

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİABETİK SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA
ENALAPRİL VE LOSARTAN'IN
GHRELİN İMMUNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehmet Murat DOĞAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emir DÖNDER**

**ELAZIĞ
2010**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir DÖNDER ve tüm değerli iç hastalıkları hocalarıma, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Özlem DABAK, emeğini ve bilgisini hiç esirgemeyen Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU'na ve yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Ali Gürel'e teşekkür ederim.

Yine, uzmanlık eğitimi aldığım İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda çalışan araştırma görevlisi, hemşire, personel arkadaşlarıma ve eğitimim boyunca sabırla desteklerini esirgemeyen çok kıymetli annem ve ablalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

En son olarak uzmanlık eğitimimin her aşamasında emeğini ve her konudaki yardımını esirgemeyen sevgili eşim Emel ve hayatımızın neşe ve mutluluk kaynağı bitanecik kızım Nehir'e sonsuz teşekkürler.

Bu tez, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından 1956 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

DENEYSEL DİABETİK SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA ENALAPRİL VE LOSARTAN'IN GHRELİN İMMUNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Diabetes mellitus kan şekeri yüksekliği ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyretmektedir. Dünyada giderek daha fazla sayıda insanı etkileyen diabetes mellitusun önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden birisi de diabetik nefropatidir. Enalapril ve losartanın renal sistem üzerine oksidasyon yollarında inhibisyona neden olarak ve proteinüriyi azaltarak böbreği korudukları bilinmektedir.

Ghrelın, büyüme hormonu (BH) salınımını uyarın ve böbrek dahil birçok dokudan salgılanan endojen bir peptiddir. Son zamanlarda, yeni düzenleyici bir peptid olan ghrelinin diabetes mellitus patogeneğinde rol oynayabileceği vurgulanmaktadır.

Bu çalışmada, diabetin önemli hedef organlarından birisi olan böbrek dokusundaki hasarda tedavi ajanı olarak kullanılan enalapril ve losartanın, BH salınımını uyarıcı bir molekül olan ghrelın immunreaktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 6 haftalık, 210 ± 20 gram ağırlığında Wistar albino cinsi 28 sıçan kullanıldı. Tüm gruplar 4 hafta süre ile standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Kontrol grubuna (Grup 1) herhangi bir uygulama yapılmadı. Diğer 3 gruba ise 50 mg/kg olacak şekilde tek doz streptozocin 0, 1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. Deneysel diabetes mellitus oluştuktan sonra diabet grubu (Grup 2) belirlenip herhangi bir uygulama yapılmadı. Diabet+enalapril grubuna (Grup 3) 4 hafta süreyle 5 mg/kg/gün enalapril orogastrik sonda ile uygulandı. Diabet+losartan grubuna (Grup 4) 4 hafta süreyle 10 mg/kg/gün losartan orogastrik sonda ile uygulandı. Deney sonunda sıçanlar dekapite edildi ve böbrek dokuları çıkarıldı. Rutin ışık mikroskobu takibi yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere histolojik boyamalar yapıldı ve ghrelın immunreaktivitesi için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı.

İmmunhistokimyasal boyamada, kontrol grubunda distal tübüllerde orta şiddette (++) ghrelın immunreaktivitesi izlendi. Deneysel olarak diabet oluşturulan sıçanlarda böbrek korteksinde distal tübüllerde şiddetli (+++) ghrelın

immunreaktivitesi izlendi. Aynı şekilde bu grupta böbrek medullasındaki distal tübüllerde de şiddetli (+++) ghrelin immunreaktivitesi izlendi. Tedavi gruplarında (Grup 3 ve Grup 4) ise, böbrek korteks ve medullasında ghrelin immunreaktivitesi kontrollerdekine benzer bir görünümdeydi. Distal tübüllerde orta şiddette (++) ghrelin immunreaktivitesi izlendi.

Diabetes mellitusun patogenezi ile ghrelin arasında bir ilişki vardır. Diabetik grupta ghrelin immunreaktivitesi artmıştır. Tedavi gruplarının her ikisinde de ghrelin immunreaktivitesinin diabetik gruba göre azaldığı saptandı. Bu çalışmanın sonucunda enalapril ve losartan uygulanmasının diabetik sıçanların böbrek dokusunda ghrelin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu ve bu konuda diabette daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Diabetes mellitus, enalapril, losartan, ghrelin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ENALAPRIL AND LOSARTAN ON GHRELIN IMMUNREACTIVITY ON KIDNEYS OF THE RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES

Diabetes mellitus is characterised with high blood glucose levels and disorders of carbohydrate, protein, and lipid metabolisms. Diabetes mellitus affects more and more people worldwide and one of the most important morbidity and mortality cause of diabetes is diabetic nephropathy. Renal protective effects of enalapril and losartan by inhibition of oxidation pathways and reducing proteinuria is known.

Ghrelin is an endogenous peptide, which stimulates the growth hormone secretion, is secreted by most of the tissues includes kidneys. Recently, it is assumed that ghrelin, which is a regulatory peptide, can have role in the pathogenesis of diabetes mellitus.

In this study, we investigated the effects of losartan and enalapril which are used as therapeutic agents in diabetic nephropathy on immunreactivity of ghrelin.

We used 28 Wistar albino rats that were 6 weeks age and 210 ± 20 gr weight. We fed all groups for 4 weeks with standard food and water. In control group, (Group 1) no intervention was executed. In other 3 groups, 50 mg/kg streptozocin solved in 0,1 M phosphate-citrate buffer (pH 4.5) was injected intraperitoneally. After the establishment of experimental diabetes mellitus we determined the diabetes group (Group 2) and no intervention was executed to this group. In diabetes + enalapril group (Group 3), we administered 5 mg/kg/day enalapril via orogastric catether for 4 weeks. Diabetes+losartan group (Group 4), we administered 10 mg/kg/day losartan via orogastric catether for 4 weeks. After the experiments rats were decapitated and renal tissues were taken out. With routine light microscope observation, tissues were intered into paraffine blockes stained with histologic coloures and for ghrelin immunreactivity “avidin-biotin-peroxidase” method was applied.

With immunohistochemical stain, we observed moderate (++) ghrelin immunreactivity on distal tubuli. In experimentally diabetes group, we observed severe (+++) ghrelin immunreactivity on renal cortex and renal medulla distal tubuli. In treatment groups (Group 3 and Group 4), ghrelin immunreactivity in renal cortex

and medulla was similar to control group, and moderate (++) ghrelin immunoreactivity was observed in distal tubuli.

There is relationship between diabetes mellitus and ghrelin. In diabetic group, ghrelin immunoreactivity was high. In both treatment groups, ghrelin immunoreactivity was low in comparison with diabetic group. In conclusion, we determined that enalapril and losartan administration has effects on ghrelin expression in renal tissue of diabetic rats and more comprehensive studies are needed on this issue.

Key Words: Diabetes mellitus, enalapril, losartan, ghrelin

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.1.1. Diabetes mellitus'un Tanımı	1
1.1.2. Diabetes mellitus'un Sınıflandırılması	1
1.1.3. Diabetes mellitus'un Komplikasyonları	2
1.2. Diabetik Nefropati	3
1.2.1. Diabetik Nefropati'nin Tanımı ve Epidemiyolojisi	3
1.2.2. Diabetik Nefropati'nin Patogenezi	3
1.2.3. Diabetik Nefropati'nin Patolojisi	4
1.2.4. Diabetik Nefropati'nin Klinik Seyri	5
1.2.5. Diabetik Nefropati'den Korunma ve Tedavi	5
1.3. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi	6
1.4. Anjiotensin Converting Enzim İnhibitörleri	7
1.5. Angiotensin II ve Reseptörleri	7
1.6. Anjiotensin II Tip 1 Reseptör Blokerleri	7
1.7. Diabetik Nefropati Patogenezi ve Büyüme Hormonu İlişkisi	8
1.8. Ghrelin	9
1.8.1. Ghrelin'in Yapısı	10
1.8.2. Ghrelinin Doku Dağılımı	10
1.8.3. Ghrelin ve GHS-R Dağılımı	11
1.8.4. Ghrelinin Hormon Salgılatıcı Etkileri	14
1.8.5. Ghrelinin Sistemler Üzerine Etkileri	14

1.8.6. Ghrelinin Endokrin ve Periferik Etkileri	15
1.8.7. Ghrelin ve İlişkili Hastalıklar	16
1.8.7.1. Ghrelin ve Obezite	16
1.8.7.2. Ghrelin ve Renal Yetmezlik	17
1.8.7.3. Ghrelin ve Diabetes Mellitus	17
2. GEREÇ ve YÖNTEM	19
2.1. Deneysel Hayvanları ve Beslenmeleri	19
2.2. Deneysel Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar	19
2.3. Örneklerin Alınması	21
2.4. Biyokimyasal Çalışma	21
2.5. Histolojik Çalışma	21
2.6. İmmünohistokimyasal Çalışma	22
2.7. İstatistiksel Analiz	24
3. BULGULAR	25
3.1. Klinik ve Biyokimyasal Bulgular	25
3.2. Histolojik Bulgular	25
3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	31
4. TARTIŞMA	37
5. KAYNAKLAR	42
6. ÖZGEÇMİŞ	56

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Ülkemizde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diabet Bilim Dalı'nın diabetik nefropati istatistik tablosu	3
Tablo 2. Ghrelinin etkileri	16
Tablo 3. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	19
Tablo 4. Histolojik takip serileri	22
Tablo 5. İmmunohistokimyasal boyama işlemi	23
Tablo 6. İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi	24
Tablo 7. STZ ile deneysel DM oluştuğu andaki başlangıç ve 4 hafta sonraki final ağırlık ve kan şekeri ölçüm değerleri	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Grup 1’de normal böbrek histolojisi	27
Şekil 2. Grup 1’de normal yapıda proksimal ve distal tübüller	27
Şekil 3. Grup 2’de glomerüllerde mezangial matriks artışı	28
Şekil 4. Grup 2’de tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarında ayrılma ve bozulmalar	28
Şekil 5. Grup 3’de Bowman mesafesi	29
Şekil 6. Grup 3’de tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarında ayrılma ve bozulmalar	29
Şekil 7. Grup 4’de Bowman mesafesi	30
Şekil 8. Grup 4’de tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarında ayrılma ve bozulmalar	30
Şekil 9. Grup 1’de böbrek korteksinde ve distal tübüllerde ghrelin immunreaktivitesi	32
Şekil 10. Grup 1’de böbrek medullasının ve distal tübüllerinin görünümü	32
Şekil 11. Grup 2’de böbrek korteksinde ve distal tübüllerde ghrelin immunreaktivitesi	33
Şekil 12. Grup 2’de böbrek medullasında ve distal tübülde ghrelin immunreaktivitesi	33
Şekil 13. Grup 3’de böbrek korteksinde ve distal tübüllerde ghrelin immunreaktivitesi	34
Şekil 14. Grup 3’de böbrek medullasında ve distal tübüllerde ghrelin immunreaktivitesi	34
Şekil 15. Grup 4’de böbrek korteksinde ve distal tübüllerde ghrelin immunreaktivitesi	35
Şekil 16. Grup 4’de böbrek medullasında ghrelin immunreaktivitesi	35
Şekil 17. Negatif kontrol	36
Şekil 18. Pozitif kontrol. Midede ghrelin immunreaktif hücreler	36

KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiotensin Converting Enzim
ACEİ	: Anjiotensin Converting Enzim İnhibitörü
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AGE	: İleri Glikolizasyon Son Ürünleri
ARB	: Anjiotensin II Reseptör Blokeri
AT I	: Anjiotensin II Tip 1 Reseptörü
AT II	: Anjiotensin II Tip 2 Reseptörü
AT III	: Anjiotensin II Tip 3 Reseptörü
AT IV	: Anjiotensin II Tip 4 Reseptörü
BH	: Büyüme Hormonu
BHRH	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
DM	: Diabetes mellitus
EN	: Enalapril
FSH	: Folikül stimulan hormon
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GH	: Growth hormone (Büyüme Hormonu)
GHS-R	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör
GHS-R1a	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü 1a
GHS-R1b	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü 1b
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü - 1
İ.p	: İntraperitoneal
İ.v	: İntravenöz
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
LS	: Losartan
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PAS	: Peryodik Asit Shift
RAAS	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
RKA	: Renal Kan Akımı
S.c	: Subkutan
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
STZ	: Streptozosin
TSH	: Tiroid stimulan (uyarıcı) hormon
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı

Kan şekeri yüksekliği ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden diabetes mellitus; pankreastan salgılanan insülin hormonunun mutlak veya nisbi yetersizliği veya insülin hormonunun etkisizliği veya insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucunda oluşur (1). Diabetes mellitus (DM) klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi semptomlar ile ortaya çıkar. Çoğunlukla semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Kimi zaman da retinopati, nöropati ve nefropati gibi komplikasyonlar ile karşımıza gelir (2-4). 2005 yılında dünyada yaklaşık olarak 130 milyon diabetik hasta olduğu tahmin edilmekte iken, bu sayının Uluslararası Diabet Federasyonu'nun önerdiği koruma önlemleri alınmadığı takdirde, 2025 yılında 333 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Kayıtların düzenli ve güvenilir tutulduğu Amerika Birleşik Devletleri'nde 2005 yılında 18.2 milyon kişinin diabetli olduğu ve bu sayının her yıl 1 milyonun üzerinde arttığı belirtilmektedir (5).

1.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Son yıllardaki gelişmelerle DM'un sınıflandırılmasında yeni düzenlemelerin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı 1995 yılında Amerikan Diabet Cemiyetinin destekleriyle kurulan ve çalışmaya başlayan International Expert Committee, 1980'lerden beri yapılan çalışmaların tamamını incelemiş ve tekrar değerlendirerek DM'un sınıflamasını gözden geçirmiştir. International Expert Committee'nin önerdiği DM'un etyolojik sınıflaması aşağıdaki gibidir (6);

1. Tip 1 DM

- A. Otoimmün
- B. İdiyopatik

2. Tip 2 DM

Belirgin insülin direnci ile birlikte insülin eksikliği ve/veya belirgin insülin salgılanma bozukluğu ile birlikte nisbi insülin direnci arasında değişebilir.

3. Gestasyonel DM

4. Diğer spesifik tipler

- A. Beta hücre fonksiyonunun genetik defektleri

- B. İnsülin etkisindeki genetik defektler
- C. Ekzokrin pankreas hastalıkları (Pankreatit, travma, neoplazi, kistik fibrozis, hemokromatozis)
- D. Endokrin hastalıklar (Akromegali, cushing sendromu, glukagonoma, hipertiroidizm, somatostatinoma)
- E. İlaç veya kimyasal maddelerin indüklediği (Vacor, pentamidin, nikotinik asit, glukokortikoid, tiroid hormonları, dilantin, diazoksid)
- F. Enfeksiyonlar (Konjenital rubella, sitomegalovirus)
- G. Otoimmuniteye bağlı nadir diabet formları
- H. Diabetle birlikte olan diğer genetik sendromlar (Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Prader-Willi sendromu)

1.1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diabetes mellitus, akut ve kronik komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır.

Komplikasyonlar aşağıdaki gibi gruplandırılabilir (7);

1- Akut Komplikasyonlar

- A. Diabetik ketoasidoz koması
- B. Hiperosmolar nonketotik koma
- C. Hipoglisemi
- D. Laktik asidoz koması

2- Kronik Komplikasyonlar

I- Mikrovasküler

- A. Diabetik retinopati
- B. Diabetik nefropati
- C. Diabetik nöropati

II- Makrovasküler

- A. Serebrovasküler hastalık
- B. Koroner arter hastalığı
- C. Periferik damar hastalığı
- D. Diğerleri (Gastrointestinal, genitoüriner, dermatolojik, enfeksiyon, katarakt, glukoma)

Kronik dejeneratif komplikasyonlar, en ciddi sağlık sorunlarından birini oluşturur. Uzun süre diabeti olan olgularda tüm damarlarda bozukluklar gelişir. Değişiklikler hem kapiller ve arteriollerini yapan vasküler hücreleri ve hem de bunların

bazal membranlarını tutar. Bütün mikrovasküler yapılar tutulmuş olmasına karşın, klinik olarak ancak retina, renal glomerüller ve büyük sinirlerde patoloji ortaya çıkar (8).

1.2. Diabetik Nefropati

1.2.1. Diabetik Nefropati'nin Tanımı ve Epidemiyolojisi

Diabetik nefropati, başka bir renal hastalığı, kalp yetersizliği, üriner sistem enfeksiyonu veya hematürisi olmayan diabetik bireylerde saptanan kalıcı albuminüri, glomerüler filtrasyon hızında azalma ve kan basıncında yükseklik olarak tanımlanır. Diabetik nefropati son dönem böbrek yetersizliğinin en sık nedenidir. Diyaliz programına yeni alınan hastaların % 30-40'ı diabetik nefropatik bireylerdir. Diyaliz ve transplantasyon tedavilerindeki gelişmelere rağmen, 5 yıllık sağkalım, nondiabetiklerden daha düşük, % 20'ler dolayındadır. Nefropatili diabetik bireylerde mortalite oranı, nefropatisi olmayanlara göre 20-40 kat daha fazladır (9).

Tip 1 ve Tip 2 DM için, aşık proteinürinin kriter olarak alınmasına bağlı olarak Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) dünyadaki 13 merkezde yapılan tarama sonuçlarına göre diabetik nefropati prevalansı % 25 çıkmıştır. Tip 1 DM için prevalans % 6-27 iken, Tip 2 DM için % 5-32.9 aralığında bulunmuştur (10).

Ülkemizde ise İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diabet Bilim Dalı'nın diabetik nefropati istatistiği Tablo 1'de verilmiştir (11).

Tablo 1. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diabet Bilim Dalı'nın Diabetik Nefropati İstatistik Tablosu

DM Tipi	0-5. yıl	6-10. yıl	11-20. yıl	21 yıl ve üzeri
Tip 1 DM (%)	1.2	3.2	29.4	27.8
Tip 2 DM (%)	4.1	6.5	12.4	22.8

1.2.2. Diabetik Nefropati'nin Patogenezi

Diabetik nefropati patogenezinden hemodinamik faktörler, metabolik faktörler, oksidatif stresler ve renal hipertrofi sorumlu tutulmaktadır. Böbrek hücreleri diabetik nefropati sürecinde mekanik yüklenme, proteinüri, hiperglisemi, glikozillenmiş proteinler, sitokinler, hormonlar, kemokinler, adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks gibi birçok ekstraselüler sinyaller alırlar (12).

Diabetik hastaların çoğunda diabetik nefropati, diabetin ortaya çıkışından en az 10 yıl sonra görülür ve Tip 1 diabette, Tip 2 diabetten daha sık görülmektedir. Diabet tanısı konduktan 30 yıl içinde proteinüri görülmez ise, bu hastalarda diabetik glomeruloskleroza nadiren rastlanır. Diabetik nefropatide hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonlar geç dönemlerde ortaya çıkar ve mortalite riski daha fazladır (13, 14).

1.2.3. Diabetik Nefropati'nin Patolojisi

Diabetik nefropatinin patolojisi, makroskopik ve mikroskopik özelliklere göre 2'ye ayrılır (12);

A. Makroskopik Özellikler: Diabetin tipi, süresi, hipertansiyon ve infeksiyon varlığına göre böbreklerin makroskopik morfolojisi değişkenlik gösterir. Erken evrelerde böbrekler hipertrofi ve hiperplazi nedeniyle büyüktür. Son dönem böbrek yetmezliği evresinde Tip 1 diabetes mellituslu hastaların böbrekleri küçülmüştür. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda ise son dönemde bile böbreklerin boyutu değişmeyebilir.

B. Mikroskopik Özellikler: Glomerüller, tubuluslar ve damarlar ayrı ayrı incelenir;

a. Glomerüller: 4 grupta incelenir;

1. Nodüler interkapiller glomeruloskleroz: Diabete özgüdür. Nodüller asellülerdir ve glomerülde birden çok nodül bulunabilir. Genellikle diffüz lezyonlara eşlik eder. Görülme sıklığı % 22-55 arasındadır.
2. Diffüz interkapiller glomeruloskleroz: Tüm glomerül yumağı ve glomerüllerin çoğu tutulur. Nodüler formun öncüsüdür. Bu lezyon ile glomerüler filtrasyon hızı (GFR) azalması, proteinüri ve hipertansiyon arasında ilişki saptanmıştır.
3. Kapsüler drop lezyonu: Glomerül bazal membran katmanlarındaki eozinofilik bir yığındır. Erken dönem diabetik nefropati tanısında yardımcıdır.
4. Eksudatif lezyon: Sık görülür ve fibrin-cap lezyonu olarak adlandırılır. Diabete özgü değildir. Ateroskleroz ve vaskülitlerle ilişki gösterir. Heterojen dağılım gösteren eozinofilik ve lipit içeren bir yapıdır.

b. Tubuluslar: En özgül değişiklik tubulus epitelindeki glukojen depolanmasıdır (Armani Ebstein lezyonu).

c. Damarlar: Afferent ve efferent arteriollerde subintimal hyalin birikimi tipiktir.

1.2.4. Diabetik Nefropatinin Klinik Seyri

Diabetik nefropatinin kliniği ve seyri 5 evreye ayrılır. Bunlar (9);

Evre I: Başlangıçta böbreklerde herhangi histolojik bir değişiklik yoktur, ancak renal kan akımı (RKA) ve GFR artmıştır.

Evre II: Glisemi değeri kontrol altına alınamazsa 3 yıl içinde histolojik değişiklikler ortaya çıkmaya başlar. Bu evrede RKA ve GFR yüksekliği devam etmektedir. Takip eden 10-15 yıl içinde renal hasar ilerleme göstermesine rağmen renal tutulumun laboratuvar bulguları yoktur. Fizik egzersiz yapıldığında veya hiperglisemi dönemlerinde mikroalbuminüri (30-300 mg /gün veya 20-200 mcg/dk) görülebilir. İstirahat sırasında veya metabolik kontrolün iyi olduğu dönemlerde mikroalbuminüri yoktur. Birçok hasta yaşamı boyunca 2. evreden ileri geçmez.

Evre III: Bu dönemin sonlarına doğru rutin yöntemlerle saptanamayan albumin atılımının belirgin özelliği, mikroalbuminürinin kalıcı özellik kazanmasıdır. Başlangıç diabetik nefropati dönemi diye de adlandırılır. Bu dönemde kan basıncının yüksek oluşu nefropati gelişimini hızlandıracaktır.

Evre IV: Tanıdan yaklaşık 15 yıl sonra makroalbuminüri (>300 mg/gün) saptanır. RKA ve GFR düşmeye başlar. Antihipertansif tedavi ile GFR düşme hızını % 60 oranında azaltmak mümkündür.

Evre V: Makroalbuminüri başlangıcından sonra 5 yıl içinde hastaların % 50' sinde GFR düşer ve serum kreatinini 2 katına çıkar. Bir sonraki 5 yıl içinde ise bu hastaların yarısı son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) geçiş gösterir.

1.2.5. Diabetik Nefropatiden Korunma ve Tedavi

Diabetik nefropatiden korunmanın yolları hastalığın oluşumunda ve ilerleyişinde rolü bulunan faktörleri diabetik hastada ortadan kaldırmak veya etkilerini hafifletmekten geçer. Bunlar; yüksek GFR, sürekli yüksek ve/veya düzensiz hiperglisemi, gözden kaçan veya tedavisine özen gösterilmeyen hipertansiyon, dislipidemi, elektrolit değişiklikleri, anemi, hipervizkozite, yorucu işlerde çalışmak, ateroskleroz, sigara, aşırı hayvansal protein ve tuz tüketimi gibi çeşitli faktörlerdir (15).

Birincil korunma ve tedavi, risk altındaki diabet hastalarına yönelik yapılan tedavi yöntemleridir. Normoalbuminürik ve hipertansif Tip 2 diabet hastalarında anjiotensin converting enzim inhibitörü (ACEİ), dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokerleri ve beta blokerler benzer oranlarda renoproteksiyon sağlarlar. Normotansif ve normoalbuminürik Tip 1 ve Tip 2 diabet hastalarında antihipertansif kullanımı mikroalbuminüri oluşmasını engeller (12).

İkincil korunma ve tedavi, mikroalbuminürik yüksek risk altındaki diabetik hastalara yönelik tedavi yöntemleridir. ACEİ'leri mikroalbuminüriye gidişi % 62 oranında azaltmaktadır. İkincil korunmada en önemli görüş, böbrek hastalığının ilerlemesini önlemek için ACEİ'leri kullanmaktır (12).

Üçüncül korunma ve tedavi, SDBY gelişmesini önlemek ve geciktirmek için klinik diabetik nefropatili hastalara uygulanan tedavilerdir. En önemli yaklaşım proteinürinin azaltılmasıdır. Tip 1 DM'de erken ve agresif antihipertansif tedavi albuminüriyi azaltmakla birlikte glomerüler filtrasyon hızını da yavaşlatır. ACEİ'leri ve Anjiotensin II Reseptör Blokerleri (ARB) kan basıncı ve albuminüriyi azaltmada benzer etkinlik göstermektedirler. Hipertansif makroalbuminürik ve böbrek yetmezliği olan Tip 2 diabetli hastalarda ARB kullanımı, nefropatinin ilerlemesini geciktirmektedir (12).

1.3. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi (RAS)

RAS, vücut sıvı, elektrolit dengesi ve arteryel basıncı etkilemek suretiyle kardiyovasküler sistemin yanısıra renal ve adrenal fonksiyonları da kontrol etmektedir. RAS'ın ana mediatörü olan Anjiotensin II, vazokonstriksiyon, aldosteron salınımı, vazopressin salınımı, sodyum ve su retansiyonu ve sempatik aktivasyona neden olur (16). Buna ek olarak, renin anjiotensin - aldosteron sistemi (RAAS); renal hemodinami, kan basıncı ve sıvı elektrolit dengesinin ayarlanmasında rol oynayan, hedef organ hasarının belirleyicisi bir enzim grubundan oluşmaktadır (17, 18). Renal perfüzyon basıncındaki azalmaya yanıt olarak salınan renin, karaciğer kaynaklı bir alfa-2 globulin olan anjiotensinojenin bir dekapeptit olan Anjiotensin I' e dönüşümünü sağlar. Anjiotensin I daha sonra bir oktapeptit olan Anjiotensin II' ye dönüşür. Bu dönüşümün % 60'ından ACE sorumlu iken, geri kalanı kimaz, katepsin G ve diğer serin proteazlar tarafından gerçekleştirilir (19). RAS sistemine ait genetik anomaliler diabetik nefropati gelişiminde potansiyel risklerdir. Diabetik

nefropati ve SDBY ilerlemesi gliseminin kontrolü ve ACEİ'leri kullanımı ile hastalığın ilk basamaklarında geri döndürülebilir (20).

1.4. Anjiotensin Converting Enzim İnhibitörleri (ACEİ)

ACE, pulmoner damarlar, endokard ve beyinde yaygın olmak üzere vasküler endotelyumda bulunan ve çinko atomu içeren bir metalloproteazdır (21). Bu enzimin inhibisyonu güçlü bir vazokonstriktör olan Anjiotensin II düzeyinde azalmaya neden olur. Bu azalma, arter ve venüllerde vazodilatasyon oluşturarak total periferik damar direncini azaltır ve kan basıncında düşmeye neden olur. ACE inhibisyonuyla Anjiotensin II'ye dönüştürülemeyen Anjiotensin I, vazodilatatör olan anjiyotensin 1-7'ye dönüştürülür. ACEİ'lerinden enalapril, aktif kısmının kimyasal yapısına göre karboksil grubu içeren grupta bulunmaktadır (22).

1.5. Angiotensin II ve Reseptörleri

RAS'ın ana medyatörü olan Angiotensin II, damar düz kaslarının direkt kasılmasıyla kan basıncının yükselmesini ve miyokardiyal kontraktilitenin arttırılmasını sağlar. Adrenal bezlerden aldosteron salınımının uyarılmasıyla da su ve tuz retansiyonu, sempatik sinir uçlarından katekolamin salınımının uyarılması, hücre büyüme ve çoğalmasının aktivasyonunu sağlayan birçok etkisi vardır (23). Araştırmacıların yaptığı çalışmalara göre 1980'li yıllarda, Anjiotensin II için Anjiotensin II Tip 1 Reseptörü (AT I) ve Anjiotensin II Tip 2 Reseptörü (AT II) isimli birbirinden farklı, en az iki tane reseptör alt tipi tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar ise, Anjiotensin II Tip 3 Reseptörü (AT III) ve Anjiotensin II Tip 4 Reseptörü (AT IV) reseptörlerinin varlığını göstermiştir. Ancak, yeterince klonlama çalışmaları yapılmadığı için bu reseptör fonksiyonları hakkındaki bilgiler henüz eksiktir (24). Anjiotensin II, kardiyovasküler, nöronal, renal, endokrin ve hepatik sistem üzerindeki fizyolojik etkilerinin hemen hemen tamamını AT1 reseptörünün uyarılması ile gerçekleştirir (25). AT1 reseptörü; kalp, böbrek, vasküler düz kas hücreleri, beyin, adrenal bez, trombositler, yağ dokusu ve plasantada yerleşmiş olarak bulunur (26, 27).

1.6. Anjiotensin II Tip 1 Reseptör Blokerleri

1970 yılından itibaren yapılan çalışmalar, Angiotensin II'nin kalp ve böbrekte oluşturduğu zararlı etkileri göstermiştir. Yüksek plazma renin aktivitesine sahip olan hastaların düşük plazma renin aktivitesi gösterenlere oranla daha ileri derecede myokard enfarktüsü ve şok riski taşıdığı bulunmuştur (28). Daha sonraları, RAS'ı

bloke eden ilaçların gelişimi ile sistemik kan basıncı ve hipertansiyon gibi hastalıklar tedavi edilebilmiş, konjestif kalp yetmezliği ve kronik böbrek yetmezliği kontrol altına alınabilmiştir. RAS inhibisyonu yapan ACE inhibitörleri bir seri çalışma sonucunda geliştirilmiştir (29, 30).

ACE inhibitörü tedavisi sırasında çeşitli nedenlerle ortaya çıkan sorunlar nedeniyle ACE inhibitörü tedavisine alternatif arayışlar ortaya çıkmıştır. Günümüzde tedavi alanına girmiş ya da hala Faz III ve Faz IV klinik farmakolojik çalışmaları sürmekte olan güçlü ve uzun etkili oral yolla kullanılan nonpeptid yapıda selektif AT1 reseptör blokerleri bulunmuştur. 1994 yılında Losartan ve 1997 yılında Valsartan'ın ortaya çıkması ile AT1 reseptör blokerleri kullanıma girmiştir (31).

1.7. Diabetik Nefropati Patogenezi ve Büyüme Hormonu İlişkisi

Diabetik nefropati patogenezi üzerine etkili olan faktörler aşağıda belirtilmiştir (15);

- A. Hemodinami:** Hemodinamik değişimler ve glomerül içi basınç artışı, büyüme hormonu (BH) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), eikosanoidler, bradikinin, RAS, endotelin-1 ve reseptörü, nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz, atrial natriüretik peptid ve sodyum-hidrojen ters akımı.
- B. Hiperglisemi:** Glukoz toksisitesi ve ileri glikasyon son ürünleri (AGEP) ve reseptörleri, poliol yolu-aldoz redüktaz, glomerüler glikozaminoglikan ve heparan sülfat içeriği, büyüme faktörleri, protein kinaz C aktivitesi, sitokinler ve kemokinler.
- C. Hücre ve Moleküler Yapı Değişiklikleri:** Nefron ve glomerülopati ilişkisi, renal elastin-elastaz sistemi, albüminüri oluşmasında tübüler mekanizma (cubilin ve megalin), mononükleer hücrelerin glomerüler ve peritübüller kapiller endotel hücrelerinde birikimi ve adezyon moleküllerinin rolü.
- D. Dislipidemi**
- E. İnsülin Direnci**
- F. Böbrek İçi Pıhtılaşma ve Fibrinoliz Defektleri**
- G. Metilentetrahidrofolat Redüktaz**

BH etkilerinin çoğunu somatomedinler veya insülin benzeri büyüme faktörleri olarak da adlandırılan aracı maddeler yoluyla gerçekleştirir (32). Yapılan çalışmalarda, IGF-1'in sadece glomerüler hemodinami üzerine değil, diabetik

nefropatinin patognomonik bulgularının başında gelen mezangial hücre hipertrofisinde de rol aldığı görülmüştür (15). İlk kez kardiyovasküler alanda çalışma yapan Japon bilim adamları tarafından midede keşfedilen ve BH salgılatıcı aktiviteye sahip olan ghrelinin, IGF-1 ile de ilişkili olduğu saptanmıştır (33, 34).

Araştırmacılar, deneysel diabetik sıçanların böbrek dokularında distal tübülüs ve toplayıcı kanallarda diabetin süresiyle orantılı olarak ghrelin immunreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir (35). Yapılan klinik çalışmalarda ise son dönem böbrek hastalarının hemodiyaliz öncesi serum ghrelin düzeylerinin arttığı ve hemodiyaliz sonrası azaldığı gösterilmiştir (36). Böylece, diabetik nefropatinin etyopatogenezinde ghrelin ile ilgili dinamiklerin rolü önem kazanmıştır.

1.8. Ghrelin

Ghrelin *invivo* ve *invitro* olarak BH salınımını uyaran Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör (GHS-R) için endojen bir ligand olarak izole edilmiş, 28 aminoasitli, peptid yapısında bir hormondur. Başlıca salınım yeri mide oksintik mukozasındaki A-benzeri hücrelerdir. Ghrelin, 1999 yılında Japon araştırmacı Masayasu Kojima tarafından GHS-R 1a'ya bağlanmış endojen bir ligand olan peptid yapıda gastrik hormon olarak keşfedilmiştir (37). Ghrelin adı, *ghre* ile *relin*'in birleşmesinden türetilmiştir. “Ghre” modern ingilizcede “grow” yani büyüme anlamında, “relin” ise büyüme hormonu salgılatıcı aktivite anlamında kullanılmaktadır. Ghrelinin hormon olarak keşfedilmesinden önce, 1996 yılında GHS-R tanımlanmış ve G protein ailesine ait olduğu saptanmıştır (38). GHS-R'nin bulunmasından sonra, bu reseptörün endojen ligandı aranmaya başlanmış ve ghrelin bulunmuştur (39).

Ghrelin oreksijenik hormon olarak adlandırılmaktadır. İnsan ve hayvanlarda beslenmeyi uyarır ve BH salgılanmasını sağlar. Bitkilerin parenkim hücreleri de dahil olmak üzere pek çok dokudan salgılanır (39). Güncel çalışmalarda gösterilmiştir ki, ghrelin homologlarının balıklarda, kuşlarda ve birçok memelide bulunduğu saptanmıştır (40). Ghrelin, 1999 yılında Kojima ve arkadaşları tarafından midede endojen bir ligant olarak keşfedilen peptid yapıda bir hormondur (37). İnsanda mide mukozasında yer alan oksintik mukozadaki A-benzeri hücreler tarafından üretilen ghrelin (41), ayrıca bağırsak, yanak mukozası, özofagus, hipofiz, tiroid, lenf düğümü, lenfositler, akciğer, karaciğer, safra kesesi, pankreas, kalp, dalak, testis, prostat, ovaryum, tuba uterina ve plasenta dokularında da

bulunmaktadır. Cerrahi, endoskopi ve otopsi yoluyla elde edilen, insana ait tüm doku örneklerinde ghrelin mRNA'sının mevcut olduğu bulunmuştur (42).

1.8.1. Ghrelin'in Yapısı

28 amino asitten oluşmuş bir polipeptid olan ghrelin, posttranslasyonel olarak N-terminal üçüncü amino asiti olan serin kalıntısına n-oktanoik asit bağlanması ile fizyolojik olarak aktif şekline döner. Ghrelinde oluşan bu açıl modifikasyonu GHS-R'e bağlanması için gereklidir. Bu açılasyonu katalizleyen açıl transferaz henüz bilinmemekle birlikte, açılasyon sonucunda ghrelin kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir (37).

Preproghrelin olarak sentezlenen ghrelin, N terminalinde sinyal peptidi ve C terminalinde kuyruktan oluşmuştur. C terminal, proghrelin konsantrasyonu insanlarda ölçülmüş ve ghrelinden birbuçuk kat daha yüksek bulunmuştur (43). Ghrelinin 3. amino asidi olan serin kalıntısının daha uzun alifatik zincirlerle, doymamış veya dallanmış oktanoil grupları ile açılasyonu ghrelin aktivitesini değiştirmez, ancak daha kısa hidrofobik gruplar asetil grupları gibi grupların bağlanması, peptidin aktivitesini azaltır. Daha kısalmış ghrelin molekülleri, in vitro olarak BH arttırıcı etki gösterir, ancak in vivo olarak etki göstermez. Açılmemiş (dezoktanoil veya desaçil) ghrelin, açılmemiş forma göre çok yüksek oranlarda dolaşımında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda ghrelinin açılmemiş formu olan desaçil ghrelin düzeyleri, midede ve kanda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (44).

Vücudumuzda birçok peptid hormonun sadece aktif formlarının değil, aynı zamanda inaktif formlarının da bulunduğu bilinmektedir. İnaktif formların klirens hızları aktif formlara göre düşük, yarı ömürleri aktif formlara göre daha uzundur. Çok yüksek düzeylerde açılmemiş ghrelin, açılmemiş ghrelinin bazı fonksiyonlarını önlediği insanlarda ve farelerde saptanmıştır (45,46).

1.8.2. Ghrelinin Doku Dağılımı

Ghrelin, öncelikle mide fundusunda asit salgılayan oksintik bezde saptanmıştır. Ghrelin içeren hücreler, fundusta pilordan daha yüksek miktarda bulunmuştur ve midede mukozal epitelyumda ayrı bir endokrin hücre tipidir (41). Dolaşımında bulunan ghrelinin % 30 kadarının gastrointestinal kaynaklı olduğu saptanmıştır (47).

Barsakta duodenumdan kolona inildikçe ghrelin konsantrasyonu azalmaktadır. Santral sinir sisteminde ghrelin, mRNA ve immunreaktif peptid

düzeyleri çok düşük oranda saptanmıştır. Hipotalamusta ghrelin peptidi ekspresyonunun hipotalamik arkuat nükleuslarda olduğu gösterilmiş, ancak ghrelin-pozitif nöronların sayısı düşük bulunmuştur (37, 44).

Geçmişte BH sekresyonunun, BHRH ve somatostatin olmak üzere başlıca iki peptid tarafından kontrol edildiği ifade edilmekteydi (48, 49). BHRH, 44 aminoasitten oluşan, BH sentez ve salınımını uyaran hipotalamik bir peptittir. Somatostatin ise 14 aminoasitten oluşan hipotalamusta sentezlenen peptid yapıda bir hormondur ve BH sentezini inhibe eder (32). Keşfinden sonra bunlara sıçan midesinde üretilen ghrelin de ilave edilmiştir (50). Yapılan çalışmalarda ghrelinin, BHRH salınımını arttırdığı (51), ancak pankreatik somatostatin salınımını ise azalttığı gösterilmiştir (52).

1.8.3. Ghrelin ve GHS-R Dağılımı

Ghrelinin biyolojik etkileri çoğunlukla hücre yüzey reseptörü olarak adlandırılan GHS-R ile etkileşimi sonucu gerçekleşir (53). GHS-R, G protein'e bağlı reseptör ailesinin bir üyesidir (54). GHS-R geni 3q26.2. kromozomu üzerinde yerleşmiştir (33, 55). GHS-R'nin bilinen iki tane formu vardır. Bunlar; GHS reseptör tip 1a (GHS-R 1a) ve GHS reseptör tip 1b (GHS-R 1b) dir. (33, 53, 55). GHS-R 1a fonksiyonel reseptördür ve 7 transmembran bölgesi olup GHS-R 1b ise 5 transmembran bölgesi olmakla birlikte biyolojik olarak inaktiftir (53, 54, 56). Birçok insan dokusunda ghrelin, polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak incelenmiş ve ayrıca dokulardaki ghrelinin GHS-R 1a ve GHS-R 1b mRNA ekspresyonu da araştırılmıştır. GHS-R 1a çoğunlukla hipofizde, daha düşük seviyelerde ise pankreas, dalak, miyokard, tiroid ve adrenal bezde eksprese edilmektedir. GHS-R 1b ekspresyonu ise incelenen tüm dokularda; bağırsak, yanak mukozası, özofagus, hipofiz, tiroid, lenf düğümü, lenfositler, akciğer, karaciğer, safra kesesi, pankreas, kalp, dalak, testis, prostat, ovaryum, tuba uterina ve plasentada yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (42).

Oksintik bezler, mide korpus ve fundusunun iç yüzeyinde bulunurlar ve mide proksimalinin % 80'ini oluştururlar (32). Ghrelin, insan ve sıçan midesinde, oksintik bezlerde bol miktarda bulunmaktadır. Işık ve elektron mikroskobu düzeyinde, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, oksintik mukozada bugüne kadar başlıca endokrin hücreler; enterokromoffin benzeri hücreler, delta hücreleri, enterokromoffin hücreler ve X/A benzeri hücreler olarak 4 tipe ayrılmıştır (57).

Ghrelın, sindirim sistemi boyunca duodenum, ileum, çekum ve kolonda da üretilmektedir. Ghrelın saptanan hücreler arasında immunreaktivite açısından herhangi bir fark gözlenmemiş, ancak kalın bağırsaklara doğru gittikçe ghrelın immunreaktif hücre sayısının azaldığı bulunmuştur. Midedeki yuvarlak şekilli, küçük, ghrelın immunpozitif hücreler kapalı tip hücre olarak isimlendirilmiştir. Bağırsaklarda bunlara ilave olarak, apikal sitoplazmaları ile lmenle ilişkisi olan üçgen şekilli ikinci bir hücre tipi saptanmış ve bu hücreler ise açık tip olarak adlandırılmışlardır. Gastrointestinal sistem boyunca bütün ghrelın pozitif hücreler içerisinde açık tip hücrelerin sayısının mideden kalın bağırsaklara doğru gittikçe dereceli olarak arttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalardaki bu sonuçlar, iki tip ghrelın hücresinin gastrointestinal sistemin çeşitli bölümlerinde farklı fizyolojik roller oynayabileceklerini göstermiştir. Böylece gastrointestinal sistemin bu değişik bölümlerinden ghrelın sekresyonunun farklı uyaranlarla düzenlenebileceği düşünülmektedir (58).

Ghrelının immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, fare ve sıçanların hipotalamuslarında lateral hipotalamus, arkuat nukleus, ventromedial nukleus, dorsomedial nukleus, paraventriküler nukleus ve 3.ventrikülün ependimal tabakasında eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca akson terminallerinde, stria terminalis, amygdala, talamus ve nukleus habenulada da ghrelıne rastlanmıştır (59).

Kardiyovasküler sistem üzerine ghrelının etkilerinin olduğu ve reseptörlerinin sol ventrikülü, sağ atrium, aorta, koroner arter, safen ven ve pulmoner vende bulunduğu gösterilmiştir (60).

Ghrelın ve GHS-R, reme organlarında ve plasentada da bulunmuştur (61, 62). mRNA ekspresyonu ile hem ghrelın peptidi ve hem de ghrelın insan ve sıçan plasentasında gösterilmiştir. İnsan ve sıçan plasentasının, ghrelın ekspresyonu açısından gebelik zamanıyla ilişkili bir dağılım gösterdiği bildirilmektedir. İnsan plasentasında, ilk trimesterde immunohistokimyasal olarak ghrelının başlıca sitotrofoblastlarda ve çok az miktarda da sinsityotrofoblastlarda eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Ancak termde, plasentada immunohistokimyasal olarak ghrelın saptanmamıştır. Gebe sıçanlarda ise ghrelın mRNA ekspresyonu erken gebelik döneminde belirlenememişken, 16. gebelik gününde belirgin bir yükselme göstermekte ve gebeliğin son dönemlerinde ekspresyonu gittikçe gerilemektedir (61).

Ghrelin, ovaryumun corpus luteumunda en yoğun olarak eksprese edilmektedir (63). Ghrelin ve fonksiyonel reseptörü olan GHS-R 1a'nın erişkin insan testisinde eksprese olduğu bildirilmiştir. Ghrelin immunreaktivitesi, testiste, leydig hücrelerinde ve daha az olarak sertoli hücrelerinde saptanmıştır (62). Ghrelinin, surrealin zona glomeruloza ve zona fasikülatanın dış kısmında eksprese edildiği gözlenmiştir (64).

Erişkin, çocuk ve fetüs akciğer dokularında da ghrelin eksprese olmaktadır. Ghrelin, embriyon döneminden fetal döneme doğru gittikçe akciğer dokusunda azaldığı bulunmuştur. Akciğer gelişiminde ghrelin ekspresyonu psödoglandüler ve kanaliküler evrelerde saptanmıştır (65, 66).

Ghrelin, pankreasın endokrin hücrelerinde de sentezlenmektedir. İnsan ve sıçan pankreas dokularında ghrelin immunoreaktif hücrelerin Langerhans adacıklarının periferinde yerleştiği belirlenmiştir. Ghrelinin sıçan adacık alfa hücrelerinde glukagonla beraber bulunduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, beta hücrelerindeki sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı ve izole sıçan pankreas adacık hücrelerine ilave edildiği zaman insülin sekresyonunu uyardığı gözlenmiştir. Ghrelin mRNA'sı ve reseptörü de sıçan pankreas adacık hücrelerinde saptanmıştır. GHS-R'nin pankreas adacık hücrelerinde tanımlanmış olması endokrin ve parakrin etki ile insülin sekresyonunun ayarlanmasında rolü olduğu bulunmuştur (67). Ghrelin ve insülinin, glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde daha karmaşık genetik bir mekanizma aracılığıyla da etkili olabileceği son çalışmalarda gösterilmiştir (68).

Önemli miktarda böbrek dokularında da tespit edilen bir hormon olan ghrelinin sıçanların böbrek dokularında pre-proghrelin gen ekspresyonu saptanmıştır (69). Yapılan çalışmalarda fare böbreğinde pre-proghrelin gen ekspresyonu glomerüllerde belirlenmiş olup, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve radioimmunassay yöntemi ile fare böbreğinin ghrelin ürettiği gösterilmiştir. Fare böbreğindeki ghrelin immunreaktivitesi plazmadan daha yüksek oranda saptanmıştır. Sıçan böbreklerinde ghrelin reseptör geninin eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu bulgular ghrelinin lokal olarak böbrekte sentezlendiğini, glomerül ve renal hücrelerin pre-proghrelin geni eksprese ettiklerini ortaya çıkarmaktadır (70). Böbrekte ghrelin peptidinin lokalizasyonu net olarak anlaşılamamasına karşın,

ghrelinin böbrekteki dağılımının incelenmesinin, fizyolojik ve klinik etkilerinin anlaşılması bakımından yeni yaklaşımlara neden olacağı düşünülmektedir (69).

Ghrelinin yaygın doku dağılımının önemi henüz tam olarak aydınlatılamamasına rağmen tüm bu bilgiler ghrelinin, endokrin ve endokrin olmayan dokularda GHS-R'nin farklı ve kısmen tanımlanmış alt tipleri yoluyla geniş fizyolojik etkilerinin olabileceğini göstermektedir (42).

1.8.4. Ghrelinin Hormon Salgılatıcı Etkileri

BH salınımını güçlü bir şekilde uyanan (37) ghrelinin, nervus vagus yoluyla da BH salınımını uyardığı saptanmıştır (67). Ghrelin ve GHS'ler güçlü BH salgılatıcı aktiviteye sahiptirler. Bu etkileri doza bağımlı olarak yaptıkları düşünülmektedir (33, 51). Sağlıklı insanlarda i.v olarak uygulanan ghrelin, kuvvetli bir şekilde BH sekresyonunu uyarmaktadır (51, 71).

Sıçanlara BHRH uygulanması, hipofiz bezinde ghrelin reseptörlerinde ciddi bir artış oluşturmuştur (72). Ghrelinin BH üzerine etki göstermesi için BHRH gereklidir. Ghrelin ve BHRH'nin birlikte uygulanması sonucunda BH sekresyonunda sinerjistik bir etki belirgin şekilde oluşmakta ve BH sekresyonu artmaktadır. BHRH antiserumu ile birlikte ghrelin verildiğinde ise BH düzeylerinde artış oluşmamaktadır (51). Ghrelinin BH salgılatıcı aktivitesini, BHRH antagonistleri azaltmaktadırlar (73). BHRH antagonisti verilerek BH seviyeleri baskılanmış sağlıklı kişilerde ghrelin seviyeleri normal olarak saptanmıştır (74).

Yapılan çalışmalarda ghrelinin sistemik uygulanmasının sağlıklı kişilerde ACTH ve kortizol seviyelerini arttırdığı saptanmıştır (75, 76). Ghrelinin prolaktin salgılatıcı etkisi hipofiz hücre kültürlerinde keşfedilmiştir (77).

1.8.5. Ghrelinin Sistemler Üzerine Etkileri

Ghrelinin kardiyak fonksiyonu koruyucu etkisi vardır. Gönüllü insan deneklerinde, ghrelinin intravenöz uygulanmasının, ortalama arteriyel basıncını kalp atım hızını değiştirmeden düşürdüğü ve sistemik vasküler direnci azaltarak kalp yetmezlikli hastalarda kardiyak output'u arttırdığı gözlenmiştir (71). Ghrelin in vitro olarak, endotel hücreleri ve kardiyomiyositlerin apoptozisini baskılamaktadır. Sıçanlarda sol ventrikül disfonksiyonunu düzeltmektedir (78 - 80). Ghrelinin memeli arterlerindeki endotelin-1'in vazokonstriktif etkisini de ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (78, 81).

Ghrelinin endometriyumda ekspresyonunu ve plasentada sentezlendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Sıçanların fetal dönemdeki büyümelerinde önemi belirtilmektedir (61, 82, 83). Embriyonik implantasyon konusunda da ghrelin ve GHS'lerin olası endokrin ve parakrin rolleri olabileceği üzerine çalışmalar devam etmektedir (40). Erkeklerde testiküler fonksiyonda da ghrelinin önemli rolü vardır (62).

Normal insanlara göre, karaciğer yetmezliğine yol açan hastalıklarda ghrelin düzeyi daha yüksek bulunmasına rağmen aralarındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır, fakat kronik karaciğer hastalığının kötüleşmesinin klinik göstergeleri olan gastrointestinal kanama, asit, ensefalopati, anemi, inflamatuvar belirteçler, hipoglisemi ve renal disfonksiyon durumlarında ise aralarındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (84). Ghrelinin non alkolik yağlı karaciğer hastalığındaki rolü hala açık değildir (85, 86).

Sıçanlarda subkutan ghrelin uygulanması bazal gastrik asit sekresyonunu etkilemez iken, intravenöz uygulanması ise bazal gastrik asit sekresyonunu ve gastrik motiliteyi doza bağlı olarak arttırmıştır (87–90). Bu etkiler hem vagotomi ve hem de atropin uygulanmasıyla bloke edilmiştir. Bu sıçanlara H2-reseptör antagonisti verilmesinin gastrik asit sekresyonuna ve gastrik motiliteye bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Böylece, ghrelinin gastrik fonksiyonları n. vagus aracılığıyla etkilediği gösterilmiştir (41, 89, 91).

Ghrelin uygulanması osteoblastların proliferasyonuna ve farklılaşmasına yardım etmektedir. Ayrıca, apoptozisi de baskılamaktadır (92). Dişi sıçanlara BH salgılatıcı peptid-6 veya analogu ipamorelin verilmesinin in vivo olarak kemik mineralizasyonunu arttırdığı saptanmıştır. GHS'lerin kemik üzerine pozitif etkilerini direk olarak mı yoksa BH salınımı aracılığıyla mı gerçekleştirdikleri net olarak gösterilememiştir (93).

1.8.6. Ghrelinin Endokrin ve Periferik Etkileri

Ghrelinin endokrin ve periferik etkileri Tablo 2'de gösterilmiştir (48).

Tablo 2. Ghrelinin Etkileri

Hormon salgılatıcı etkisi	
Büyüme Hormonu (GH)	↑
Adrenokortikotropik hormon (ACTH)	↑
Kortizol	↑
Prolaktin	↑
Tiroid stimulan hormon (TSH)	↓ ? →
Luteinizan hormon (LH)	↑ ? →
Folikül stimulan hormon (FSH)	→
İnsulin	↑ ? ↓
Anabolik etkisi	
İştah	↑
Kilo alımı	↑
Kardiyovasküler fonksiyonlar	
Kardiyak output	↑
Kan Basıncı	↓
Kardiyomiyositlerin apoptozisi (in vitro)	↓
Gastrik fonksiyonlar	
Mide asidi sekresyonu	↑
Gastrik motilite	↑

↑ : Artma ↓ : Azalma → : Değişiklik yok ? : Belirsiz

1.8.7. Ghrelin ve İlişkili Hastalıklar

Yapılan çalışmalarda ghrelinin birçok hastalığın oluşması ve seyri esnasında önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bunlar aşağıda belirtilmiştir:

1.8.7.1. Ghrelin ve Obezite

Obezite prevalansındaki artış, besin alımı ile ilgili çalışmaları fazlaştırmıştır. Sağlıklı insanlara intravenöz uygulanan ghrelin, yemek alımını ve iştahı arttırmaktadır. Memelilerde iştah arttıran ajanların en kuvvetlilerinden bir tanesidir (94-96).

Midede salınan ghrelin, bağırsaklardan beyine iştah açıcı sinyaller göndermektedir (97). İmmunreaktivitesi hipotalamusun arkuat nükleusunda saptanmıştır (98). Plazma ghrelin konsantrasyonları açlık sırasında progresif artıp yemekten bir saat sonra azalmaktadır (97, 99).

Açıle ghrelina spesifik olarak bağlanan bileşikler, GHS-reseptör aktivasyonu aracılığıyla ghrelinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Ghrelinin immun bağlayıcıları ile aşılansmış ratların vücut yağında ve besin alımında azalma olduğu saptanmıştır (100).

1.8.7.2. Ghrelin ve Renal Yetmezlik

Bilateral nefrektomi ve kısmi nefrektomi uygulanmış farelerde plazma total ghrelinin düzeyinin arttığı bulunmuştur. Bu, ghrelinin renal klirensinde ve yıkılmasındaki azalmayla ilişkili olabilir (101).

Ghrelin geninin distal tübül epitelinden olduğu gibi glomerül ve renal hücrelerden de sekrete edildiği bulunmuştur (70). Ghrelin kandan filtre edilip idrarla aktif sekrete edilmektedir. İdrarda dolaşımdakinden daha fazla ghrelin bulunduğu saptanmıştır (101).

Ghrelin ve desaçile ghrelinin, total plazma ghrelininini oluşturmaktadır. Total ghrelininin % 50'sinin ve BH'nun % 99'unun hemodiyaliz ile kandan çekildiği gösterilmiştir. Periton diyalizli hastalarda ghrelin düzeyi, prediyaliz ve hemodiyalize giren hastalara göre daha düşük saptanmıştır (102).

1.8.7.3. Ghrelin ve Diabetes Mellitus

Ghrelinin insülin sekresyonu üzerine etkisi hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sonuçlar, bazı hayvan çalışmalarında ghrelinin insülin sekresyonunu uyardığı (67, 103) bazılarında ise baskıladığı (52, 104) yönündedir. İnsan çalışmalarında ise ghrelin salgısı arttıkça insülin sekresyonunun azaldığı saptanmıştır (99, 104, 105). İnsülinin gastrointestinal sistem boyunca sinyal iletimi yoluyla postprandiyal ghrelin düzeyini azalttığı saptanmıştır (106).

Ghrelin düzeyi, yeni tanı Tip 1 diabetli çocuklarda insülin tedavisinden 1-4 ay sonra sağlıklı bireylere göre azaldığı saptanmıştır (107).

Tip 2 diabetik bireylerde ghrelin seviyesi düşük saptanmıştır (108, 109). Streptozotosin (STZ) ile oluşturulmuş deneysel diabetli sıçanlarda ise dolaşımdaki ghrelin seviyesinin arttığı ve insülin tedavisiyle normale döndüğü gözlenmiştir (110). Yapılan çalışmalarla ghrelinin diabet fizyopatolojisinde önemli rol oynayabileceği iddia edilmektedir (111).

Diabetik nefropati, günümüzde diabetes mellitusun morbidite ve mortalite açısından en önemli komplikasyonlarından birisidir. Ghrelin ise böbrekte önemli miktarda bulunan bir peptid olup, diabetik nefropatinin oluşmasında rol oynayabilir.

Bu çalışmamızın amacı; diabetik böbrek dokusundaki hasarda tedavi ajanı olarak kullanılan enalapril ve losartanın ghrelin immunreaktivitesi üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Çalışmamızda Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen erişkin, Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. 21 °C oda ısısında 12 saat ışık (7:00–19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00–7:00) tutulan sıçanlar her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Hayvan yemleri Yem Sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlandı. Yemlerin terkibi aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi.

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29, 4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0, 6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0, 2
Methionin (%)	0, 2
DCP (%)**	1, 6

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0, 8 mg K₃, 0, 8 mg B₁, 2, 4 mg B₂, 1, 2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3, 2 mg Cal. D. Panth. 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0, 8 mg I, 0, 2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

**% 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Deneysel çalışmalar, toplam 28 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Tüm sıçanlar aynı ortamda gözetim altında tutuldu ve aynı standart sıçan yemi verilerek add-libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Tüm sıçanlar 12 saat aç bırakıldıktan sonra kuyruk venlerinden kan örnekleri alındı ve bazal kan glukoz düzeyleri saptandı. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Sıçanlar, kontrol, diabetik grup, diabet + enalapril ve diabet + losartan olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (Grup 1): Toplam 7 adet sıçan kullanılan bu gruba deney süresince hiçbir uygulama yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

Diabetik grup (Grup 2): Bu grupta 7 adet sıçan, çalışmanın diabetik grubu olarak kullanıldı. Bu gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ (Sigma Chemical Co Louis Missouri) 0, 1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra, 12 saat açlık sonrasında kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diabetik olarak kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi

Diabet + Enalapril Grubu (Grup 3): Bu grupta 7 adet sıçan, çalışmanın tedavi grubu olarak kullanıldı. Bu gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ (Sigma Chemical Co Louis Missouri) 0, 1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra, 12 saat açlık sonrasında kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diabetik olarak kabul edilip, sıçanlara diabet olduğu andan itibaren 4 hafta süre ile günlük 5 mg/kg olacak şekilde enalapril orogastrik sonda ile verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

Diabet + Losartan Grubu (Grup 4): Bu grupta 7 adet sıçan, çalışmanın tedavi grubu olarak kullanıldı. Bu gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ (Sigma Chemical Co Louis Missouri) 0, 1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra, 12 saat açlık sonrasında kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diabetik olarak kabul edilip sıçanlara diabet olduğu andan itibaren 4 hafta süre ile günlük 10 mg/kg olacak şekilde losartan orogastrik sonda ile verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi

2.3. Örneklerin Alınması

Tüm gruptaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, deneyin 4. haftasının sonunda ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların böbrek dokuları hızla çıkarılıp % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit sonrası rutin histolojik doku takibinin ardından histolojik ve histokimyasal incelemelere başlandı.

2.4. Biyokimyasal Çalışma

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (GlukoDr süper sensor, All Medicus co. Ltd.-Korea) ile ölçüldü.

2.5. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan böbrek dokuları, % 10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkanmaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 4). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler PAS (Peryodik Asit Shift) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH–2) incelenip fotoğraflandı. Histolojik takip serileri aşağıda tabloda verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1, 5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1, 5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

2.6. İmmünohistokimyasal Çalışma:

Böbrek dokusunda ghrelin immunreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. İmmunohistokimyasal boyama işlemi

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol III	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7 + 5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3 X 5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3 X 5 dakika
13	Normal serum	60dakika
14	Primer antikor	+ 4°C
15	PBS	bir gece
16	Sekonder antikor	3 X 5 dakika
17	PBS	30 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	3 X 5 dakika
19	PBS	20 dakika
20	DAB	3 X 5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Harris hematoksilen	5 dakika
23	Akarsuda	10 saniye
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	5 dakika

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için % 20’lik normal eşek serumuyla muameleden sonra primer antikor (Ghrelin goat poliklonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ile +4 °C de nemli ortamda bir gece inkübe edildi. Ertesi gün sekonder antikor (donkey anti-goat IgG, Santa Cruz Biotechnology, California,

USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve DAB kromojeni uygulandıktan sonra Harris hematoksilinle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. Pozitif kontrol için mide dokusu kullanıldı. Phosphate buffered saline ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın şiddeti esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın şiddeti 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 6).

Tablo 6. İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Hafif
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri student T “paired” ve one-way ANOVA testi ile belirlendi. $P < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Klinik ve Biyokimyasal Bulgular

Kontrol grubunun başlangıç ve final ağırlıkları arasında anlamlı artış gözlemlendi ($p<0.05$). DM, DM+EN (Enalapril) ve DM+LS (Losartan) grupları arasında ise başlangıç ve final ağırlıkları arasında anlamlı azalma olduğu bulunmuştur (her biri için $p<0.05$). Kontrol grubuna göre DM ($p<0.05$), DM+EN ($p<0.05$) ve DM+LS ($p<0.05$) gruplarının ağırlıkları karşılaştırıldığında final ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmuştur.

DM, DM+EN ve DM+LS grupları arasında başlangıç ve final kan şekeri değerleri arasında anlamlı artış olduğu bulunmuştur (her biri için $p<0.05$). Kontrol grubuna göre; DM ($p<0.05$), DM+EN ($p<0.05$) ve DM+LS ($p<0.05$) gruplarının kan şekeri ölçüm değerleri karşılaştırıldığında, final kan şekeri ölçüm değerleri arasında anlamlı artış olduğu bulunmuştur. Tüm bu parametreler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve 4 hafta sonraki final ağırlık ve kan şekeri ölçüm değerleri

	Başlangıç Ağırlık (gr)	Final Ağırlık (gr)	Başlangıç Kan şekeri (mg/dl)	Final Kan şekeri (mg/dl)
Kontrol	214,6 ± 7,14	251,4 ± 7,59 ^a	93 ± 3,07	102 ± 2,35
DM	217 ± 8,32	191,8 ± 4,63 ^{ab}	311,6 ± 16,06	384,8 ± 12,38 ^{ab}
DM+EN	207,2 ± 8,36	188,6 ± 9,42 ^{ab}	313,2 ± 12,87	340 ± 9,27 ^{ab}
DM+LS	213,4 ± 6,75	195 ± 6,63 ^{ab}	310,4 ± 7,03	341,6 ± 12,06 ^{ab}

Veriler Ortalama ±Standart Hata (SH) olarak ifade edilmiştir. $P<0,05$ anlamlı kabul edildi. ^a, grup içi ilk değere göre; ^b, aynı zaman noktasında kontrol grubuna göre; ^c, aynı zaman noktasında DM grubuna göre istatistiksel anlamlılık vardır

3.2 Histolojik Bulgular

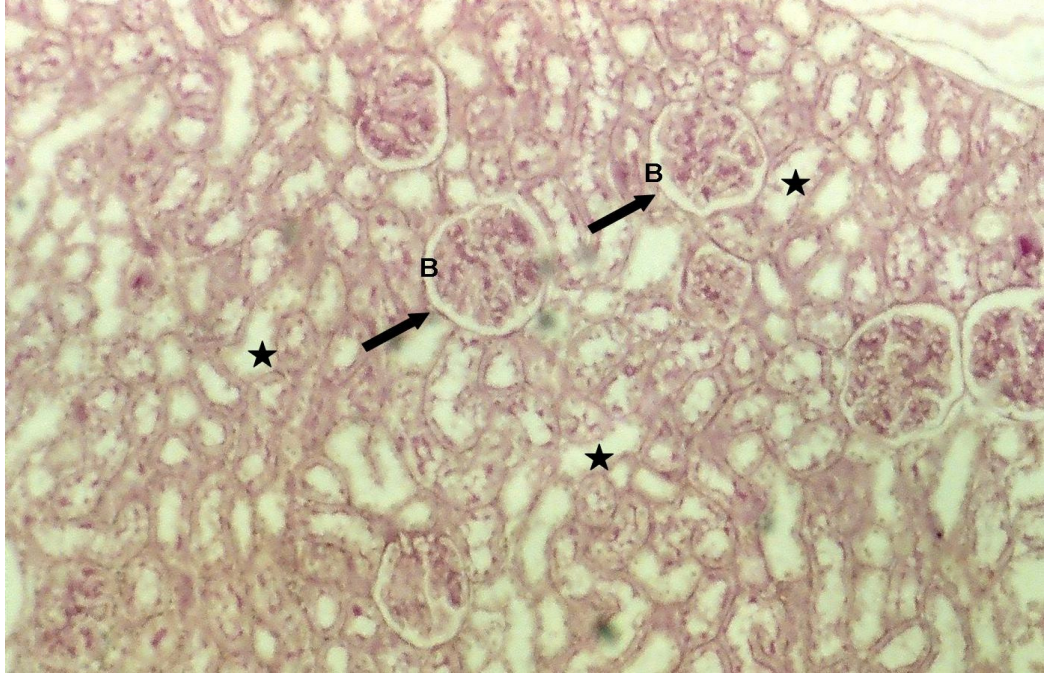
Grup 1 - Böbrek dokularında, glomerül ve tübül yapıları normal olarak izlendi (Şekil 1, 2).

Grup 2 - Bazı glomerüllerde Bowman mesafesinde daralma, mezangial matris artışı ve tübül dilatasyon vardı (Şekil 3). Ayrıca tübül epitellerinin fırçası kenarlarında ayrılma ve bozulmalar, tübül bazal membranlarında kalınlaşma,

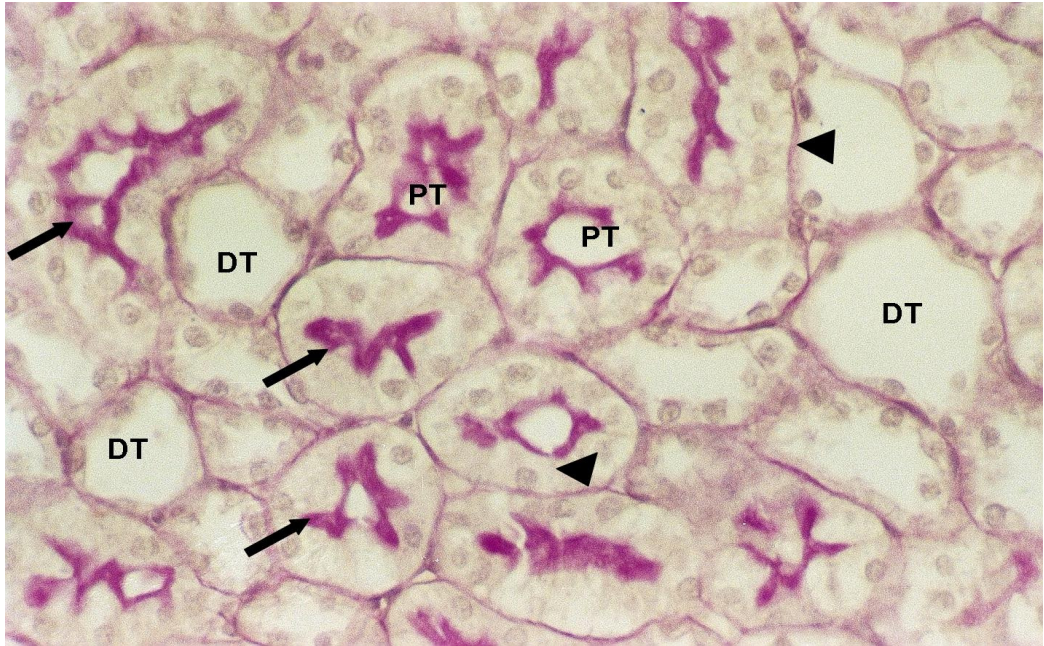
glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüller (Armani-Ebstein lezyonları) ve tübül lümenine dökülmeler dikkati çekti (Şekil 4).

Grup 3 - Glomerüllerde Bowman mesafesinde daralma gözlenmedi. Ancak, mezangial matriks artışı izlendi. Tübüler dilatasyonlar ise Grup 2'ye göre daha az belirgindi (Şekil 5). Tübül epitellerinin fırçamsı kenarları Grup 2 ile karşılaştırıldığında daha iyi görünümde olup, tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarındaki ayrılma ve bozulmalar daha az belirgindi. Grup 3'de glukojenik vakuolizasyonlar daha az yoğunlukta olup, tübül bazal membranlarında kalınlaşma olduğu gözlemlendi (Şekil 6).

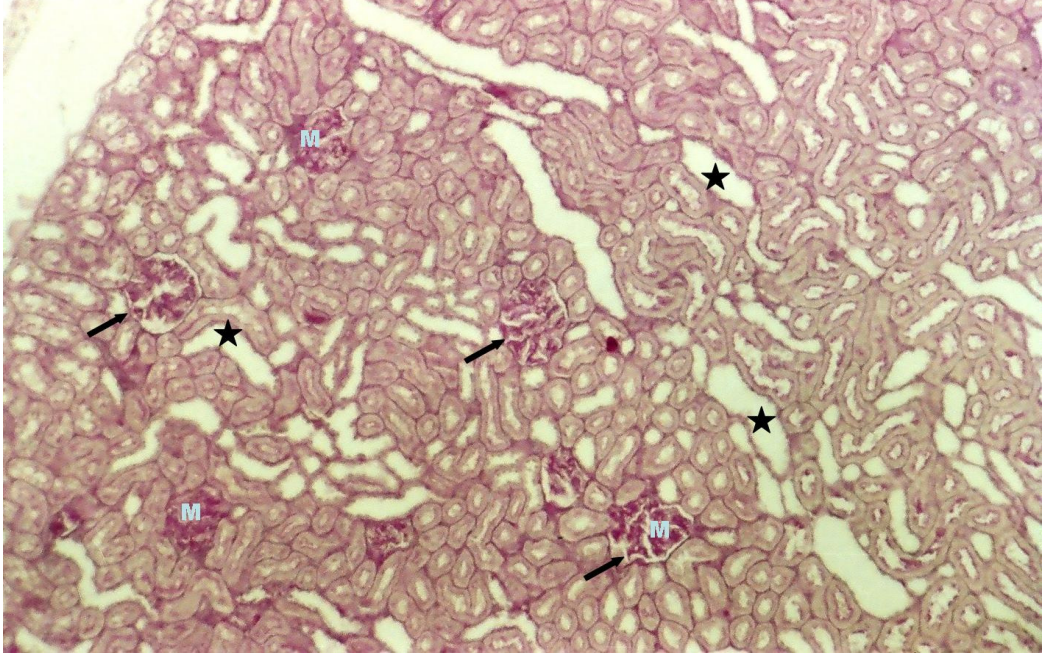
Grup 4 - Grup 3'dekine benzer şekilde glomerüllerde Bowman mesafesinde daralma gözlenmedi, mezangial matriks artmıştı ve tübüller dilatasyonlar ise Grup 2'ye göre daha az belirgindi (Şekil 7). Grup 2'ye göre tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarında daha az ayrılma ve bozulmalar izlendi. Glukojenik vakuolizasyonlar daha az yoğunlukta olup, tübül bazal membranlarında kalınlaşma olduğu gözlemlendi (Şekil 8).



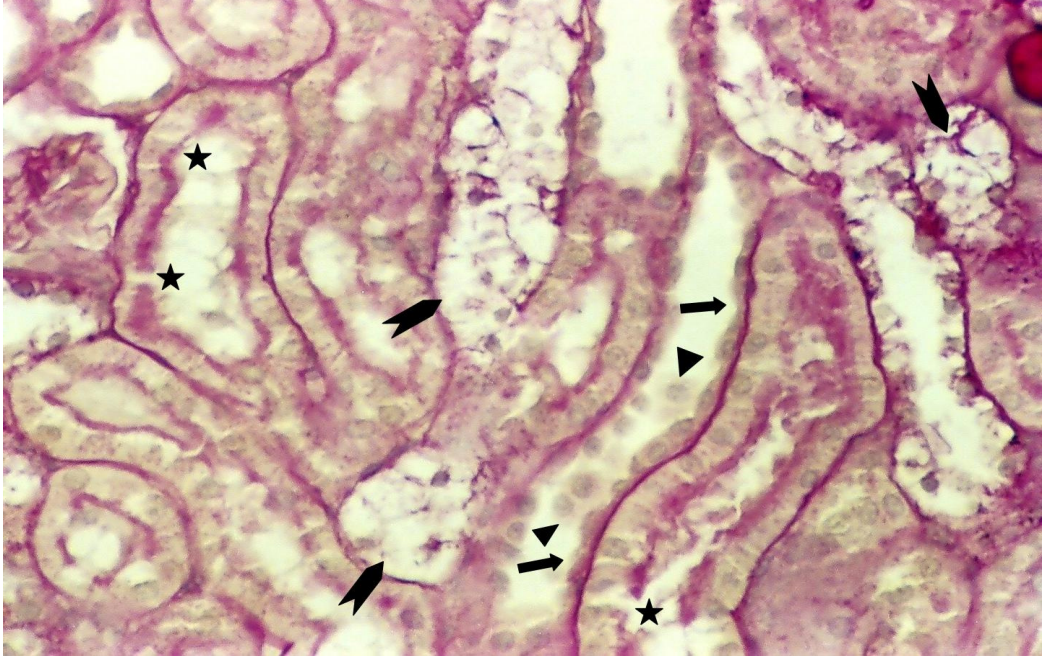
Şekil 1. Grup 1'de Normal böbrek histolojisi. Glomerül (→), Bowman mesafesi (B), tübül (*). PAS X 4.



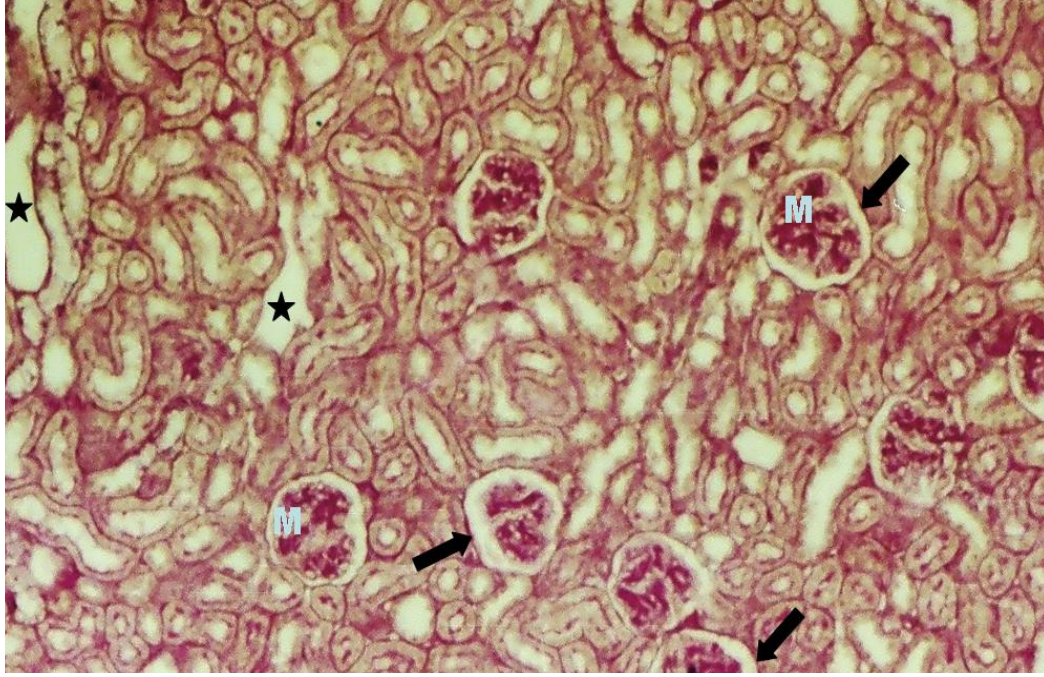
Şekil 2. Grup 1'de normal yapıda proksimal (PT) ve distal (DT) tübüller. Normal görünümlü tübül epiteli fırçamsı kenarları (→) ve tübül bazal membranı (◄). PAS X 20.



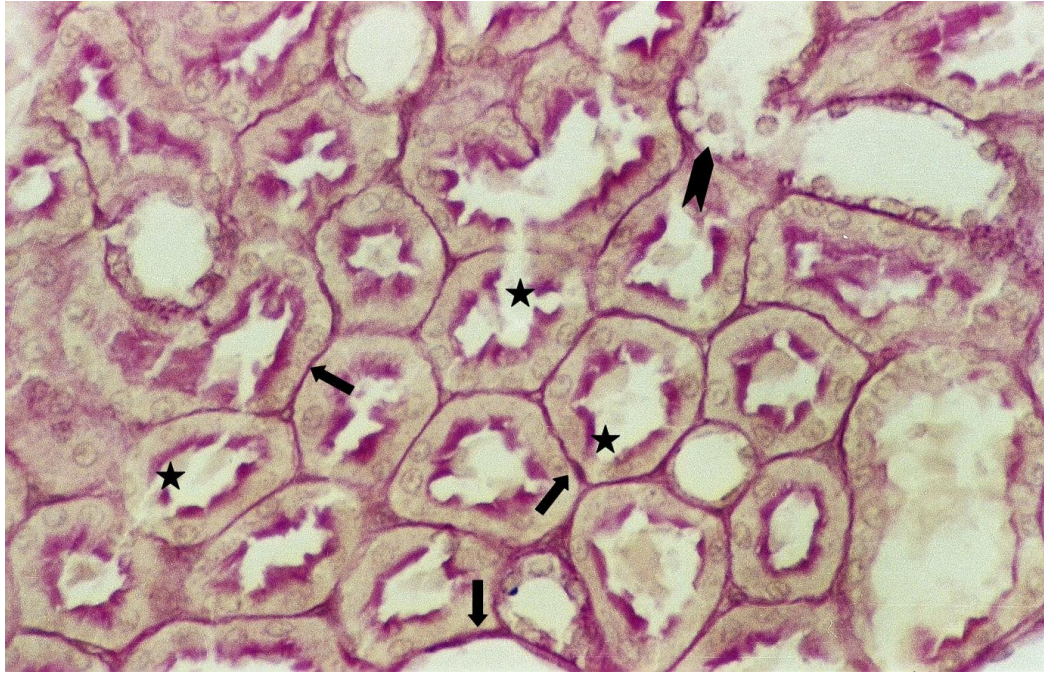
Şekil 3. Grup 2’de glomerüllerde mezangial matriks artışı (M), Bowman mesafesinde daralma (→), tübül dilatasyonlar (*). PAS X 4.



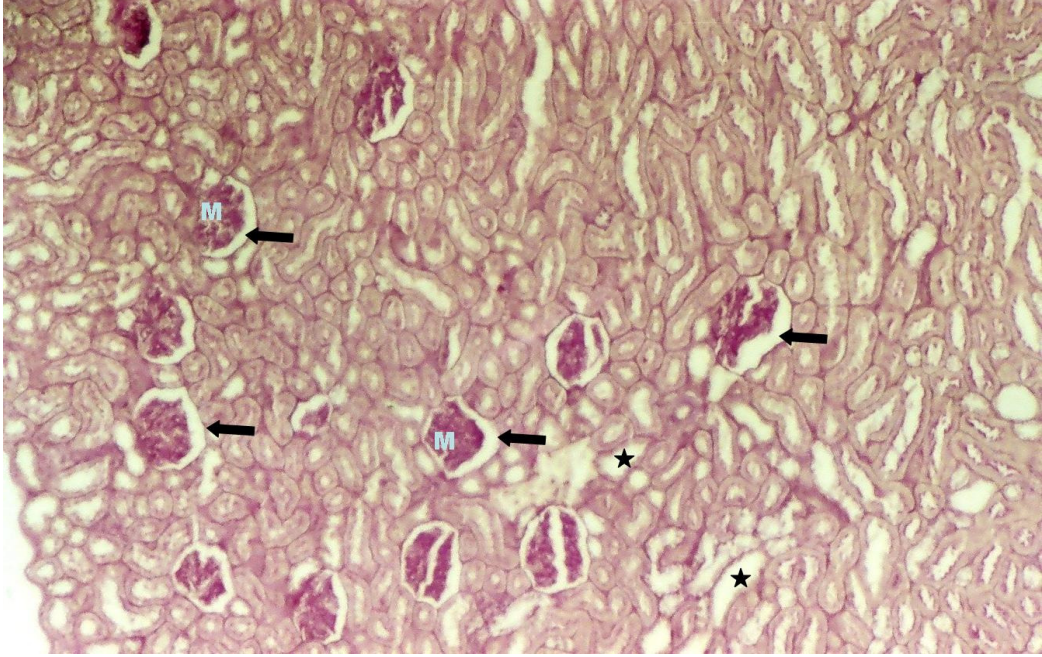
Şekil 4. Grup 2’de tübül epitellerinin fırçasmsı kenarlarında ayrılma ve bozulmalar (*), tübül bazal membranlarında kalınlaşma (→), glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görümlü tübüller (▶), tübül lümenine dökülmeler (◄). PAS X 20.



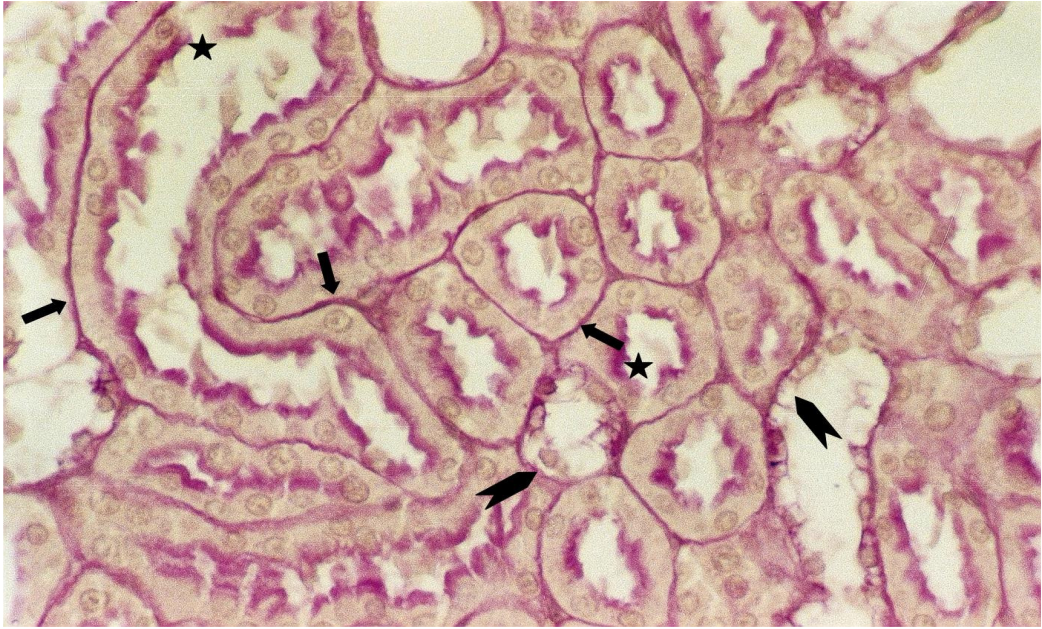
Şekil 5. Grup 3’de Bowman mesafesi (→), Glomerüllerde mezangial matriks artışı (M), tübül dilatasyonlar (*). PAS X 4.



Şekil 6. Grup 3’de tübül epitellerinin fırçası kenarlarında ayrılma ve bozulmalar (*), tübül bazal membranlarında kalınlaşma (→), glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüller (★) PAS X 20.



Şekil 7. Grup 4'de Bowman mesafesi (→), Glomerüllerde mezangial matriks artışı (M), tübül dilatasyonlar (*). PAS X 4.



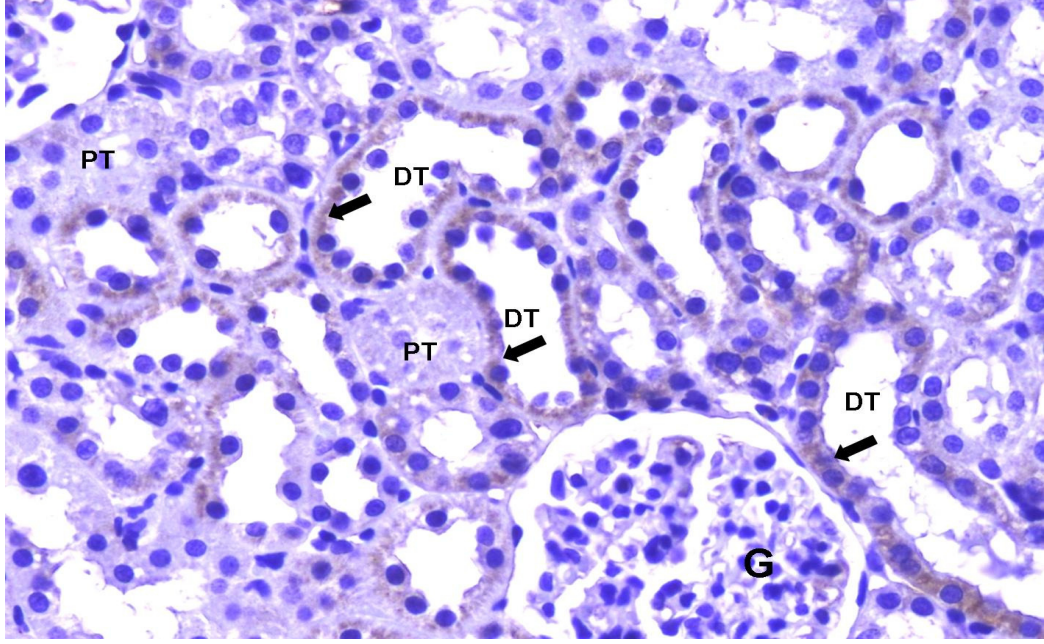
Şekil 8. Grup 4'de tübül epitellerinin fırçası kenarlarında ayrılma ve bozulmalar (*), tübül bazal membranlarında kalınlaşma (→), glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görümlü tübüller (➤). PAS X 20.

3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

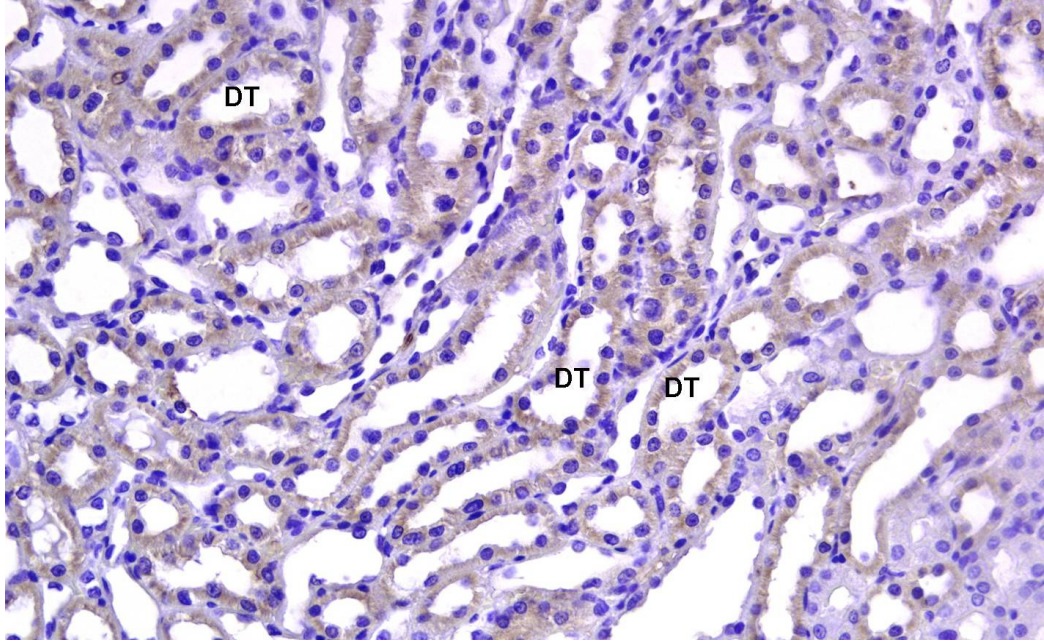
Grup 1'e ait kesitlerde böbrek korteksinde pozitif boyanma belirgin olarak distal tübüllerde izlendi (Şekil 9). Aynı şekilde böbrek medullasında da ghrelin immunreaktivitesi distal tübül kesitlerinde gözlemlendi (Şekil 10). Distal tübüllerdeki ghrelin immunreaktivitesi orta şiddette (++) bulundu (Şekil 9, 10). Glomerüller ve proksimal tübülde ghrelin immunreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 9, 10).

Grup 2'de ise böbrekte ghrelin immunreaktivitesi açısından önemli farklılıklar saptandı. Bu grupta böbrek korteksinde distal tübüllerde şiddetli (+++) ghrelin immunreaktivitesi izlendi (Şekil 11). Aynı şekilde bu grupta böbrek medullasında ve distal tübüllerde şiddetli (+++) ghrelin immunreaktivitesi izlendi (Şekil 12). Bu grupta glomerüller ve proksimal tübülde ise ghrelin immunreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 11, 12).

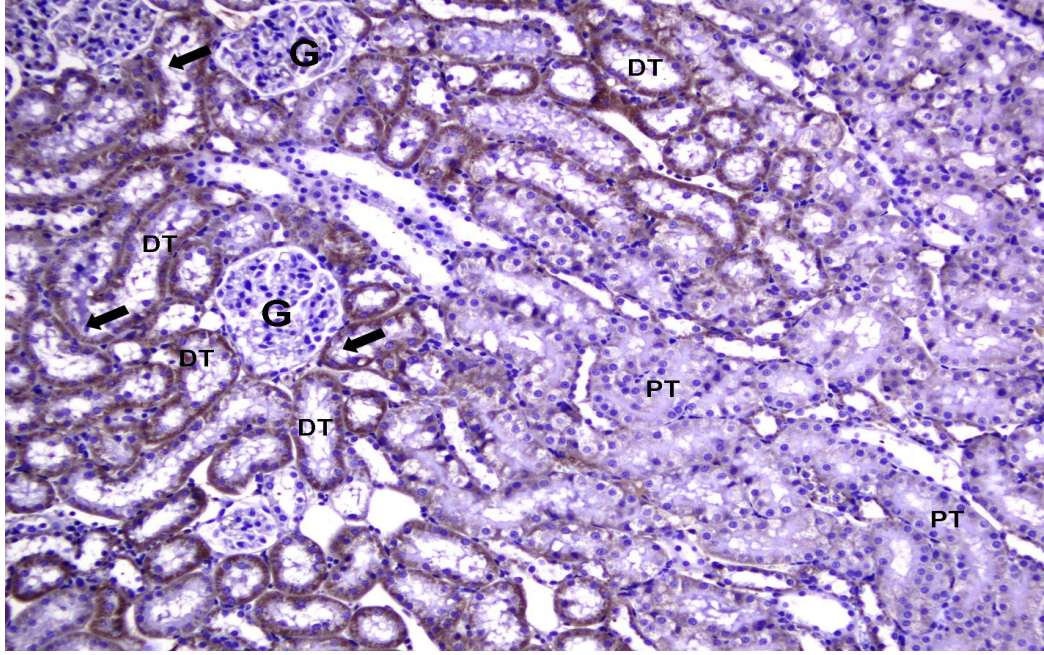
Grup 3'de ve Grup 4'de, böbrek korteks ve medullasında ghrelin immunreaktivitesi kontrol grubundakine benzer bir görünümdeydi (Şekil 13, 14, 15, 16). Aynı şekilde, distal tübüllerde orta şiddette (++) ghrelin immunreaktivitesi izlenirken, glomerüller ve proksimal tübülde ghrelin immunreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 13, 14, 15, 16). Negatif kontrolde yapılan boyamalarda böbrek dokusunda herhangi bir immunreaktivite gözlenmedi (Şekil 17). Pozitif kontrolde ise mide dokusunda ghrelin immunreaktif hücreler belirlendi (Şekil 18).



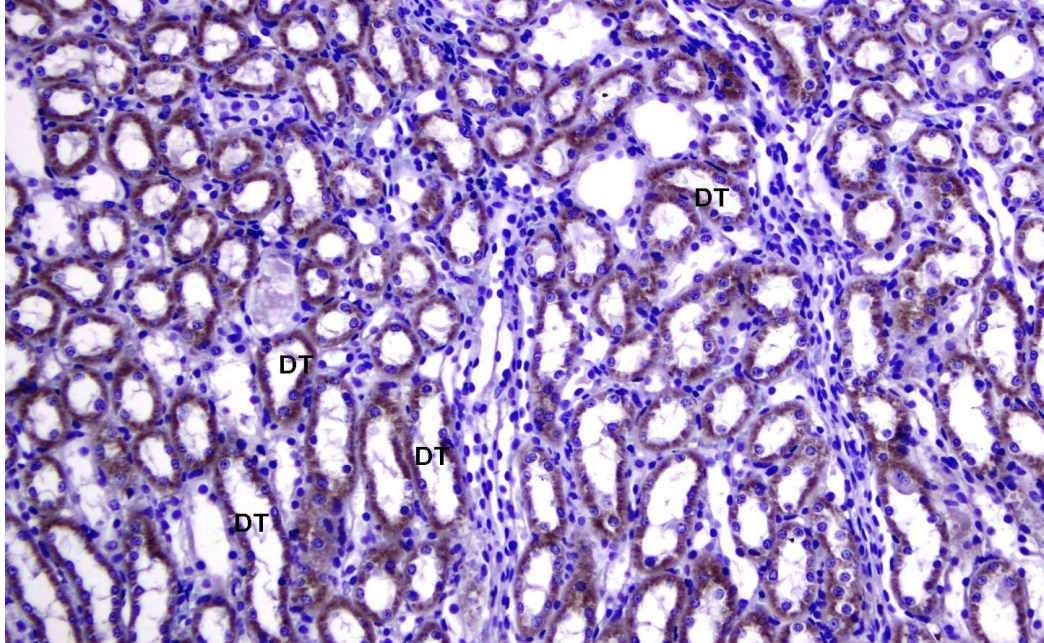
Şekil 9. Grup 1'de böbrek korteksinde distal tübüllerde (DT) (++) ghrelin immunreaktivitesi. Glomerül (G), Proksimal tübül (PT), İmmunreaktif alan (→)X 20.



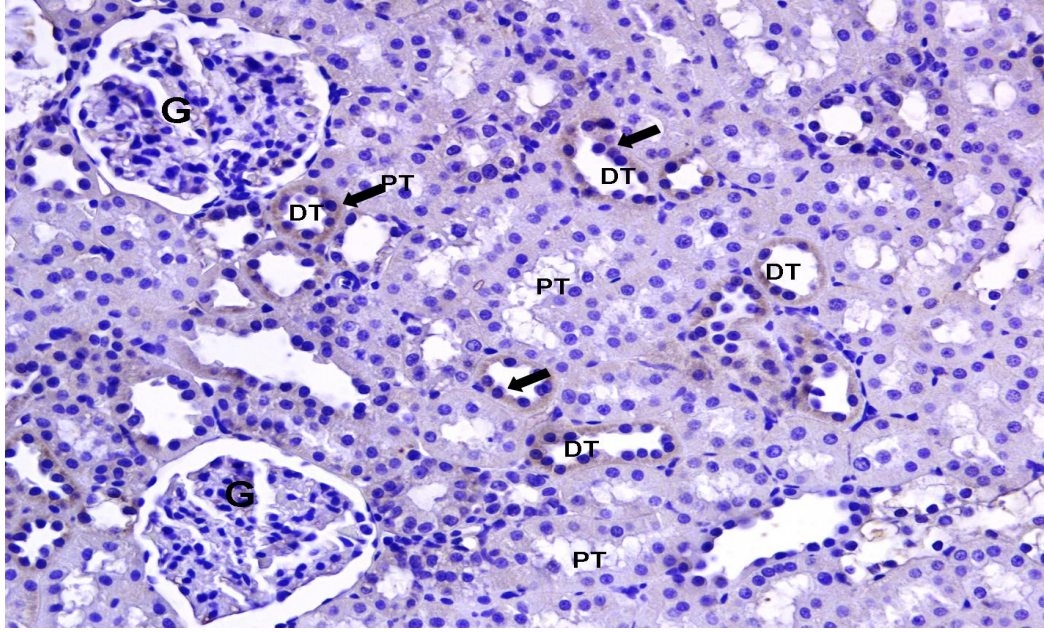
Şekil 10. Grup 1'de böbrek medullasında (++) ghrelin immunreaktivitesi. Distal tübül (DT) X 20.



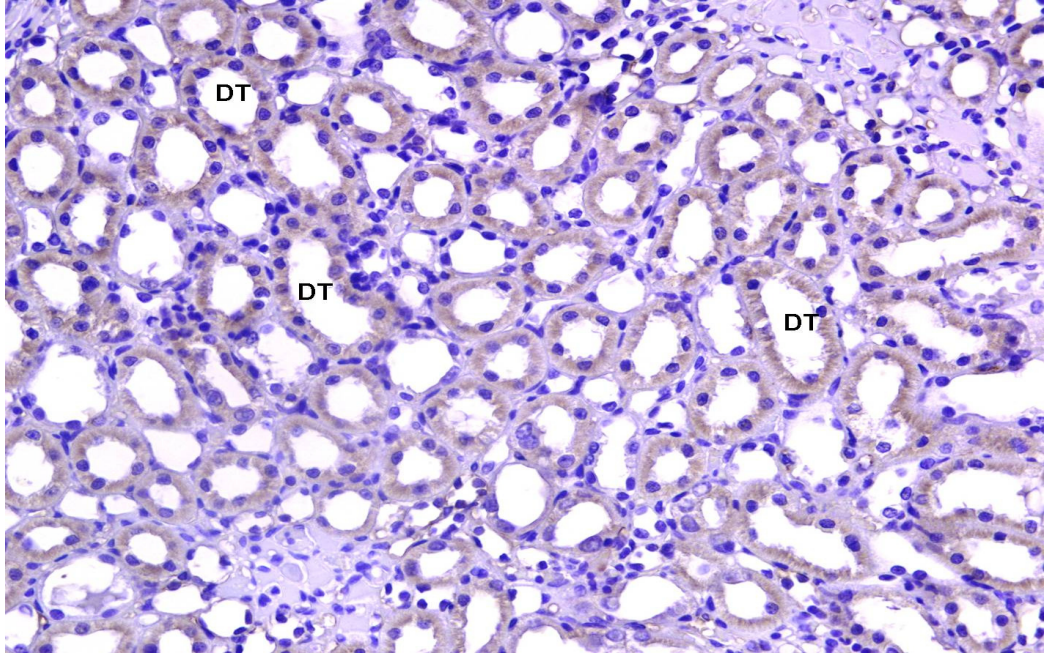
Şekil 11. Grup 2'de böbrek korteksinde distal tübüllerde (DT) (+++) ghrelin immunreaktivitesi. Glomerül (G), Proksimal tübül (PT), İmmunreaktif alan (→) X 10.



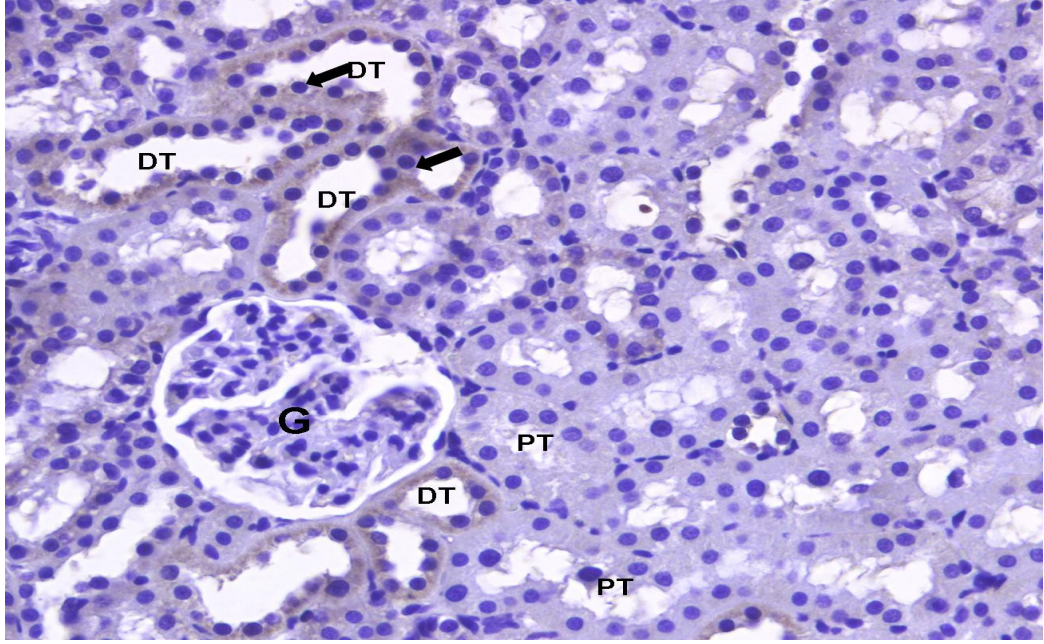
Şekil 12: Grup 2'de böbrek medullasında (+++) ghrelin immunreaktivitesi. Distal tübül (DT) X 20.



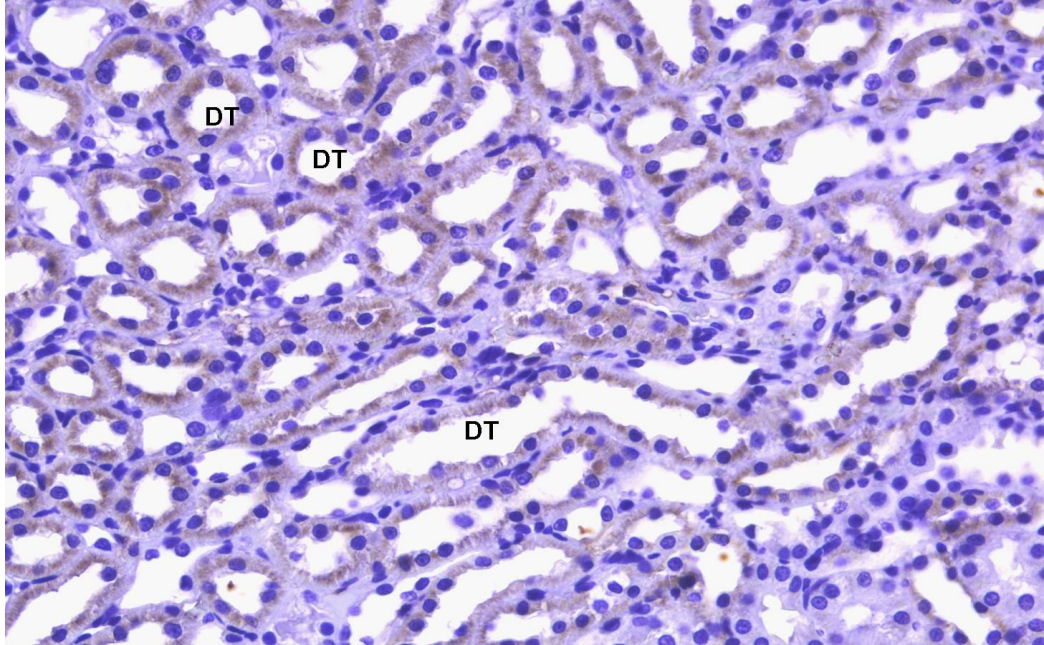
Şekil 13. Grup 3'de böbrek korteksinde distal tübüllerde (DT) (++) ghrelin immunreaktivitesi. Glomerül (G), Proksimal tübül (PT), İmmunreaktif alan (→) X 20.



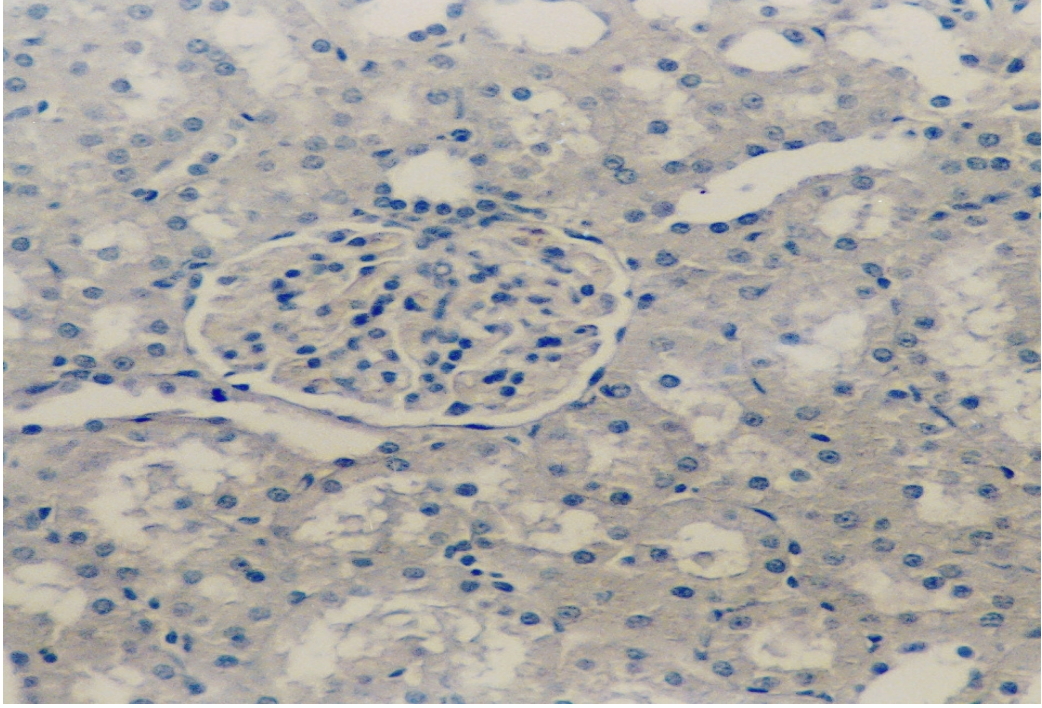
Şekil 14. Grup 3'de böbrek medullasında (++) ghrelin immunreaktivitesi. Distal tübül (DT) X 20.



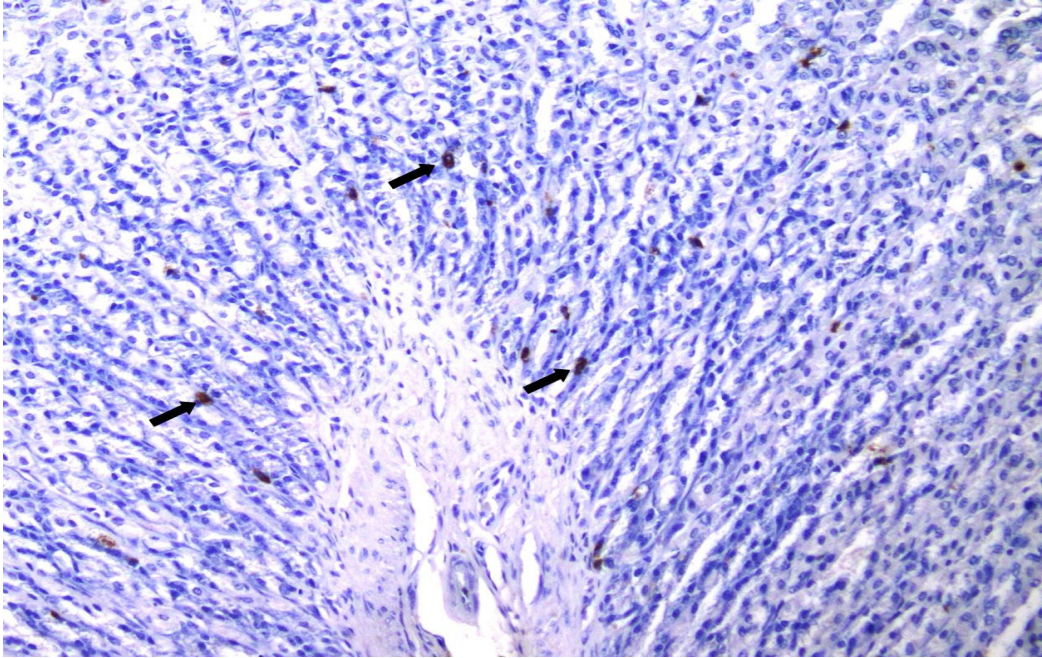
Şekil 15. Grup 4'de böbrek korteksinde distal tübüllerde (DT) (++) ghrelin immunreaktivitesi. Glomerül (G), Proksimal tübül (PT), İmmunreaktif alan (→) X 20.



Şekil 16. Grup 4'de böbrek medullasında (++) ghrelin immunreaktivitesi. Distal tübül (DT) X 20.



Şekil 17. Negatif kontrol böbrek dokusu X 40.



Şekil 18. Pozitif kontrol. Midede ghrelin immunreaktif hücreler (→). X 10.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel diabet modeli, pankreas beta hücrelerine toksik etkili bir antibiyotik olan ve *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen STZ ile oluşturulmuştur (112).

Diabetin başta gelen hedef organlarından bir tanesi de böbreklerdir. Böbrek yetmezliği, diabete bağlı ölüm nedenleri arasında miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada yer almaktadır (113). Etyolojisi ve patogenezi henüz tam aydınlatılmamış olan diabetik nefropati, son dönem böbrek yetersizliğinin önemli bir sebebidir ve nefropati sıklığı diabet süresinin uzamasıyla artmaktadır (15, 114). Tip 1 ve Tip 2 diabette gözlenen böbrek değişiklikleri arasında belirgin bir fark yoktur, fakat her iki diabet tipinde de diabetik nefropatide glomerüler ve interstisyel lezyonların gelişmesi ortak özelliştir (115, 116).

Klinik bulguların ve deneysel çalışmaların çoğu, diabetik komplikasyonların metabolik bozukluklar, özellikle de hiperglisemi sonucu olduğunu işaret etmektedir. Hiperglisemi ile uzun süreli diabetin komplikasyonları arasında bağlantı kuran birçok mekanizma üzerinde çalışılmıştır. Çalışmalar sonucunda, hiperglisemi kontrolü ile diabetin komplikasyonlarının gelişmesinin geciktirilebildiği saptanmıştır (113). Devamlı hiperglisemiyle seyreden durumlar, böbreklerde kalıcı ve giderek yaşamsal tehlike oluşturan yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Hiperglisemi nefropatinin başlaması için olmazsa olmaz bir faktör değildir. Nefropati geliyecekse, o zaman hiperglisemiyi, bu patolojiyi şiddetlendiren bir faktör olarak değerlendirmek daha uygundur (15). STZ ile deneysel diabet oluşturulmuş sıçanlarda, insülin ile hiperglisemi kontrolü sağlandığında, glomerül bazal membran kalınlaşması ve mezangial matriks artışı gibi diabetik nefropati bulgularının önlenemediği gösterilmiştir (117, 118).

Diabetik nefropati, böbreğin bütün bölümlerini kapsayan yapısal değişiklikleri içerir, fakat en karakteristik değişiklikler glomerüllerde saptanmıştır (119). Glomerüler lezyonların en önemlileri, kapiller bazal membran kalınlaşmaları, diffüz glomerüloskleroz ve nodüler glomerülosklerozdur. Diffüz glomerüloskleroz, mezangial hücre proliferasyonu ve beraberinde mezangial matrikste diffüz artış olarak gruplanabilir ve her zaman bazal membran kalınlaşması ile ilişkili olan durumlardır (113). Bu çalışmada da, diabetik grupta glomerüllerde Bowman

mesafesinde daralma, diffüz mezangiyal matriks artışı ve tübüler dilatasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, tübül epitellerinin fırçamsı kenarlarında ayrışma ve bozulmalar, tübül bazal membranlarında kalınlaşmalar, glukojenik vokualizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüller (Armanni-Ebstein lezyonları) ve tübül lümenine dökülmeler dikkat çekmiştir.

Diabetik nefropatinin erken döneminde; glomerül ve tübüllerde hipertrofi, tübüller vakuolizasyon, glomerül ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, glomerüllerde mezangial matriks ve hücre artışı gibi histopatolojik değişiklikler gösterdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (120–122). Bizim çalışmamızda da, ışık mikroskobu düzeyinde PAS (+) mezangial matrikste artış, tübüller vakuolizasyon ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma gözlenmesi literatür bilgileri ile uyumlu bulunmuştur (123). Ayrıca, kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, diabetik olan grupta Armanni-Ebstein lezyonlarının da belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Kontrol altına alınamayan glukozürüli hastalarda, tübüller epitelde glukozun reabsorbe edilerek glukojen olarak depolandığı bilinmektedir (113). Günümüzde Armanni-Ebstein lezyonlarının bir hastalık belirtisi olmaktan çok, tübüller sıvıda yüksek yoğunluktaki glukozun geri emilimi sonucu glukojen birikiminin bir işareti olduğu saptanmıştır (15).

Oksidatif stres; vücuttaki oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesiyle oluşan çeşitli moleküler değişikliklerin ifadesidir (124, 125). Oksidatif stresin özellikle yaşlanma, diabet, üremi, kardiyovasküler hastalıklar, malnütrisyon ve kanser gibi durumlarda önemi ortaya konmuştur (126). Son dönem böbrek yetmezliğinde (SDBY) pro-oksidanlar ile anti-oksidanlar arasındaki denge artmış oksidatif stres yönüne kaymıştır. SDBY hastaları böbrek hastalığının kendisinin yanında diyaliz işlemi, diyaliz tedavisi sırasında kullanılan diyaliz sıvısı, diyaliz membranı, immun sistem aktivatörleri ve diğer farmakolojik tedaviler nedeniyle yoğun oksidatif stress yükü altındadırlar. Bu nedenle son zamanlarda SDBY hastalarında oksidatif stres ve antioksidanlarla ilgili çalışmalar ilgi çeken konuların başında gelmektedir (127).

Oksidatif stresin ve inflamasyonun SDBY’de en önemli morbidite ve mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde de yer aldığı göz önüne alındığında geliştirilecek antioksidan ve antiinflamatuvar tedavilerin bu hastalardaki önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. KBH’da en fazla kullanılan

anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ) ve anjiotensin reseptör blokerlerinin (ARB) oksidatif stres üzerine olan etkileri birçok çalışmaya konu olmuştur. Farmakolojik tedavinin en önemli ve vazgeçilmez öğelerinden olan bu ilaçların oksidatif stres üzerine olan etkilerini birebir karşılaştıran çalışmaların sayısı ise sınırlıdır. Çeşitli çalışmalarda, ACEİ ve ARB'lerin gerek sistemik ve gerekse sadece böbrekte olsun, NADPH oksidaz inhibisyonu ile (128-131) süperoksit düzeyini düşürerek (132) okside LDL düzeyinde (133) ve ileri glikolizasyon son ürünlerinde (AGE) azalma yaparak oksidatif yükü azalttıkları gösterilmiştir (134).

Onozato ve ark. (131), diabetik nefropatili ratlarda yaptıkları çalışmada ACEİ'lerinin renal NADPH oksidazı inhibe ettiğini ve proteinüriyi azalttığını göstermişlerdir.

Büyüme hızlandırması ve proliferatif etkileri yanında, diabetik böbrek hastalığının oluşumundaki fonksiyonel ve yapısal değişimlere katkıları nedeniyle diabetik nefropati patogenezinde büyüme faktörleri de çok önemli bir yer tutarlar. Diabetik nefropatide rol alan başlıca büyüme faktörleri; BH, IGF-1, vasküler endotelyal büyüme faktörü, transforming büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve platelet kökenli büyüme faktörüdür. Bunlardan BH/IGF sistemini oluşturan moleküller; dolaşımında, ekstrasellüler mesafede ve çoğu dokuda bulunmaktadır. Büyüme ile ilgili önemli görevler üstlenmektedirler (15). Araştırmalar bu sistemin diabetik nefropatide önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (135).

BH, diabetik mikroanjiyopatinin oluşumunda rol almaktadır. Ayrıca, BH ve IGF'nin diabetik nefropatide patojenik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (136, 137). Tip 1 diabet modeli oluşturulmuş nonobez diabetik farelerde ve STZ ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda, serumda oldukça belirgin bir şekilde BH artışı olduğu gösterilmiştir (110, 138).

BH reseptör antagonistleri ile nonobez diabetik ve STZ ile diabet oluşturulmuş farelerde, renal ve glomerüler hipertrofi ve albüminürinin önlenemediği gösterilmiştir (138, 139).

Masaoka ve ark. da (110) çalışmamızdakine benzer bir şekilde Wistar sıçanlarda STZ ile diabet oluşturmuşlardır. Serum insülin ve IGF-1 düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenirken, serum BH, serum total ve aktif ghrelin seviyelerinde ise bariz bir artış saptamışlardır. Artmış plazma ghrelin konsantrasyonundan, midedeki ghrelin immunreaktif hücreleri sorumlu tutmalarına rağmen, diabette mide

dışında bir organda da ghrelin sentezinin artmış olabileceği ihtimalini de belirtmektedirler (110).

Bilateral nefrektomi ve kısmi nefrektomi uygulanmış farelerde, plazma total ghrelin düzeyinin arttığı bulunmuş, fakat nefrektomi öncesinde midede ghrelin mRNA düzeyleri ve ghrelin içeriğinde artış gözlenmemiştir. Bu nedenle, bu artış ghrelinin renal klirensinde ve yıkılmasındaki azalmayla ilişkili olabilir (101).

Mori ve ark. (70), ilk kez gastrointestinal sistem ve beyin dışında fare böbreğinde preproghrelin gen ekspresyonunu göstererek, böbrekte ghrelinin lokal olarak üretilebildiğini ve ayrıca ghrelinin bu organda endokrin ve/veya parakrin rollere sahip olabileceği düşünülmektedir. Kuloğlu ve ark. (35) yaptıkları çalışmada, deneysel diabetik sıçanların böbrek dokularında distal tübülüslerde diabetin süresiyle orantılı olarak ghrelin immunreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir.

Ghrelin, distal tübül epitelinden ve kandan filtre edilmektedir. İdrarla aktif olarak sekrete edilmektedir. İdrarda dolaşımdakinden daha fazla ghrelin bulunduğu saptanmıştır (101).

Yapılan bir klinik çalışmada, son dönem böbrek hastalarında hemodiyaliz öncesi serum ghrelin düzeyinin arttığı, hemodiyaliz sonrası ise azaldığı gösterilmiştir (36).

Tüm bu bilgiler gözönüne alındığında, diabette ghrelin dinamiklerinde meydana gelen değişikliklerin sonucu olarak, böbreklerden de ghrelin sentezinin artabileceği ve bunun diabet fizyopatolojisinde etkili olabileceği akılda tutulmalıdır. Zaten diabet'in karakteristik özelliği olan hiperfajinin de yüksek ghrelin seviyesinden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve ghrelin reseptör antagonisti verilerek kısmen gerilediği saptanmıştır (111).

Çalışmamızda, çeşitli oksidasyon yolaklarında inhibisyona neden olan ve proteinüriyi azaltarak renal koruma sağlayan enalapril ve losartan'ın STZ ile deneysel diabet oluşturulmuş sıçanlara verilerek ghrelin immunreaktivitesi gözlemlenmiştir (128-131). Enalapril ve losartan verilen her iki grupta da böbrek korteks ve medullasında ghrelin immunreaktivitesi kontrollerdeki gibi orta şiddette (++) saptanmıştır. Aynı şekilde distal tübüllerde de orta şiddette (++) ghrelin immunreaktivitesi izlenmiştir. Diabetik grupta ise böbrek korteksinde, medullada ve distal tübüllerde şiddetli (+++) ghrelin immunreaktivitesi izlendi.

Enalapril, reaktif oksijen sistemine etki ederek serbest radikalleri azaltmaktadır. Benzer şekilde ghrelin de serbest radikalleri ortadan kaldırdığından serbest radikal düzeylerini azaltabilir (140). Küçüksu (140) yaptığı çalışmada, ghrelin ve enalaprilin benzer yollardan oksidatif stresi ortadan kaldırdıkları için, enalapril kullanımının ghrelinin sağladığı dengeleyici mekanizmayı bloke ederek ghrelin düzeyini azalttığını ileri sürmüştür. Biz de bu çalışmamızda, enalapril ve losartan moleküllerinin aynı şekilde ghrelin ile etkileşiminin olabileceğini düşünmekteyiz. Böylelikle diabette enalapril ve losartan kullanımının distal tübül ghrelin ekspresyonunu kontrol grubundakine benzer şekilde etkileyebileceği kanaatindeyiz.

Bu çalışmanın sonucunda enalapril ve losartan uygulanmasının diabetik sıçanların böbrek dokusunda ghrelin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu ve bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğine inanmaktayız.

5. KAYNAKLAR

1. Başkal N. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması. Erdoğan G. (ed), Endokrinoloji Temel ve Klinik. İkinci Baskı. Ankara: Medical Network & Nobel, 2005; 342-348
2. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 51-61, 63-67, 69-81, 215-217, 237-243.
3. Foster DW. Diabetes Mellitus. In: Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, et al (eds), Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th edition. New York: Mc Graw Hill Companies 1998; 2: 2060-2080.
4. Koloğlu S. Diabetes Mellitus. Koloğlu S. (ed), Endokrinoloji Temel ve Klinik. Birinci Baskı. Ankara: Medical Network & Nobel 1996; 368-385.
5. American Diabetes Association: World Diabetes Day Focuses on Preventing Diabetic Kidney Disease, 2005
6. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2003; 26: 5-20.
7. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, (eds). Harrison's principles of Internal Medicine. 16th ed. McGraw Hill 2005: 2152- 2180.
8. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. Fourteenth edition. Boston: Lippincott Williams and Wilkins, 2005; 331-338.
9. Karşıdağ K. Diabetin Kronik Komplikasyonları. Büyüköztürk K. (ed), İç Hastalıkları. Birinci Baskı. Medical Network & Nobel, 2007; 551-564.
10. The World Health Organisation Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics; Prevalence of small vessel and large vessel disease in diabetic patients from 14 centers. Diabetologia 1985; 28: 615-640.
11. Satman I: 2nd International Experience Exchange Committee on Diabetes. Cologne June 1996: 20-23.

12. Evrankaya R. Diabetik Nefropati. Özata M ve Yöner A. (ed), Endokrinoloji Metabolizma ve Diabet. Birinci Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006; 359-366.
13. Deckert T, Paulsen E, Larsen M. Prognosis of diabetics onset before the age of thirty-one. I. Survival, causes of death, and complications. Diabetologia 1978; 14: 363-337.
14. Fabre J, Balant LP, Dayer PG, Fox HM, Vernet AT. The kidney in maturity onset diabetes mellitus: clinical study of 510 patients. Kidney Int 1982; 21: 730-738.
15. Büyükdevrim AS, Büyükbeşe MA, Davutoğlu M. Diabetik nefropati. Klinik moleküler patogenezi klasik ve moleküler tedavi. İstanbul: Turgut yayıncılık, 2005: 432-529, 136-342
16. Roland E. Schmieder. Mechanisms for the Clinical Benefits of Angiotensin II Receptor Blockers Am J Hypertens 2005; 18: 720–730
17. El-Atat FA, Stas SN, McFarlane SI. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. J Am Soc Nephrol 2004 Nov; 15: 2816-2827.
18. Mizuno M, Sada T, Kato M. Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in animal model of type 2 diabetes. Hypertens Res 2002; 25: 271.
19. Martínez Veá A. Polymorphism of the renin-angiotensin system and renal failure. Nefrologia 2002; 22: 89-94.
20. Freedman BI, Bowden DW, Rich SS, Apel RG. Genetic Initiation of hypertensive and diabetic nephropathy. AJH 1998; 11; 251-257
21. Dökmeci İ. Farmakoloji Temel Kavramlar. Tayf ofset, 2000; 343-353
22. Opie LH. Angiotensin converting enzyme inhibitors: scientific basis for clinical use. 1994; 1-22.
23. Gerald B., Alice S. Angiotensin II Receptor Antagonists: Role in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Renoprotection. Progress in Cardiovascular Diseases. 2004: 47: 105-115.

24. Gasparo MD, Catt KJ, Inagami JW, Wright JW, Unger TH. International union of pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472.
25. Kokkonen Jorma O, Ken AL, Antti Kuoppala and Kovanen Petri T. Kinin-Degrading Pathways in the Human Heart *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 42-45.
26. Brunner HR, Kirsman DJ, Sealey JE. Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science* 1971; 174: 1344-1346.
27. Brunner HR, Gavras H, Laragh JH. Angiotensin-II blockade in man by Sar-Ala-angiotensin II for understanding and treatment of high blood pressure. *Lancet* 1973; 2: 1045-1048.
28. Duncia JV, Chiu AT, Carini DJ. The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: A new class of potent antihypertensives. *J Med Chem* 1990; 33: 1312-1329.
29. Faxon DP, Creager MA, Halperin JL. Central and peripheral hemodynamic effect of angiotensin inhibition in patients with refractory congestive heart failure. *Circulation* 1980; 61: 925-931.
30. Murakami M, Suzuki H, Naitoh M, Matsumoto A, Kageyama Y, Tsujimoto G, Saruta T. Blockade of the renin-angiotensin system in heart failure in conscious dogs. *J Hypert* 1995; 13: 1405-1412.
31. Canberk A. Renin Anjiotensin Sistemini Etkileyen Droglar. *Büyüköztürk K. Ve Koylan N. (ed), Anjiotensin II ve Anjiotensin II Antagonistleri. Üçüncü Baskı. İstanbul, 2007; 73-74.*
32. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (Çeviri Ed) s:315-319* 9. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1996.
33. Muccioli G, Tschöp M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002; 440: 235-254.
34. Soriano-Guillen L, Barrios V, Chowen JA, Sanchez I, Vila S, Quero J and Argente J. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship

- with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004; 144: 30–35.
- 35.** Kuloglu T and Dabak DO. Determination of Ghrelin Immunoreactivity in Kidney Tissues of Diabetic Rats. *Renal Failure* 2009, 31: 562-566.
- 36.** Aygen B, Doğukan A, Dursun FE, Aydın S, Kılıç N, Şahpaz F and Çeliker H. Ghrelin and Obestatin Levels in End-Stage Renal Diseases. *The Journal of International Medical Research* 2009; 37: 757-765.
- 37.** Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
- 38.** McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL et al. Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 1997; 46: 426-434.
- 39.** Aydın S. Ghrelin hormonunun keşfi: Araştırmaları ve klinik uygulamaları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32: 76–89.
- 40.** Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495–522.
- 41.** Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255–4261.
- 42.** Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988–2991.
- 43.** Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, Richards M. C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 567-573.

44. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909-913.
45. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, et al. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3062-3065.
46. Gauna C, Meyler FM, Janssen JAMJL, Delhanty PJD, Abribat T, van Koetsveld P, et al. Administration of Acylated Ghrelin Reduces Insulin Sensitivity, Whereas the Combination of Acylated Plus Unacylated Ghrelin Strongly Improves Insulin Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5035-5042.
47. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758.
48. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 398-410.
49. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 2004; 15; 119: 77-81.
50. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Insulin-like growth factor-I down-regulates ghrelin receptor (growth hormone secretagogue receptor) expression in the rat pituitary. *Regul Pept* 2005; 15: 203-206.
51. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4908-4911.
52. Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 241-244.

53. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974–977.
54. Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, et al. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept* 2005; 126: 67–71.
55. Cao JM, Ong H, Chen C. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 13–18.
56. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, et al. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 415–423.
57. Sachs G, Zeng N, Prinz C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 234–256.
58. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K and Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23: 531–536.
59. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37: 649–661.
60. Katugampola SD, Pallikaros Z, Davenport AP. [125I-His (9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 143–149.
61. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788–794.
62. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth

hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 400–409.

63. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144: 1594–1602.
64. Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP and Nussdorfer GG. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: Evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett* 2003; 536: 173–179.
65. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1013–1021.
66. Santos M, Bastos P, Gonzaga S, Roriz JM, Baptista MJ, Nogueira-Silva C, et al. Ghrelin expression in human and rat fetal lungs and the effect of ghrelin administration in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2006; 59: 531–537.
67. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 124–129.
68. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2924–2929.
69. Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, et al. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol* 2006; 126: 231–238.
70. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; 486: 213–216.

71. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 1483–1487.
72. Kineman RD, Kamegai J, Frohman LA. Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692, 585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1999; 140: 3581–3586.
73. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Regulation of the ghrelin gene: growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology* 2001; 142: 4154–4157.
74. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2180–2184.
75. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1169–1174.
76. Leal-Cerro A, Torres E, Soto A, Dios E, Deghenghi R, Arvat E, et al. Ghrelin is no longer able to stimulate growth hormone secretion in patients with Cushing's syndrome but instead induces exaggerated corticotropin and cortisol responses. *Neuroendocrinology* 2002; 76: 390–396.
77. Rubinfeld H, Hadani M, Taylor JE. Novel ghrelin analogs with improved affinity for the GH secretagogue receptor stimulate GH and prolactin release from human pituitary cells. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 787–795.
78. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept* 2003; 114: 71–77.
79. Pecker F. Ghrelin in the heart and growth hormone: which is chicken, which is egg? *Cardiovasc Res* 2004; 62: 442–443.

80. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104:1430–1435.
81. Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1146–1152.
82. Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 2002; 173: 239–245.
83. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2335–2340.
84. Tacke F, Brabant G, Kruck E. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 447-454.
85. Marchesini G, Pagotto U, Bugianesi E. Low ghrelin concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are related to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metabol* 2003; 88: 5674-5679.
86. Sajjad A, Mottershead M, Syn WK, Jones R, Smith S, Nwokolo CU. Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentrations in non-alcoholic steatohepatitis. *Alim Pharmacol Ther* 2005; 22: 291-299.
87. Levin F, Edholm T, Ehrström M, Wallin B, Schmidt PT, Kirchgessner AM, et al. Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 2005; 131: 59–65.
88. Edholm T, Levin F, Hellström PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept* 2004; 121: 25–30.

89. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905–908.
90. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K and Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194–198.
91. Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept* 2005; 126: 11–19.
92. Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, et al. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 2005; 37: 359–369.
93. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 27–68.
94. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; 184: 291-318.
95. Waren AM, Small CJ, Ward HL. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328.
96. Tscop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
97. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T. Plasma ghrelin levels are influenced by acute and chronic feeding states in humans. *Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Denver, CO, 2001*; 336.
98. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 2002; 143: 155-162.
99. Cummings E, Purnell JQ, Frayo SR, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.

100. Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA. From the Cover: Vaccination against weight gain. *Proc Natnl Acad Sci USA* 2006; 103: 13226-13231.
101. Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2748-2752.
102. Inglesias P, Diez JI, Fernantez-Reyes MJ. Serum ghrelin concentrations in patients with renal failure undergoing dialysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 68.
103. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 555-560.
104. Kvist Reimer M, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2003; 144: 916-921.
105. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E and Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 3997-4000.
106. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 1902.
107. Soriano-Guillen L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen JA, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res* 2004; 55: 830-835.
108. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5747-5752.
109. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2546-2553.
110. Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett* 2003; 541: 64-68.

111. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 2002; 143: 4934–4937.
112. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512: 121–134.
113. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji*, Prof. Dr. Uğur Çevikbaş (ed). s:511–517. 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000.
114. Tuğrul A. Diabetik Nefropati. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 19: 113–121.
115. Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab* 2000; 26: 8–14.
116. White KE, Marshall SM, Bilous RW. Are glomerular volume differences between type 1 and type 2 diabetic patients pathologically significant ? *Diabetologia* 2007; 50: 906–912.
117. Rusch R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. The mesangial regions *Diabetologia* 1979; 17: 243–248.
118. Rusch R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. *Diabetologia* 1979; 16: 319–324.
119. Osterby R, Asplund J, Bangstad HJ, Nyberg G, Rudberg S, Viberti GC and Walker JD. Neovascularization at the vascular pole region in diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 348–352.
120. Cortes P, Dumler F, Goldman J, Levin NW. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1987; 36: 80–87.
121. Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, et al. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2000; 43: 91–100.

122. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blantz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int* 1991; 39: 1176–1183.
123. New JP, Canavan JP, Flyvbjerg A, Hamon G, Bilous RW, Marshall SM. Renal enlargement and insulin-like growth factor-1 accumulation in the Wistar rat model of experimental diabetes is not prevented by angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 1996; 39: 166–171.
124. Ronco C, La Greca G. Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization. *Contrib Nephrol* 127: 1-31, 1999.
125. Sies H. Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295.
126. Altan N, Dinçel AS, Koca C, Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Türk Biyokimya Dergisi. 2006; 31; 51-56.
127. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome, Consensus Paper. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1272-1280.
128. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003, 42: 1075-1081.
129. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004, 37: 1263-1273.
130. Touyz RM, Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999, 34: 976-982.
131. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int*. 2002; 61: 186 -194.
132. Berry C, Anderson N, Kirk AJ, Dominiczak AF, McMurray JJ. Renin angiotensin system inhibition is associated with reduced free radical concentrations in arteries of patients with coronary heart disease. *Heart* 2001, 86: 217-220.

133. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ and Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 2005, 4: 5.
134. Fan Q, Liao J, Kobayashi M, Yamashita M, Gu L, Gohda T, et al. Candesartan reduced advanced glycation end-products 56 accumulation and diminished nitro-oxidative stress in type 2 diabetic KK/Ta mice. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:3012-3020.
135. Flyvbjerg A. Role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the renal complications of diabetes. *Kidney Int Sup* 1997; 60: 12–19.
136. Esposito C, Liu ZH, Striker GE, Phillips C, Chen NY, Chen WY, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a GH antagonist: A molecular analysis. *Kidney Int* 1996; 50: 506–514.
137. Lundbaek K, Christensen NJ, Jensen VA, Johansen K, Olsen TS, Hansen AP, et al. Diabetes, diabetic angiopathy, and growth hormone. *Lancet* 1970; 2: 131–133.
138. Segev Y, Landau D, Rasch R, Flyvbjerg A, Phillip M. Growth hormone receptor antagonism prevents early renal changes in nonobese diabetic mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2374–2381.
139. Flyvbjerg A, Bennett WF, Rasch R, Kopchick JJ, Scarlett JA. Inhibitory effect of a growth hormone receptor antagonist (G120K-PEG) on renal enlargement, glomerular hypertrophy, and urinary albumin excretion in experimental diabetes in mice. *Diabetes* 1999; 48: 377–382.
140. Küçük M. Metabolik Sendrom Oluşturulmuş Ratlarda Enalapril Maleate'ın Ghrelin ve Obestatin Üzerine Etkisi, *Uzmanlık Tezi*. 2009; 61-74.

6. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Kırşehir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kırşehir’de tamamladı. 1997 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde yüksek öğrenimine başladı ve 2004 yılında bu fakülteden mezun oldu. 2004-2006 yılları arasında Kırşehir E Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda görev yaptıktan sonra 2006 yılında ayrılarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır. Yabancı dili İngilizce’dir.