., Sethupathi, P. and Singh, R., 2008, Glomerular renin angiotensin system in streptozotocin diabetic and Zucker diabetic fatty rats, *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 151(4), 208–216.
- Li, P., Chen, X. R., Xu, F., Liu, C., Li, C., Liu, H., Wang, H., Sun, W., Sheng, Y. H. and Kong, X. Q., 2018, Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways, *Life sciences*, 206, 106–116.
- Lim, E. L. and Taylor, R., 2024, *Clinical presentations of diabetes*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 24 , John Wiley & Sons, UK, ISBN:9781119697428, 330-339.
- Liu, C., Yang, C. X., Chen, X. R., Liu, B. X., Li, Y., Wang, X. Z., Sun, W., Li, P. and Kong, X. Q., 2018, Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats, *Amino acids*, 50(8), 1071–1081.

- Loeffler, I. and Wolf, G., 2023, Angiotensin II as a mediator of renal fibrogenesis, *In Molecular Mediators in Health and Disease: How Cells Communicate, Angiotensin from the kidney to Coronavirus*, in: pilowsky, P. (ed.), chapter 8, Academic Press, Elsevier ISBN:9780323996181, 235-262.
- Ma, C., Xin, H., Jiang, X. Y., Wang, Y. X. and Zhang, Y. S., 2014, Relationship between renal injury and the antagonistic roles of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2, *Genetics and molecular research : GMR*, 13(2), 2333–2342.
- Martyniak, A. and Tomasik, P. J., 2022, A New Perspective on the renin-angiotensin system, *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(1), 16.
- Mezzano, S., Droguett, A., Burgos, M. E., Ardiles, L. G., Flores, C. A., Aros, C. A., Caorsi, I., Vío, C. P., Ruiz-Ortega, M. and Egido, J., 2003, Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy, *Kidney international. Supplement*, (86), 64–70.
- Milasta, S., Padiani, J., Appelbe, S., Trim, S., Wyatt, M., Cox, P., Fidock, M. and Milligan, G., 2006, Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD, *Molecular pharmacology*, 69(2), 479–491.
- Mizui, S., Hemmi, H., Arita, M., Ohashi, Y., Tanaka, Y., Miyagi, M., Sakai, K., Ishikawa, Y., Shibuya, K., Hase, H. and Aikawa, A., 2008, Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls, *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 51(4), 613–623.
- Moon J. Y., 2013, Recent update of renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of hypertension, *Electrolyte & blood pressure : E & BP*, 11(2), 41–45.
- Mori, J., Patel, V. B., Ramprasath, T., Alrob, O. A., DesAulniers, J., Scholey, J. W., Lopaschuk, G. D. and Oudit, G. Y., 2014, Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 306(8), F812–F821.
- Mori, Y., Ajay, A. K., Chang, J. H., Mou, S., Zhao, H., Kishi, S., Li, J., Brooks, C. R., Xiao, S., Woo, H. M., Sabbiseti, V. S., Palmer, S. C., Galichon, P., Li, L., Henderson, J. M., Kuchroo, V. K., Hawkins, J., Ichimura, T. and Bonventre, J. V., 2021, KIM-1 mediates fatty acid uptake by renal tubular cells to promote progressive diabetic kidney disease, *Cell metabolism*, 33(5), 1042–1061.e7.
- Oliveira, A. C., Melo, M. B., Motta-Santos, D., Peluso, A. A., Souza-Neto, F., da Silva, R. F., Almeida, J. F. Q., Canta, G., Reis, A. M., Goncalves, G., Cerri, G., Coutinho, D., Guedes de Jesus, I. C., Guatimosim, S., Linhares, N. D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J. and Santos, R. A. S., 2019, Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice, *American journal of physiology, Heart and circulatory physiology*, 316(1), H123–H133.
- Oudit, G. Y., Herzenberg, A. M., Kassiri, Z., Wong, D., Reich, H., Khokha, R., Crackower, M. A., Backx, P. H., Penninger, J. M. and Scholey, J. W., 2006, Loss of angiotensin-

- converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis, *The American journal of pathology*, 168(6), 1808–1820.
- Park, B. M., Phuong, H. T. A., Yu, L. and Kim, S. H., 2018, Alamandine protects the heart against reperfusion injury via the MrgD receptor, *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, 82(10), 2584–2593.
- Patel, V. B., Takawale, A., Ramprasath, T., Das, S. K., Basu, R., Grant, M. B., Hall, D. A., Kassiri, Z., and Oudit, G. Y., 2015, Antagonism of angiotensin 1-7 prevents the therapeutic effects of recombinant human ACE2, *Journal of molecular medicine*, 93(9), 1003–1013.
- Puglisi, S., Rossini, A., Poli, R., Dughera, F., Pia, A., Terzolo, M. and Reimondo, G., 2021, Effects of SGLT2 Inhibitors and GLP-1 receptor agonists on renin-angiotensin-aldosterone system, *Frontiers in endocrinology*, 12, 738848.
- Qaradakh, T., Matsoukas, M. T., Hayes, A., Rybalka, E., Caprnda, M., Rimarova, K., Sepsi, M., Büsselberg, D., Kruzliak, P., Matsoukas, J., Apostolopoulos, V. and Zulli, A., 2017, Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms, *Cardiovascular therapeutics*, 35(6), 10.1111/1755-5922.12306.
- Ramachandran, A., Snehalatha, C., Raghavan, A. and Nanditha, A., 2024, *Classification and diagnosis of diabetes*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 2, John Wiley & Sons, UK, ISBN:9781119697428, 22-27.
- Reich, H. N., Oudit, G. Y., Penninger, J. M., Scholey, J. W. and Herzenberg, A. M., 2008, Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease, *Kidney international*, 74(12), 1610–1616.
- Roep, B. O. and Peakman, M., 2012, Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4), a007781.
- Romaní-Pérez, M., Outeiriño-Iglesias, V., Moya, C. M., Santisteban, P., González-Matías, L. C., Vigo, E. and Mallo, F., 2015, Activation of the GLP-1 receptor by liraglutide increases ACE2 expression, reversing right ventricle hypertrophy, and improving the production of SP-A and SP-B in the lungs of type 1 diabetes rats. *Endocrinology*, 156(10), 3559–3569.
- Rossing, P. and Flyvbjerg, A., 2024, *Diabetic nephropathy*, Textbook of diabetes, 6th Edition, In: Holt, R. (ed.) and Flyvbjerg, A. (ed.), Chapter 44, John Wiley & Sons, UK, ISBN:9781119697428, 341-353.
- Sabbisetti, V. S., Waikar, S. S., Antoine, D. J., Smiles, A., Wang, C., Ravisankar, A., Ito, K., Sharma, S., Ramadesikan, S., Lee, M., Briskin, R., De Jager, P. L., Ngo, T. T., Radlinski, M., Dear, J. W., Park, K. B., Betensky, R., Krolewski, A. S. & Bonventre, J. V., 2014, Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(10), 2177–2186.
- Santos, S. H., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V., Pôrto, L. C., Alvarez-Leite, J. I., Botion, L. M., Bader, M., Alenina, N. and Santos, R. A., 2008, Mas deficiency in FVB/N

mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism, *Diabetes*, 57(2), 340–347.

- Santos, S. H., Giani, J. F., Burghi, V., Miquet, J. G., Qadri, F., Braga, J. F., Todiras, M., Kotnik, K., Alenina, N., Dominici, F. P. and Santos, R. A., & Bader, M., 2014, Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 92(3), 255–265.
- Sharma, R. B. and Alonso, L. C., 2014, Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well?, *Current diabetes reports*, 14(6), 492.
- Shiota, A., Yamamoto, K., Ohishi, M., Tatara, Y., Ohnishi, M., Maekawa, Y., Iwamoto, Y., Takeda, M. and Rakugi, H., 2010, Loss of ACE2 accelerates time-dependent glomerular and tubulointerstitial damage in streptozotocin-induced diabetic mice, *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 33(4), 298–307.
- Soares, E. R., Barbosa, C. M., Campagnole-Santos, M. J., Santos, R. A. S. and Alzamora, A. C., 2017, Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats, *Peptides*, 96, 67–75.
- Soler, M. J., Wysocki, J., Ye, M., Lloveras, J., Kanwar, Y. and Batlle, D., 2007, ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice, *Kidney international*, 72(5), 614–623.
- Soltani Hekmat, A., Amini, F. and Javanmardi, K., 2024, Effects of alamandine on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 27(4), 500-508.
- Soltani Hekmat, A., Chenari, A., Alipanah, H. and Javanmardi, K., 2021a, Protective effect of alamandine on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats, *BMC pharmacology & toxicology*, 22(1), 31.
- Soltani Hekmat, A., Javanmardi, K., Kouhpayeh, A., Baharamali, E. and Farjam, M., 2017, Differences in cardiovascular responses to alamandine in two-kidney, one clip hypertensive and normotensive rats, *Circulation journal:official journal of the Japanese Circulation Society*, 81(3), 405–412.
- Song, X. D., Feng, J. P. and Yang, R. X., 2019, Alamandine protects rat from myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JNK and inhibiting NF- κ B, *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(15), 6718–6726.
- Songür, H. S., Kaya, S. A., Altınışik, Y. C., Abanoz, R., Özçelebi, E., Özmen, F., Kösemehmetoğlu, K. and Soydan, G., 2023, Alamandine treatment prevents LPS-induced acute renal and systemic dysfunction with multi-organ injury in rats via inhibiting iNOS expression, *European journal of pharmacology*, 960, 176160.
- Soro-Paavonen, A., Gordin, D., Forsblom, C., Rosengard-Barlund, M., Waden, J., Thorn, L., Sandholm, N., Thomas, M. C., Groop, P. H. and FinnDiane Study Group, 2012,

Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications, *Journal of hypertension*, 30(2), 375–383.

Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K. and Candasamy, M., 2019, Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention, *Diabetes & metabolic syndrome*, 13(1), 364–372.

Tanrıverdi, L. H., Özhan, O., Ulu, A., Yıldız, A., Ateş, B., Vardı, N., Acet, H. A. and Parlakpınar, H., 2023, Activation of the Mas receptors by AVE0991 and MrgD receptor using alamandine to limit the deleterious effects of Ang II-induced hypertension, *Fundamental & clinical pharmacology*, 37(1), 60–74.

Taquini, A. C., Jr. and Taquini, A. C., 1961, The renin-angiotensin system in hypertension, *American heart journal*, 62, 558–564.

The International Diabetes Federation, 2021, *Diabetes Atlas*, 10th ed., In: Boyko, E. J. (ed.), Magliano, D.J. (ed.), Karuranga, S. (ed.), Piemonte, L. (ed.), Riley, P. (ed.), Saeedi, P. (ed.), Sun, H. (ed.), Chapter 1, ISBN: 978-2-930229-98-0, 5.

Tikellis, C., Bialkowski, K., Pete, J., Sheehy, K., Su, Q., Johnston, C., Cooper, M. E. and Thomas, M. C., 2008, ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes, *Diabetes*, 57(4), 1018–1025.

Tikellis, C., Pickering, R., Tsorotes, D., Du, X. J., Kiriazis, H., Nguyen-Huu, T. P., Head, G. A., Cooper, M. E. and Thomas, M. C., 2012, Interaction of diabetes and ACE2 in the pathogenesis of cardiovascular disease in experimental diabetes, *Clinical science (London, England: 1979)*, 123(8), 519–529.

Tokgöz, B., 2019, Diyabetik Nefropati, *Temel Nefroloji*, In: Yeniçerioğlu, Y. (ed.), Güngör, Ö. (ed.) ve Arıcı, M. (ed.), Kısım 6, Bölüm 1, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-975-277-778-1.

Tonon, F., Candido, R., Toffoli, B., Tommasi, E., Cortello, T., Fabris, B. and Bernardi, S., 2022, Type 1 diabetes is associated with significant changes of ACE and ACE2 expression in peripheral blood mononuclear cells, *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 32(5), 1275–1282.

Triebel, H. and Castrop, H., 2024, The renin angiotensin aldosterone system. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, Advance online publication.

Uchiyama, T., Okajima, F., Mogi, C., Tobo, A., Tomono, S. and Sato, K., 2017, Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue, *PloS one*, 12(6), e0178769.

Vaidya, V. S., Niewczas, M. A., Ficociello, L. H., Johnson, A. C., Collings, F. B., Warram, J. H., Krolewski, A. S. and Bonventre, J. V., 2011, Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase, *Kidney international*, 79(4), 464–470.

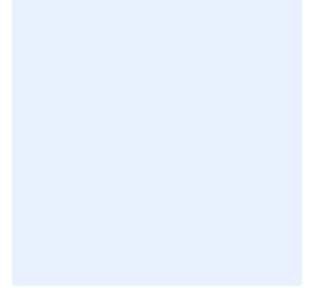
- Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Costa-Besada, M. A., Rivas-Santisteban, R., Garrido-Gil, P., Lopez-Lopez, A., Navarro, G., Lanciego, J. L., Franco, R. and Labandeira-Garcia, J. L., 2021, An ACE2/Mas-related receptor MrgE axis in dopaminergic neuron mitochondria, *Redox biology*, 46, 102078.
- Vallon V., 2015, The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus, *Annual review of medicine*, 66, 255–270.
- Vallon, V. and Komers, R., 2011, Pathophysiology of the diabetic kidney, *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1175–1232.
- Wang, D., Li, J., Luo, G., Zhou, J., Wang, N., Wang, S., Zhao, R., Cao, X., Ma, Y., Liu, G. and Hao, L., 2023a, Nox4 as a novel therapeutic target for diabetic vascular complications, *Redox biology*, 64, 102781
- Wang, W., Zhang, Y., Huang, W., Yuan, Y., Hong, Q., Xie, Z., Li, L., Chen, Y., Li, X. and Meng, Y., 2023b, Alamandine/MrgD axis prevents TGF- β 1-mediated fibroblast activation via regulation of aerobic glycolysis and mitophagy, *Journal of translational medicine*, 21(1), 24. b.
- Wang, Y., Fang, Q., Jin, Y., Liu, Z., Zou, C., Yu, W., Li, W., Shan, X., Chen, R., Khan, Z. and Liang, G., 2019, Blockade of myeloid differentiation 2 attenuates diabetic nephropathy by reducing activation of the renin-angiotensin system in mouse kidneys, *British journal of pharmacology*, 176(14), 2642–2657.
- Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S., 2005, Inflammation, stress, and diabetes, *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1111–1119.
- World Health Organization (WHO), 1999, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consultation, Department of Non communicable Disease Surveillance, WHO, Geneva.
- Wysocki, J., Ye, M., Soler, M. J., Gurley, S. B., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., Coffman, T. M., Chen, S. and Batlle, D., 2006, ACE and ACE2 activity in diabetic mice, *Diabetes*, 55(7), 2132–2139.
- Yamaleyeva, L. M., Gilliam-Davis, S., Almeida, I., Brosnihan, K. B., Lindsey, S. H. and Chappell, M. C., 2012, Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes, *American journal of physiology. Renal physiology*, 302(11), F1374–F1384.
- Yang, C., Wu, X., Shen, Y., Liu, C., Kong, X. and Li, P., 2020, Alamandine attenuates angiotensin II-induced vascular fibrosis via inhibiting p38 MAPK pathway, *European journal of pharmacology*, 883, 173384.
- Yang, S., Zhao, L., Han, Y., Liu, Y., Chen, C., Zhan, M., Xiong, X., Zhu, X., Xiao, L., Hu, C., Liu, F., Zhou, Z., Kanwar, Y. S. and Sun, L., 2017, Probucol ameliorates renal injury in diabetic nephropathy by inhibiting the expression of the redox enzyme p66Shc, *Redox biology*, 13, 482–497.

- Ye, M., Wysocki, J., Naaz, P., Salabat, M. R., LaPointe, M. S. and Batlle, D., 2004, Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination?, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 43(5), 1120–1125.
- Yildiz, A., Aras, M. Y., Gunata, M., Durhan, M., Polat, S., Parlakpınar, H., Cigremis, Y. and Vardi, N., 2023, Alamandine alleviates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats by targeting oxidative stress and inflammation, *Annals of Medical Research*, 30(8), 899–904.
- Zeni, L., Norden, A. G. W., Cancarini, G. and Unwin, R. J., 2017, A more tubulocentric view of diabetic kidney disease, *Journal of nephrology*, 30(6), 701–717.
- Zhang, K., Meng, X., Li, D., Yang, J., Kong, J., Hao, P., Guo, T., Zhang, M., Zhang, Y. and Zhang, C., 2015, Angiotensin (1-7) attenuates the progression of streptozotocin-induced diabetic renal injury better than angiotensin receptor blockade, *Kidney international*, 87(2), 359–369.
- Zhang, L., Taylor, N., Xie, Y., Ford, R., Johnson, J., Paulsen, J. E. and Bates, B., 2005, Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human. *Brain research, Molecular brain research*, 133(2), 187–197.
- Zhao, K., Hua, D., Yang, C., Wu, X., Mao, Y., Sheng, Y., Sun, W., Li, Y., Kong, X. and Li, P., 2023, Nuclear import of Mas-related G protein-coupled receptor member D induces pathological cardiac remodeling, *Cell communication and signaling : CCS*, 21(1), 181.
- Zhao, K., Xu, T., Mao, Y., Wu, X., Hua, D., Sheng, Y. and Li, P., 2022, Alamandine alleviated heart failure and fibrosis in myocardial infarction mice, *Biology direct*, 17(1), 25.
- Zheng, C., Huang, L., Luo, W., Yu, W., Hu, X., Guan, X., Cai, Y., Zou, C., Yin, H., Xu, Z., Liang, G. And Wang, Y., 2019, Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice, *Cell death & disease*, 10(11), 848.
- Zhu, J., Qiu, J. G., Xu, W. T., Ma, H. X. and Jiang, K., 2021, Alamandine protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats via inhibiting oxidative stress, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 73(11), 1491–1502.
- Zhu, P., Verma, A., Prasad, T. and Li, Q., 2020, Expression and function of Mas-related G protein-coupled receptor D and its ligand alamandine in retina, *Molecular neurobiology*, 57(1), 513–527.
- Zhuo, J. L., Ferrao, F. M., Zheng, Y. and Li, X. C., 2013, New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms, *Frontiers in endocrinology*, 4, 166.

EKLER**EK1: Etik kurul karar metni**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	
Fakülte	
Bölümü	
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	

Makale ve Bildiriler	