

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

**DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDAKİ  
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE BENFOTİAMİN VE  
C VİTAMİNİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Mehmet ÜNAL**

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

**ELAZIĞ  
2011**

**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 aynı zamanda İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. Emir DÖNDER ve tüm değerli İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki hocalarıma, katkılarından dolayı Doç. Dr. Özlem DABAK'a ve tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyimlerini, bilgisini ve emeğini hiç esirgemeyen Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU'na,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım samimi ve dostane duygular paylaştığım tüm asistan ve uzman olmuş arkadaşlarıma, iç hastalıkları servislerinde çalışan tüm hemşire, personel ve kliniğimiz çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini bir an bile esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında her türlü desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven ve huzur veren yol arkadaşım, sevgili eşim Av. Nedime Eşeli ÜNAL'a ve biricik, mutluluk kaynağımız, oğlumuz Ali Said'e teşekkür ederim.

Bu tez, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından TF.11.01 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## ÖZET

Diabetes Mellitus (DM), mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların görülebildiği kronik metabolik bir hastalıktır. Diabetik nefropatili hastalarda artmış oksidatif strese bağlı olarak glomerüller bazal membranlarda kalınlaşma, hipertrofi ve böbrek fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda Benfotiamin'in antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Vitamin C ise çok önemli bir antioksidan olup, lipid peroksidasyonuna karşı savunmada etkilidir.

Bu çalışmada, Streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde Benfotiamin ve Vitamin C'nin sıçan böbrek dokusundaki apoptotik değişiklikler üzerine koruyucu etkileri incelenmiştir.

Çalışmada 28 adet 6 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deneysel hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (Grup I) herhangi bir işlem yapılmadı. Diğer 3 gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum sitrat tamponunda (ph:4.5) çözülürülerek intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Diyabet oluştuğundan sonra diyabetik grup (grup II) tespit edilerek herhangi bir işlem yapılmadı. DM + Benfotiamin grubuna (grup III) Benfotiamin 70 mg/kg/gün ve DM +Vitamin C grubuna (grup IV) ise Vitamin C (900 mg/kg/gün) 6 hafta süreyle oral olarak verildi. Deneysel sonrasında sıçanlar dekapite edilerek böbrek dokuları çıkarıldı. Böbrek dokularına Hematoksilin-Eozin ve Tunel boyama yapıldı.

Çalışmamızda DM grubu sıçanların böbrek dokularında PAS boyaması sonucu glomerüllerde hipertrofi ve mezengial matriks artışı belirgin olarak görüldü. Tübüllerde dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar ile glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüller (Armani Ebstein lezyonları) gözlemlendi.

Çalışmamızda Vitamin C verilen sıçanların böbrek glomerüllerinde diyabetik gruptakine benzer şekilde belirgin mezengial matriks artışı ve glomerüller hipertrofi gözlemlendi. Yine bu sıçanların böbrek tübüllerinde diyabetik gruba karşılaştırıldığında daha az oranda tübül dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılmalar ve glukojenik vakuolizasyon izlendi. Ancak bu düzelme Benfotiamin grubu ile kıyaslandığında daha az belirgindi.

Sonuç olarak, diyabete bağlı oksidatif strese karşı Benfotiamin ve C Vitamininin koruyucu etkisinin gösterilmesinin, diyabetin komplikasyonlarını engellemek açısından yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus, benfotiamin, C vitamini, apoptozis, böbrek.

## **ABSTRACT**

### **THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF VITAMIN C AND BENFOTHIAMINE ON ALTERATIONS IN THE EXPERIMENTAL DIABETIC RAT KIDNEY TISSUES**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder with microvascular and macrovascular complications. Thickening and hypertrophy of glomerular basement membrane and renal function disorders can be seen due to oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. Antioxidant effects of benfothiamine have been reported in recent years. Vitamin C is also an important antioxidant with the protective effects against lipid peroxidation.

In this study, we investigated the protective effects of benfothiamine and vitamin C against apoptosis in streptozotocin (STZ) induced experimental diabetic rats.

We studied on 28 albino, male Wistar rats with 6 week age. We separated this rats to 4 groups as 7 rats in each group. No intervention executed to control group (group 1). To other 3 groups 0.1 M STZ in sodium citrate buffer (pH:4.5) was administered intraperitoneally (i.p.). After the onset of DM, no intervention was executed to diabetic group (group 2). To DM+benfothiamine group (group 3), 70 mg/kg/day benfothiamine and to DM+vitamin C group (group 4) 900 mg/kg/day vitamin C was administered by oral route for 6 weeks. After the experiment rats were decapitated and renal tissues were obtained and dyed with hematoxylin-eosin and Tunel paints.

In our study, we determined prominent glomerular and mesangial matrix hypertrophy, tubular dilatation, injury of tubular epithelium, transparent tubuli with glucogenic vacuolisation (Armani-Ebstein lesion) on the renal tissues of diabetic group rats with PAS staining.

In the vitamin C group, we determined increase of mesangial matrix and glomerular hypertrophy similar with diabetic group. On the other hand, although tubular dilatation, injury of tubular epithelium and glucogenic vacuolisation of vitamin C group were less prominent than diabetic group, but healing of these lesions were less than benfothiamine group.

In conclusion, we determined the protective effects of benfothiamine and vitamin C against the oxidative stress due to DM and these findings can be useful to prevent diabetic complications.

**Keywords:** Diabetes mellitus, benfothiamine, vitamin C, apoptosis, kidney.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı	1
1.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	2
1.1.2.1. Tip 1 Diabet	2
1.1.2.2. Tip 2 Diabet	2
1.1.2.3. Gestasyonel DM	2
1.1.2.4. Diğer Spesifik Tipler	2
1.1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	3
1.1.3.1. Akut Komplikasyonlar	3
1.1.3.2. Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları	3
1.2. Diyabetik Nefropati	3
1.2.1. Diyabetik Nefropati'nin Tanımı ve Epidemiyolojisi	3
1.2.2. Diyabetik Nefropati'nin Patolojisi	4
1.2.2.1. Makroskopik Özellikler	4
1.2.2.2. Mikroskopik Özellikler	4
1.2.3. Diyabetik Nefropati'nin Klinik Seyri	5
1.2.3.1. Birinci Devre	5
1.2.3.2. İkinci Devre	5
1.2.3.3. Üçüncü Devre	6
1.2.3.4. Dördüncü Devre	6
1.2.3.5. Beşinci Devre	6

1.3. Serbest Radikaller	6
1.3.1. Oksidatif Stres	7
1.3.2. Diyabet ve Oksidatif Stres	7
1.3.2.1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi	8
1.3.2.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri) Oluşumu	8
1.3.2.3. Poliöl Yol	9
1.3.3. Antioksidanların Sınıflandırılması	9
1.4. Apoptozis	10
1.4.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi	10
1.4.2. Apoptozisin Regülasyonu	10
1.4.2.1. p53'ün Rolü	10
1.4.2.2. Bcl-2/Bax	11
1.4.2.3. Kaspazlar	11
1.4.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu	12
1.4.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi	12
1.4.3.2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu	12
1.4.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)	12
1.4.5. Hastalıklarda Apoptozis	12
1.4.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	13
1.4.6.1. TUNEL (TdT-mediated nick and labeling technique) Yöntemi	13
1.5. Benfotiamin	13
1.6. C Vitamini	14
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>15</b>
2.1 Deney Hayvanları	15
2.2. Diyabet İndüksiyonu	16
2.3 Deney Gruplarının Oluşturulması	16
2.3.1. Birinci Grup: (n= 7) Kontrol Grubu	16
2.3.2. İkinci Grup: (n=7) Diyabet Grubu	16
2.3.3. Üçüncü Grup: (n=7) Diyabet + Vitamin C Grubu	16
2.3.4. Dördüncü Grup: (n=7) Diyabet + Benfotiamin Grubu	17
2.4. Örneklerin Alınması	17

2.5. Biyokimyasal Çalışma	17
2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri	17
2.6. Histolojik Çalışma	17
2.7. TUNEL Metodu	18
2.8. İstatistiksel Analiz	20
<b>3. BULGULAR</b>	<b>21</b>
3.1. Klinik ve Biyokimyasal Bulgular	21
3.2. Histolojik Bulgular	22
3.3. TUNEL Bulgular	30
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>31</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>35</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>44</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler	13
<b>Tablo 2.</b> Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşenleri	15
<b>Tablo 3.</b> Histolojik takip serileri	18
<b>Tablo 4.</b> TUNEL boyama işlemi	19
<b>Tablo 5.</b> TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi	20
<b>Tablo 6.</b> STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve 4 hafta sonraki final ağırlık ve kan şekeri ölçüm değerleri	21

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Kontrol grubunda normal böbrek histolojisi. Glomerül (→), Proksimal tübül (PT), Distal tübül (DT). PAS X 100. 22
- Şekil 2.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitelleri ve fırçamsı kenarın(→)normal görünümü. Proksimal tübül (PT), Distal tübül (DT). PAS X 200. 22
- Şekil 3.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100. 23
- Şekil 4.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200. 23
- Şekil 5.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda bir glomerülde (G) Bowman kapsülünün pariyetal yaprağında kalınlaşma (→).PAS X 200. 24
- Şekil 6.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100. 24
- Şekil 7.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200. 25
- Şekil 8.** Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100. 25
- Şekil 9.** Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200. 26
- Şekil 10.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100. 26
- Şekil 11.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda +4 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler(→) X 100. 27
- Şekil 12.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100. 27

<b>Şekil 13.</b> Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100.	28
<b>Şekil 14.</b> TUNEL pozitif kontrol. Meme Dokusu. X 200	28
<b>Şekil 15.</b> TUNEL negatif kontrol. X 200	29

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AGE</b>	: Glikozilasyon Son Ürünleri
<b>AIDS</b>	: Acquired Immüne Deficiency Syndrome
<b>AIF</b>	: Apoptozis Uyarıcı Faktör
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>CAD</b>	: Caspase Activated DNase
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T Lenfositler
<b>DAB</b>	: 3,3'-Diaminobenzidine
<b>DIDMOAD</b>	: Diabetes Insipitus Diabetes Mellitus Optik Atrofi Deafness
<b>DKA</b>	: Diabetik Ketoasidoz
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DT</b>	: Distal Tübül
<b>DUTP</b>	: Deoksi Üridil Trifosfat
<b>FÜDAM</b>	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
<b>GFR</b>	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>H-E</b>	: Hematoksilen-Eozin
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NK</b>	: Naturel Killer
<b>NKHD</b>	: Non Ketotik Hiperosmolar Durum
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>OH</b>	: Hidroksil

<b>PAS</b>	: Periyodik Asit Schiff
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PT</b>	: Proksimal Tübül
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SDBY</b>	: Son Dönem Böbrek Yetersizliği
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>TdT</b>	: Deoksinükleotidil Transferaz
<b>TNF</b>	: Tümör Nekrozis Faktör
<b>TUNEL</b>	: TdT-Mediated Nick and Labeling Technique

## 1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormon sekresyonunun veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (1). Diabetes Mellitusun kronik komplikasyonları makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak incelenmektedir. Nefropati, retinopati ve nöropati mikrovasküler hastalık sonucu oluşmaktadır. Büyük damarların ateroskleroza mikrovasküler komplikasyondur (2,3).

Diabetes Mellitusta reaktif oksijen türlerinin etkisi 1980'li yıllardan bu yana yaygın şekilde bilinen bir konudur (4). Yapılan çeşitli çalışmalar, diyabet hastalarının plazma ve dokularında serbest radikal düzeylerinin arttığını ve antioksidan düzeyinin azaldığını ortaya koymaktadır (5-7). Vitaminler reaktif oksijen türlerinin alıcı ve vericileri görevini üstlenirken, mineraller ise enzimlerin aktivitesini düzenlemede görevlidirler (8).

Bu çalışmamızda patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı diabetes mellitusun sıçan böbrek dokusunda meydana getirdiği değişiklikler üzerine benfotiamin ve C vitamininin iyileştirici etkilerinin histolojik ve immünohistokimya yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır.

### 1.1. Diabetes Mellitus

#### 1.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı

Diabetes Mellitus insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. Diyabetteki kronik hiperglisemi özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları gibi bazı organlarda uzun dönemde hasar, disfonksiyon ve yetmezliğe neden olur. Belirgin hipergliseminin semptomları poliüri, polidipsi, kilo kaybı, bazen de polifaji ve görme bozukluğunu içerir (9). DM etiyojisine bağlı olarak, insülin sekresyonunda azalma, plazma glukoz kullanımında azalma ve glukoz yapımında artma gibi faktörler hiperglisemiye katkıda bulunur. DM'a eşlik eden metabolik bozukluk pek çok organı ilgilendiren fizyopatolojik değişikliklere ve buna bağlı olarak, kişi ve toplum üzerinde ciddi bir sağlık yüküne neden olmaktadır (10).

## **1.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması**

### **1.1.2.1. Tip 1 Diabet**

**a-**İmmün-mediated diabetes

**b-**İdiopatik diabetes

### **1.1.2.2. Tip 2 Diabet**

### **1.1.2.3. Gestasyonel DM**

### **1.1.2.4. Diğer Spesifik Tipler**

**a-** Hücre fonksiyonu genetik bozuklukları

**b-** İnsülin etkisindeki genetik bozukluklar: Akantozis Nigrikans, Leprechaunism, Rabson-Mendenhall Sendromu

**c-**Egzokrin Pankreas Hastalıkları: Pankreasta diffüz hasara yol açan durumlar diyabet nedeni olabilir. Bunlar pankreatit, travma, pankreatektomi ameliyatı, pankreas kanseri olarak sayılabilir. Kistik fibrozis ve hemokromatozis de beta hücrelerine zarar verebilir ve insülin salgılanmasını bozabilir.

**d-** Endokrinopatiler: Çeşitli hormonlar (örneğin büyüme hormonu, kortizol, glukagon, epinefrin), insülin etkisini antagonize ederler. Bu hormonların fazla miktarda olması (örneğin. Akromegali, Cushing Sendromu, Glukagonoma, Feokromasitoma) diyabete neden olabilir.

**e-** İlaç ve kimyasal maddeler: Pek çok ilaç insülin salgılanmasını bozabilir. Vacor (bir fare zehiri) ve intravenöz pentamidin gibi bazı toksinler sürekli pankreas beta hücrelerini tahrip edebilir. Birçok ilaç ve hormonlar insülin etkisini azaltabilir. Örnek olarak nikotinik asit ve glukokortikoidler sayılabilir.

**f-** Enfeksiyonlar: Bazı virüsler beta hücre yıkımı ile ilişkili bulunmuştur. Konjenital kızamıkçık olan hastalarda diyabet görülmüştür. Buna ilave olarak sitomegalovirüs, adenovirüs, coxsackivirüs ve kabakulak hastalığı da suçlanmıştır.

**g-** Otoimmüniteye bağlı nadir diyabet formları

Diyabetle birlikte olan diğer genetik sendromlar: Down Sendromu, Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu, Wolfram Sendromu = DIDMOAD Sendromu (11).

### **1.1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları**

#### **1.1.3.1. Akut Komplikasyonlar**

Diabetik Ketoasidoz (DKA) ve nonketotik hiperosmolar durum (NKHD) diyabetin akut komplikasyonlarıdır.

#### **1.1.3.2. Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları**

**a-Mikrovasküler:**

##### Göz Hastalığı

Retinopati (nonproliferatif / proliferatif)

Maküler ödem

Katarakt

Glokom

##### Nöropati

Duyusal ve motor (mononöropati ve polinöropati)

Otonom

##### Nefropati

**b-Makrovasküler:**

Koroner arter hastalığı

Periferik vasküler hastalık

Serebrovasküler hastalık

Diğer

Gastrointestinal (gastroparezi, diyare)

Genitoüriner (üropati / seksüel disfonksiyon)

Dermatolojik (12).

### **1.2. Diyabetik Nefropati**

#### **1.2.1. Diyabetik Nefropati'nin Tanımı ve Epidemiyolojisi**

Diyabetik nefropati, başka bir renal hastalığı, kalp yetersizliği, üriner sistem enfeksiyonu veya hematürisi olmayan diyabetik bireylerde saptanan kalıcı albüminüri, glomerüler filtrasyon hızında azalma ve kan basıncında yükseklik olarak tanımlanır (13).

Diyabetik nefropati dünyada ve ülkemizde son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. ABD'de düzenli diyaliz

tedavisine giren hastaların % 40'ını DM' a bağlı SDBY oluşturmaktadır. Ülkemizde de Türk Nefroloji Derneği 2005 verilerine göre diyaliz hastaları arasında DM % 25,3 ile SDBY nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır (14).

### **1.2.2. Diyabetik Nefropati'nin Patolojisi**

Diyabetik nefropati patogenezinin hemodinamik faktörler, metabolik faktörler, oksidatif stresler ve renal hipertrofi sorumlu tutulmaktadır. Böbrek hücreleri diyabetik nefropati sürecinde mekanik yüklenme, proteinüri, hiperglisemi, glikozillenmiş proteinler, sitokinler, hormonlar, kemokinler, adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks gibi birçok ekstraselüler sinyaller alırlar (10).

Diyabetik hastaların çoğunda diyabet tanısından en az 10 yıl sonra görülen diyabetik nefropati, Tip 2 diyabetlilere oranla Tip 1 diyabetlilerde daha fazla görülmektedir. Diyabet tanısını takip eden 30 yıl içinde proteinüri görülmeyen hastalarda ise diyabetik glomerüloskleroza nadiren rastlanmaktadır. Diyabetik nefropatili hastalarda hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonlar geç dönemlerde ortaya çıkmakla birlikte mortalite riski daha fazladır (15, 16).

Diyabetik nefropatinin patolojisi, makroskopik ve mikroskopik özelliklere göre ele alınmaktadır (10).

#### **1.2.2.1. Makroskopik Özellikler**

Diyabetin tipi, süresi, hipertansiyon ve infeksiyon varlığına göre böbreklerin morfolojisi değişiklik gösterir. Erken evrelerde böbrekler hipertrofi ve hiperplazi nedeniyle büyüktür. SDBY evresinde Tip 1 diyabetlilerin böbrekleri kontraktedir. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda son dönemlerde bile böbrekler küçülmeyebilir(10).

#### **1.2.2.2. Mikroskopik Özellikler**

Glomerüller, tubuluslar ve damarlar ayrı ayrı incelenir:

**a-Glomerüller:**

**aa-Nodüller interkapiller glomerüloskleroz:** Diyabete özgüdür, nodüller asellülerdir, glomerüllerde birden çok nodül bulunabilir. Genellikle diffüz lezyonlara eşlik eder. Görülme sıklığı % 22-55 arasındadır.

**ab-Diffüz interkapiller glomerüloskleroz:** Tam glomerül yumağı ve glomerüllerin çoğu tutulur. Nodüller formun öncüsüdür. Bu lezyon ile glomerüller

filtrasyon hızı (GFR) azalması, proteinüri ve hipertansiyon arasında bağlantı saptanmıştır.

**ac**-Kapsüler drop lezyonu: Glomerül bazal membran katmanlarındaki eozinofilik bir yığındır. Erken dönem diyabetik nefropati tanısında yardımcıdır.

**ad**-Eksüdatif lezyon: Sık görülür ve fibrin-cap lezyonu olarak adlandırılır. Diyabete özgü değildir. Arterioskleroz ve vaskülitlerle bağlantı gösterir. Heterojen dağılım gösteren eozinofilik ve lipid içeren bir yapıdır.

**b**-Tubuluslar: En özgül değişiklik tubulus epitelindeki glikojen depolanmasıdır (Armani Epstein lezyonu).

**c**-Damarlar: Afferent ve efferent arteriollerde subintimal hyalin birikimi tipiktir (10).

### **1.2.3. Diyabetik Nefropati'nin Klinik Seyri**

Diyabetin erken devresinde, insülin tedavisi başlamadan önce böbrekler büyümüştür. Bu büyüme glomerüler ve tübüler volüm artışına bağlıdır. Glomerül

filtrasyon hızı ve proteinüri özellikle metabolik kontrolün olmadığı zamanlarda fazladır. Proteinüri diyabet nefropatisinin ana göstergesi olan üremi ve erken mortalitenin de habercisidir. Hassas tekniklerle protein artışında erken devrede bozuklukların olduğu gösterilmiştir (17). Bu proteinüri, mikroalbuminüri olarak tanımlanır. Mikroalbuminüri ileride oluşacak böbrek yetmezliğinin habercisidir. Mikroalbuminürinin diyabet nefropatisinin gelişmesindeki rolü anlaşıldıktan ve yine erken devredeki hiperfonksiyon ve hipertrofisi saptandıktan sonra diyabet nefropatisi yeniden sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre;

#### **1.2.3.1. Birinci Devre**

##### **Hipertansiyon ve Hipertrofi Devresi**

Diyabetin tanısı konduğu sırada mevcuttur. Bu devrede böbrekler büyüktür. Glomerüler filtrasyon hızı, renal plazma akımı ve filtrasyon fraksiyonu artmıştır. İdrarda albumin vardır. Arteriyel kan basıncı normaldir. Böbreklerde glomerüler hipertrofi gelişmiştir. Bazal membran ve mezangium normaldir. Bu evrede çeşitli yöntemlerle sıkı glisemi kontrolü sağlanırsa adı geçen patolojiler normale döner (17).

#### **1.2.3.2. İkinci Devre**

##### **Sessiz Devre**

Hastalığın 2-15 yıllık dönemidir. Glomerül filtrasyon hızı normal veya artmış olabilir, aşikar proteinüri yoktur. Yapısal olarak bu dönemde bazal membranda kalınlaşma ve mezengiumda genişleme vardır. Mikroalbüminüri özellikle egzersiz sonrasında mevcut olabilir (17).

### **1.2.3.3. Üçüncü Devre**

Proteinüri Devresi (Başlangıç Nefropati)

Hastalığın 10-20. yıllarında ortaya çıkar. Önce mikroalbüminüri (30-300 mg / 24 saat) tarzında olan proteinüri daha sonra makroalbüminüri (>300 mg / 24 saat) karakterini kazanır. Makroalbüminüri başlangıçta intermittant iken, daha sonra devamlı şekil alır ve glomerüler filtrasyon hızı düşmeye başlar (17).

### **1.2.3.4. Dördüncü Devre**

Azotemik Devre (Aşikar Nefropati)

Glomerüllerde tıkanıklıklar artmıştır. Mezengial genişleme belirgindir. Glomerüler filtrasyon hızı (30-70 ml/dk.) düşmüş, üre ve kreatinin seviyeleri yükselmiştir. Hipertansiyon mutlaka mevcuttur. Çeşitli derecelerde proteinüri vardır (17).

### **1.2.3.5. Beşinci Devre**

Üremik Devre

Son dönemde böbrek yetmezliği sahneye hakimdir. Yaygın glomerüler tıkanıklıklar nedeni ile glomerüler filtrasyon hızı 0-10 ml/dk. düzeyine kadar iner. Belirgin üre ve kreatinin retansiyonu, hipoalbüminemi, yaygın ödem ve ağır hipertansiyon mevcuttur (17).

## **1.3. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, ömrü kısa, düşük molekül ağırlığına sahip etkili moleküller olarak tanımlanır. Birçok olayda serbest radikal birikimi, patolojinin bir parçasıdır ve birçok ksenobiyotik maddenin toksik etkisi, serbest radikal üretimi ile ilişkili bulunmuştur (18, 19). Serbest radikaller kimyasal olarak hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi birçok forma sahiptirler (20). Organizmada serbest radikallerin üretim hızı ile ortadan kaldırılması bir denge halindedir ve bu duruma *oksidatif denge* adı verilmektedir. "*Oksidatif Stres*" olarak adlandırılan durumda; serbest radikal

oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında ciddi dengesizlik oluşmakta, bu durum doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (21).

### **1.3.1. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, diyabet etiolojisinde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Serbest radikaller normal metabolik süreçte vücutta üretilmekte ve çevresel faktörlerle etkileşim içinde bulunmaktadır. Antioksidanların çoğu fizyolojik olarak vücutta serbest radikallerin yol açtığı olumsuz sonuçlara karşı vücudu savunmaktadır (22).

Diabetes Mellitus, günümüz şartlarından dolayı dünyada hızla yayılan, yüksek morbidite ve mortaliteye yol açan bir hastalıktır. Oksidatif stresin diyabetin etiolojisinde rol oynadığı ve diyabetin ilerlemesine yol açtığı, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabeti bulunan olgularda serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir (23).

### **1.3.2. Diyabet ve Oksidatif Stres**

Diyabet ve diyabete bağlı oluşan komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini belirten çalışmalarda; nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizması değişiklikleri sonucu oluşan metabolik stres, sorbitol yol aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu görülen doku hasarının serbest radikal oluşumunu artırdığı vurgulanmaktadır (24).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan özellikteki enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan etkinin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi dokularla karşılaştırıldığında, onlara oranla en düşük seviyede olduğu bilinmektedir (25, 26).

Oksidatif strese karşı en duyarlı yapılardan biri olarak kabul edilen beta hücrelerinde görülen hasarın, hipergliseminin toksik etkileri nedeniyle olduğu düşünülmektedir (27). Hidrojen peroksidin, yüksek reaktivite içeren bir ROS ürünü olarak bilinen OH radikaline dönüşmesi sonrasında insülin reseptör sinyal sistemi üzerine etki gösterdiği ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile ayarlanan sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir görev üstlenebileceği görüşü araştırmacıların görüşleri arasında bulunmaktadır (28). Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt etkisi sonucu olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (29). Endotel ve

düz kas hücreleri yüksek oranda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde serbest radikal oluşumunun başladığı tespit edilmiştir (30, 31). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında bağlantı olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de gösterilmiştir (32).

Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardaki gibi diyabet oluşturmak amacıyla kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin (STZ) (33), oksidan özellikte maddeler oluşturarak Langerhans adacıklarını hasara uğratmakta ve uygun olmayan NO cevaplarına yol açarak diyabeti başlattığı öngörülmektedir (34, 35).

Hiperglisemi aracılığı ile oluşan ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (36).

### **1.3.2.1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi**

Bir geçiş elementi eşliğinde glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna dönüştürülür. Reaksiyonlar serisi, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonlanır. Hücre içi glukozun oksidasyonu NADH'nın Schiff bazları, oluşmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi amacıyla gereken enerjiyi sağlamak için kullanılır. Solunum zincirindeki bu tepkime sırasında süperoksit radikali ortaya çıkar. Yüksek glukoz konsantrasyonunda bu yolla süperoksit radikal üretiminde artış olur. Mitokondri solunum zinciri hücre içindeki ROS üretiminin önemli kaynağıdır. Normal solunum zinciri reaksiyonları esnasında sürekli bir şekilde süperoksit radikali oluştuğu kabul edilmektedir. Son yıllarda ortaya konulan çalışmalar, diyabette görülen patolojilerin, önemli bir kısmının mitokondriyal ROS üretimindeki artış ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (37-39).

### **1.3.2.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri) Oluşumu**

Proteinler artmış glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzime ihtiyaç duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon tepkimelerine yol açar. Glikasyona uğrayan protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali üretimine sebep olur (40). Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında gözlenen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları nedeniyle önce Schiff bazları, sonra Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinden sonra ileri glikasyon son ürünleri AGE oluşur (41).

Yapılan çalışmalar AGE'lerin, reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyardığını, ayrıca artan serbest radikallerin de hücre içindeki AGE oluşumunu artırdığını ortaya koymaktadır (42).

Diyabetik nefropatili sıçanlara AGE inhibitörleri verildiğinde glisemik düzeyde herhangi bir değişiklik görülmeden albüminürinin önlenildiği gösterilmiştir (43).

### **1.3.2.3. Poliöl Yol**

Yüksek glukoz düzeyi, poliöl yolu ile sorbitol oluşumuna sebep olur. Bu yolda bulunan aldoz redüktaz enziminin etkisi için NADPH gerekli olduğundan hücre içi NADPH tüketilir. Oksidasyona uğramış glutatyonun redükte forma dönüştürülebilmesi ve nikrik oksit (NO) üretimi için NADPH gereklidir. Bu yüzden sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'nın olmaması hücrenin antioksidan özelliğinin azalması olarak değerlendirilmektedir (44).

Sorbitol bir doku toksini gibi etki eder. Bu yüzden retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogeneğinde etkili olduğu kabul edilmektedir (45, 46).

### **1.3.3. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanların sınıflandırılması zor bir işlemdir ve birçok faktöre göre değişik şekillerde yapılabilmektedir; yapısal özelliklerine göre (enzimatik, enzimatik olmayan), kaynaklarına göre (endojen, ekzojen), çözünürlük özelliklerine göre (suda çözünenler, yağda çözünenler) ve insan vücudundaki yerleşimlerine göre (intraselüler, ekstraselüler) sınıflandırılırlar (47).

Enzimatik özellikteki antioksidan sistemi süperoksit dizmutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) enzimleridir. Enzimatik özellikte olmayan antioksidanlar askorbik asit (Vitamin C), alfatokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlardır (47).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada benfotiaminin yüksek konsantrasyonlarda böbrek hücrelerinde direk antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir (48).

## **1.4. Apoptozis**

### **1.4.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi**

Fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü şeklinde adlandırılan apoptozis; biyoloji alanında ayrıca temel ve klinik tıp bilimlerinde ilgilenilen bir konudur. Apoptozis birçok gen ile bağlantılı bir sistem olup, Yunanca'da apo (=ayrı) ve ptozis (=düşen) sözcüklerinin birleştirilmesi ile oluşan sonbaharda yaprak dökümü şeklinde tanımlanan bir kelimedir (49).

Programlı hücre ölümünün mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücrelerin genetik olarak hafızalarında olan bu programın çeşitli uyarılarla, patofizyolojik durumlarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktif hale gelmeye başladığı düşünülmektedir (50).

Apoptozisde, hücre ölümü çevreye zarar vermeden oluşsa da; bazı durumlarda apoptozis çevre dokuda nekroza yol açabilir veya tersi olarak nekroz apoptozis oluşmasına yol açabilir (51).

Son zamanlarda, biyokimyasal ve genetik komponentlerin apoptoziste rolü olduğu düşünülmektedir. Bunların ortaya konulmasıyla apoptozis aktivasyonu veya inhibisyonuna yönelik çalışmalar yapılarak; kanser, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır (52).

### **1.4.2. Apoptozisin Regülasyonu**

Apoptozisin düzenlenmesi, nematodlardan insanlara kadar gen kontrol aşaması ile güçlü bir şekilde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile kontrol edilir. Bu aşama genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb.) veya sitokinlerin bulunmaması gibi (eritropoietin vb.) farklı uyarılarla hareketlilik gösterebilir. DNA'nın tek veya çift iplik parçaları ve nükleozit azlığı ve DNA'ya bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlar. Ardından bir dizi olay meydana gelir ve hücre apoptotik yola girer (53).

#### **1.4.2.1. p53'ün Rolü**

İnsanda apoptozisin regülasyonu, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar uzanan bir olaylar zinciridir. Bir tümör süpresör gen olarak görev yapan p53 mutasyona uğradığında veya bulunmadığında hücre yaşamı uzamaktadır. Genotoksik

olaylar sonucu oluşan hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya direkt olarak bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, G1'de hücre siklusunun durmasını sağlayarak onarım için gerekli zamanı kazanır. Diğer bir yönden hasar fazlaysa hücreyi apoptozise sevk eder. Buna ilave olarak p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2 ve Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (53).

#### **1.4.2.2. Bcl-2/Bax**

Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin düzenlenmesinden sorumludur (53, 54). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanında endoplazmik retikulum zarında da mevcuttur ve homodimer ya da heterodimerler olarak kompleks yaparak işlerini görürler (53, 55). Örnek olarak; Bcl-2 ile Bax etkileşiminde Bcl-2'nin fazla miktarda olması halinde hücre yaşamına devam eder. Bax'ın fazla miktarda olması halinde ise hücre ölür (51).

#### **1.4.2.3. Kaspazlar**

Apoptozis mekanizmasında üç temel grup görev almaktadır. Bunlar;

- 1- Ölüm reseptörleri
- 2- Adaptör proteinler
- 3- Proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (55, 56).

Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) gen ailesindedir. Ölüm reseptör polipeptitlerinin stoplazmik kısımları, ölüm alanı (Death Domain) denilen, adaptör proteinlere bağlanan bir aminoasit grubundan oluşur (56).

Reseptörle gelen sinyal sonrasında adaptör proteinler kaspazlara bağlanarak onları aktif hale getirirler. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi aktif hale gelir ve kaspazla aktif hale gelen DNaz (CAD: caspase activated Dnase) aracılı DNA yıkımından sorumludur (56).

Ölüm sinyali salan başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanmak sureti ile ölüme yön verirler. Ancak ölüme gerçekleştirmezler, bu görevi yapacak olanı aktifleştirirler. Ölüme sebep olanlar ise uygulayıcı (effektör) özellikteki kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar; başlatıcı özellikteki kaspazların akışını aktif hale getirirler (56).

### **1.4.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu**

#### **1.4.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi**

Salgısal özellikteki bu apoptotik yol, patojenle infekte olmuş hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev yapmaktadır. Granzim ve Perforinler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve Naturel Killer (NK) hücrelerinde bulunan stoplazmik salgı granülleri içerisindeki proteinlerin en önemlileridir (53).

#### **1.4.3.2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu**

Apoptozisin salgısız mekanizması, hücre zarı üzerinde yer alan “ölüm reseptörlerinin“ aktive olmasıyla bağlantılıdır. Hücre yüzeyinde reseptör olan Fas (CD95), tümör nekroz faktör grubundandır. Fas apoptotik sinyalin uyarıcısıdır ve birçok hücre türünde yer almaktadır. TNF grubunun bir üyesi olarak bilinen Fas ligandı (FasL) ise, sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinde mevcuttur. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması sonrasında apoptotik süreç başlar (53).

#### **1.4.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)**

Apoptozis nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşmasını kapsayan birkaç morfolojik nükleer değişiklikle ortaya çıkmaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve DNA kırılmasına sebep olan gen son zamanlarda bulunmuş, sonra klonlanmış ve AIF adı verilmiştir. AIF, kaspazdan bağımsız olarak DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşması sonucu apoptozisi başlatır (57).

Kanser hücreleri, kanser gelişim ve ilerlemesi aşamasında, hücre ölümü uyarısından kendilerini korumaları sebebiyle apoptozisten kurtulma özelliği kazanırlar. AIF, NADH oksidaz aktivitesi sonucu kolon kanserine sebep olur (58).

#### **1.4.5. Hastalıklarda Apoptozis**

Apoptozis birçok patolojik ve fizyolojik olayda rol almaktadır. Fizyolojik olaylar olarak hücre yapımı ve yıkımı olarak kabul edilmektedir. Deri, barsak epiteli ve kan hücreleri gibi hücre yapım ve yıkım hızının fazla olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozis sonucu ortamdaki ayrıştırılarak yeni hücrelerin üretimi sağlanır. Patolojik kabul edilebilecek durumlarda ise, tümörlerde hem küçülme hem de büyüme sürecinde görev alır. Apoptozis; dokularda hormonal patolojik atrofi,

otoimmün hastalıklar, kalp hastalıklarının bir kısmı, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi olaylarda rol alır (52, 59-62).

#### **1.4.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler**

Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler Tablo-1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler (63)

---

Morfolojik Yöntemler
İmmünohistokimyasal Yöntemler
İmmünolojik Yöntemler
Moleküler Biyolojik Yöntemler

---

##### **1.4.6.1. TUNEL (TdT-mediated nick and labeling technique) Yöntemi**

Apoptotik sinyal döngüsünde DNA kırıklarının tespit edilmesinde, Tunel yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (64). Apoptozisde sonlandırıcı proteinler aktif hale geldikten sonra çekirdek ve sitoplazmada yer alan proteinleri yıkarlar (65). Bu proteinlerden biri DNA endonükleaz ile bağ oluşturan proteindir. Kaspazlar bu proteini etkisiz hale getirerek endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine yerleşen Ca – Mg bağımlı endonükleaz, DNA kırıklarına yol açar (66). Bu yöntemde ortaya çıkan DNA kırık uçlarının, kimyasal olarak spesifik uçlar olması prensibinden yararlanılmaktadır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalandıklarından kromatin ağ bütünlüğü kaybolur ve 3' – OH taşıyan DNA parçacıklarının sayısı artar (66). Hücrede terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortamdaki biotin-dUTP'yi parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3' – OH uçlarına getirir (65, 67). Biotin ile işaretlenen DNA parçacıkları avidin ilave edildiğinde görünür duruma gelirler (66).

#### **1.5. Benfotiamin**

Benfotiamin vitamin B1'in yağda çözünen şeklidir (68). Benfotiamin yüksek glikoz düzeyinin zararlarına karşı koruyucu role sahiptir (69). Reaktif oksijen ürünleri üzerinde benfotiaminin baskılayıcı özellikte olduğunu gösteren çalışmalar vardır (70, 71). Redükte olmuş glutatyon; hücre içerisinde oksidan ajanların etkisini azaltarak hücrenin etkili proteinlerini oksidasyona karşı korur, antioksidan özellik gösterir. Bu esnada glutatyon oksitlenir. Bu glutatyonun görevini yerine getirebilmesi

için tekrar redükte olması gerekmektedir. Bu amaçla NADPH'lar kullanılır. NADPH için Pentoz fosfat yolu önemlidir ve tiamin de bu yola etki ettiği için bir antioksidan olarak kabul edilebilir (69, 72). Yüksek glikoz düzeyine bağlı oluşan apoptozis benfotiamin tarafından önlenir (73). Diyabetik sıçanlarda benfotiaminin çok sayıda oksijen türünü normale getirdiği belirlenmiştir (74). Ayrıca Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan farelerde oksidatif zararlı etkileri azalttığı gösterilmiştir (75).

### **1.6. C Vitamini**

Vitamin C, diğer bir deyişle askorbik asit, suda çözünen vitaminlerdendir. Askorbik asit kokusuz, beyaz katı kıvamda olup kimyasal formülü  $C_6H_8O_6$  şeklindedir (76).

Birçok yiyecek iyi dengelenmiş Vitamin C içermektedir. C vitamininin en iyi kaynaklarının turunçgiller ve suları olduğu iyi bilinmektedir. Meyvelerden portakal, limon, şeftali, çilek, muz ve greylift yüksek C vitamini içermektedir (77).

Vitamin C antioksidan savunma sisteminde ve apoptozisde merkezi rol oynar (78, 79). Genel olarak metal iyonlarla katalize edilen reaksiyonların yokluğunda Vitamin C en önemli plazma antioksidanıdır. Bu yüzden Vitamin C in vitro antioksidan deneylerinde antioksidan seçenek olarak kullanılır (80). Yapılan deneysel diyabetik çalışmalarda Vitamin C'nin kan glukoz düzeyini değıştirmeden böbrek dokusunda iyileştirici etkileri görülmüştür (81).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile beraber Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Çalışmanın yapılabilmesi için gerekli olan etik onay Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alındı.

### 2.1 Deney Hayvanları

Deneysel hayvanlarda en az 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Bu sıçanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (FÜDAM) Hayvan Laboratuvarı'nda sıcaklığı 22-25 derece arasında olan bir ortamda tutuldu ve deney hayvanları 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlık ortamda takip edildi. Deney hayvanları havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel hazırlanmış ve her gün alttan temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu şeklinde verildi. Sıçanlar Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler şeklindeki sıçan yemleriyle beslendi. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo-2'de gösterilmiştir. Deney hayvanlarının deneysel uygulama yapılincaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

**Tablo 2.** Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşenleri

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. Diyabet İndüksiyonu**

Diyabet oluşturulması planlanan 21 adet sıçanda bu amaçla 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 mg/kg dozunda STZ (Streptozotosin Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal yolla 0,4 ml (0,1M) sodyum sitrat tamponu içinde (pH: 4,5) çözdürülerek intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle tek doz olacak şekilde uygulandı. Yetmiş iki saat sonra sıçanların kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazında ölçüm yapılarak açlık kan glukozu 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçüm işlemi Clever Chek, TD-4222 ile yapıldı. Sıçanların açlık kan glukoz seviyelerini belirlemek için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 09.00-10.00 civarında alındı.

## **2.3 Deney Gruplarının Oluşturulması**

Hayvan çalışmaları, toplam 28 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. İlk ağırlık ölçümleri yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Sıçanlar; kontrol (grup-1), diyabetik (grup-2), diyabet+Vitamin C (grup-3) ve diyabet+Benfotiamin (grup-4) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

### **2.3.1. Birinci Grup: (n= 7) Kontrol Grubu**

Altı haftalık çalışma süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda kan glukoz düzeyleri düzenli olarak kaydedildi.

### **2.3.2. İkinci Grup: (n=7) Diyabet Grubu**

50 mg/kg dozunda sodyum-sitrat tamponu içinde çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilerek 72 saat sonra kuyruk veninden ölçülen kan şekeri seviyesi 250 mg/dl'yi geçenler diyabetik olarak kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda kan glukoz seviyeleri düzenli olarak kaydedildi.

### **2.3.3. Üçüncü Grup: (n=7) Diyabet + Vitamin C Grubu**

50 mg/kg dozunda sodyum-sitrat tamponu içinde çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilerek 72 saat sonra kuyruk veninden ölçülen kan şekeri seviyesi 250 mg/dl'yi geçen bu hayvanlara diyabet oluşumu itibarı ile 6 hafta boyunca vitamin C (900 mg/kg/gün Redoxon efervesan tablet, 1000 mg, 10 adet, Roche) oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda kan glukoz düzeyleri düzenli olarak kaydedildi.

#### **2.3.4. Dördüncü Grup: (n=7) Diyabet + Benfotiamin Grubu**

50 mg/kg dozunda sodyum-sitrat tamponu içinde çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilerek 72 saat sonra kuyruk veninden ölçülen kan şekeri seviyesi 250 mg/dl'yi geçen bu hayvanlara diyabet oluşumu itibarı ile 6 hafta boyunca Benfotiamin (70 mg/kg/gün, Sigma, B9636 S-Benzoylthiamine O-monophosphate [Benfotiamine] Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, USA.) oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda kan glukoz düzeyleri düzenli olarak kaydedildi.

#### **2.4. Örneklerin Alınması**

Bütün gruptaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p. uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların böbrek dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan böbrek dokuları histolojik çalışma için boin solüsyonunda tespit edildi. Böbrek dokuları yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartıldı.

#### **2.5. Biyokimyasal Çalışma**

##### **2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri**

Deneysel çalışma boyunca kan glukoz düzeyleri glukometre (Clever Chek, TD-4222) ile ölçüldü.

#### **2.6. Histolojik Çalışma**

Bütün gruptan alınan böbrek dokuları, boin solüsyonunda 24 saat boyunca tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkandı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular ardından rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo-3). Daha sonra böbrek dokuları parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklar içinden 5-6 Mm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen – Eozin (H&E) yöntemiyle boyandı. Elde edilen preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenip fotoğraflandı.

**Tablo 3.** Histolojik takip serileri

<b>SIRA</b>	<b>İŞLEM</b>	<b>SÜRESİ</b>
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	

### **2.7. TUNEL Metodu**

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında olacak şekilde elde edilen kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptozise uğrayan hücreler belirlendi. Boyama işlemi aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** TUNEL boyama işlemi

İŞLEM	SÜRE
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS*	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme ) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml ) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB** Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	.....

\*-PBS (Phospate Buffered Saline)

\*\* -DAB (3,3'-diaminobenzidine).

Elde edilen preparatlar araştırma mikroskobunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyama işleminin değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanan çekirdekler normal, kahverengi nükleer şeklinde boyanan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 5).

**Tablo 5.** TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Çok az
+2	Az
+3	Orta
+4	Şiddetli

## 2.8. 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+BENFO ve DM+VİT C 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+BENFO ( $p<0.05$ ) ve DM+VİT C ( $p<0.05$ ) gruplarının ağırlıkları karşılaştırıldığında final ağırlıkları arasında anlamlı fark bulunmuştur.

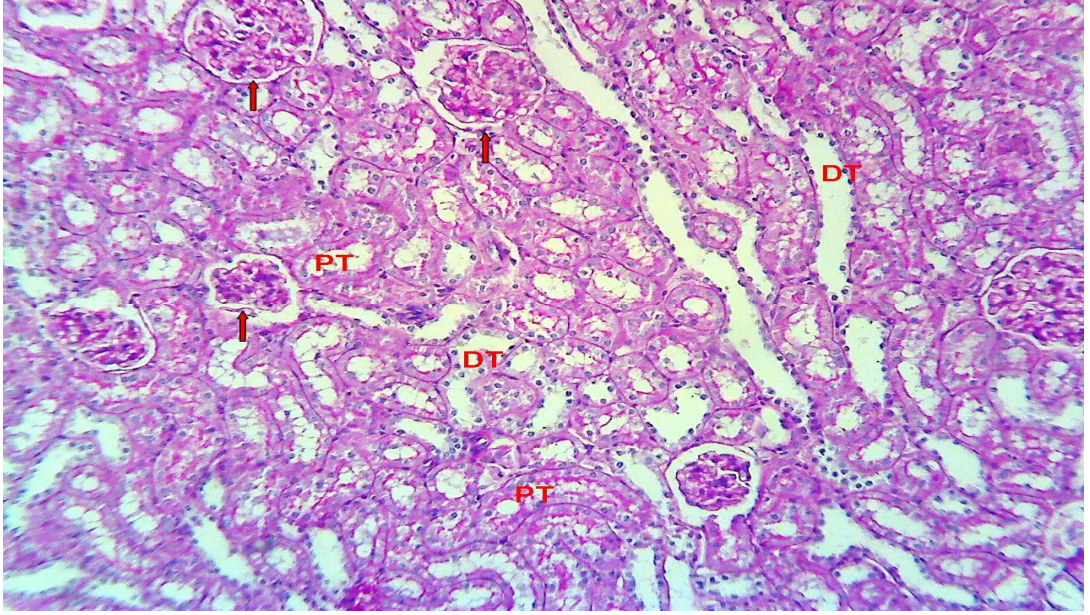
DM, DM+BENFO ve DM+VİT C grupları arasında başlangıç ve final kan şekeri değerleri arasında anlamlı artış olduğu bulunmuştur (her biri için  $p<0.05$ ). Kontrol grubuna göre; DM ( $p<0.05$ ), DM+BENFO ( $p<0.05$ ) ve DM+VİT C ( $p<0.05$ ) gruplarının kan şekeri ölçüm değerleri karşılaştırıldığında, final kan şekeri ölçüm değerleri arasında anlamlı artış olduğu bulunmuştur. Tüm bu parametreler Tablo 6' da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** STZ ile deneysel DM oluştuğu andaki başlangıç ve 4 hafta sonraki final ağırlık ve kan şekeri ölçüm değerleri

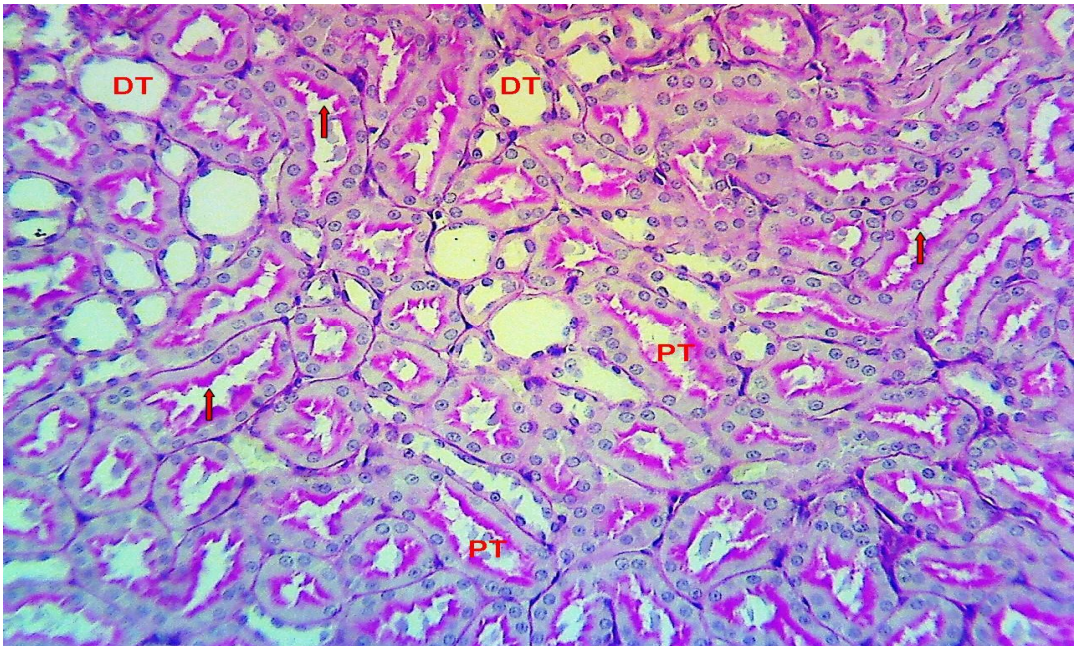
	<b>Başlangıç Ağırlık (gr)</b>	<b>Final Ağırlık (gr)</b>	<b>Başlangıç Kan şekeri (mg/dl)</b>	<b>Final Kan şekeri (mg/dl)</b>
<b>Kontrol</b>	220 ± 6,85	267 ± 7,39 <sup>a</sup>	107,33 ± 5,99	110,83 ± 6068
<b>DM</b>	221,33± 5,85	198,16 ± 4,16 <sup>ab</sup>	392,83 ± 34,01	399,16 ± 34,16 <sup>ab</sup>
<b>DM+Benfo</b>	231,33 ± 3,72	207,50± 5,54 <sup>ab</sup>	120,50 ± 10,18	402 ± 47,71 <sup>ab</sup>
<b>DM+vit C</b>	231 ± 9,11	208,33 ± 8,71 <sup>ab</sup>	115,16± 10,09	402,50 ± 46,32 <sup>ab</sup>

Veriler Ortalama ±Standart Hata (SH) olarak ifade edilmiştir.  $P<0,05$  anlamlı kabul edildi. <sup>a</sup>, grup içi ilk değere göre; <sup>b</sup>, aynı zaman noktasında kontrol grubuna göre.

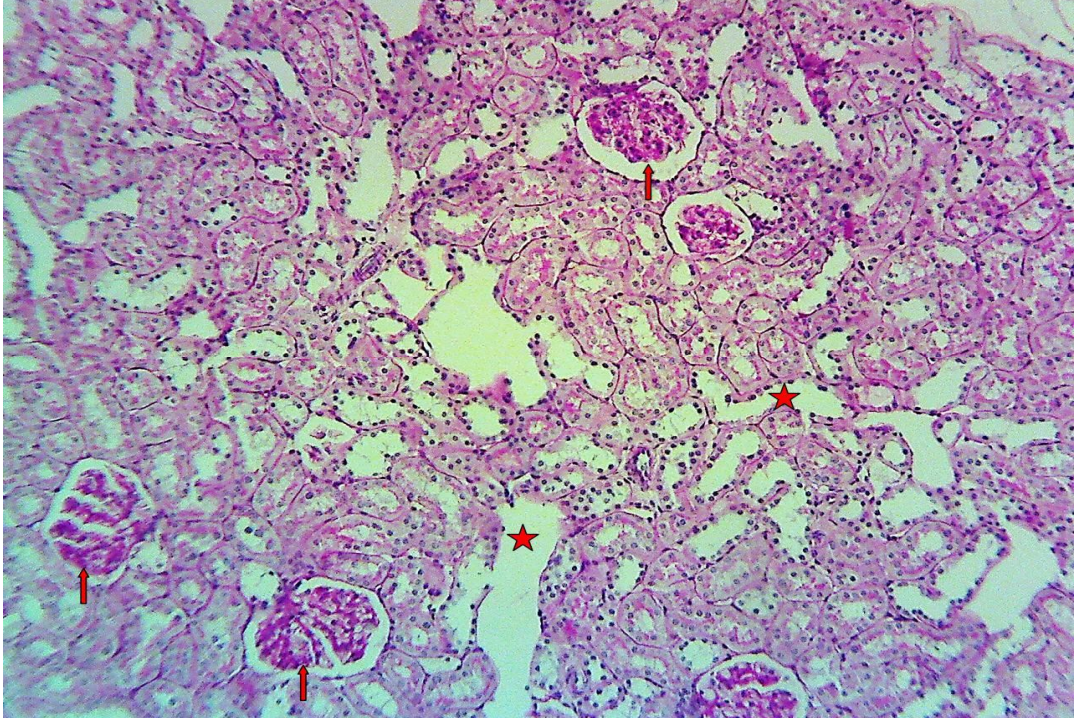
### 3.2. Histolojik Bulgular



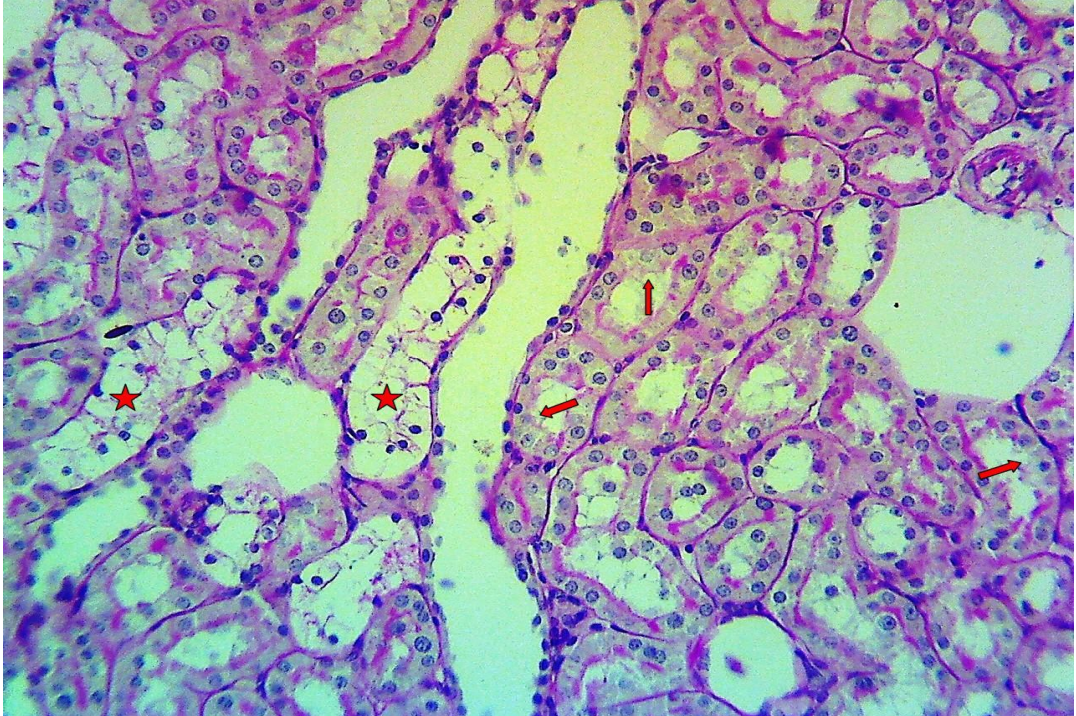
**Şekil 1.** Kontrol grubunda normal böbrek histolojisi. Glomerül (→), Proksimal tübül (PT), Distal tübül (DT). PAS X 100.



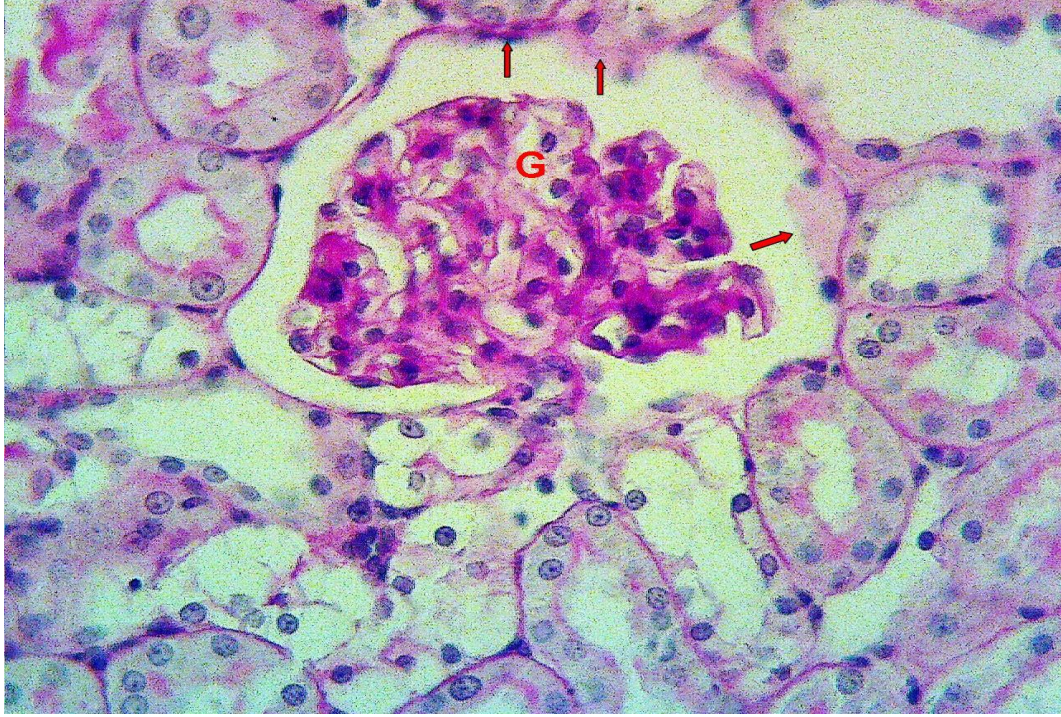
**Şekil 2.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitelleri ve firçamsı kenarın (→) normal görünümü. Proksimal tübül (PT), Distal tübül (DT). PAS X 200.



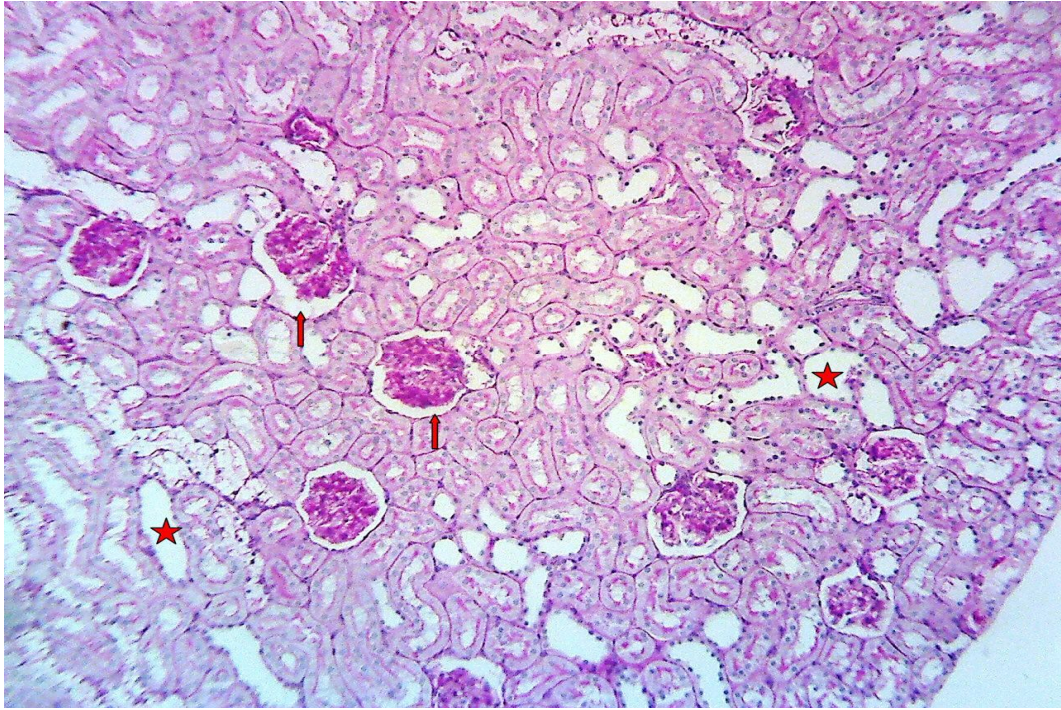
**Şekil 3.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100.



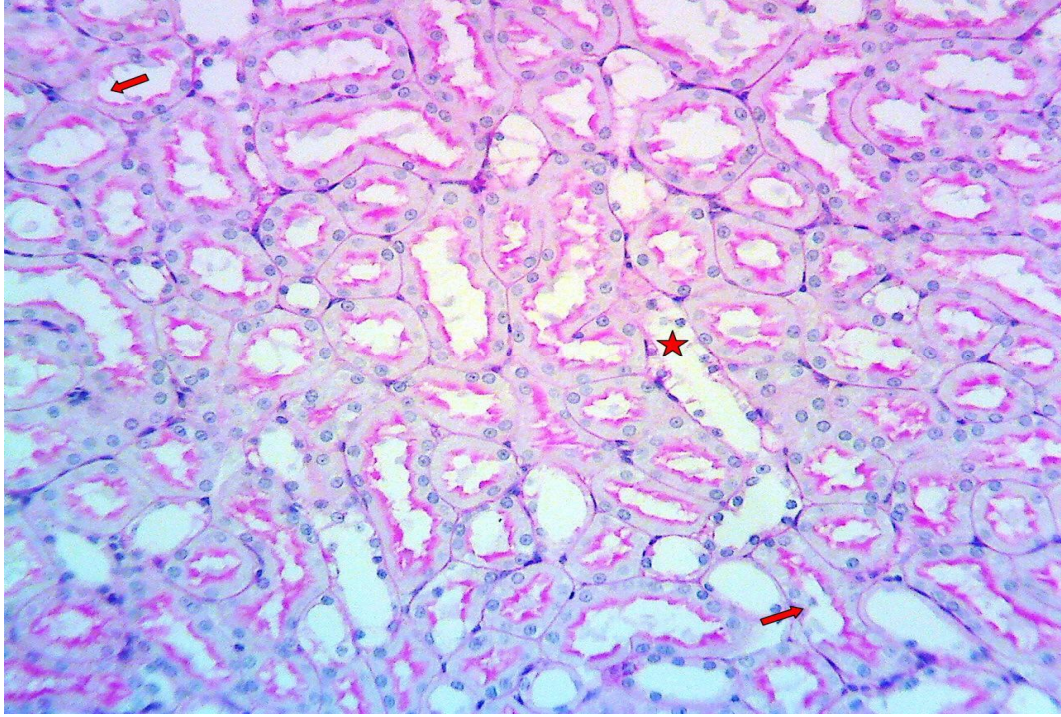
**Şekil 4.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200.



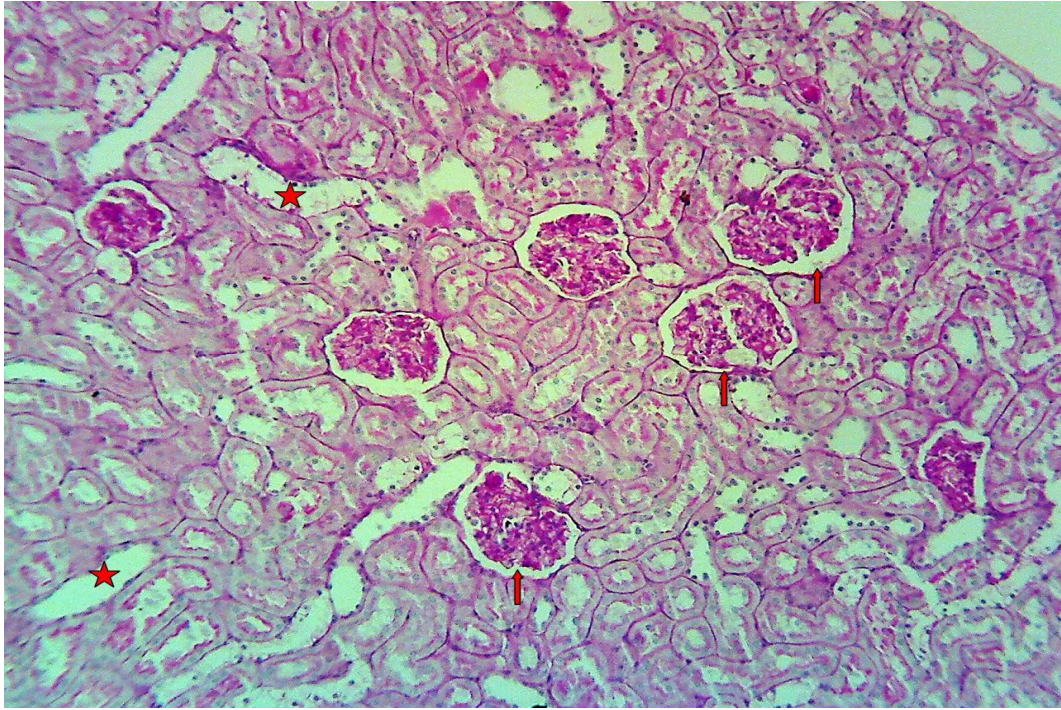
**Şekil 5.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda bir glomerülde (G) Bowman kapsülünün pariyetal yaprağında kalınlaşma (→). PAS X 200.



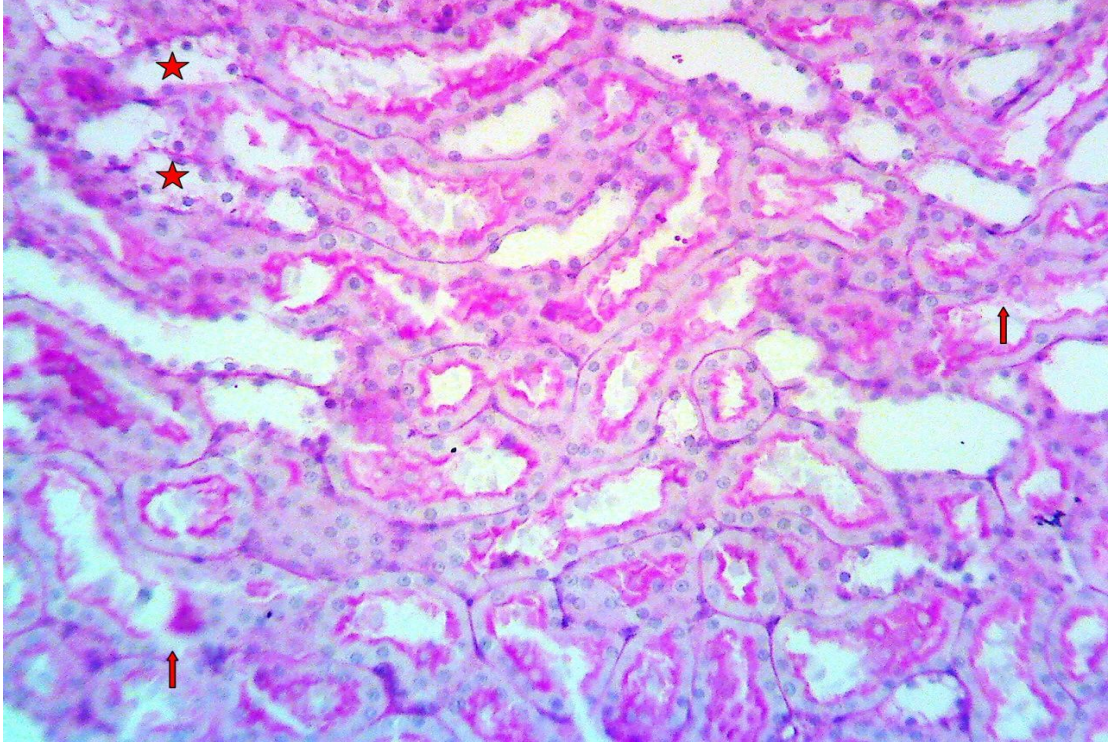
**Şekil 6.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100.



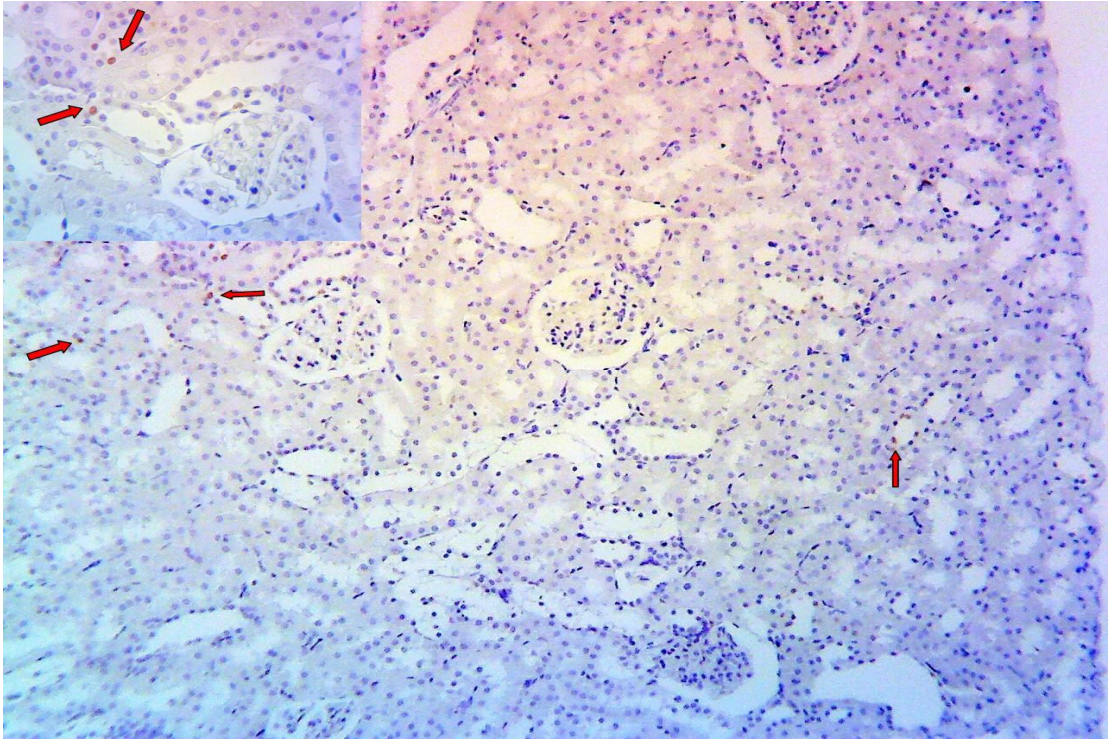
**Şekil 7.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200.



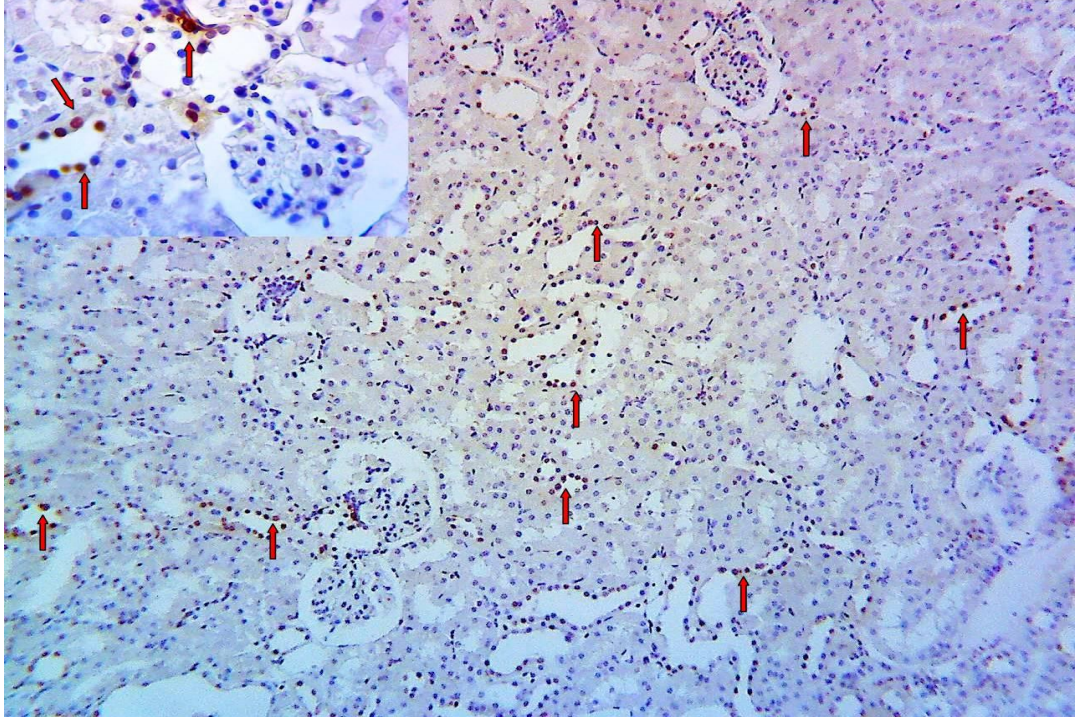
**Şekil 8.** Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda glomerüllerde mezengial matriks artışı ve hipertrofi (→), tübüler dilatasyon (\*). PAS X 100.



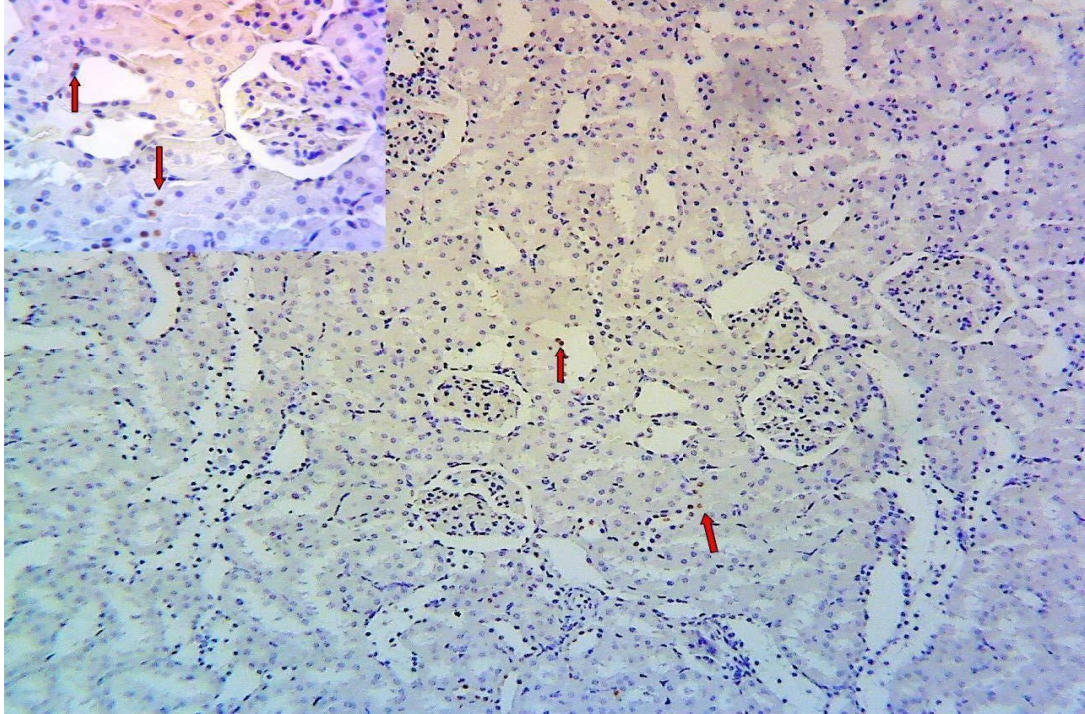
**Şekil 9.** Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda tübül epitelinde ayrılma ve bozulmalar (→), glukojenik vakuolizasyonu (\*). PAS X 200.



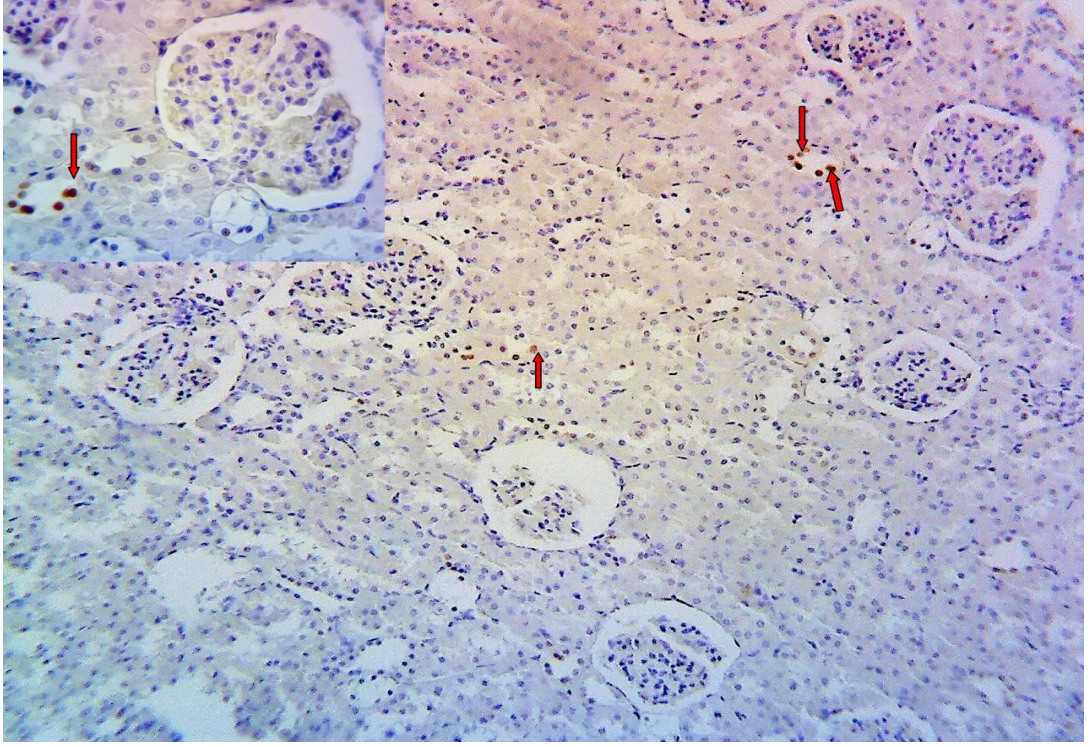
**Şekil 10.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100.



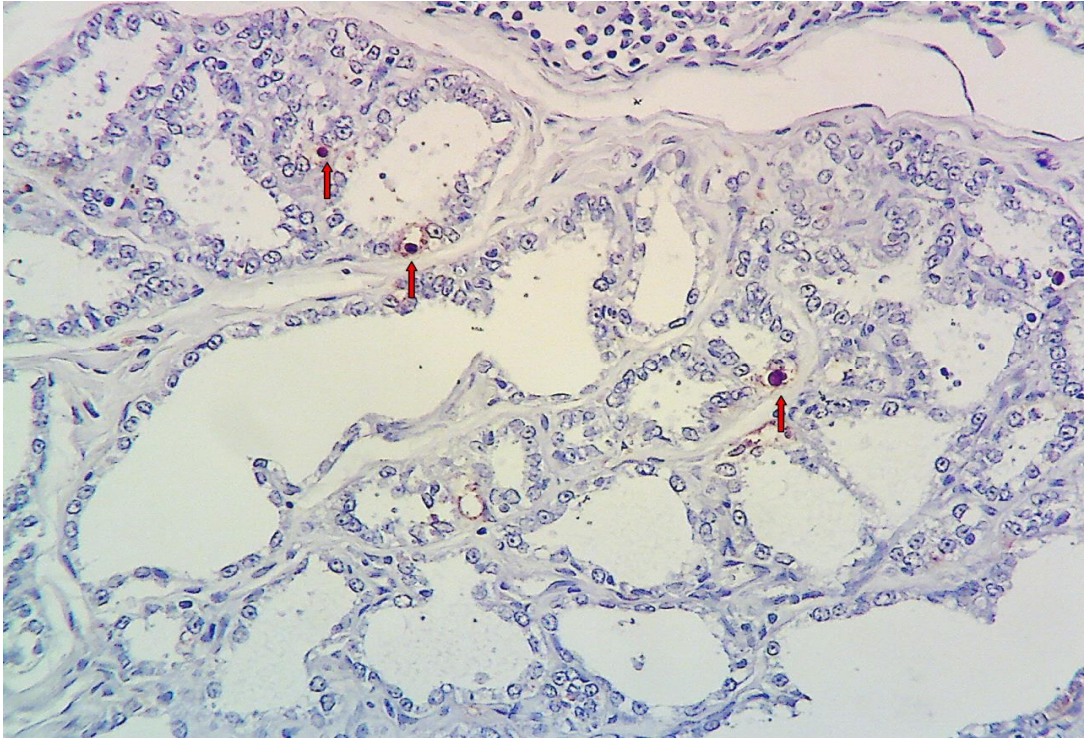
**Şekil 11.** Diyabetik gruba ait böbrek dokusunda +4 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100.



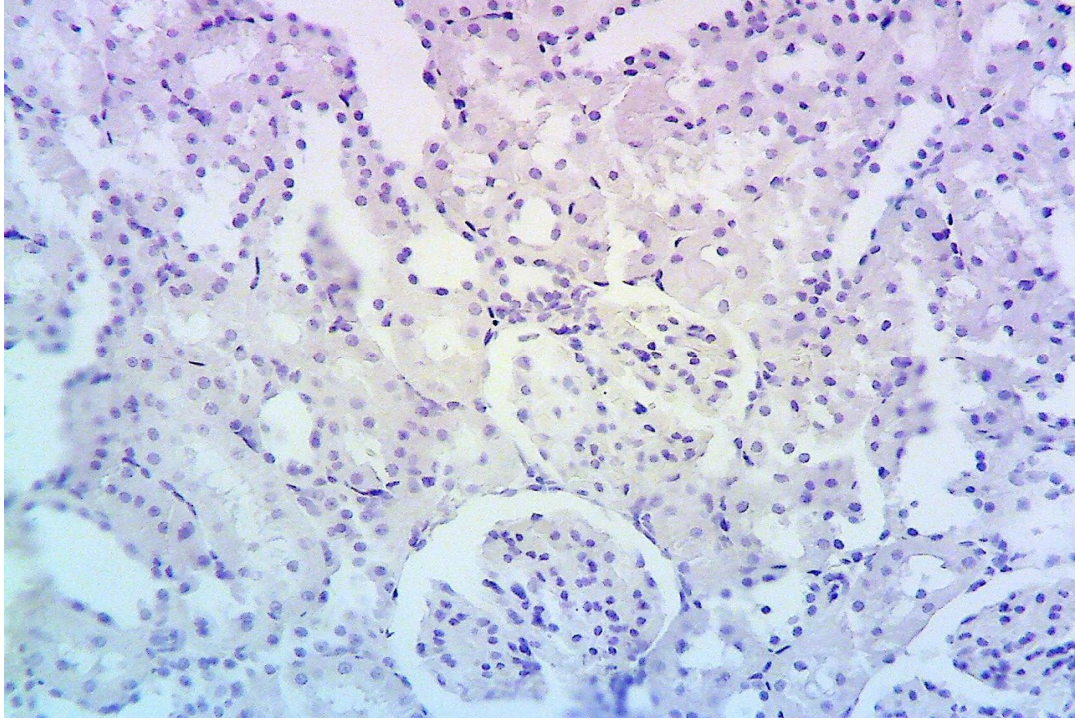
**Şekil 12.** Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100.



**Şekil 13.** Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler (→) X 100.



**Şekil 14.** TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu. X 200



**Şekil 15.** TUNEL negatif kontrol. X 200

Işık mikroskobu incelemelerinde kontrol grubuna ait böbrek dokularında, glomerül ve tübül yapıları normal olarak izlendi (Şekil 1, 2).

Diyabet grubuna ait böbrek dokularında kortekste glomerüllerde hipertrofi, mezangial matriks artışı belirgin olarak görüldü (Şekil 3). Tübüllerde ise dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar ile glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görünümlü tübüller (Armani-Ebstein lezyonları) gözlemlendi (Şekil 3, 4). Ayrıca bazı glomerüllerde Bowman kapsülünün pariyetal yaprağındaki kalınlaşma belirgin olarak izlendi (Şekil 5).

Benfotiamin grubuna ait böbrek dokularında glomerüllerde mezangial matriks artışı ve hipertrofi gözlenmesine rağmen, diyabetik grupla karşılaştırıldığında daha az belirgin olarak izlendi (Şekil 4-6). Benfotiamin grubuna ait böbrek dokusu tübüllerinde ise tübül dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar ile glukojenik vakuolizasyonun diyabetik grupla karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 3, 4, 6, 7).

Vitamin C grubuna ait böbrek dokularında glomerüllerde diyabetik gruptakine benzer bir şekilde belirgin mezangial matriks artışı ve glomerüler hipertrofi gözlemlendi (Şekil 4, 8). Vitamin C grubuna ait böbrek dokusunda tübüllerde

ise diyabetik grupla karşılaştırıldığında daha az belirgin oranda tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılmalar ve glukojenik vakuolizasyon izlendi. Ancak bu düzelme Benfotiamin grubu ile karşılaştırıldığında daha az belirgindi (Şekil 3,4,6,7,8,9).

### **3.3. TUNEL Bulgular**

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol grubunda +1 yaygınlığında gözlendi (Şekil 10). Kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik grupta belirgin olarak artmış TUNEL pozitifliği dikkati çekti ve +4 olarak değerlendirildi (Şekil 10, 11). Benfotiamin ve Vitamin C gruplarında ise TUNEL pozitifliği diyabetik gruba göre anlamlı olarak azalmış olup kontrol grubuna benzerdi ve +1 olarak değerlendirildi (Şekil 10-13).

#### 4. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hipoglisemi ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. Diyabetteki kronik hiperglisemi özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları gibi bazı organlarda uzun dönemde hasar, disfonksiyon ve yetmezliğe neden olmaktadır (9).

Diyabetin başta gelen hedefi böbreklerdir ve böbrek yetmezliği bu hastalığa bağlı ölümün nedenleri arasında myokardiyal enfarktüstten sonra ikinci sırada gelmektedir (82).

Diyabetik nefropati dünyada ve ülkemizde son dönem böbrek yetersizliği nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır (14).

Diyabetik nefropatide en önemli glomerüler lezyonlar, kapiller bazal membran kalınlaşmaları, diffüz glomerüloskleroz ve nodüler glomerülosklerozdur (Kimmelstiel – Wilson lezyonu).

Diffüz glomerüloskleroz, mezengial hücre proliferasyonu ve beraberinde mezengial matrikste diffüz artış olarak tanımlanabilir ve her zaman bazal membran kalınlaşması ile ilişkilidir (82).

Oksidatif stres; vücuttaki oksidanlar ile antioksidanlar arasında bulunan dengenin oksidanlar yönünde değişmesi sonucu oluşan birtakım moleküler değişikliklerin tanımıdır (83, 84).

Son dönem böbrek yetmezliğinde pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasında bulunan denge oksidatif stresin artması yönüne kaymıştır. Bu yüzden son zamanlarda son dönem böbrek yetmezliği hastalarında oksidatif stres ve antioksidanlarla ilgili çalışmalar önem arz etmektedir (85).

DeneySEL olarak diyabet yapılan sıçanlarda ve diyabet hastalarında oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığı ve oksidatif stresin diyabetin etiyolojisinde ve ilerlemesinde önemli olduğu bildirilmiştir (23).

Benfotiamin vitamin B1'in yağda çözünen şeklidir (68). Benfotiamin yüksek glukoz düzeyinin zararlarına karşı koruyucu role sahiptir (69). Reaktif oksijen ürünleri üzerinde benfotiaminin baskılayıcı özellikte olduğunu gösteren çalışmalar vardır (70, 71). Redükte olmuş glutatyon; hücre içerisinde oksidan ajanların etkisini azaltarak hücrenin etkili proteinlerini oksidasyona karşı korur, antioksidan özellik

gösterir. Bu esnada glutatyon oksitlenir. Bu glutatyonun görevini yerine getirebilmesi için tekrar redükte olması gerekmektedir. Bu amaçla NADPH'lar kullanılır. NADPH için pentoz fosfat yolu önemlidir ve tiamin de bu yola etki ettiği için bir antioksidan olarak kabul edilebilir (69, 72). Yüksek glukoz düzeyine bağlı oluşan apoptozis benfotiamin tarafından önlenabilir (73). Diyabetik sıçanlarda benfotiaminin çok sayıda oksijen türünü normale getirdiği belirlenmiştir (74). Ayrıca streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan farelerde oksidatif zararlı etkileri azalttığı gösterilmiştir (75).

Vitamin C antioksidan savunma sisteminde ve apoptozisde merkezi rol oynar (78, 79). Genel olarak metal iyonlarla katalize edilen reaksiyonların yokluğunda vitamin C en önemli plazma antioksidanıdır. Bu yüzden vitamin C in vitro antioksidan deneylerde antioksidan seçenek olarak kullanılır (80). Yapılan deneysel diyabetik çalışmalarda vitamin C'nin kan glukoz düzeyini değiştirmeden böbrek dokusunda iyileştirici etkileri görülmüştür (81).

Bu çalışmamızda diyabetik sıçan böbrek dokusunda antioksidan etkileri bilinen benfotiamin ve vitamin C'nin iyileştirici etkilerinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda DM grubu sıçanların böbrek dokularında PAS boyaması sonucu glomerüllerde hipertrofi ve mezengial matriks artışı belirgin olarak görüldü. Tübüllerde dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar ile glukojenik vakuolizasyonu gösteren şeffaf görümlü tübüller (Armani-Ebstein lezyonları) gözlemlendi. Ayrıca bazı glomerüllerde Bowman kapsülünün pariyetal yaprağında belirgin kalınlaşma izlendi. Doğan (86) STZ ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların böbrek dokularında çalışmamızdaki sonuçlara benzer bulgular elde etmiştir.

Koya ve ark. (87) ayrıca Finkel ve Holbrook (88) yaptıkları deneysel diyabet modelinde, renal kortekste malondialdehit (MDA) artması, glomerülde 8-OHdG (nükleik asit oksidasyonunun artmasını belirten index) artışı, renal kortekste glutatyonun azalması ve glomerülde ROS'ların üretiminin artışı, NADPH oksidaz ve Hem-oksijenaz-1 aktivitelerinin artışı, renal oksidatif stresin artışının kanıtı olarak belirlemişlerdir. Bu değişikliklerin diyabetik hayvanların antioksidanlarla tedavi edilmesi sonucu tamamen baskılandığını göstermişlerdir (87, 88).

Çalışmamızda benfotiamin verilen sıçanların böbrek dokularında mezengial matriks artışı ve hipertrofi gözlenmesine rağmen, diyabetik grupla karşılaştırıldığında daha az belirgin olarak izlendi. Böbrek dokusu tübüllerinde ise tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılma ve bozulmalar ile glukojenik vakuolizasyonun diyabetik grupla karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı gözlemlendi.

Balakumar ve ark. (89) yaptıkları çalışmada deneysel diyabet modelinde benfotiamin veya fenofibrat veya lisinopril kullanımının glomerüllerdeki diyabet kökenli patolojik değişiklikleri azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, benfotiamin ve fenofibratın eş zamanlı kullanımının iki ilaçtan birinin tek başına veya lisinopril tedavisi alımıyla kıyaslandığında, glomerüller kapiller boyutu düzelterek ve mezengial genişlemeleri azaltarak patolojik değişiklikleri belirgin olarak azalttığını göstermişlerdir. Bu bulgular bizim çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyumlu idi. Biz de bu durumun benfotiaminin antioksidan özelliğinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda vitamin C verilen sıçanların böbrek dokularında glomerüllerde diyabetik gruptakine benzer şekilde belirgin mezengial matriks artışı ve glomerüler hipertrofi gözlemlendi. Yine bu sıçanların böbrek dokusunda tübüllerde ise diyabetik grupla karşılaştırıldığında daha az belirgin oranda tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde ayrılmalar ve glukojenik vakuolizasyon izlendi. Ancak bu düzelme benfotiamin grubu ile kıyaslandığında daha az belirgindi.

Lee ve ark. (81) yaptıkları çalışmada diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre daha fazla glomerüler genişleme, skleroz ve tübülointerstisyel fibrozis tespit etmişlerdir. Vitamin C verilen sıçanlarda ise etkili bir şekilde diyabete bağlı glomerüler ve tübülointerstisyel lezyonların azaldığını tespit etmişlerdir.

Biz de vitamin C verilen sıçanlarda görülen bu düzelmelerin vitamin C'nin antioksidan özelliğine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Oksidatif strese kalsiyum düzeyleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişmektedir. Bu değişiklik mitokondrielerde ve DNA'da hasara sebep olarak hücreyi apoptozise götürür (90).

Hücrenin hasara uğraması ve apoptozise gitmesi esnasında mitokondri membran potansiyelinde oksidatif stresin katıldığı bazı değişiklikler olur. Bu değişiklikler sonrasında sitokrom c, sitozole salınır. Sitokrom c'nin sitozole

salınması Bcl-2 ailesinin apoptozisi engelleyici üyeleri (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Bu esnada Bcl-2'nin pro apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) sitokrom c salınmasını artırmak için çalışırlar. Hücrenin ölmesi ile yaşaması bu dengeyle bağlantılıdır. Bu proteinlerden proapoptotik olanların artışı hücreyi ölüme sürükler (91-96).

Zhang ve ark.'nın (97) yaptıkları çalışmada hiperglisemide serbest radikal üretimindeki artışın diyabet komplikasyonlarının gelişiminde rol aldığını, diyabetik böbrekte oksidatif stres artışının apoptozise yol açtığını ve apoptozisin diyabetik nefropati gelişiminde etkili olabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL yöntemi ile boyanan preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; böbrekte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda apoptotik hücrelerde anlamlı bir artış vardı. DM+Benfotiamin ile DM+Vit.C grubunda ise DM grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücrelerde anlamlı bir azalma vardı. Bu da muhtemelen benfotiamin ve vitamin C'nin antioksidan özelliklerine bağlı olarak oksidatif strese azalmaya yol açarak apoptozisi engellemesine bağlı olabilir. Balakumar ve ark.'nın (89) yaptıkları çalışmada deneysel diyabet modelinde benfotiaminin glomerüler kapiller boyutu düzelterek ve mezengial genişlemeleri azaltarak patolojik değişiklikleri belirgin olarak azalttığını göstermeleri bizim çalışmamızla benzer özellikler taşımaktadır. Yine Lee ve ark.'nın (81) yaptıkları çalışmada vitamin C verilen diyabetik sıçanlarda etkili bir şekilde diyabete bağlı glomerüler ve tübülointerstisyel lezyonların azaldığını tesbit etmeleri bizim çalışmamızla benzer özellikler taşımaktadır.

Sonuç olarak; DM'nin yol açtığı hücresel hasara bağlı olarak gelişen böbrek fonksiyon bozukluklarına karşı benfotiamin ve vitamin C'nin koruyucu etkilerinin olmasının ortaya konulması, diyabetin komplikasyonları yönünden değerlendirildiğinde önemli bir bakış açısı kazandırabilecektir. Gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla diyabette benfotiamin ve vitamin C ile ilgili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla yeni tedavi yaklaşımları da ortaya konabilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Yenigün M, Altuntaş Y, Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2001: 51-67.
2. O' Connor AS, Schelling JK. Diabetes and the kidney. Am J Kidney Dis 2005; 46: 766-73.
3. Shaw KM: Macrovascular disease in diabetes. Shaw KM (ed). Diabetic complications. John Willey & Sons. Chichester, England 1996; 179-205.
4. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 1991; 40: 405-412.
5. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radicals. Br Med Bull 1993; 49: 643-652.
6. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioksidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol Cell Biochem 1998; 84: 223-231.
7. Konukoğlu D, Akçay T, Dinçer Y, Hatemi H. The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type 2 diabetic patients with angiopathy. Metabolism 1999; 48: 1481-1484.
8. Opera EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. R Soc Health 2002; 122: 28-34.
9. Arslan M. Diabetes Mellitusta Tanı ve Sınıflandırma. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editors). 2. Baskı, 2003; 2279-2282.
10. Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006; 275-427.
11. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2011 34 Suppl 1: 62-69.
12. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Harrison. İç Hastalıkları Prensipleri, Sağlıkker Y (Çeviren). s.2109-2137, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.

13. Karşıdağ K. Diyabetin kronik komplikasyonları. Büyüköztürk K (editors). İç Hastalıkları. Birinci Baskı, Medical Network & Nobel, 2007; 551-564.
14. Erek E. Türkiye’de Nefroloji – Diyaliz ve Transplantasyon. İstanbul: Türk Nefroloji Derneği Yayınları. 2006; 5-7.
15. Deckert T, Paulsen E, Larsen M. Prognosis of diabetics onset before the age of thirty-one. Survival, causes of death, and complications. *Diabetologia* 1978; 14: 363-337.
16. Fabre J, Balant LP, Dayer PG, Fox HM, Vernet AT. The kidney in maturity onset diabetes mellitus: clinical study of 510 patients. *Kidney Int* 1982-1983; 21: 730-738.
17. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik, 1. Baskı: 1996; 359-529.
18. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zfariet K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp Biochem Physiol C* 2003; 135: 331-336.
19. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004; 10: 141-147.
20. Cochran CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 92: 235-305.
21. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Rep* 2004; 9: 145-152.
22. Birrel AM, Heffeman SJ, Ansellin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, Yue DK. Functional and structural abnormalities in the nerves of type 1 diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.
23. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992; 50: 335-339.
24. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.

25. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733-1740.
26. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S, Complementary action of antioxidant enzyme in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5f cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 1998; 47: 1578-1585.
27. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 119-124.
28. Houslay MD. 'Crosstalks': a pivotal role protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* 1991; 195: 9-27.
29. Giugliano I, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
30. Rösen P, Du X, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 188: 103-111.
31. Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NFKappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27: 752-763.
32. Ceriello A. Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetes Medicine* 1997; 14: 45-49.
33. Davidoff AJ, Rodgers RL. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1990; 15: 633-642.
34. Das K, Chainy GBN. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochemica at Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2001; 1537: 1-13.

35. Altan N, Bugdaycı G, Tutkun-Kosova F, Sabcak-Çaycı B, Nazaroğlu NK. The influence of the sulfonylurea glyburide on nitric oxide in streptozotocin induced diabetic rat. *General pharmacology* 1998; 31: 319-321.
36. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2002; 5: 561-568.
37. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. 2001; *Nature* 414: 813-820.
38. Gren K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 110-118.
39. Altan N, Yiğit Ş, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılınc N. Effects of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocine-induced diabetic rat muscle. *general pharmacology* 1977; 28: 795-796.
40. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1998; 14: 1114-1120.
41. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002; 51: 1360-1362.
42. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 97: 1422-1428.
43. Soulis T, Cooper ME, Sastra S, Thallas V, Panagiotopoulos S, Bjerrum OJ, Jerums G. Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to amino guanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 1997; 40: 1141-1151.
44. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003; 17: 4-38.

45. Bukan N, Sancak B, Bilgihan A, Kosova F, Bupdaycı G, Altan N. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 2004; 26: 519-522.
46. Karasu Ç, Öztürk Y, Altan N, Yıldızoğlu N, İkizler Ç, Altan VM. Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *General Pharmacology* 1990; 21: 735-740.
47. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
48. Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev*, 2008.
49. Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5: 100-115.
50. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
51. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-107.
52. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Bere – Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, et al. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9431-9435.
53. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
54. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-1538.
55. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-1777.

56. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 577-628.
57. Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwann JC, Ng PY, Guo K, et al. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J* 2005; 24: 2815-2826.
58. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury and cell death. Kumar V, Abbas A, Fausto N (editors). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Philadelphia, 2005; 7: 26-32.
59. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvonen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136: 5-12.
60. Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA (S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2004; 29: 237-242.
61. McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, et al. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci* 2003; 23: 6914-6927.
62. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 511-517.
63. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2008; 19: 55-63.
64. Dubska L, Matalova E, Misek I. Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: *Acta Vet BRNO* 2002; 71: 529-553.
65. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to Tunel specificity. *Biomed pharmacoter* 1998; 52: 252-258.

66. Hekim N. Apoptosis. Kalıtsal hastalıklara moleküler tıp açısından bakış sempozyumu, 2003: 115-140.
67. Katherine L, Jonathan M. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 821-832.
68. H. Woelk, S. Lehl, R. Bitsch and W. Kopcke. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy; an 8-week randomized controlled study (BABI Study), *Alcohol*. 33:1998: 318-631.
69. Bakker SJ, Heine RJ, Gans Ro. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
70. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV, Grainai G, Todaro M, Meloni M. et al. Benfotiamine accelerate the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006; 49: 405-420.
71. Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Laura D. et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/ FOXO signaling. *Diabetes* 2006; 55: 2231-2237.
72. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinetti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.
73. Beltramo E, Berrone E, Buutiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultered in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 330-336.
74. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsuma T, Ju Q, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9: 294-299.
75. Wu S, Ren J. Benfotiamine allerites diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci Lett* 2006; 394: 158-162.
76. Groff, JL, Gropper SS, Hunt SM. Suda Çözünen Vitaminler. In: İleri Beslenme ve İnsan Metabolizması. Minneapolis: Batı Yayınları, 1995; 222-237.

77. Jacob, R.A. Vitamin C. In: Modern Nutrition in Health and Disease. Maurice S, James O, Moshe S, Catharine RA (editors). Baltimore; Williams & Wilkins, Ninth Edition.1999; 467-482.
78. Chen L, Jia RH, Qui CJ, Ding G. Hyperglycemia inhibits the uptake of dehydroascorbate in tubular epithelial cell. Am J Nephrol 2005; 25: 459-465.
79. Serbecic N, Beutelspacher SC. Vitamins inhibit oxidant induced apoptosis of corneal endothelial cells. Jpn J Ophthalmol 2005; 49: 355-362.
80. Kang SA, Jang YJ, Park H. In vivo dual effects of vitamin C on Paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. Free Radic Res 1998; 28: 93-107.
81. Lee EY, Lee MY, Hong SW, Chung CH, Hong SY. Blockade of oxidative stress by vitamin C ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic rats. Yonsei Med J. 2007; 48: 847-855.
82. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji, Çevikbaş U (editors). İstanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2003; 635-655.
83. Ronco C, La Greca G. Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization. Contrib Nephrol 1999; 127:1-31.
84. Sies H. Oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997; 82: 291-295.
85. Francesco L, Bernard C, Kai-Uwe E, Peter S, Christoph W, Carmine Z. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome, Consensus Paper. Nephrol Dial Transplant 2003; 18: 1272-1280.
86. Doğan MM. Deneysel Diyabetik Sıçan Böbrek Dokusunda Enalapril ve Losartanın Ghrelin İmmünreaktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniv. İç Hastalıkları Bölümü 2010; 25-36.
87. Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 250-253.
88. Finkel T, Holbrook N. Oxidants oxidative stress and the biology of aging, Nature 2000; 408: 239-247.

89. Balakumar P, Chakkarwar VA, Singh M. Ameliorative effect of combination of benfotiamine and fenofibrate in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction and nephropathy in the rat. *Mol Cell Biochem* 2009; 320: 149-162.
90. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*. 2004; 35: 159-169.
91. Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966.
92. Hoijman E, Rocha VL, Keller SMI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004; 145: 418-425.
93. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroentrol Hepatol* 2000; 15: 109-120.
94. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
95. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Ganas Dev* 2001; 15: 2922-2933.
96. Öniz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. *Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 2004; 14: 1-20.
97. Zhang G, Khanna P, Chan LL. Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem Mol Med* 1997; 61: 58-62.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Mersin'in Mut ilçesinde doğdum. 1996 yılında Ankara İnönü Lisesinden mezun olup 1997 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2004 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Sivas ili Gemerek ilçesi Sızır beldesinde görev yaptıktan sonra 2006-2007 yılları arasında vatani görevimi yaptım. Askerlik sonrası Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak 2007 yılı Mayıs ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitime devam etmekteyim. Evliyim ve bir çocuk babasıyım. Yabancı dilim İngilizcedir.