

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

**DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA  
MATRİX METALLOPROTEİNASE 9 VE APOPTOZİS ÜZERİNE  
VİTAMİN D'NİN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Fatih GENÇ**

**TEZ DANIŞMANI  
Yrd. Doç. Dr. Nevzat GÖZEL**

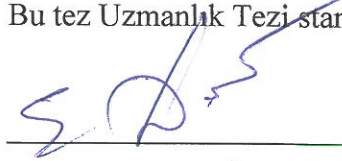
**ELAZIĞ  
2016**

**DEKANLIK ONAYI**

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

**DEKAN VEKİLİ**

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.

Yrd. Doç. Dr. Nevzat GÖZEL \_\_\_\_\_

**Danışman**

**Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

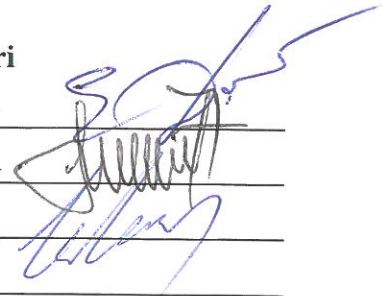
Prof. Dr. Emir DÖNDER

Yrd. Doç. Dr. Nevzat GÖZEL

Yrd. Doç. Dr. Behri EYRİ

.....

.....



## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, değerli hocam Dahiliye Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir DÖNDER'e tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle yardımcı olan ve asistanlık eğitimime katkı sağlayan, tez danışmanım, Yrd. Doç. Dr. Nevzat GÖZEL'e, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Dahiliye Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarıma, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, yine katkılarından dolayı Uzm. Dr. Ali GÜREL ve Uzm. Dr. Soykan BİÇİM'e teşekkür ederim.

## ÖZET

Diyabetik nefropati, son dönem böbrek hastalığının en önemli nedenidir ve diyabete bağlı ölüm nedenlerinde ilk sıralarda yer almaktadır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstrasellüler matriksin parçalanması ve dönüşümünde rol oynamaktadır. Bu çalışmada deneysel diyabetik sıçan böbrek dokusunda MMP 9 ve apoptozis üzerine vitamin D' nin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda erişkin Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olmak üzere 5 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 8 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Tampon grubuna tek doz fosfat-sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) olarak, Vitamin D grubuna ise vitamin D 50 IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla verildi. Diyabet grubuna 50 mg/kg tek doz Streptozotosin (STZ) fosfat-sitrat tamponunda çözdürülerek i.p olarak uygulandı. Diyabet+Vitamin D grubuna ise 50 mg/kg tek doz STZ i.p olarak verilmesinden sonra diyabetin oluşumunu takiben vitamin D 50 IU/gün oral olarak verildi.

Deney sonunda sıçanlar dekapite edilip böbrek dokuları çıkartıldı. Rutin histolojik takipler yapılarak parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitlere MMP 9 için immünohistokimyasal, apoptozis için TUNEL boyama yapıldı. Biyokimyasal total antioxydant status (TAS) ve total oxydant status (TOS) çalışma için örnekler -80 C<sup>o</sup>'de saklandı.

Apoptozis, TAS, TOS, MMP 9 değerleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS, apoptozis ve MMP 9 değerleri artmış izlenirken TAS değerleri azalmış olarak izlendi. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet + Vitamin D grubunda TOS, apoptozis ve MMP 9 değerleri azalmış gözlenirken TAS değerleri artmıştı.

Sonuç olarak; diyabetik nefropati patogenezinde oksidatif stres ile MMP 9 arasında ilişkinin aydınlatılabilmesi için gelecekte farklı yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ve diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla vitamin D ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının denenebileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Matriks metalloproteinaz-9, D vitamini, diabetes mellitus, apoptozis.

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF VITAMIN D ON MATRIX METALLOPROTEINASE 9 AND APOPTOSIS ON EXPERIMENTAL RAT KIDNEY TISSUE

Diabetic nephropathy is the most important reason of the end stage kidney disease and it has a major place about the cause of death related to diabetes. Matrix metalloproteinases (MMP) plays a role on disintegration and transformation of extracellular matrix. In this study, it was intended to examine the effects of vitamin D on matrix metalloproteinase 9 and apoptosis on experimental rat kidney tissue.

Our study was made with Male Wistar albino rats. They are divided to 5 equal groups which contains 7 members. Any process was made to Control group during 8 weeks. It were given to Buffer group that one dose of phosphate-cytrate buffer intraperitoneally (i.p) and also 50 IU/day vitamin D orally with dropper to Vitamin D group. One dose of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) which was dissolved at phosphate-cytrate buffer was given i.p to Diabetes group. Also to the Diabetes+Vitamin D group, after it was given one dose of 50 mg/kg STZ i.p and the next the diabetes develops; 50 IU/day vitamin D was given orally.

Rats were sacrificed, kidneys were removed at the end of the study. Tissues was burried into paraffin blocks and routine histological follow up was made. Immunohistochemical tests for MMP 9, TUNEL tests for apopitosis was made to the section of paraffin blocks. Samples were stored at -80 C<sup>o</sup> for biochemical tests total antioxydant status (TAS) and total oxydant status (TOS).

Apoptosis, TAS, TOS, MMP 9 results for the group of Control, Buffer and Vitamin D were the same. When compared with the Control group; TOS, apoptozis and MMP 9 values were seemed increased on Diabetes group althought TAS values were decreased. Comparing with Diabetes group; TOS, apoptosis and MMP 9 values of Diabetes+Vitamin D group were decreased and TAS valuse were increased.

In conclusion, our data revealed that it was needed to make further studies to understand the correlation between oxydative stres and MMP 9 on diabetic nephropathy pathogenesis and it can be tested which vitamin D related therapies to prevent the complication of diabetes.

**Key words:** Matriks metalloproteinaz-9, vitamin D, diabetes mellitus, apoptosis

## 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>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	1
1.1.3. Tanı	2
1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması	4
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	6
1.1.6. Diabetes Mellitus'un Nefrolojik Komplikasyonları	7
1.2. Oksidatif Stres	10
1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	11
1.2.1.1. Glukozun Otooksidasyonu	12
1.2.1.2. Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu	12
1.2.1.3. PKC aktivasyonu	13
1.2.1.4. Polyol yolağı	13
1.3. Apoptozis	15
1.3.1. İntrinsik Apoptozis Yolağı	16
1.3.2. Ekstrinsik Apoptozis Yolağı	17

1.3.3. Kaspazlar	17
1.3.4. Apoptozisin Kontrolü	17
1.4. Matriks Metalloproteinazlar	19
1.4.1. Matriks Metalloproteinazların Özellikleri	20
1.4.2. Metalloproteinazların Yapısı	21
1.4.3. Metalloproteinazların sınıflandırılması	22
1.4.3.1. Jelatinazlar	23
1.4.3.1.1. Matriks Metalloproteinaz-2 (Jelatinaz A)	23
1.4.3.1.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (Jelatinaz B)	23
1.4.4. Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu	25
1.5. D Vitamini	25
1.5.1. D Vitamini Kaynakları	26
1.5.2. D Vitamini Metabolizması	26
1.5.3. D Vitamininin Fonksiyonu	27
1.5.4. D Vitamini Düzeyleri	27
1.5.5. D Vitamini ve Diyabetik Nefropati	27
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>32</b>
2.1. Deney Hayvanları Ve Beslenmeleri	32
2.2. Diyabet İndüksiyonu	33
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	33
2.4. Örneklerin Alınması	34
2.5. Biyokimyasal Çalışma	34
2.5.1. Kan glukoz düzeyleri	34
2.5.2. Total Antioxydant Status (TAS) ve Total Oxydant Status (TOS) ölçümü	34
2.6. TUNEL Metodu	34
2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme	35
2.8. İstatistiksel Analiz	37
<b>3. BULGULAR</b>	<b>38</b>
3.1. Biyokimyasal Bulgular	38

3.2. TUNEL Bulgular	38
3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular (MMP-9 İmmünreaktivitesi)	42
3.4. Total Antioxydant Status (TAS) ve Total Oxydant Status (TOS) Bulgular	45
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>47</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>52</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>66</b>



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Diyabet ve Glukoz Metabolizmasının Diğer Bozuklukları İçin Güncel Tanı Kriterleri (8)	2
<b>Tablo 2.</b> Diyabetin Etiyolojik Sınıflaması (11)	5
<b>Tablo 3.</b> Üriner Albümin Ekskresyonu Değerlendirilmesi	8
<b>Tablo 4.</b> Deney Hayvanlarına Verilen Sıçan Yeminin Terkibi	32
<b>Tablo 5.</b> TUNEL Boyama Prosedürü	35
<b>Tablo 6.</b> İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	37
<b>Tablo 7.</b> Deney Hayvanlarının Başlangıç ve Final Kan Glukoz Değerleri	38
<b>Tablo 8.</b> Apoptotik indeks (%)	39
<b>Tablo 9.</b> MMP 9 histoskor	42
<b>Tablo 10.</b> TOS düzeyleri	46
<b>Tablo 11.</b> TAS düzeyleri	46

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Polyol Yolunun Şeması (69)	15
<b>Şekil 2.</b> Apoptozisin genel görünümü (73)	16
<b>Şekil 3.</b> Matriks Metalloproteinazların Yapısı	22
<b>Şekil 4.</b> Matriks Metalloproteinaz-9'un yapısı (98)	24
<b>Şekil 5.</b> D vitamini metabolizması	26
<b>Şekil 6.</b> Diyabetik nefropati gelişiminde aktif D vitamininin etkileri (117)	29
<b>Şekil 7.</b> Kompansatuar renin artışı ve D vitamin tarafından inhibisyonu (112)	30
<b>Şekil 8.</b> Kontrol Gurubu TUNEL Pozitifliği	39
<b>Şekil 9.</b> Tampon Gurubu TUNEL Pozitifliği	40
<b>Şekil 10.</b> Vitamin D Gurubu TUNEL Pozitifliği	40
<b>Şekil 11.</b> Diyabet Gurubu TUNEL Pozitifliği	41
<b>Şekil 12.</b> Diyabet + Vitamin D Grubu TUNEL Pozitifliği	41
<b>Şekil 13.</b> Kontrol Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi	43
<b>Şekil 14.</b> Tampon Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi	43
<b>Şekil 15.</b> Vitamin D Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi	44
<b>Şekil 16.</b> Diyabet Grubu MMP-9 İmmünreaktivitesi	44
<b>Şekil 17.</b> Diyabet+Vitamin D Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi	45

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ACE-I</b>	: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
<b>ADA</b>	: Amerikan Diyabet Cemiyeti
<b>AGE</b>	: Advanced Glication End Products
<b>AIF</b>	: Apoptozis İnhibe Edici Faktör
<b>APG</b>	: Açlık plazma glukozu
<b>APAF – 1</b>	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
<b>ARB</b>	: Angiotensin Receptor Blocker
<b>A1C</b>	: Glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c)
<b>BGT</b>	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
<b>Cat</b>	: Katalaz
<b>cFLIP</b>	: Hüresel FLICE- İnhibitör Protein
<b>DCCT</b>	: Diabetes Control and Complications Trial
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DNA-PK</b>	: Deoksiribonükleik asit protein kinaz
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EASD</b>	: Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
<b>ESM</b>	: Ekstrasellüler matriks
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
<b>GPx</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>HbA1c</b>	: Hemoglobin A1c
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı likid kromatografi
<b>HCT</b>	: Hematokrit
<b>H2O2</b>	: Hidrojen peroksit
<b>IFG</b>	: Bozulmuş açlık glisemisi
<b>IDF</b>	: Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
<b>İGT</b>	: Bozulmuş glukoz toleransı

<b>IFCC</b>	: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
<b>MAPK</b>	: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar
<b>MDA</b>	: Malonildialdehit
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinazlar
<b>MODY</b>	: Maturity onset Diabetes of the Young
<b>NADPH</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)
<b>NGSP</b>	: National Glycohemoglobin Standardization Program
<b>NFKB</b>	: Nükleer faktör kapp B
<b>OGTT</b>	: Oral glukoz tolerans testi
<b>O2</b>	: Süperoksit anyonu
<b>OH</b>	: Hidroksil radikalleri
<b>ONOO</b>	:Peroksinitrit
<b>RAS</b>	: Renin Anjiotensin Sistemi
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>PTH</b>	: Parathormon
<b>PG</b>	: Plazma Glukoz
<b>RAAS</b>	: Renin anjiotensin aldosteron sistemi
<b>RANKL</b>	: Nükleer faktör kapp-B ligand'ın reseptör aktivatörü
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>TGF-β</b>	: Transforming growth faktör-β
<b>TNF</b>	: Tümör Nekroz Faktörü
<b>TIMP</b>	: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
<b>TURDEP</b>	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
<b>TRAIL</b>	: Tümör Nekrozis Faktör İle İlişkili Apoptozise Sebep Olan Ligand
<b>T1D</b>	: Tip 1 Diabetes Mellitus
<b>T2D</b>	: Tip 2 Diabetes Mellitus
<b>UKPDS</b>	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
<b>VDR</b>	: Vitamin D reseptörü
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Diabetes Mellitus

#### 1.1.1. Tanım

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan meydana gelen, özellikle hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik, metabolik bir hastalıktır (1).

Diabetes Mellitus klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi klinik belirtiler ile meydana gelir. Ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi belirtiler gösterir. Çoğu zaman semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da olmayabilir. Patolojik değişikliklere neden olan hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Kimi zaman da retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonları ile karşımıza çıkar (1-3).

Bazı durumlarda diyabet, Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) veya gebelikte oluşan glukoz intoleransı gibi örneklerde olduğu gibi kolaylıkla anlaşılabilir. Bazı kişilerde diyabet gelişme olasılığı glukoz tolerans anomalilerinden önce de belirtilebilir (4).

#### 1.1.2. Epidemiyoloji

Son 20 yıldır tüm dünyada DM prevalansı aşırı derecede artmıştır (5). DM birçok ülkede ölüme sebep olan ilk 5 hastalık içerisinde bulunmaktadır. Üstelik DM'ye ölüm raporları içerisinde yer verilemediğinden ve mortaliteye etkisi olduğu düşünüldüğünden daha az hesaplanmaktadır. 2000 yılında yapılan bir analizde dünyada 141.9 milyon Tip 2 DM'li hasta olduğu belirtilmiştir ki, bu rakam erişkin dünya nüfusunun %3.8'ine denk gelmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından 2025 yılı için DM'li hasta sayısı tahmini olarak 334 milyondur. Populasyonlardaki büyüme, sağlıksız beslenme, obezite ve fiziksel inaktivite prevalanslarında artışlar, yaşlanma ve kentleşme sebebiyle diyabetli hasta sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (6).

Türkiye’de Diyabet sıklığını taramak için Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması (TURDEP) yapılmaktadır. Bu çalışma sonuçlarına göre ülkemizde diyabet sıklığı %7,2 olarak bulunmuştur. Bunun %30’unu tarama esnasında yeni tanı alan diyabet hastaları oluşturmuştur. Bu rakamlar ülkemizde de DM’nin yaygın olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada obezite sıklığı %25 olarak belirtilmiştir. Bu bilgiler DM’nin artan bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir (7).

### 1.1.3. Tanı

Diyabet ve glukoz metabolizmasının diğer bozuklukları için güncel tanı kriterleri Tablo 1’de görülmektedir.

**Tablo 1. Diyabet ve Glukoz Metabolizmasının Diğer Bozuklukları İçin Güncel Tanı Kriterleri (8)**

	Aşkar DM	İzole IFG <sup>***</sup>	İzole IGT	IFG + IGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.st PG (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200 mg/dl + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C <sup>****</sup>	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

<sup>\*\*\*</sup>Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile "mg/dl" olarak ölçülür. "Aşkar DM" tanısı için dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli iken "İzole IFG", "İzole IGT" ve "IFG + IGT" için her iki kriterin bulunması şarttır. <sup>\*\*\*\*</sup>2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve IFG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir. <sup>\*\*\*\*</sup>Standardize metotlarla ölçülmelidir.

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A<sub>1c</sub>, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance), WHO: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu.

Buna göre diyabet tanısı dört yöntemden herhangi birisi ile konulabilir. Çok ağır diyabet semptomlarının bulunmadığı durumlar dışında, tanının daha sonraki bir gün, tercihen aynı (veya farklı bir) yöntemle doğrulanması gerekir. Eğer başlangıçta iki farklı test yapılmış ve test sonuçları uyumsuz ise sonucu eşik değerinin üstünde çıkan test tekrarlanmalı ve sonuç yine diyagnostik ise diyabet tanısı konulmalıdır. Tanı için 75 gram glukoz ile standart Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) yapılması, Açlık Plazma Glukozu’na (APG) göre daha sensitif ve spesifik olmakla birlikte, bu testin aynı kişide günden güne değişkenliğinin yüksek, emek yoğun ve maliyetli olması rutin kullanımını güçleştirmektedir. Diğer taraftan, APG’nin daha kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması klinik pratikte kullanımını artırmaktadır.

Hastalığın aşikar klinik başlangıcı nedeniyle tip 1 diyabet tanısı için çoğu kez OGTT yapılması gerekmez. Tanı kriterleri venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile yapılan ölçümleri baz almaktadır. Klinikte veya hastaların evde glisemi takibinde kullandıkları tam kan, kapiller kan ve serum glisemi değerleri aşağıdaki formüllerde gösterildiği gibi biraz daha düşüktür (\*). Bu formüllere dayanarak, son yıllarda kapiller tam kanda glukoz düzeyini ölçen cihazların plazma glukoz (PG) düzeylerine göre kalibre edilerek kullanılması benimsenmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre açlıkta kapiller tam kanın glukoz düzeyi venöz plazmadaki düzeye eşittir, ancak toklukta kapiller kanda glukoz düzeyi plazmadakinden yaklaşık olarak %11 daha düşük kabul edilmektedir. Hematokrite (Hct) bağlı olarak bu fark değişir, Hct %55 olan bir kişide fark %15'e yükselir, buna karşılık Hct %30 olan bir kişide fark %8'e iner. Günlük pratikte OGTT yapılan bazı kişilerde açlık ve 2. saat glukoz normal (ya da IFG/IGT aralıklarında) bulunmasına rağmen 1. saat PG düzeyinin 200 mg/dl'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Bu vakaların tıpkı aşikar diyabet gibi takip edilmesi oldukça yaygın kabul gören bir yaklaşımdır. Tanı testi olarak hemoglobin A1c (HbA1c:A1C) standardizasyonundaki sorunlar ve tanı eşliğindeki belirsizlik nedeniyle glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c: A1C)'nin diyabet tanı aracı olarak kullanılması uzun yıllar önerilmemiştir.

Son yıllarda tüm dünyada standardizasyonu yönündeki çabalar ve prognostik önemine dair kanıtların artması sonucunda A1C'nin de diyabet tanı testi olarak kullanılabilceği gündeme gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm laboratuvarların kullandıkları A1C ölçüm yöntemlerinin 'Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı' (NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program) tarafından sertifikalandırılması ve sonuçların DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) çalışmasında kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen HPLC (yüksek performanslı likid kromatografi) yöntemine göre kalibre edilmesi şart koşulmaktadır.

---

\*Plazma glukoz [mg/dl] = 0.558 + [20.254 X tam kan glukoz [mg/dl] / 18]  
Plazma glukoz [mg/dl] = 0.102 + [19.295 X kapiller kan glukoz [mg/dl] / 18]  
Plazma glukoz [mg/dl] = -0.137 + [18.951 X serum glukoz [mg/dl] / 18]

Buna göre venöz plazmada 126 mg/dl olarak ölçülen glukoz düzeyi tam kanda ~%11 (112 mg/dl), kapiller kanda ~%7 (118 mg/dl), serumda ise ~%5 (120 mg/dl) daha düşük ölçülür.

Uluslararası Klinik Kimyacılar ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu (IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) ile birlikte Amerikan Diyabet Cemiyeti (ADA), Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) temsilcilerinin oluşturduğu Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi, 2008 yılında diyabet tanısı için A1C kesim noktasını % 6.5 (48 mmol/mol) olarak belirlemiştir. Bazı uzmanlar  $A1C \geq 6.5$  ( $\geq 48$  mmol/mol) ile birlikte,  $APG \geq 126$  mg/dl bulunan kişilere diyabet tanısı konulmasını ve bu yaklaşımın OGTT'ye alternatif olarak kullanılmasını önermektedir. Dünya Sağlık Örgütü, 2011 yılında yayımladığı Konsültasyon Raporu'nda, güvenilir bir yöntemin kullanılması ve uluslararası referans değerlerine göre düzenli olarak standardize edilmesi koşulu ile, A1C'nin tanı testi olarak kullanılabileceğini önermiştir. Ulusal (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrin Hastalıklar Prevalans Çalışması: TURDEP-II) ve uluslararası toplumsal bazlı çalışmalar, A1C'ye göre diyabet tanısı alan kişilerin, APG veya OGTT ile tanı alan kişilere göre, metabolik açıdan (kilo, bel çevresi, lipid ve kan basıncı yönünden) daha olumsuz durumda olduklarını göstermektedir. TURDEP-II çalışmasında, A1C'ye göre 'Diyabet Riski Yüksek' (A1C: %5.7-6.4) kategorisinde tanımlanmış grubun metabolik risk profili, 'Kombine Glukoz Tolerans Bozukluğu' (IFG + IGT) saptanmış grubun risk profiline yakın ölçüde bozulmuş bulunmuştur. Bu durum göz önüne alındığında, testin tanı amaçlı kullanılmasının, komplikasyonlara daha yatkın kişilerin tanınmasında ve tedavi edilmesinde, ayrıca komplikasyonların önlenmesi veya geciktirilmesi açısından da yarar sağlayacağı açıktır. Bu sebeple Sağlık Bakanlığı tarafından yapılacak düzenlemeler ile A1C'nin standardizasyon çalışmalarına hız verilmesi gerekmektedir (9).

#### **1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması**

Diyabet sınıflandırılmasını tarihte ilk yapan kişi Sir Harold Percival (Harry) Himsworth'dur. 1936 tarihinde Ocak ayında Tip 1 ve Tip 2 diyabet olarak adlandırılan hastalıklar arasındaki farkları ortaya koymuştur (10). Bu yıllardan sonra yapılan farklı grupların birbirine yakın çok sayıda sınıflaması vardır.

2014 yılında Amerikan Diyabet Akademisinin (ADA) yayınladığı ayrıntılı sınıflama tablo 2'de verilmiştir (11).

**Tablo 2. Diyabetin Etiyolojik Sınıflaması (11)**

I. Tip 1 Diyabet	E. İlaç veya kimyasal ile indüklenen
A. immün aracılı	1. Vakor
B. İdiopatik	2. Pentamidin
II. Tip 2 diyabet	3. Nikotik asit
III. Diğer spesifik tipler	4. Glukokortikoidler
A. Beta hücrelerinde genetik defekt varlığı	5. Tiroid hormonları
1. Kromozom 12, HNF-1 $\alpha$ (MODY3)	6. Diazoksit
2. Kromozom 7, glucokinase (MODY2)	7. $\beta$ -adrenerjik agonistler
3. Kromozom 20, HNF-4 $\alpha$ (MODY1)	8. Tiazidler
4. Kromozom 13, insulin promoter	9. Dilantin
5. Kromozom 17, HNF-1 $\beta$ (MODY5)	10. $\alpha$ -Interferon
6. Kromozom 2, <i>NeuroD1</i> (MODY6)	11. Diğerleri
7. Mitokondriyal DNA	F. Enfeksiyonlar
8. Diğerleri	1. Konjenital rubella
B. İnsülin etkisinde genetik defekt varlığı	2. Sitomegalovirus
1. Tip A insulin direnci	3. Diğerleri
2. Leprechaunizm	G. İmmün aracılı diyabetin yaygın
3. Rabson-Mendenhall sendromu	1. "Stiff-man" sendromu
4. Lipoatrofik diyabet	2. Anti-insulin reseptör
5. Diğerleri	3. Diğerleri
C. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	H. Diyabet ile ilişkili diğer genetik
1. Pankreatit	1. Down sendromu
2. Travma/pancreatektomi	2. Klinefelter sendromu
3. Neoplazi	3. Turner sendromu
4. Kistik fibrozis	4. Wolfram sendromu
5. Hemokromatozis	5. Friedreich ataksisi
6. Fibrokalküloz pankreatopati	6. Huntington köresi
7. Diğerleri	7. Laurence-Moon-Biedl
D. Endokrinopatiler	8. Myotonik distrofi
1. Akromegali	9. Porfiriler
2. Cushing sendromu	10. Prader-Willi
3. Glukagonoma	11. Diğerleri
4. Feokromasitoma	IV. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)
5. Hipertiroidizm	
6. Somatostatinoma	
7. Aldosteronoma	
8. Diğerleri	

Diyabet 2015 yılında yayınlanan ADA rehberi esas alınarak 4 genel kategoride incelenir (12):

- 1 - Tip 1 diyabet (beta hücre destrüksiyonuna bağlı, mutlak insülin yokluğu ile giden)
- 2 - Tip 2 diyabet (insülin rezistansının eşlik ettiği insülin salgınım defekti)
- 3 - Gestasyonel diyabet (gebeliğin ikinci veya üçüncü trimestrında tanı koyulan aşikâr olmayan diyabet)
- 4 - Diğer sebeplere bağlı spesifik diyabet tipleri (ör; monogenik diyabet, neonatal diyabet, maturity onset diabetes-MODY, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç veya kimyasal ile indüklenmiş diyabet- organ nakli veya AIDS tedavisi sırasında)

Tanı sürecinde diyabetin tipi ile ilgili bilgi sahibi olunabilir. Ancak yıllar içinde gelişmelerin gösterdiği en önemli nokta diyabet tiplerinin birbiri içine girebildiği, tanısız olanakların artması ile sınıflandırılmasının da artabileceğidir. Geleneksel olarak erişkinlik döneminde ortaya çıkan diyabet Tip 2 diyabet (T2D) iken çocukluk çağında ortaya çıkan Tip 1 diyabet (T1D) olarak değerlendirilir ancak tersi mümkünken ikisinin aynı anda olması da mümkündür.

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

Diabetes mellitusun komplikasyonları aşağıda akut ve kronik olarak sınıflandırılmıştır (13).

##### **A) Akut (Metabolik) Komplikasyonlar:**

- Diyabetik ketoasidoz
- Hiperosmolar non-ketotik koma
- Laktik asidoz koması
- Hipoglisemi koması

##### **B) Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar:**

###### **1) Makrovasküler komplikasyonlar:**

- Kardiyovasküler hastalıklar (Hipertansiyon, Koroner kalp hastalığı)
- Serebrovasküler hastalıklar

- Periferik damar hastalığı

## 2) Mikrovasküler Komplikasyonlar:

- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati
- Diyabetik nöropati

## 3) Diğer Kronik Komplikasyonlar:

- Diyabetik ayak
- Eretil disfonksiyon ve diğer seksüel fonksiyon bozuklukları
- Gastrointestinal problemler
- Kemik ve mineral metabolizma bozuklukları
- Psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklar

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) çalışmasının sonuçları ve deneysel çalışmalar, glukoz kontrolünün iyi olması durumunda diyabetin komplikasyonlarını azaltıcı etkisinin olduğunu göstermiştir. Uzun süreli olarak HbA1C düzeylerinin  $< \% 7.1$  olması sonucu mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nöropati ve nefropati  $\% 50-70$  oranında azalma göstermiştir. Bu düzey makrovasküler komplikasyonlar açısından da yararlı olmaktadır (13).

### 1.1.6. Diabetes Mellitus'un Nefrolojik Komplikasyonları

Diyabetik nefropati, diyabetli hastaların  $\%20$  ile  $\%40$ 'ı arasında gelişir ve son dönem böbrek hastalığının en önemli nedenidir. Son 3-6 ay içerisinde idrarda yapılan 3 albümin ölçümden en az 2'si normalden yüksek ( $>30$  mg/gün) ise mikroalbuminüri olarak kabul edilir (14). Üriner albümin ekskresyonu (ÜAE) değerlendirilmesi Tablo 3'de verilmiştir (15).

Diyabetik nefropatinin patogeneğinde glomerüllerde üç histopatolojik değişiklik görülmektedir. Bu değişiklikler, bazal membran kalınlaşması, mezengial genişleme (büyüme) ve glomerüler skleroz olarak bilinmektedir. Ayrıca glomerüler arteriollerde hiyalin depozitlerinden meydana gelen nodüler lezyonlar (Kimmelstiel-Wilson lezyonu) oluşur. Bu farklı histolojik patern, prognostik öneme sahiptir (16).

**Tablo 3. Üriner Albümin Ekskresyonu Değerlendirilmesi**

	Spot İdrarda	24 Saatlik İdrarda
Kategori	Albümin/Kreatinin Oranı (mg/gr)	Albümin Ekskresyon Hızı (mg/gün)
Normal	<30	<30
Mikroalbüminüri*	30-299	30-299
Makroalbüminüri (Klinik Albüminüri)	≥300	≥300

Son 3-6 ayda yapılan 3 ölçümden en az 2'si normalden yüksek ise mikralbüminüri kabul edilir. Son 24 saatte yoğun egzersiz yapılmışsa, infeksiyon, yüksek ateş, konjestif kalp yetersizliği, belirgin hiperglisemi ve hipertansiyon varsa üriner albümin ekskresyonu yüksek çıkabilir.

Erken dönemde hipergliseminin afferent arteriollerde dilatasyon etkisine bağlı oluşan hiperfiltrasyon en dikkat çekici bulgudur. Hiperfiltrasyon ile birlikte meydana gelen glomerüler hipertansiyon, nefropati gelişiminde önemli role sahiptir. Hiperglisemi, amino asitlerin ve proteinlerin non-enzimatik glukolizasyonuna yol açmakla beraber, advanced glycated end products (AGE) denilen ileri glukolizasyon yıkım ürünlerine çevirmektedir. AGE'ler hücrelerde proliferasyon ve hipertrofi, mezengial genişleme, extrasellüler matriks depolanması, nitrik oksit sentezinin inhibe edilmesi ve transforming growth faktör- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) salınımına neden olmaktadır. Hiperglisemi, hücre proliferasyonu, vasküler permeabilite, kan akımında önemli role sahip olan protein kinaz C aktivasyonunu meydana getirir ve aldoz redüktaz enzimi aktivasyonuna neden olarak sorbitol oluşumunu arttırmakta, bu da intrasellüler ozmolalite de artışına bağlı olarak nefropatiye katkı sağlamaktadır. Anjiotensin II'nin hücre proliferasyonu ve hipertrofisi, extrasellüler matriks depolanması, mezengial genişleme ve sitokin salınımı gibi etkilerle nefropatiye katkısı olur (17-21).

Diyabetik nefropati fizyopatolojik olarak 5 evreden meydana gelir:

**Evre 1: Hiperfiltrasyon ve hipertrofi evresi**

Diyabet tanısı konduğu anda vardır. Glomerüler filtrasyon hızı %20 ile %40 oranında artmıştır. Bu dönemdeki değişikliklerin renal plazma akımı ve filtrasyon hızının artmasından doğduğu, glomerüler bazal membranda hafif kalınlaşma dışında önemli bir morfolojik değişiklik olmadığı belirtilmiştir (16, 20, 22, 23).

## **Evre 2: Normoalbuminüri evresi (Sessiz dönem)**

Glomerüler filtrasyon hızının yüksek kabul edildiği bir evredir. Albüminüri normal seviyededir. Kan basıncı bu evrede normal sınırlardadır. Bu evrede histopatolojik olarak bazal membranda kalınlaşma ve minimal mezengial genişleme görülmektedir (16, 22-24).

## **Evre 3: Mikroalbuminüri evresi**

Bu dönemde glomerüler filtrasyon hızı normal seviyededir. Genellikle tanıdan 5-15 yıl sonra meydana gelir. Üriner albumin ekskresyonu mikroalbuminürik seviyede, 30-299 mg/gün arasındadır. Bu evrede kan basıncı artma eğilimindedir. Histopatolojik olarak bazal membran kalınlaşması ve mezengial genişleme belirgin hale gelir (16, 18-20).

## **Evre 4: Klinik (aşikar) nefropati evresi**

Klasik olarak persistan proteinüri ( $\geq 300$  mg/gün) ile ilgilidir. Beraberinde hipertansiyon da olur. Bu evrede glomerüler filtrasyon hızı düşer. Histopatolojik olarak glomerüllerde skleroz da görülür (16, 20, 21).

## **Evre 5: Son dönem böbrek yetmezliği evresi**

Üremi oluştuğu zaman, sıvı retansiyonu, ödem gibi diğer komplikasyonlar da görülmeye başlar. Kan basıncını kontrol etmek zorlaşır. Glomerüler filtrasyon hızı  $15 \text{ ml/dk } 1.73 \text{ m}^2$  nin altında olur (20, 21, 24).

Albüminürinin  $>30$  mg/gün olması diyabetik nefropatinin erken belirleyicisi olduğu ve artmış kardiyovasküler hastalık riski ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (14, 25, 26). Albüminüri düzeylerinde ilerleme olan ( $\geq 300$  mg/gün) hastalarda son dönemlerde böbrek hastalığı gelişme riski daha fazladır. Yapılan prospektif randomize çalışmalarda, diyabetik hastaların yoğun glisemik kontrol ile normoglisemi sağlanıp, artmış üriner albumin atılımının başlangıcı ve ilerlemesinin azaldığı gözlemlenmiştir (14, 27-32). Birleşik Krallık prospektif diyabet çalışması (United Kingdom Prospective Diabetes Study-UKPDS) çalışmalarında kan basıncı kontrolü ile nefropati gelişiminin azaldığına dair güçlü bulgular elde edilmiştir (14, 33). Hipertansif normoalbuminürik tip 2 diyabetli hastalarda renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) inhibisyonunun albüminürinin yükselmesini geciktirdiği belirlenmiştir (14, 34). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACE-I), diyabetli hastalarda majör kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı belirtilmiştir.

Kardiyovasküler risk faktörü ve yüksek albüminürisi olan diyabetli hastalarda ACE inhibitörlerinin kullanımı tavsiye edilmektedir (14, 35). Angiotensin Receptor Blocker (ARB)'lerin tip 2 diyabet ve/ veya son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda albüminüri düzeylerindeki ilerleme ( $\geq 300$  mg/gün) hızını azalttığı bildirilmiştir (14, 36, 37). RAAS blokerlerinin birlikte kullanılması önerilmemektedir. Çünkü bu kombinasyonların kardiyovasküler hastalıklarda ek bir fayda sağlamadığı ve daha yüksek yan etki oluşturduğu gösterilmiştir (14, 38, 39).

## **1.2. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres; herhangi bir nedenle oksidan üretiminde artış ve antioksidan savunma mekanizmasında yetersizlik sebebiyle aradaki dengenin bozulmasıyla oluşan doku hasarı olarak tanımlanır (40). Oksidatif stres insandaki birçok patolojik durumun meydana gelmesinde, ilerlemesinde ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli bir etkidir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar daha çok oksijenin indirgenmesiyle oluşan serbest radikallerin organizmadaki biyolojik ve kimyasal özelliklerine aittir. Oksijen, serbest radikallerin temel kaynaklarından biri olup genel görüş serbest radikallerin oksidan özelliğinin yapısındaki oksijenden kaynaklandığı yönündedir (41). Gerçekte oksijen radikallerinin yapımı normal biyolojik fonksiyonların ayrılmaz bir parçasıdır (42). Serbest radikaller çoğu zaman oksidan aktivite göstermez ve sadece oksidatif stresten sorumlu değildir. Serbest radikaller ve oksidasyon organizmada birçok biyokimyasal reaksiyon ve hücre iletim sisteminde görev almaktadır (43). Bazal koşullarda tüm aerobik hücrelerde solunum, fagositoz, araşidonik asit metabolizması gibi reaksiyonlarda bir miktar serbest oksijen radikali meydana gelir ve bunlar sağlıklı bir organizmada antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla ortadan kaldırılır (41). Serbest radikaller, üretim hızlarına, aktivitelerine ve savunma sistemine bağlı olarak oksidatif stres meydana getirirler. Serbest radikallerin çokça üretilmesi, bazı enzimlerin (oksidazlar, hem içeren proteinazlar, metaloproteinazlar) hücre dışına çıkması, demir bakır gibi bazı maddelerin serbest radikallerle kompleks yapması ve savunma sistemindeki bozukluklar oksidatif stresin artmasına sebep olurlar (43).

### 1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Diyabet ROS (reaktif oksijen türleri)'nin artmış üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuç olarak artmış oksidatif stresle alakalıdır (44, 45). Ancak oksidatif stresin diyabetin bir komplikasyonu mu, yoksa diyabetin diğer uzun dönem komplikasyonlarının bir nedeni mi olduğu konusunda araştırmalar sürmektedir (44, 46). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogenezinde rol aldığını göstermiştir. Lipid peroksidasyonu; yağların, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak bilinmektedir (47). Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulmakta, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girmektedir. Kalsiyumun hücre içinde artması sonucu proteazlar aktive olmakta ve hücre iskeletinde hasar meydana gelmektedir. Kalsiyum endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına sebep olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri; hidrokarbon gazlar ve toksik aldehitlerdir (48). Aldehit grubundan malonildialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun belirtisidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılır (48, 49).

Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (50-56). Diabetes Mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından ötürü tüm dünyada hızla artan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede artış gösterdiği ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemede rolü olduğu gözlemlenmiştir (57). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (58, 59).

Reaktif oksijen türleri (ROS) düşük konsantrasyonlarda normal hücrel fonksiyon için esansiyel olmalarına rağmen, lipid membranların, DNA (deoksiribonükleik asit)'in ve proteinlerin peroksidasyonuna sebep olur ve hücrel homeostazı ve fonksiyonları olumsuz yönde etkiler.  $O_2^{\bullet-}$  (süperoksit anyonu),  $\bullet OH$

(hidroksil radikalleri),  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit) ve  $ONOO^\bullet$  (peroksinitrit) gibi ROS'nin oluşumu, ROS ile mücadele eden Cat (katalaz), GPx (glutatyon peroksidaz), SOD (süperoksit dismutaz), vitamin E ve GSH (redükte glutatyon) gibi bileşiklerle oluşturulur. Hiperglisemi pro- ve antioksidan bileşikler arasındaki dengeyi bozacak değişiklikleri aktive edebilir ve bu da ROS'un artmış üretimi ve savunma mekanizmalarının yetersizliği ile sonuçlanabilir (45). Diabetes Mellitusta artan ROS üretiminin hiperglisemi dışında kalan sebepleri iskemi, artmış mitokondrial kaçak, katekolamin oksidasyonu ve lökositlerdir (44). Diğer yandan ROS'ni temizleyen bileşiklerin eksikliği ise, diyabetin bu temizleyicilerin üretimi ya da aktivitesi üzerine olan direkt etkisine bağlı olabileceği gibi, bu bileşiklerin ROS tarafından artmış tüketimine de bağlı olabilir (60). Hiperglisemi ROS'nin üretimini farklı mekanizmalar ile arttırır. Bu mekanizmalar; glukoz otooksidasyonu, protein glikasyonu, PKC aktivasyonu ve polyol yolağıdır (44, 46, 61, 62).

#### **1.2.1.1. Glukozun Otooksidasyonu**

Geçiş metallerinin varlığında, glukozun bir enediol radikal anyonuna döndüğü haldir. Bu radikal moleküler oksijeni indirgerken  $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$  ve  $H_2O_2$  gibi oksidan araçılar ve  $\alpha$ -ketoaldehidlerin üretimine sebep olurlar. Bu moleküller DNA, proteinler ve lipidler gibi önemli biyomoleküllere zarara uğratabilirler (44). Ayrıca glukozun otooksidasyonu AGEs'nin oluşumu ile de yakından alakalıdır (61).

#### **1.2.1.2. Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu**

Protein glikasyonu glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki kovalent bağlanmalar sonucu oluşur. Geçiş metallerinin varlığında (demir, bakır vs.) glikasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına sebep olur. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerinin yokluğunda da meydana gelebileceği bildirilmiştir. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan fazla olduğu durumlarda glikasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'ni meydana getirir. Glikasyona uğramış proteinler gibi, AGEs de serbest oksijen radikalleri meydana getirirler. Ayrıca ROS de AGEs'nin oluşumunu arttırır (62).

Diyabetik hayvanlarda ve insanlarda ROS ile mücadele eden SOD ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin non-enzimatik glikasyonunun da bu enzimlerin azalmış aktivitelerinden sorumlu olabileceği ve ROS'nin artışına sebep olabileceği düşünülmektedir (45).

#### **1.2.1.3. PKC aktivasyonu**

Hipergliseminin kendisi bazı anahtar hücrel özellikleri değiştirerek ROS'nin mitokondriden aşırı miktarda serbestlenmesine sebep olur. Hipergliseminin sebep olduğu bu değişikliklerden birisi de PKC'nin aktivasyonudur (62). Diaçilgliserolün de novo senteziyle PKC izoformlarının aktivasyonu, diyabette hasara uğrayan hedef organellerde patolojik gen ekspresyonu ve protein modifikasyonu ile sonuçlanmaktadır (63). Yapılan bazı çalışmalarda aldoz redüktaz yolağının aktivasyonunun da diyabetik komplikasyonlara duyarlı bazı dokularda PKC'nin aktivasyonuna katılabileceği gösterilmiştir (64, 65). Yine aldoz redüktaz yolağının bir sonucu olarak GSH ve taurin gibi antioksidanların miktarındaki azalmanın da PKC'nin aktivasyonuna etki edip azaltabileceği belirtilmiştir (59).

#### **1.2.1.4. Polyol yolağı**

Hücre içine giren glukoz bir kez fosforile edilip glukoz-6-fosfat'a çevrildiğinde, iki temel yolla metabolize edilebilir; glikoliz ve pentoz fosfat yolu. Bunlardan pentoz fosfat yolu primer NADPH (redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kaynağıdır (66). Glukozun hücre içi konsantrasyonunun normal dışı olarak arttığı durumlarda ise polyol yolağı ile metabolize edilebilir. Polyol yolağında bulunan glukoz aldoz redüktaz ile sorbitole indirgenir ve sorbitol de sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza yükseltgenir. Aldoz redüktazın aktivite gösterebilmesi için NADPH'a ihtiyaç duyar. Bu yüzden polyol yolağı aktivitesinin artması intrasellüler NADPH eksikliğiyle son bulur. Glutatyon redüktaz gibi antioksidanların da NADPH'a ihtiyacı vardır. Bu yüzden bu kofaktörün intrasellüler eksikliği glutatyon redüktaz aktivitesini azaltıp, serbest radikal aracılı hasarlara karşı korunmada önemli bir faktör olan intrasellüler GSH içeriğinin azalmasına neden olur (59). Aldoz redüktaz inhibitörlerinin kullanıldığı bazı çalışmalar lipid peroksidasyonunun azaldığı (64) ve eritrosit GSH düzeylerinin arttığını (65) göstermektedir. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin artması ise hücre içi NADH / NAD<sup>+</sup> (redükte nikotinamid adenin dinükleotid / nikotinamid adenin dinükleotid)

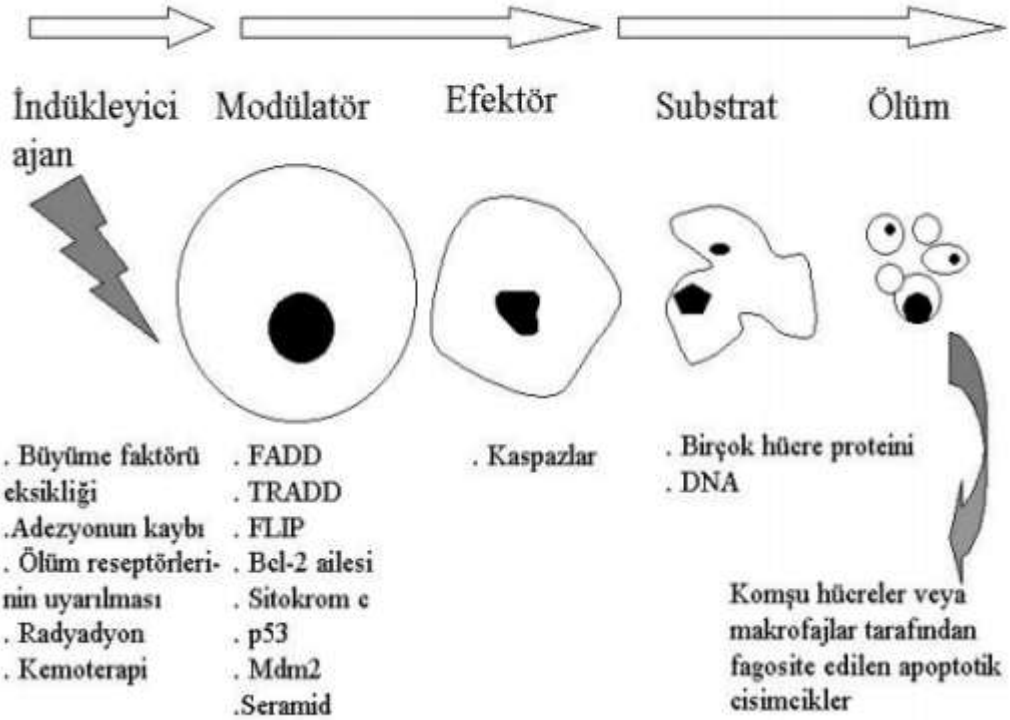
oranının artmasına sebep olur. Bu durum “hiperglisemik psödohipoksi” olarak tanımlanır ve serbest radikal üretiminin artmasına sebep olur bu da iskemiyle sonuçlanabilir (67). Bunun ötesinde biriken sorbitol ozmotik stres aracılığıyla mitokondrial disfonksiyona sebep olarak, antioksidatif defansı negatif yönde etkiler. İntrasellüler bir ozmolit ve endojen bir antioksidan olan ve antioksidatif defansta rol alan taurinin ve glutatyonun azalmasına sebep olur (57). Yine hücre içi ROS'nin aşırı üretimine sebep olan bir başka neden de glikoliz sonucu oluşan piruvatın kompleks II (süksinatubikinin) düzeyinde mitokondriye olan transportudur (61).

Son yıllarda, ROS ve oksidatif stresle alakalı olarak bazı farklı biyokimyasal yollarda da hipergliseminin rolü üzerinde durulmaktadır. Bunlar; nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), NH<sub>2</sub>-terminal Jun kinazlar / stresle aktive edilen protein kinazlar (JNK/SAPK), p38 mitojenle aktive edilen protein (MAP) kinaz ve heksozaminin stresle aktive edilen yollarıdır (58).

Diyabetin sebep olduğu artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan aktivite beynin patolojik olaylara karşı daha duyarlı hale gelmesine sebep olur. Deneysel olarak indüklenen hiperglisemide ratların beyinlerinde oksidatif hasarın arttığı bilinmektedir. Tip 1 diyabetik hastaların serumlarında da süperoksit üretiminin arttığı ve bu artışın glisemik kontrolün etkinliğinin arttırılmasıyla azaldığı gösterilmiştir. (68). Yine yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin de hem Tip 1 diyabetik ratların (56), hem de Tip 2 diyabetik ratların beyinlerinde arttığı raporlanmıştır (68). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda beynin antioksidan defansında rol alan SOD ve Cat aktivitelerinin azaldığı ancak Tip 2 diyabetik ratlarda ise SOD'ın aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (56).



## APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil 2. Apoptozisin genel görünümü (73)

### 1.3.1. İntrensik Apoptozis Yolağı

Bu yolda, apoptotik sinyal iletimi mitokondri aracılı olarak oluşur. Hücreye gelen sinyal dış mitokondri membranını uyarır ve mitokondriden proapoptotik moleküllerin salınımına neden olur. Bu moleküller Sitokrom C ve Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases) proteinleridir. Sonradan sitosolde Sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozomun oluşumuna katkı sağlar. Prokaspaz-9 apoptozom içinde aktif forma dönüşür. Kaspaz-9, bu yolağın aktivasyonunda “başlangıç” kaspazı olarak bilinir ve o da diğer kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) aktive ederek apoptosis sürecini tetikler (71, 72). Apoptozisi tetikleyen etkenler, DNA hasarı oluşması veya hipoksi, onkoprotein aktivasyonu ve büyüme faktörü eksikliği gibi hücrede stres oluşturan değişikliklerdir. İyonize radyasyon veya ultraviyole ışın etkisiyle DNAda çift zincir kırıkları oluşur. DNA hasarı, protein kinazlarını harekete geçirir ve bu kinazlar da hedef proteinlerin fosforilasyonunu

arttırır. DNA protein kinaz (DNA-PK) ve MAPK'lar gibi protein kinazların önemli hedeflerinden biri de p53'tür. P53 fosforile olunca, p21 ve GADD45 proteinleri üzerine pozitif düzenleyici etki yapar ve hücre döngüsü inhibe olur (72).

### **1.3.2. Ekstrinsik Apoptozis Yolağı**

Bu apoptotik sinyal yolu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenir. Ölüm reseptörleri hücre membranında olan proteinlerdir ve ligandları ile bağlanınca apoptozisi uyarırlar. Bu reseptörler TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör ailesindedir. 7 adet ölüm reseptörü (FAS, TNF-R1, DR-3, TRAIL-R2, DR-6, EDA-R ve p75NTR belirtilmiştir (72). Nükleer faktör kappa B (NFkB) bir transkripsiyon faktörüdür. Nükleer faktör kappa B'nin apoptozis, metastaz ve anjiyogenez sürecinde önemli bir etkidir (71). Nükleer faktör kappa B'nin antiapoptotik etkisi tümör progresyonunda etkilidir. Nükleer faktör kappa B uyarısı birçok dış etkenle uyarılır. Bunlar arasında TNF- $\alpha$ , interlökin 1, kemoterapötikler, bakteriyer lipopolisakaritler, radyasyon ve enflamasyon olduğu bilinir.

### **1.3.3. Kaspazlar**

Kaspazlar, proteolitik etki gösteren moleküllerin oluşturduğu bir gruptur ve apoptozisde ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri uyarmaktadır. İnsan hücrelerinde bir düzineden fazla kaspaz olduğu bilinmektedir (74). Bu proteinler, normal koşullarda hücrenin sitoplazmasında inaktif zimojen (inaktif proenzim) formunda bulunurlar ve prokaspaz olarak isimlendirilirler. Prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü hücreye ölüm uyarısının gelmesini takiben proteolitik bir işlem ile meydana gelir. Kaspazlara ihtiyaç duyulduğunda yeniden sentezlenmesine gerek duyulmaz. Apoptozis tetikleyen başlangıç sinyalinin ardından, sitoplazmadaki proenzimler aktif kaspaz formuna geçerler ve yaklaşık bir saat içinde hücre ölümü meydana gelir (75).

### **1.3.4. Apoptozisin Kontrolü**

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenmektedir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunur. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterirler.

Apoptotik süreçte hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda görev alırlar. Lizofosfatidik asit gibi sinyal moleküllerinin etkisiyle de hücrede kalsiyum artışı meydana gelir ve apoptosis yollarının tetiklenmesini sağlar (73), (76). Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin oluşması için esansiyel değildir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmı (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs) apoptozisi tetikler, bir kısmı (Bcl-2, Bcl-XL) ise azaltır. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo- veya heterodimerler meydana getirirler. Hücrenin yaşaması, bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölâtif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax (ikisinin oranı) bazı hematolojik malignansilerde prognostik markır olarak kullanılır. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşır.

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun sonucudur. Plasma membran hasarına bağlı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı olduğunda, eğer hasar onarılacaksa hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için vakit kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar fazlaysa p53 apoptozisi tetikler. p53'ün apoptozisi indüklemesi, Bax'ın ekspresyonunu artırması ve böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla meydana gelir. Sitokrom C, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir.

Son zamanlarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma gelmiştir. Bu yüzden de sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya atılması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini gösterir. Sitokrom C, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptozis uyarıcı faktör) ile birlikte sitoplazmaya atılır. Sitokrom C sitoplazmik protein olan APAF-1'e bağlanır ve onu aktif eder, sonrasında ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks meydana gelir. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi işaret eder. Oysaki kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden atılan bir faktör olan AIF'ün etkisiyle oluşur. Fakat AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu şimdilik bilinmemektedir. Kaspaz'lar,

zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sisteinin yer aldığından sistein proteazlar olarak isimlendirilen bir grup enzimlerdir (73).

Apoptozisde düzenleyici rolü olan proteinler üç grupta incelenir:

**1. Hüresel FLICE- inhibitör protein (cFLIP)**

Apoptozis yolağına hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aşamasında etkilerler. DISC'e bağlanırlar ve kaspaz-8 aktivasyonunu azaltırlar. Buna göre cFLIP ekstrinsik yolağın fonksiyonel inhibisyonuna sebep olmaktadır.

**2. Bcl-2 protein ailesi**

Bu ailedeki proapoptatik proteinler (Bax, Bid, Bad, Bim, Bcl-2 ve Bcl-XL) ise antiapoptotik özelliktedirler. Bu proteinler intrinsik yolağın düzenleyici molekülleridir.

**3. Apoptozis proteinleri inhibitör ailesi (IAP)**

Bu moleküller kaspazlara bağlanırlar ve kaspazların aktivitesini azaltırlar (77).

**1.4. Matriks Metalloproteinazlar**

Ekstrasellüler matriks (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan interaktif ve dinamik bir yapıdır. Dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcıdır hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için rezervuar görevini üstlenir. Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyal yolakları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşim sağlar. Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşimler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik role sahiptir (78, 79).

Vasküler ESM molekülleri damar duvarında bulunan intimal endotel hücreleri, medyal düz kas hücreleri ve adventisyal fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. Yapılarında 3 temel protein bulunmaktadır. Bunlar proteoglikanlar, kollajen fibrilleri ve çoklu yapıştırıcı matriks glikoproteinlerinden oluşur. Oldukça viskoz yapıda olan proteoglikanlar hücrelere yastık görevi üstlenir. Kollajen fibrilleri çözünür yapıda değildir; hücreye esneklik ve güç kazandırmaktadır. Çoklu yapıştırıcı matriks glikoproteinleri ise çözünür yapıda olup proteoglikanlar ve kollajenin hücre yüzeyine bağlanmasını sağlamaktadır (78).

Hücre-matriks etkileşmeleri, ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstrasellüler proteazlar) tarafından kontrol edilmektedir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel role sahiptir. Bu enzim sistemlerinin içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturur (78, 79).

#### **1.4.1. Matriks Metalloproteinazların Özellikleri**

Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriksi parçalayıp, nötral pH'da aktif olup, multigenik bir endopeptidaz ailesine aittir. Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanmaktadırlar (80, 81). Matriks metalloproteinazlar yara iyileşmesi, anjiyogenez, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artrit, ateroskleroz, doku ülseri, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de görevlidirler (79, 80, 82).

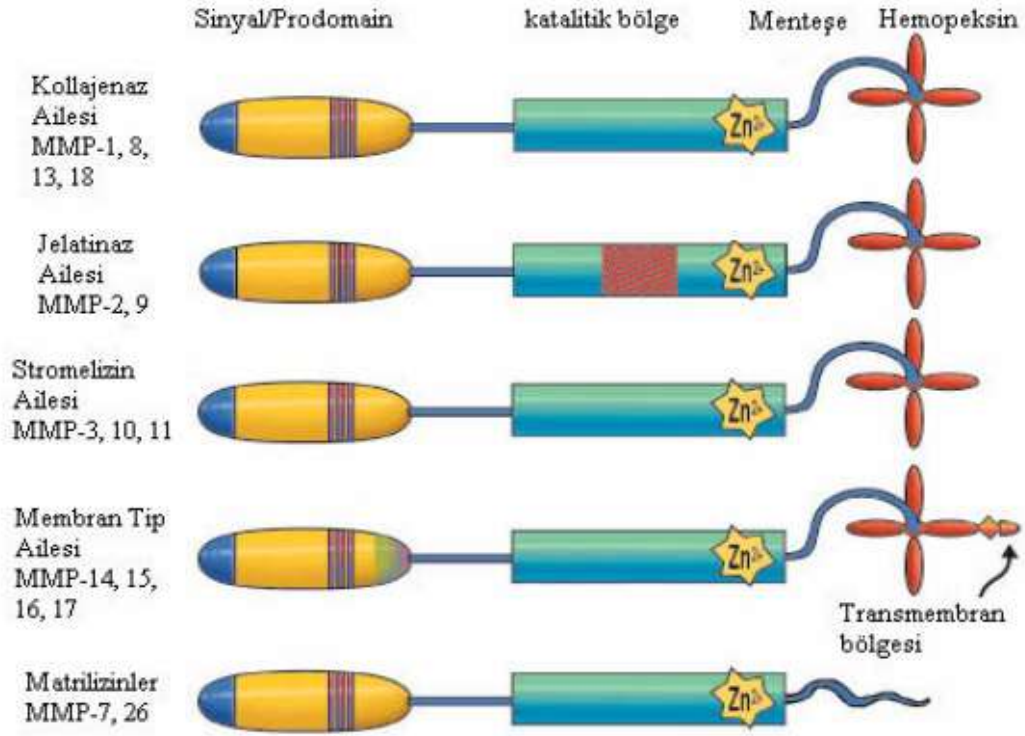
Matriks metalloproteinazlar aşağıdaki özelliklere sahiptir (80):

- a.** Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardan oluşur.
- b.** Çinko (Zn) iyonu içermekte ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olmaktadır.
- c.** Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktiveleştirilmeleri gerekmektedir.
- d.** Metalloproteinazlara özgül doku inhibitörleri ile (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMP) inaktive edilir.
- e.** Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu kanıtlanmıştır.

### 1.4.2. Metalloproteinazların Yapısı

Matriks metalloproteinazların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölgeden oluştuğu gözlemlenir. (Şekil-3) (80, 82, 83).

- a) Predomain: İlk bölge predomain olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için amaçlayan, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir.
- b) Prodomain: Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında önemli bir role sahiptir. Prodomainin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesine neden olur.
- c) Katalitik bölge: Fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonuna sahip bölgedir.
- d) Prolinden zengin bölge: Katalitik bölge ve son bölge arasındadır.
- e) Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölgedir. Hemopeksin benzeri bölge, N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanmaktadır. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği belirtilmektedir. Substrata bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmedi fonksiyonel role sahiptir.



**Şekil 3. Matriks Metalloproteinazların Yapısı**

### 1.4.3. Metalloproteinazların sınıflandırılması

Matriks metalloproteinaz ailesinin eskiden tanımlanmış 7 üyeye sahipti, yeni keşfedilen metalloproteinazların bunlara ilavesiyle sayıları giderek artmıştır. Metalloproteinazların farklı kişiler tarafından keşfi, oldukça karmaşık bir isimlendirme sistemine sebep olmuş ve bu nedenle MMPs ailesinin üyelerinin herbiri birden fazla isimle adlandırılmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği özgül enzim numaraları ve basit isimler vermeyi tavsiye etmiştir (80).

MMP'lar substrat spesifitelerine göre sınıflandırılır (84, 85):

**Kollajenazlar:** MMP-1 (interstisyel kollajenaz), MMP-8 (nötrofil kollajenaz), MMP-13 (kollajenaz 3), MMP-18 (kollajenaz 4)

**Jelatinazlar:** MMP-2, MMP-9

**Stromelizinler:** MMP-3, MMP-10, MMP-11

**Matrilizinler:** MMP-7, MMP-26 19

**Membran tip metalloproteinaz 1-6 (MT-MMP) :** MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP -17, MMP -24, MMP-25

**Diğer MMP-ler:** MMP-12 (makrofaj metalloelastaz), MMP-19, MMP-20 (enamelysin), MMP-23 (CA-MMP), MMP-27, MMP-28 (epilysin), MMP-21.

#### **1.4.3.1. Jelatinazlar**

Bu grup 72 kDa ağırlığında jelatinaz A (MMP-2) ve 92 kDa ağırlığında jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere iki enzim tarafından oluşmaktadır. Jelatinase A ve B, diğer matriks metalloproteinaz enzimlerinde olmayan, katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan, sisteinden zengin jelatin bağlayıcı bir ekstra domain içermektedirler (80, 83, 86).

##### **1.4.3.1.1. Matriks Metalloproteinaz-2 (Jelatinaz A)**

Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) oldukça yaygındır. Özellikle, fibroblastlar, keratinositler, kondrositler, monositler, osteoblastlar ve endotelial hücreleri olmak üzere birçok hücre tarafından sentezlenmektedirler (86).

##### **1.4.3.1.2. Matriks Metalloproteinaz-9 (Jelatinaz B)**

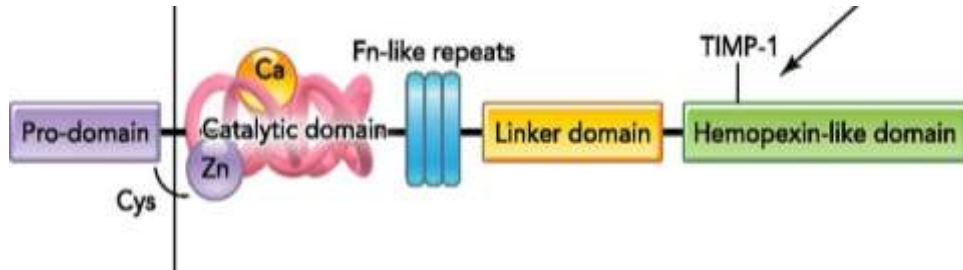
Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) akciğer alveoler makrofajları, monositler, lenfositler, polimorfonükleer lökositler ve keratinositler tarafından sentezlenmektedir. Makrofaj ve lökositler bu enzimi göçleri sırasında vücuttaki farklı doku kompartmanlarına bağlanabilmek için kullanırlar. Jelatinaz B (MMP-9), jelatin ve Tip IV bazal membran kollajeni için substrat özelliğindedir. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa olarak ölçülmektedir. Diğer substratları Tip I, III, V kollajen, elastin ve fibronektinden oluşmaktadır. Katalitik bölge içinde üç kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler vardır. Bu bölge özellikle jelatin, Tip IV kollajen ve elastin yıkımında role sahiptir (80, 82, 86). İnsanda gen lokusu 20. kromozom üzerinde yer almaktadır (87).

Matriks metalloproteinaz 9, doku remodelingini de içine alan pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alan bir endopeptidazdır. MMP-9 ekspresyonu embriyonel implantasyonda trofoblastik invazyondan başlayarak erken gestasyonel dönemde önemlidir (88). Ayrıca insanda ve kemirgenlerde gelişmekte olan kardiyak dokuda embriyogenezin 16 ve 18. günlerinde tespit edilmiştir (89).

Bununla beraber MMP-9 un vasküler yapıların basal laminasını oluşturan proteinlerin proteolitik degradasyonunda fonksiyon göstererek neovaskülarizasyonda görev aldığı belirtilmiştir (90). MMP-9 immün hücre fonksiyonunda da rol alır.

MMP-9 delesyonu eozinofil ve T helper-2 hücre gelişimini tetikleyerek akciğerlerde allerjik reaksiyonu başlatır (91). Patolojik durumlarda MMP-9 yara iyileşmesi ve gelişme dönemlerinde upregüle olur. Bu durumlara artrit diyabet ve kanser gibi inflamatuvar prosesler de örnek olarak verilebilir. İnflamasyonun rol oynadığı bu hastalıklarda; MMP-9'un proteolitik özellikleri immün cevabın oluşmasında ve hastalık progresyonunun ilerlemesinde etkilidir. MMP-9 hipertansiyon, atheroskleroz ve miyokard infarktüsü gibi kardiyovasküler hastalıklarda belirgin düzeyde artar (92).

İnsan MMP-9'u NH<sub>2</sub> terminal pro-domaini, katalitik domain bağlayıcı (linker) domain ve COOH-terminal hemopexin benzeri domainden oluşur (93). MMP'nin katalitik domaini iki adet çinko, beş adet kalsiyum iyonu ve üç adet tekrarlayan homologe fibronektin tip 2 modülü içerir. Çinko iyonlarında biri ve sistein pro-domainin anahtar motifi olup tüm yapı MMP-9'u inaktif tutmak açısından koordinelidir. Katalitik çinko iyonu ise proteolitik aktivite için gereklidir (94). MMP-9, fibronektin benzeri domain adı verilen ve üç adet fibronektin tip 2 tekrarından oluşan özgün bir domaine sahiptir. Bu domain çoğunlukla O-glikozidedir ve katalitik ile hemopeksin benzeri domainler arasında uzamış bağlantıları da içerir (95). Fibronektin benzeri domain denatüre kollojen ya da gelatine bağlanmada gereklidir (96). Hemopeksin benzeri domain ise plazma hemopeksini ile benzerlikler gösterir ve MMP-9 da bu domain TIMP-1 ve TIMP-3'un COOH-terminalleri ile sağlam kompleksler yapar. (84). Pro-MMP-9 sekresyondan önce Golgi apparatusunda TIMP-1 ile bağlı halde bulunur. TIMP-1, Pro-MMP-9'a COOH-terminali ile bağlanır ve NH<sub>2</sub> terminali diğer MMP'leri inhibe etmek için uygun pozisyonda bırakır (97).



Şekil 4. Matriks Metalloproteinaz-9'un yapısı (98)

Yapılan bir çalışmada Tip 2 diyabetik nefropatili hastaların erken dönemlerinde MMP-9'un idrar ile atılımında artış olduğu gözlemlenmiştir. MMP-9'un, Tip 2 diyabetik nefropatinin ilerlemesi ve patolojisinde rol aldığı ve Tip 2 diyabetiklerde erken dönemde üriner Tip IV kollajen ile birlikte, MMP-9 ölçümünün de, renal hastalıklarda hasarı değerlendirmede yararlı olabileceği düşünülmektedir (99).

Diyabetle ilgili bir başka çalışmada ise MMP-9'un yara dokusundaki düzeyinin diyabetik ayak ülserlerinin iyileşmesinde kötü prognostik faktör olduğunu göstermiştir (100).

#### **1.4.4. Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu**

Matriks metalloproteinaz aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP)'ler anahtar rolü oynamaktadır. Bundan başka  $\alpha$ 2- makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yere almaktadırlar (78). TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının organizasyonunda temel olan proteinlerdir. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunmaktadırlar. MMP'lere irreversible ve kovalent olmayan biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inaktive ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutmaktadırlar. İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP türü vardır. TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedirler (78, 101).

#### **1.5. D Vitamini**

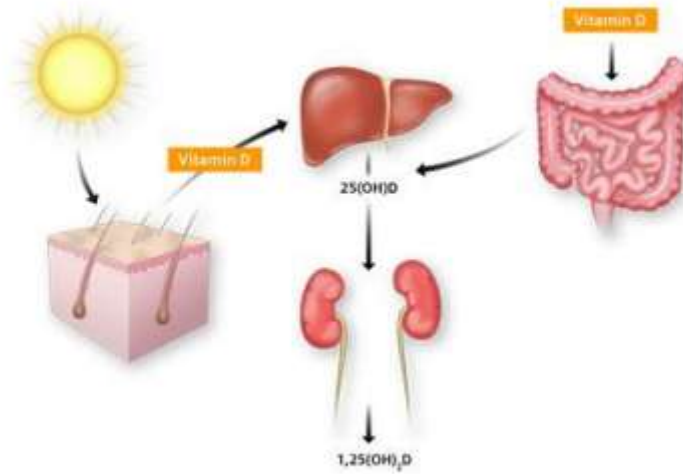
D vitaminleri hormon benzeri faaliyetleri olan bir grup sterolden oluşmaktadır. Yağda eriyen vitaminler arasındadır. D vitamini vücutta üretilmesi ve üretildiği yer dışında başka bölgelerde etki gösterebildiği için günümüzde bir hormon olarak tanımlanmaktadır. D vitaminin en önemli görevi kalsiyum ve fosforun plazma düzeylerini düzenlemektir (102).

### 1.5.1. D Vitamini Kaynakları

D vitamini diyetle alınmakta ve endojen olarak yapılabilmektedir. Bitkilerde bulunan ergokalsiferol (D2 vitamini) ve hayvanlarda bulunan kolekalsiferol (D3 vitamini) diyetle alınan D vitamini kaynaklarıdır. Kolesterolün sentezi sırasında metabolit olan 7-dehidrokolesterol endojen D vitamini öncülüdür. İnsanlarda güneş ışığı alan dermis ve epidermiste kolekalsiferole dönüşür. D vitamini sadece sınırlı güneş ışığına maruz kalan kişilerde diyetel bir gereksinimdir (102).

### 1.5.2. D Vitamini Metabolizması

D2 ve D3 vitaminleri biyolojik olarak inaktiflerdir. İki ardışık hidroksilasyon reaksiyonu ile vücutta aktif D vitaminine dönüştürülür. Dolaşımda D vitamini bir alfa globulin olan vitamin D bağlayıcı proteinle taşınmaktadır. Kolekalsiferol, vitamin D bağlayıcı protein ile karaciğere taşınmakta ve karaciğerde 25 hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksi kolekalsiferol (25-OHD3)'e dönüşmektedir.(25-OHD3) plazmada en fazla bulunan D vitamini olmakla birlikte başlıca depolanma formudur. 25-OHD3 böbreklerde 1 alfa hidroksilaz enzimi ile 1,25 dihidroksi kolekalsiferol (1,25(OH)2D3)'e dönüşmektedir. 1,25(OH)2D3 D vitaminin aktif şeklini oluşturur. Aşağıdaki şekilde D vitamini metabolizması görülmektedir.



Şekil 5. D vitamini metabolizması

Fazla aktif D vitamini varlığında 1 alfa hidroksilasyon azalmaktadır. 24 hidroksilaz enziminin salınımı artar. Böylece 24,25 dihidroksikolekalsiferol denilen inaktif form oluşmaktadır. Parathormon (PTH) ve düşük serum kalsiyum ve fosfor düzeyleri 1 alfa hidroksilasyonunu ve aktif D vitaminini arttırmaktadırlar. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) 23 aktif D vitamini yapımını azaltmakta ve 24 hidroksilaz enzimini aktive ederek 1,25(OH)2D3'ü inaktif formuna dönüştürmektedir (103). D vitamini reseptörleri intrasellüler reseptörlerdir ve birçok dokuda bulunurlar.

### **1.5.3. D Vitamininin Fonksiyonu**

1,25(OH)2D3'ün genel fonksiyonu yeterli plazma kalsiyum düzeyini devam ettirmektir. Bu fonksiyonu kemik, barsak ve böbrekler üzerinden etkileyip gösterir. 1,25(OH)2D3 kalsiyum ve fosforun barsaklardan emilimini arttırmaktadır. 1,25(OH)2D3 PTH sentez ve salınımını arttırıcı rol oynamaktadır. PTH varlığıyla kemikten kalsiyum ve fosfat serbestleşmesini uyarmaktadır. 1,25(OH)2D3 RANKL (nükleer faktör kappa-B ligand'ın reseptör aktivatörü) ekspresyonunu arttırır. RANKL proteoklastlarda RANK ile etkileşime girip proteoklastların osteoklastlara dönüşümü gerçekleştirir. Böylelikle kemik rezorpsiyonu artmaktadır (103).

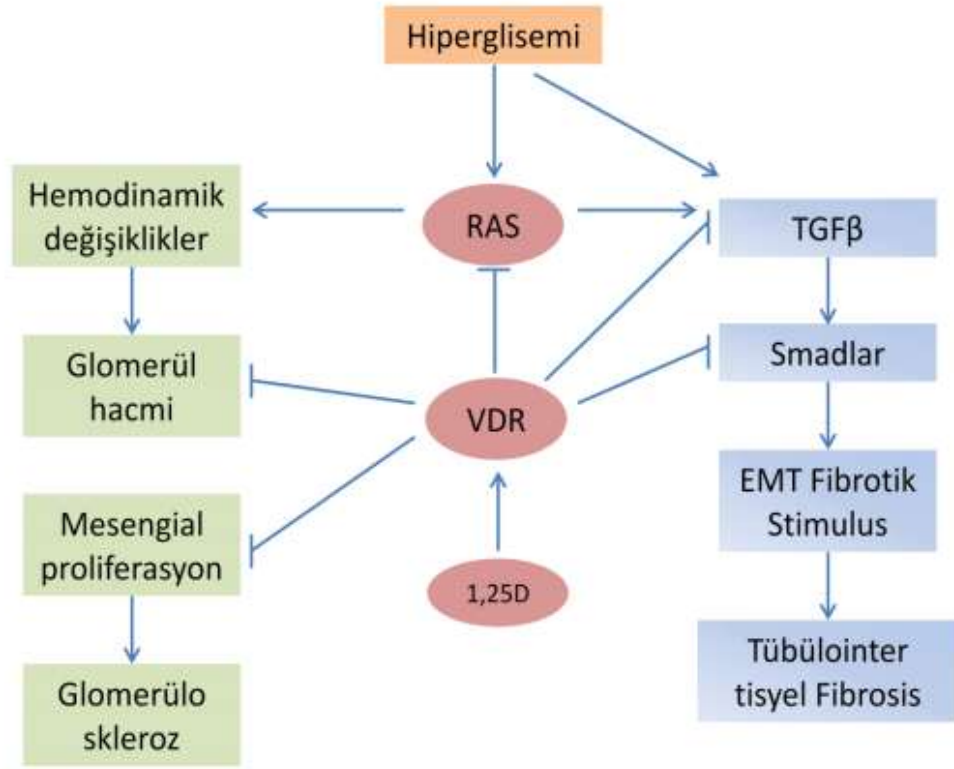
### **1.5.4. D Vitamini Düzeyleri**

Kişide D vitamini düzeyinin normal, eksik veya fazla olduğunu anlamak için 25OHD3 seviyesine bakılmalıdır. Çünkü 25OHD3 yarı ömrü 2-3 hafta olan dolaşımdaki formudur. 1,25(OH)2D3 ideal ölçüm için uygun değildir. Dolaşımdaki düzeyleri 25OHD3 ye göre 1000 kat daha düşük ve yarı ömrü 4 ile 6 saat arasındadır. Hastada vitamin D yetersizliği olursa barsaklardan kalsiyum emilimi azalır. Buna bağlı olarak iyonize kalsiyum azalmakla beraber PTH salınımı artmaktadır. PTH salınımının artışına bağlı olarak 1,25(OH)2D3 yapımı artar. Sonuç olarak kişide D vitamini eksikliği olmasına rağmen 1,25(OH)2D3 seviyeleri yüksek bulunur (103).

### **1.5.5. D Vitamini ve Diyabetik Nefropati**

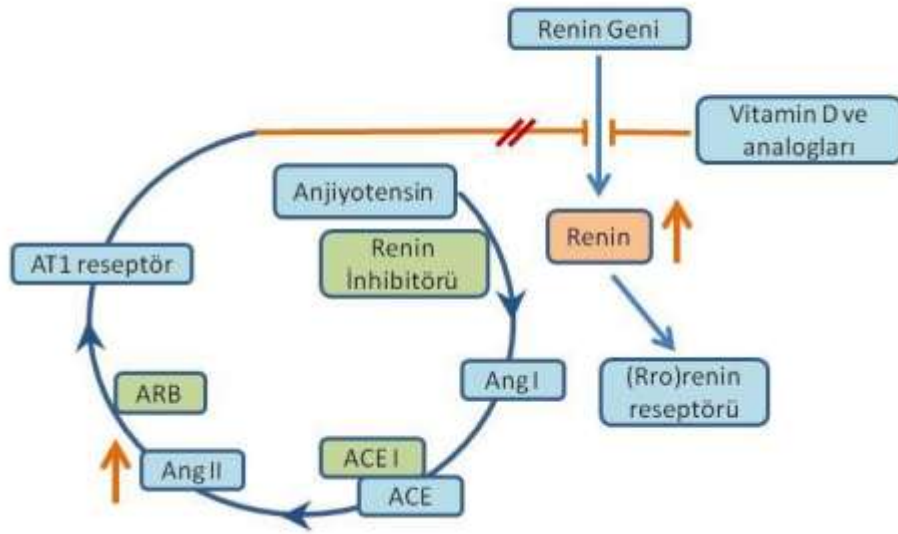
Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS) diyabetik nefropati patogeneğinde önemli bir rol oynar. RAS'ın aşırı aktivasyonunu renal ve kardiyovasküler hastalıklara neden olur.. Diyabetik farelerde intrarenal renin ve anjiyotensinojen seviyelerinde artış gözlenmektedir (104, 105). İntrarenal RAS'ın diabetes mellitusta hipergliseminin indüklediği böbrek hasarında anahtar görevi üstlendiği bilinmektedir (106). İn vitro çalışmalarda hipergliseminin mezengial hücreler ve podositlerde renin anjiyotensin

üretimini arttırdığı belirtilmiştir (107-109). Böbrekteki ANG II böbrekteki çoklu yolaklar ile glomerüler geçirgenliği artırarak, oksidatif stresi indükleyerek, proinflamatuvar ve profibrotik faktörlerin ve ekstrasellüler matriksin sentezini başlatarak, renal hasarın ilerlemesini sağlar (110, 111). Çeşitli epidemiyolojik ve klinik çalışmalar göstermektedir ki D vitamini eksikliği sonucu renal ve kardiyovasküler hastalıkların arttığı bilinmektedir. 1,25(OH)2D3 renin ve RAS'ın hız kısıtlayan enziminin ekspresyonunu azaltır, AGT azalmasına sebep olur. D vitamini eksikliği renin ekspresyonunda artışa ve RAS aktivasyonuna neden olur ki bu da renal hasarın sebebidir. D vitaminin RAS'ı baskılayıp renal ve kardiyovasküler sistemi koruyacağı tahmin edilmektedir. Vitamin D analogları renal ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedirler (112). Dolaşımdaki 1,25(OH)2D3 ile plazma renin aktivitesi arasındaki ilişki belirtilmiştir (113, 114). 1,25(OH)2D3 renin gen ekspresyonunun negatif endokrin düzenleyicisidir. VDR si olmayan farelerin böbreklerinde renin ekspresyonunda upregülasyon olması sebebiyle hiperreninemi gelişmiştir (115). Renin upregülasyonu plazma renin aktivitesinin artışı ve plazma ANG II düzeyinde artışla sonuçlanır. Yine VDR mutant farelerde (1 $\alpha$  hidroksilaz için gereken CYP27b1 eksik) hipertansiyon, hiperreninemi, ve kardiyak hipertrofi gelişmiştir. Bu bozukluklar sadece ACEİ ve ARB ile değil, beraberinde 1,25OHD3 verilmesi ile düzeltilmiştir (116). 1,25OHD3 sentezi inaktive edilmiş farelerde böbrekte renin ekspresyonu artmıştır. Öteki taraftan aktif D vitamini ile tedavi edilen farelerde renin ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır (106). Diyabetik VDR'si olmayan farelerde ciddi albüminüri, glomerüloskleroz gelişmektedir (116). Glomerül bazal mambranda kalınlaşma gözlenmiştir. VDR'si olmayan farelerde fibronektin artmış, nefrin azalmıştır. VDR'si olmayan farelerde renin, anjiotensin, TGF  $\beta$ 1, CTGF artmakta ve renal hasar oluşmaktadır. 1,25(OH)2D3 VDR ye bağlanır ve RAS aktivasyonunu ve dolayısıyla mezengial hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Fibrozisi TGF  $\beta$ 1'i indirekt olarak inaktive edip önler. 1,25(OH)2D3 glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrosisi azaltmaktadır (117). Şekilde diyabetik nefropati gelişiminde aktif D vitamininin etkilerini göstermektedir.



**Şekil 6. Diyabetik nefropati gelişiminde aktif D vitamininin etkileri (117)**

Diyabetik nefropatide kullanılan birinci grup ilaçlar ACEİ, ARB, renin inhibitörleri RAS'ı inaktive etmekte kullanılmaktadırlar. Bu ilaçlarla glomerülosklerozün ilerlemesinin, tübülointerstisyel fibrosisin ve proteinürinin azaldığı belirtilmiştir (36, 37, 118, 119) Bu ilaçlarda görülen ana problem kompensatuar renin artışına sebep olmaktadır (120). Renin aktivitesinin düzeyindeki artış anjiyotensin (ANG) I ve ANG II seviyelerinde artış olmakta bu da dolaylı olarak RAS inhibisyonunun etkinliğinde azalmaya neden olmaktadır. ACEİ alan hastalarda başlangıçta daha düşük ANG II düzeyleri olmasına rağmen ilerleyen dönemde çoğu zaman ANG II düzeylerinin bazal seviyeye ulaştığı görülmektedir (121, 122). Renin üretimindeki negatif feed back inhibisyondaki aksama renin üretiminde artışa sebep olur. Bu sorun ARB'ler ve aliskirende de görülmektedir (123). 1,25(OH)<sub>2</sub>D renin gen ekspresyonunun negatif endokrin düzenleyicisidir. (115). Şekilde kompensatuar renin artışı ve D vitamin tarafından inhibisyonu görülmektedir.



**Şekil 7. Kompansatuar renin artışı ve D vitamini tarafından inhibisyonu (112).**

Renin ve prorenin ile mezengial hücredeki reseptörler uyarılınca profibrotik bir faktör olan TGF  $\beta$  sentezi oluşur (124). Dolaşımda yüksek prorenin olan farelerde düşük kan basıncı olmasına rağmen vasküler hasar ve diyabetik renal komplikasyonların geliştiği görülmüştür (125). Kronik böbrek hastalığı olan hastalarda yapılan tetkiklerde daha düşük kalsitriol konsantrasyonlarının diyabet, yüksek idrar albümin/kreatinin seviyeleri ve düşük GFR ile yüksek oranda korele olduğu gösterilmiştir (123). Preklinik modellerde vitamin D'nin selektif aktivatörü olan paracalcitol ile albüminüri azaltılmış, kronik böbrek hastalığına ilerleyiş yavaşlatılmış ve serum elektrolitlerinde minimal farklılık gösterilmiştir (113, 114). Diyabetik nefropatide paracalcitol ve ARB kombinasyonu ile renal renin ekspresyonunda azalma ile glomerüler filtrasyon bariyerinin yapısında korunma, albüminüri gelişimi ve glomerülosklerozda azalma saptanmıştır (126). Evre 2-3 kronik böbrek hastalarında paracalcitol alan grupta plasebo alan gruba göre proteinüride belirgin bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (127). Sonuç olarak 1,25(OH)2D3 RAS'ın negatif endokrin kontrolünde anahtar görevi üstlenir. Kronik hiperglisemi diyabetik nefropati patogenezinde ana rol oynar. D vitamini insülin sekresyonu ve insülin duyarlılığı üzerine etkileri bilinmektedir. D vitamini alfa hücreleri beta hücrelerine oranla daha fazla etkiler (128, 129). D vitamini glukoz uyarımına cevap olarak insülin sekresyonunu arttırarak etkiler. D vitamini eksikliği

olan farelerde insülin sekresyonunun seviyesinin azaldığı (130) ve D vitaminin tek doz subkutan enjeksiyonundan sonra bozulmuş glukoz toleransının ve insülin sekresyonunun önemli ölçüde düzeldiği gösterilmiştir (131). İnsülin sekresyonu ve sentezi üzerinde D vitaminin etkisi kalsiyum seviyesinden bağımsız bulunmaktadır (132). Sistemik inflamasyon insülin direnciyle ilişkili bulunmuştur (133). Obezite ve tip 2 diyabet inflamatuvar reaksiyonu arttırmaktadır (133). D vitamini insülin direncini immünmodülatuar ve anti inflamatuvar etkilerle azaltmaktadır. Vitamin D eksikliği sıklıkla obezite ve tip 2 diyabetle alakalıdır (134, 135). D vitamini eksikliği olan obez kişilerde parathormon düzeylerinde artış görülmüştür (136, 137). PTH seviyelerinde artış insülin duyarlılığını azaltabilmektedir (138, 139).

Hiperparatiroidizm insülin duyarlılığında azalmayla ve bozulmuş glukoz toleransında ve diyabet prevalansında artışla alakalıdır. D vitamini eksikliği olan BGT ve DM'li hastalara D vitamini takviyesi yapılması ile insülin sekresyonu, glukoz toleransı ve HbA1c değerlerinde iyileşme saptanmıştır (138, 140). Çalışmalarda HbA1c'deki düzelmelerin mikroalüminüri seviyesini azalttığı gösterilmiştir (28, 141).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 26.08.2015 tarih ve 145 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı.

### 2.1. Deney Hayvanları Ve Beslenmeleri

Deneysel çalışmada kullanılan 35 adet 8-10 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında buldukları ortamın sıcaklığı 22–25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00- 07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek addlibitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerin terkibi Tablo 4'de gösterildi.

**Tablo 4. Deney Hayvanlarına Verilen Sıçan Yeminin Terkibi**

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 D<sub>3</sub>, 12 mg E, 0,8 mg K<sub>3</sub>, 0,8 mg B<sub>1</sub>, 2,4 mg B<sub>2</sub>, 1,2 mg B<sub>6</sub>, 0,006 mg B<sub>12</sub> vitaminleri, 16 mg Nicotinamid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg CholinChloride, 20 mg ZincBacitracin, 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

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 14 adet sıçanda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal (i.p) olarak 0,4 ml (0,1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4,5) çözdürülerek tek doz uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu > 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar, diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile yapıldı. Sıçanların açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 8-10 arasında alındı.

## 2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen 8-12 haftalık 35 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 eşit gruba ayrıldı;

**Grup I (Kontrol grubu);** Deney süresi olan 8 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Deney başlangıcı ve sonunda açlık glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

**Grup II (Tampon grubu);** Tek doz 0.1 M sodyum sitrat tamponu i.p uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

**Grup III (Vitamin D grubu);** 8 haftalık deney süresi boyunca her gün Vitamin D 50IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda düzenli bir şekilde glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

**Grup IV (Diyabetik grup);** 50mg/kg olacak şekilde tek doz streptozotosin (STZ) 0.1 M sodyum sitrat tamponunda (Ph:4.5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilip, deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

**Grup V (Diyabet + Vitamin D grubu);** 50mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tampon (Ph:4.5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün Vitamin D 50 IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

## **2.4. Örneklerin Alınması**

Tüm gruplardaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların böbrek dokuları hızla çıkarıldı. Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokuları biyokimyasal çalışma için -80C°'de saklandı. Histolojik çalışma için ise % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

## **2.5. Biyokimyasal Çalışma**

### **2.5.1. Kan glukoz düzeyleri**

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (Glucostix, Myles, Ekhart, IN) ile ölçüldü.

### **2.5.2. Total Antioxydant Status (TAS) ve Total Oxydant Status (TOS) ölçümü**

TAS ve TOS ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan total antioksidan aktivite ve total oksidan aktivite metodu kullanılarak yapıldı. Ölçümün sonuçları  $\mu\text{mol/l}$  olarak birimlendirilmiştir.

## **2.6. TUNEL Metodu**

Parafin bloklardan 5-6  $\mu\text{m}$  kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase InSitu Apoptosis Detection Kit (Chemicon, catno: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphatebufferedsaline (PBS) ile yıkandı. 0.05%'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojenperoksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogenperoxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika EquilibrationBuffer ile inkübe edilip, 37° C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70  $\mu\text{l}$  ReactionBuffer+%30 TdTEzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/WashBuffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda

incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5. TUNEL Boyama Prosedürü**

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6 1:500 d ilüsyondakiProtinaz 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 ReactionBuffer + %30 TdTEnzyme )	60 dakika
37°C'de	
12 Stop/WashBuffer ( 2ml ) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB DilutionBuffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilin	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.	.....

## 2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme

Böbrek dokusunda MMP-9 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 6).

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Endojenperoksidaz aktivitesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi.

Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigenretrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, LabVision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikor (RabbitMMP9antibody, BS-039R, Biossantibodies, USA)ile 60 dakika inkübe edildi.Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biotinylatedGoat Anti-Poliyvalent (anti-mouse/rabbitIgG), TP-125-BN, LabVision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi.

Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline Phosphatase (TS-060-AP, LabVision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübeedildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara FastRedSubstrateSystem (TA-125-AF, LabVision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayer'shematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume VisionMount, TA-125-UG, LabVision Corporation, USA) ile kapatıldı. Pozitif kontrol için, meme dokusu ile karşılaştırıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <25, 0.4:26-50, 0.6:51-75, 0.9:76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. (Histoskor= yaygınlık x şiddet). (Tablo 9)

**Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü**

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	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 (PhosphateBufferedSaline)	3X5 dakika
11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin Alkaline Phosphatase	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	Fast Red Substrate	5 dakika
21	Distilesu	5 dakika
22	Zıt boyaolarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

### 2.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve PosthocTukey testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait başlangıç ve final kan glukoz değerleri Tablo 7’de özetlenmiştir.

**Tablo 7. Deney Hayvanlarının Başlangıç ve Final Kan Glukoz Değerleri**

GRUP	Başlangıç Kan Glukoz Değerleri (mg/dl)	Final Kan Glukoz Değerleri (mg/dl)
<b>Kontrol</b>	111,66±11,16	113,33±15,73
<b>Tampon</b>	107,33±10,87	102,16±12,15
<b>Vitamin D</b>	111,83±9,78	105,25±19,67
<b>Diyabet</b>	102,50±9,13	406,75±18,90 <sup>a</sup>
<b>Diyabet+Vitamin D</b>	113,83±8,84	398,25±36,87 <sup>a</sup>

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

#### 3.2.TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği böbrekte tübül hücrelerinde (siyah ok) gözlemlendi.

TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 8), Tampon (Şekil 9) ve Vitamin D (Şekil 10) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 11) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu (p<0.05). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği Diyabet+Vitamin D grubunda (Şekil belirgin olarak azalmıştı (p<0.05). Glomerül (G). Tablo 8.Apoptotik indeks

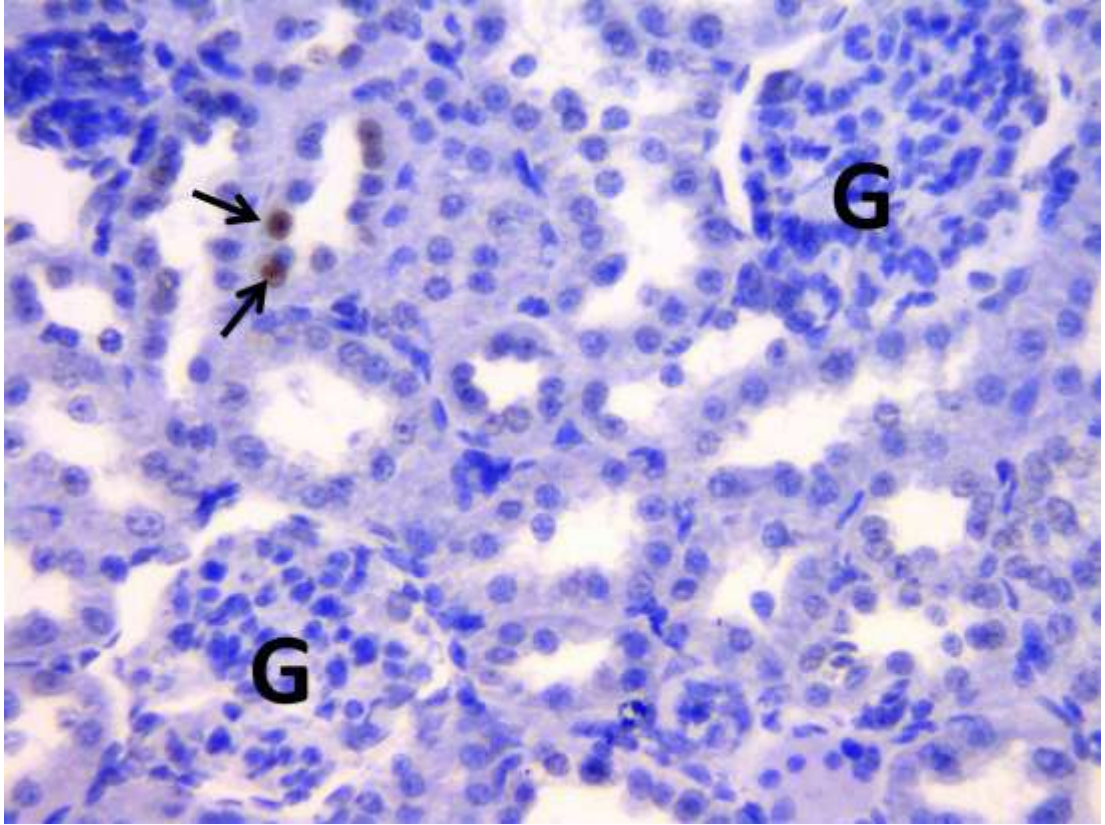
**Tablo 8. Apoptotik indeks (%)**

GRUP	Apoptotik indeks (%)
Kontrol	1,75±0,95
Tampon	2,25±1,25
Vitamin D	1,33±0,51
Diyabet	11,60±2,07 <sup>a</sup>
Diyabet+Vitamin D	5,50±1,30 <sup>ab</sup>

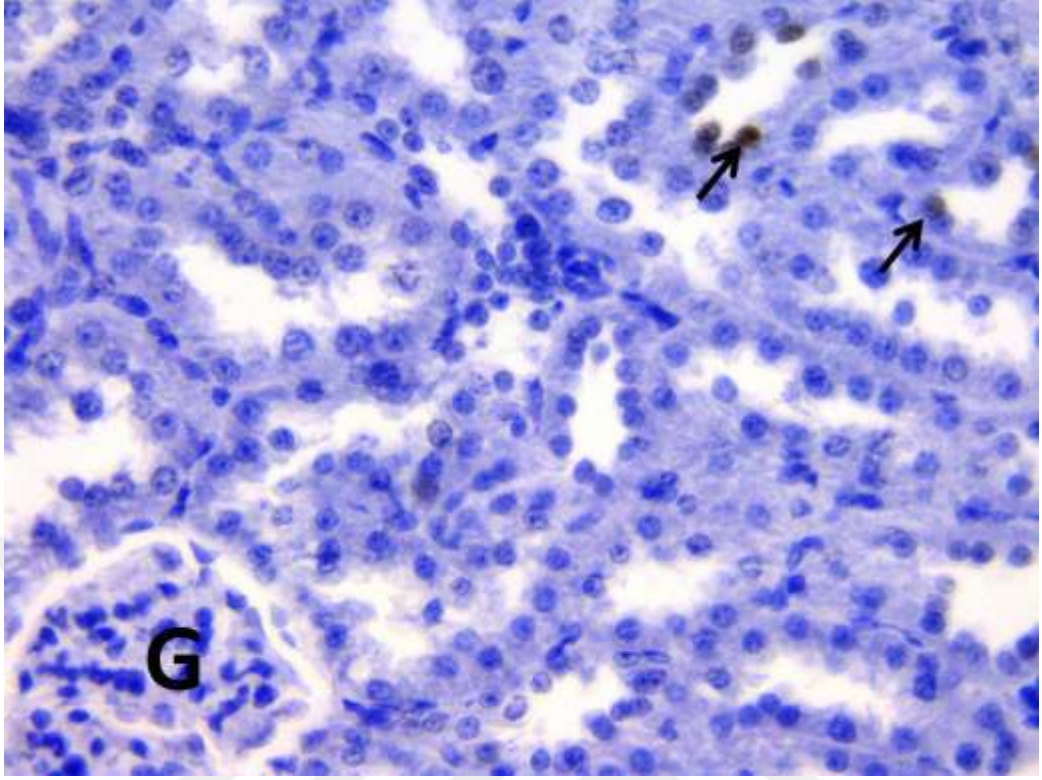
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup>Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

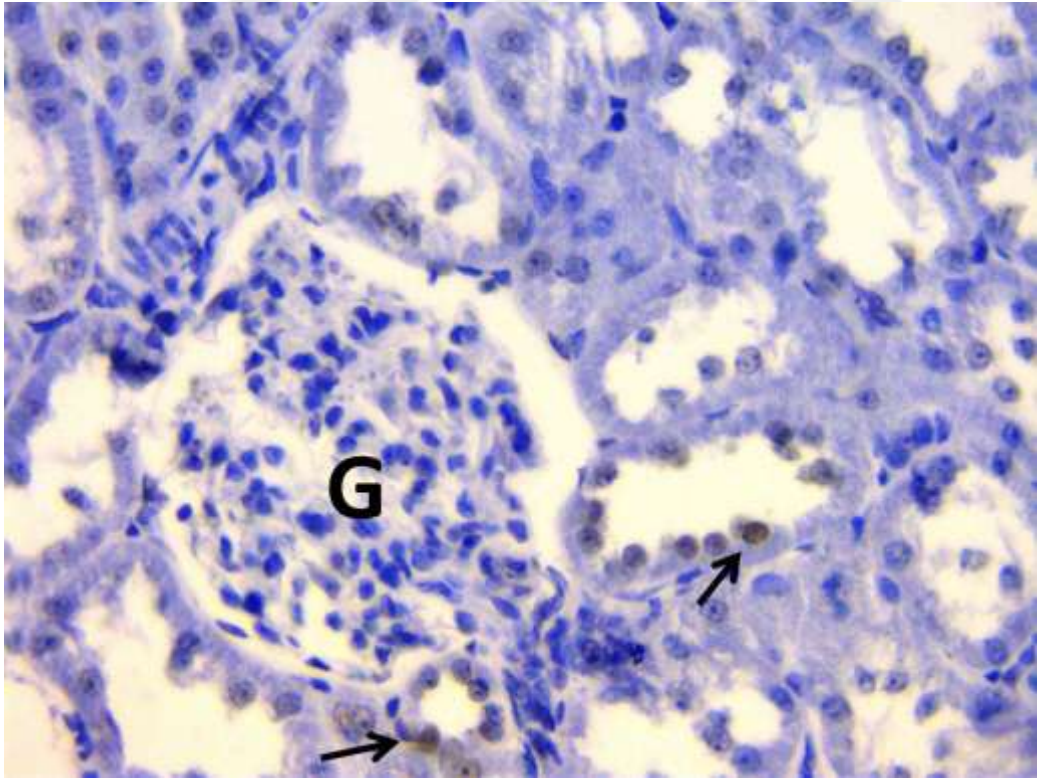
<sup>b</sup>Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05).



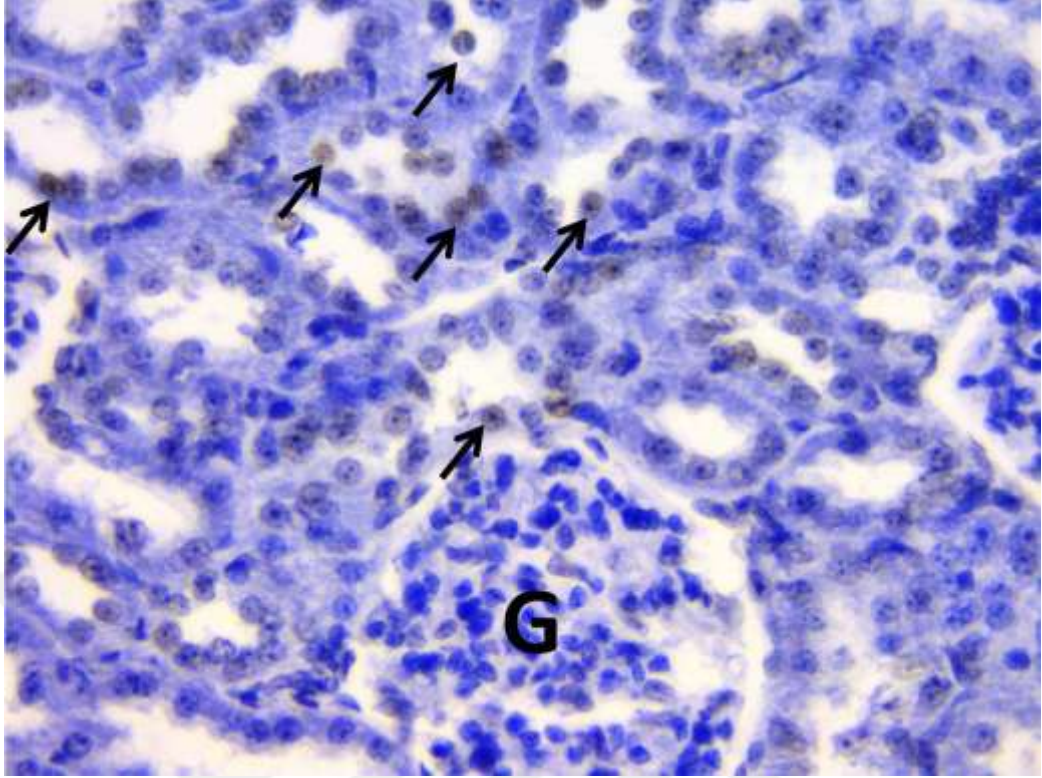
**Şekil 8. Kontrol Gurubu TUNEL Pozitifliği**



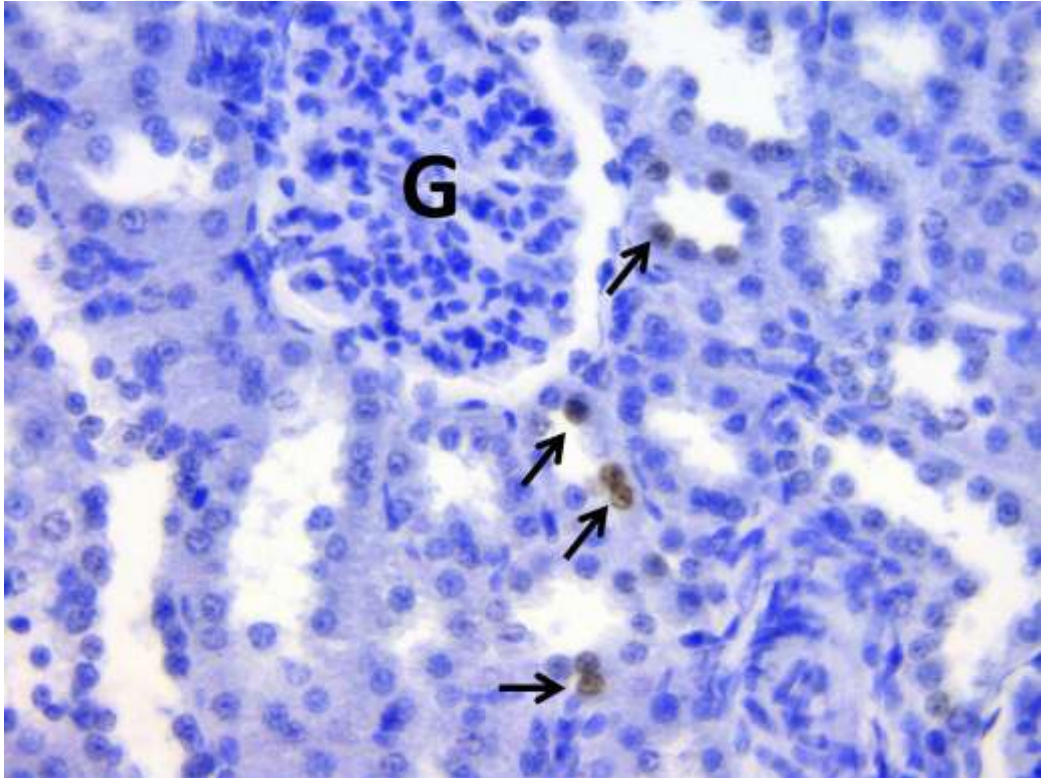
**Şekil 9. Tampon Gurubu TUNEL Pozitifliği**



**Şekil 10. Vitamin D Gurubu TUNEL Pozitifliği**



**Şekil 11. Diyabet Grubu TUNEL Pozitifliği**



**Şekil 12. Diyabet + Vitamin D Grubu TUNEL Pozitifliği**

### 3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular (MMP-9 İmmünreaktivitesi)

Matriks metalproteinaz 9 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; MMP 9 immünreaktivitesi böbrek dokusunda tübül hücrelerinin sitoplazmalarında (siyah ok) gözlemlendi.

Böbrek dokusunda MMP 9 immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 13), Tampon (Şekil 14) ve Vitamin D (Şekil 15) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 16) grubunda MMP 9 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ( $p<0.05$ ). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D (Şekil 17) grubunda bir değişiklik izlenmedi. Glomerül (G).Tablo x.MMP 9 histoskor

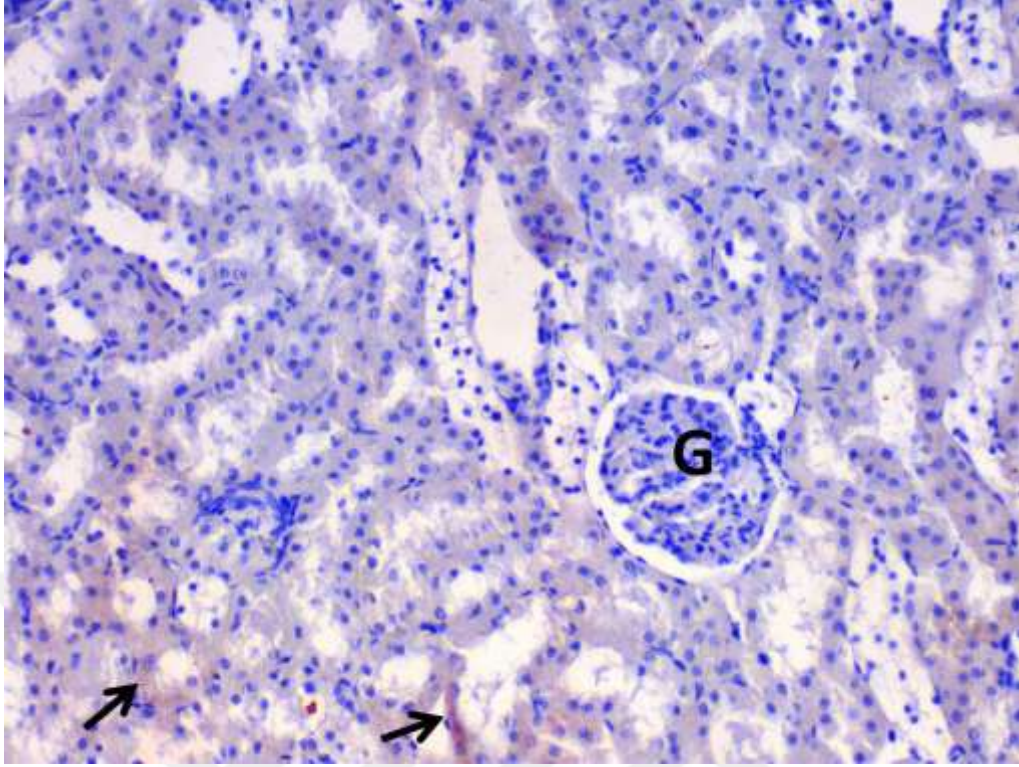
**Tablo 9. MMP 9 histoskor**

GRUP	Histoskor
Kontrol	0,36±0,07
Tampon	0,40±0,08
Vitamin D	0,33±0,20
Diyabet	2,25±0,52 <sup>a</sup>
Diyabet+Vitamin D	2,40±0,51 <sup>a</sup>

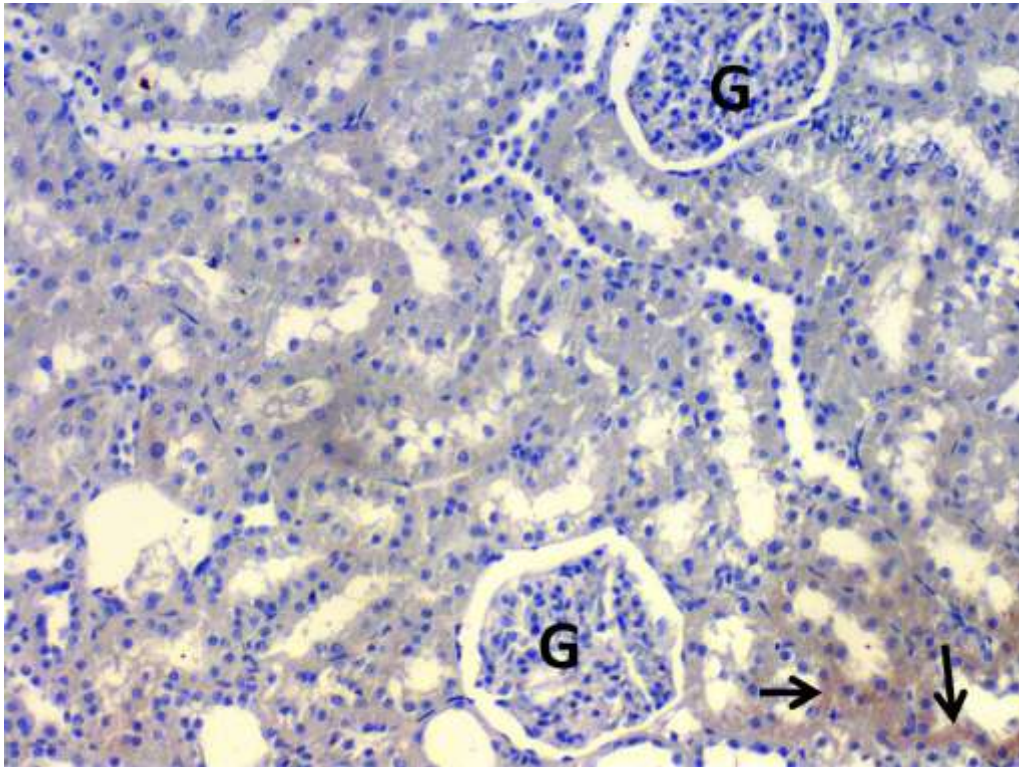
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

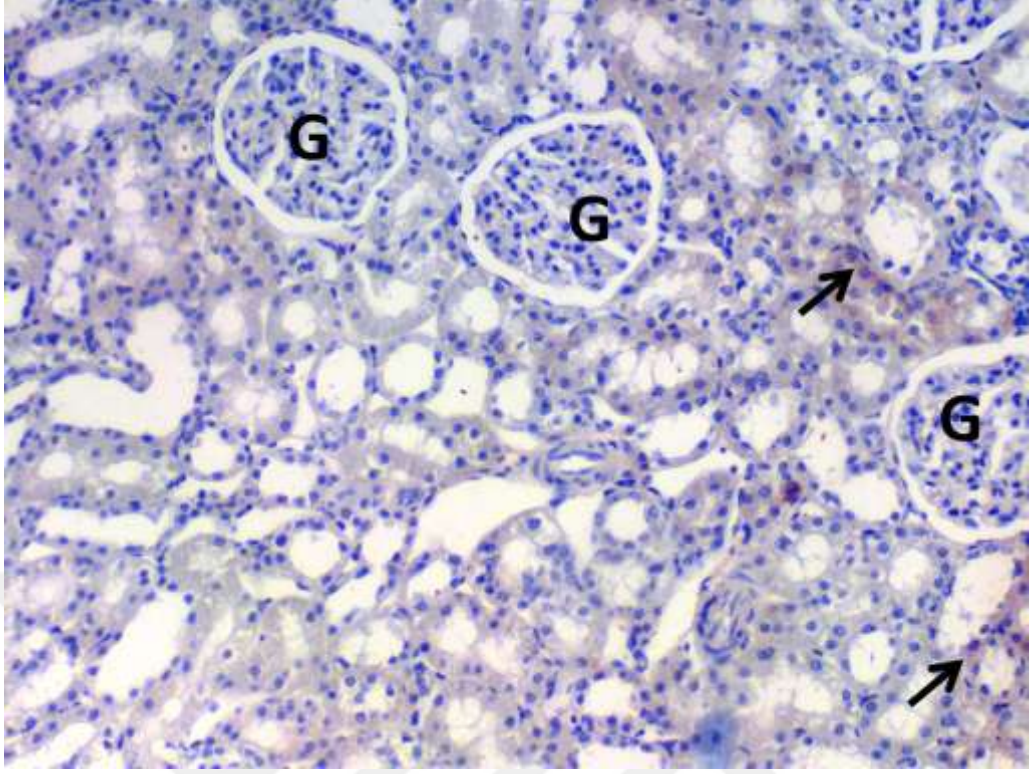
<sup>b</sup> Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).



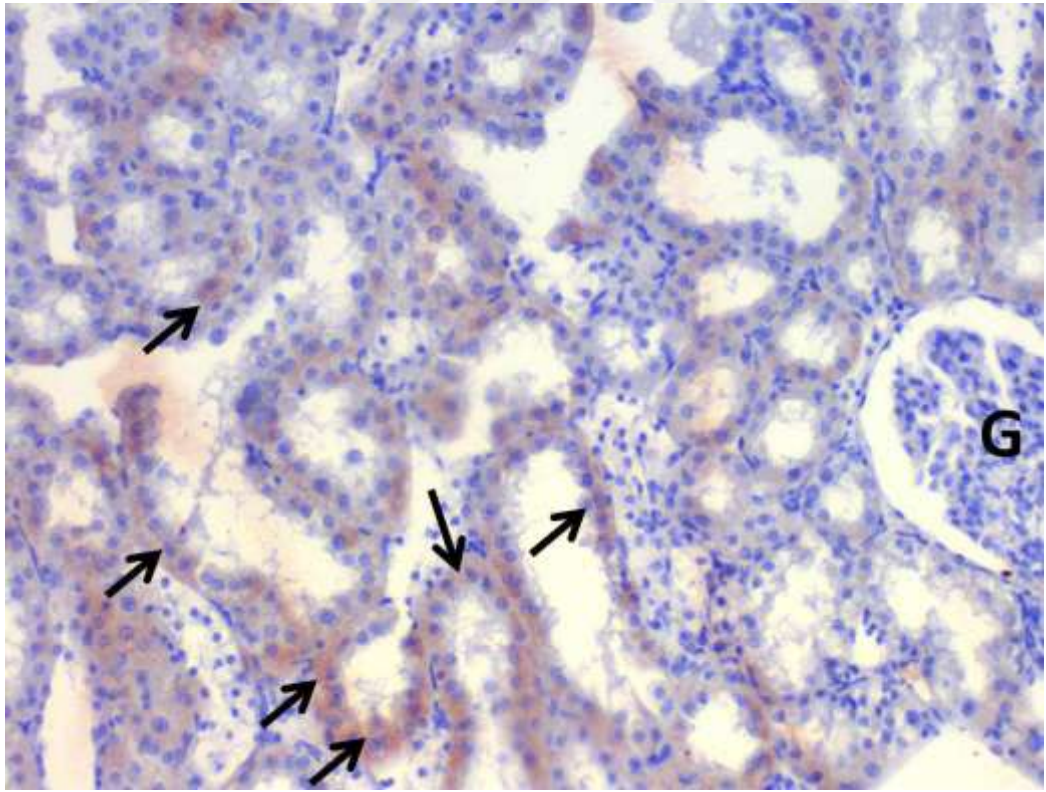
**Şekil 13. Kontrol Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi**



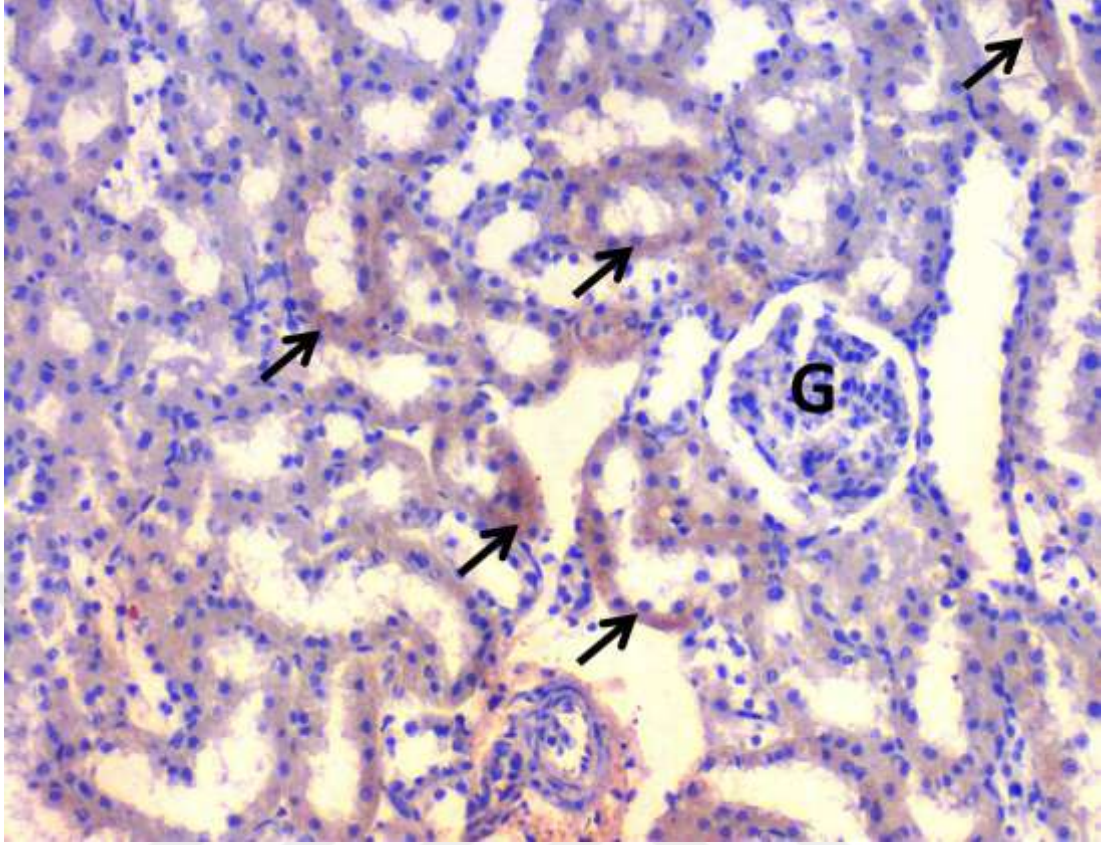
**Şekil 14. Tampon Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi**



**Şekil 15. Vitamin D Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi**



**Şekil 16. Diyabet Grubu MMP-9 İmmünreaktivitesi**



**Şekil 17. Diyabet+Vitamin D Gurubu MMP-9 İmmünreaktivitesi**

### **3.4. TAS - TOS Bulgular**

#### **TOS;**

Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokularında TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TOS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ( $p<0.05$ ). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TOS düzeyleri Diyabet+ Vitamin D grubunda belirgin olarak azalmıştı ( $p<0.05$ ). Tablo 10. TOS düzeyleri

**Tablo 10.TOS düzeyleri**

GRUP	Serum TOS( $\mu\text{mol/L}$ )	Böbrek dokusu TOS( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Kontrol</b>	157,66 $\pm$ 21,77	174,66 $\pm$ 10,69
<b>Tampon</b>	154,33 $\pm$ 8,62	171,66 $\pm$ 2,51
<b>Vitamin D</b>	152,40 $\pm$ 19,41	153,00 $\pm$ 14,30
<b>Diyabet</b>	268,33 $\pm$ 44,92 <sup>a</sup>	323,25 $\pm$ 31,15 <sup>a</sup>
<b>Diyabet+Vitamin D</b>	188,40 $\pm$ 8,53 <sup>b</sup>	268,75 $\pm$ 32,06 <sup>ab</sup>

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

### TAS;

Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokularında TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TAS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ( $p<0.05$ ). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TAS düzeyleri Diyabet+ Vitamin D grubunda belirgin olarak artmıştı ( $p<0.05$ ). Tablo 11. TAS düzeyleri

**Tablo 11.TAS düzeyleri**

GRUP	Serum TAS( $\mu\text{mol/L}$ )	Böbrekdokusu TAS( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Kontrol</b>	286,33 $\pm$ 12,22	305,66 $\pm$ 7,23
<b>Tampon</b>	294,33 $\pm$ 11,50	301,33 $\pm$ 3,78
<b>Vitamin D</b>	285,20 $\pm$ 19,22	304,50 $\pm$ 7,93
<b>Diyabet</b>	255,20 $\pm$ 14,92 <sup>a</sup>	267,25 $\pm$ 3,59 <sup>a</sup>
<b>Diyabet+Vitamin D</b>	273,00 $\pm$ 6,37 <sup>b</sup>	298,25 $\pm$ 10,71 <sup>b</sup>

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

#### 4. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan meydana gelen, özellikle hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik, metabolik bir hastalıktır (1).

İnsanların fiziksel aktivitelerinin azalması ve obezitenin artması ile DM insidansı ve prevalansında ciddi bir artış olmuştur (142). DM, metabolik anormalliklerin görüldüğü, gelişen ve sanayileşen ülkelerde morbidite ve mortaliteye neden olan bir hastalıktır (143). DM'un uzun dönem komplikasyonlarının neden olduğu morbidite ve mortalite; kapiller bazal membran kalınlaşmasıyla birlikte olan mikrovasküler hastalık, hızlanmış arteriol sklerozu ile birlikte görülen makrovasküler hastalık, somatik ve otonom sinir sisteminin ikisini de içeren nöropati, kas zayıflığı ile birlikte görülen nöromusküler disfonksiyon ve enfeksiyonlara direncin azalması ile karakterizedir. Böyle kronik komplikasyonlar göz, böbrek, kalp, sinir ve kan damarlarını etkilerler (144).

Tip 1 DM ve Tip 2 DM'nin rölatif olarak en sık görülen mikrovasküler komplikasyonu diyabetik nefropatidir. Diyabetik nefropati, diyabete bağlı mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenidir. Gelişmiş ülkelerde her yıl ilk kez renalreplasman tedavisine başlayan hastaların üçte birinde tanı diyabetik nefropatidir. Yine bu ülkelerde son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) nedeniyle ilk kez diyalize giren hastaların yaklaşık % 50'sinde etyoloji DM'dir (145).

Vitamin D önemli bir metabolittir. Vitamin D kanda insülin seviyesinin regülasyonunda önemli rol oynar, şeker metabolizmasını destekler. Vitamin D güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, ve immunomodülatör etki göstermektedir (146). Ayrıca Vitamin D3'ün geçtiğimiz on yılda antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (147).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) çinko bağımlı matriks parçalayıcı enzimlerden oluşan geniş bir aile olup ekstrasellüler matriksin parçalanması ve dönüşümünde önemli rol oynar. İçerdikleri substratlara göre çeşitli alt gruplardan oluşur. Jelatinaz alt grupları, MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B)'dir.

Jelatinazlar için klasik substratlar; tip IV, V, VII, X, XI kollajenler, elastin, fibronektin, laminin ve proteoglikanlardan oluşur. Bu substratların önemi, hepsinin de glomeruler bazal membranın komponentinin bir parçasından oluşmasından kaynaklanmaktadır (148).

Sakamaki ve ark. (149) yaptığı çalışmada, adriamisin non-immün yolla glomeruler hasar modelinde, glomeruloskleroz ve albüminürinin artışında MMP-9 ve MMP-13'in rolü olduğunu göstermişlerdir. Bu da, spesifik MMP inhibitörlerinin geliştirilmesinin, glomerulosklerozun iyileştirilmesinde yeni tedavi imkanı sağlayabileceğini belirtmektedir.

Bu çalışmada deneysel diyabetik sıçan böbrek dokusunda matriks metalloproteinaz-9 ve apoptozis üzerine vitamin D'nin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, ilk olarak tüm gruplara ait serum ve böbrek dokularında TAS ve TOS değerlerine bakılmıştır. TOS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS düzeyleri belirgin bir şekilde artmıştı. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TOS düzeyleri Diyabet + Vitamin D grubunda anlamlı olarak azalmıştı.

Total antioksidant status (TAS) düzeyleri ise Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TAS düzeyleri Diyabet + Vitamin D grubunda belirgin olarak artmıştı.

Çalışmamızdaki TAS ve TOS düzeyleri literatür bilgileri ile uyum göstermektedir.

Oksidatif stres; herhangi bir nedenle oksidan üretiminde artış ve antioksidan savunma mekanizmasında yetersizlik sebebiyle aradaki dengenin bozulmasıyla oluşan doku hasarı olarak tanımlanır (40). DM, ROS (reaktif oksijen türleri)'nin üretiminde artış, antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği ve sonuç olarak belirgin artan oksidatif stresle ilişkilidir (45). Erken ve ark. (150) ile Akkoc ve ark. (151) yaptıkları çalışmalarında diyabete bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonların oluşmasında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir.

Diyabete bağlı gelişen oksidatif strese ortaya çıkan serbest radikaller süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksittir. Yapılan birçok çalışmada diyabete bağlı gelişen komplikasyonlar ile lipid peroksidasyonu arasında belirgin bir ilişki gösterilmesinden dolayı lipid peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir (152).

Çalışmamızda Vitamin D verdiğimiz tedavi grubundaki TOS değerlerindeki azalma önceki çalışmalara paralellik göstermekteydi (147). Gürel ve ark ise yaptıkları çalışmalarında tedavi olarak verdikleri Vitamin D'nin MDA değerlerini belirgin olarak azalttığını ve antioksidan etki gösterdiğini belirtmişlerdir (153).

Deneyssel diyabetik böbrek dokusunda artmış apoptozis daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (154-156).

Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulmakta, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girmektedir. Kalsiyumun hücre içinde artması sonucu proteazlar aktive olmakta ve hücre iskeletinde hasar meydana gelmektedir. Kalsiyum endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına sebep olur. Oksidatif strese bağlı olarak kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişir. Bu değişiklik mitokondriyumlarda ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi programlı ölüme yani apoptozise sürükler (48, 157).

Çalışmamızda TUNEL boyamasının sonucunda; STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların böbrek dokularındaki apoptotik hücrelerde kontrole göre anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Tedavi olarak Vitamin D verdiğimiz grupta ise diyabetik gruba göre belirgin bir azalma olduğu izlenmiştir. Tedavi grubunda azalan apoptotik hücre sayısı Vitamin D'nin TAS ve TOS düzeylerinde yapmış olduğu değişikliklere yani antioksidan etkisine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Zira Vitamin D ve metabolitlerinin hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozisi kontrol ettiği, malign hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini engellediği bilinmektedir. Ayrıca kemik ve kalsiyumun metabolizmasına seçici olarak etki edip immün sistemin regülasyonunda de önemli rol oynamaktadır (158).

Çalışmamızda MMP-9 değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Diyabet grubunda belirgin olarak artmıştı. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet + Vitamin D grubunda bir değişiklik izlenmedi. Yapılan deneyssel ve klinik çalışmalar MMP aktivitesindeki artışın glomerüler hasarla korele olduğunu göstermiştir (159).

Diyabetik nefropatinin gelişiminde ekstraselüermatriks bozukluklarının önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte diyabetik nefropati oluşumunda MMP-9 ile ilişkili olabileceği söylenmiştir (160).

Diyabetik nefropatinin oluşumu ile ilgili kompleks mekanizmalar halen tam olarak anlaşılmış değildir. Bununla birlikte hipergliseminin neden olduğu ekstraselüler matriks birikimi ile ileri glikolizasyon ürünlerinin nefropati patogenezinde ilişkili olduğu bildirilmiştir (161).

Diyabette matriks metalloproteinazların bozukluğu ve metalloproteinazların doku inhibitörleri ekstraselüler matriks bozukluklarının kilit noktasıdır (162). Schaefer ve ark. (163) diyabetik nefropati gelişimi ile MMP 9 disfonksiyonun bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte Nakamura ve ark. ise MMP-9'un nefropati patogenezinde nasıl oynadığının halen tam olarak aydınlatılmadığını söylemişlerdir (164).

MMP-9 artmış ekspresyonu, diyabetik nefropati gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini için MMP-9 ekspresyonunu veya aktivitesinin bloke edilmesi halinde diyabetik nefropatinin gelişmesini önleyebilir olduğu anlaşılmaktadır (165).

Birçok çalışmada diyabetik hastaların serum ve idrarlarında MMP-9 artışı gösterilmiştir (166-168). Bununla birlikte Tashiro ve ark. (99) ise albuminüri ile idrar MMP 9 arasında bir koreleasyonun olduğunu bildirmişlerdir.

Matriks metalloproteinazlar için keşfedilen ilginç rollerinden biride, hücre çoğalmasının ve apoptozun düzenlenmesine birlikte yer almasıdır (169, 170).

Çalışmamızdaki diyabetik grupta artan MMP-9 ve apoptozis bu literatür bilgileri ile uygunluk içinde olduğu görülmüştür. Ayrıca diyabetik böbrek dokusunda oluşan apoptozisin sadece oksidatif hasarla değil aynı zamanda MMP 9 aracılığıyla oluştuğu söylenebilir.

Bununla birlikte Fu ve ark. (171) MMP-9 ile oksidatif stres arasında ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Fakat renal patolojide rol oynayıcı mekanizmalarda rolü olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (172).

Çalışmamızda tedavi grubumuz olan Diyabet+ Vitamin D grubunda MMP-9 değerlerinin diyabetik grupla benzer olması oksidatif stres ile MMP-9 arasında bir koreleasyon olmadığı anlamına gelebilir. Zira vitamin D, TAS değerini arttırıp TOS düzeyini azalttığı çalışmamızda gösterilmiştir.

Sonuç olarak; deneysel diyabetin TOS, MMP 9 ve apoptotik hücreleri arttırdığı, tedavi olarak verilen vitamin D'nin TOS ve apoptotik hücreleri azaltmasına rağmen MMP 9 düzeylerini etkilemediği, diyabetik nefropati patogenezinde oksidatif stres ile MMP-9 arasında ilişkinin tam olarak aydınlatılabilmesi için gelecekte farklı yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ve diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla vitamin D ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının denenebileceği kanaatine varılmıştır.



## 5. KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2001: 237-243.
2. Foster DW. Diabetes Mellitus. In Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, et al. (eds), Harrison's Principle of Internal Medicine. 14. edition. New York, Mc Graw Hill Companies 1998: 2: 2060-2080.
3. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik. Birinci Baskı. Ankara, Medical Network & Nobel, 1996: 368-385.
4. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston 2005: 331-338.
5. Özata M, Yöner A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet, 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006: 275-277, 321-323,359.
6. Gren A, Hirsch NC. The changing world demography of type 2 Diyabetes. Diyabetes Metab Res Rev 2003; 19: 3-7.
7. Satman I, Yılmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of Diyabetes and risk characteristics in Turkey: Results of the Turkish Diyabetes Epidemiology Study (TURDEP). Diyabetes Care 2002; 25 (9): 1551- 1556.
8. Diyabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diyabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2016.
9. Diyabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu 2015.
10. Himsworth HP. Diyabetes Mellitus: Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. Lancet 1936; 5864(227): 127– 130.
11. American Diyabetes Association Diagnosis and Classification of diyabetes mellitus. Diyabetes Care January 2014; 1(37): 81-90.
12. American Diyabetes Association Classification and diagnosis of diyabetes. Diyabetes Care. 2015; 1(38): 8-16.
13. American Diyabetes Association Standards of medical can for patients with diyabetes mellitus. Diyabetes Care 2003; 26: 33- 50.
14. 5. American Diyabetes Association Standards of medical care in diyabetes. Diyabetes care 2014; 1(37): 14- 80.
15. 23. Diyabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2013.

16. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Renal Pathology S: Pathologic classification of diabetic nephropathy. *JASN* 2010; 21: 556- 563.
17. Rheinberger M, Boger CA. Diabetic nephropathy: new insights into diagnosis, prevention and treatment. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2014; 139(18): 704-706.
18. Tripathi YB, Yadav D: Diabetic nephropathy: causes and managements. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 2013; 7: 57- 64.
19. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes care* 2005; 28: 164- 176.
20. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1127- 1133.
21. Lewis JB. Diabetic nephropathy in patients with type II diabetes. *Geriatric Nephrology and Urology* 1999; 9: 167- 175.
22. Jacobsen P, Rossing P, Tarnow L, Hovind P, Parving HH. Birth weight-a risk factor for progression in diabetic nephropathy? *Journal of Internal Medicine* 2003; 253: 343-350.
23. Ritz E, Stefanski A. Diabetic nephropathy in type II diabetes. *American journal of kidney diseases. the official journal of the National Kidney Foundation* 1996; 27(2): 167- 194.
24. Grzeszczak W, Zukowska-Szczechowska E. Diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej* 1999; 102: 45-59.
25. Garg JP, Bakris GL. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. *Vascular medicine* 2002; 7: 35- 43.
26. Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A, Eckfeldt JH, et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 2014; 37: 226- 234.
27. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352: 854- 865.
28. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of

- complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853.
29. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359: 1577- 1589.
  30. Group AC, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Travert F, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358: 2560- 2572.
  31. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Investigators V: Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360:129- 139.
  32. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, et al. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 419- 430.
  33. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998; 317: 703- 713.
  34. Remuzzi G, Macia M, Ruggenenti P. Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study. *JASN* 2006; 17: 90- 97.
  35. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 2000; 355: 253- 259.
  36. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Collaborative Study G: Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 851- 860.
  37. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 861-869.
  38. Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I, Oren S, Viskoper R, Watts RW, Cooper ME. Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *Bmj* 2000; 321: 1440-1444.

39. Investigators O, Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *The New England Journal of Medicine* 2008, 358: 1547- 1559.
40. Sies H. Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291- 295.
41. Ronco C, La Greca G. Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization. *Contrib Nephrol* 1999; 127: 1-31.
42. Jaques L, Goy J, Rozensztajn L. Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Chim Acta* 1989; 196: 119- 126.
43. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 77- 96.
44. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145- 152.
45. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. *Diabetic Complications* 2001; 77: 1- 18.
46. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. *Neuroscience Research Communications* 1997; 21: 41-48.
47. Doroty J, Vander J, Jason MH. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical Biochemistry* 2001; 34: 265-270.
48. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*. First edition, New York, Oxford University Press 1994: 1- 160.
49. Halliwell B. Oxidants and Central Nervous System: Some Fundamental Questions. *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126: 23-33.
50. Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
51. Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia* 2000; 30: 91- 96.
52. Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D* 2005; 6: 35- 40.
53. Hasanoğlu E, Altan N, Sindel P, Ongun CÖ, Bali M, Altıntaş E. The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al, Cu, Zn) of Dialysis Patients. *General Pharmacology* 1994; 25: 107- 110.

54. Özenirler S, Tuncer C, Ongun CÖ, Altan N, Kandilci U. Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. *General Pharmacology* 1994; 25: 1349- 1351.
55. Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memiş L, Bukan N. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery* 2003; 27: 253- 255.
56. Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, Sepici V. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? *Free Radical Research* 2004; 38: 623- 628.
57. Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Şimşek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 61- 64.
58. 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 Science* 1992; 50: 335- 339.
59. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews* 1995; 11: 181- 192.
60. Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, Koca C, Tutkun F, Özçelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian J Biochem* 2003; 40: 447-450.
61. Bissels GJ, Heide LP, Kamal A. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 2002; 441: 1- 14.
62. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 217- 223.
63. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1- 8.
64. Rousselot DB, Bastard JP, Jaudon MC. Consequences of the diabetic status on the oxidant /antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism* 2000;26: 163- 176.
65. Stern DM, Yan SD, Yan SF. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and complications of diabetes. *Ageing Research Reviews* 2002; 1: 1-15.
66. Lee ET, Keen H, Bennett PH. Follow-up of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* 2001; 44: 3- 13.

67. Levy J, Gavin JR, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *The American Journal of Medicine* 1994; 96: 260- 273.
68. Schmidt AM, Stern D. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 31: 367- 69.
69. Bursell SE, Takagi C, Clermont AC. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2711- 2720.
70. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239- 257
71. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277- 288.
72. McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, Johnston SR, Williamson KE. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol* 2005; 173: 683- 690.
73. Kayıhan E. Akciğer Kanseri tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. Bursa, Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. 2001: 7.
74. Riedl SJ. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *NatRev Mol Cell Biol* 2004; 5: 897- 907.
75. Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 2006; 119: 2036- 2043.
76. Holtsberg FW, Steiner MR, Keller JN, Mark RJ, Mattson MP, Steiner SM. Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1998; 70: 66- 76.
77. Özen HTL. Üroonkoloji. Ankara, Ertem Basım Yayın 2007; 31.
78. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz T Klin J Med Sci 2006;26: 527- 537.
79. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 269– 285.
80. Aksun SA, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin J Med Sci*. 2001; 21: 332- 342.
81. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem* 2003; 252: 305- 329.
82. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: 827-839.
83. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 905– 911.

84. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562- 573.
85. Bjorklund M, Koivunen E: Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 37- 69.
86. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 121- 131.
87. MMP9 matrix metalloproteinase 9 Homo sapiens (human) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4318>.
88. Canete-Soler R, Gui YH, Linask KK, Muschel RJ. Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev Dyn* 1995; 204: 30– 40.
89. Baroncini LAV, Nakao LS, Ramos SG, Filho AP, Murta LO Jr, Ingberman M, et al. Assessment of MMP-9, TIMP-1 and COX-2 in normal tissue and in advanced symptomatic and asymptomatic carotid plaques. *Thromb J* 2011; 9: 6.
90. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biol* 2000; 2: 737– 744.
91. McMillan SJ, Kearley J, Campbell JD, Zhu XW, Larbi KY. Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 2004; 172: 2586– 2594.
92. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Therap* 2013; 139: 32– 40.
93. Papazafiropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia* 2009; 13: 76– 82.
94. Rowsell S, Hawtin P, Minshall CA, Jepson H, Brockbank SM. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. *J Mol Biol* 2002; 319: 173– 181.
95. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 851– 859.
96. O'Farrell TJ, Pourmotabbed T. The fibronectin-like domain is required for the type V and XI collagenolytic activity of gelatinase B. *Arch Biochem Biophys* 1998; 354: 24– 30.

97. Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem* 2007; 388: 1227– 1234.
98. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RB, Hall ME, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2013; 6(28): 391-403 .
99. Tashiro K, Koyanagi I, Ohara I, Ito T, Saitoh A, Horikoshi S, Tomino Y. Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2004; 18: 206- 210.
100. Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, et al. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers *Diabetes Care* 2009; 32(1): 117-119 <http://dx.doi.org/10.2337/dca081911>
101. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 187- 198.
102. Champe PC. *Lipincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2007.
103. Belkız Öngen CK, Zuhâl Parıldar. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2008: 23- 31.
104. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *The American journal of physiology* 1993; 265(2): 477- 486.
105. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG, et al. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney international* 2000; 58(6): 2320- 2330.
106. Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003; 14(6): 274- 81.
107. Durvasula RV, Shankland SJ. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *American journal of physiology Renal physiology* 2008; 294(4): 830- 839.
108. Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, Leite CA, Schor N, Boim MA. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *American journal of physiology Renal physiology* 2004; 286(6): 1039- 1045.
109. Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, Jung DS, Kwak SJ, Ryu DR, et al. Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney international* 2007; 71(10): 1019- 1027.

110. Fryer RM, Rakestraw PA, Nakane M, Dixon D, Banfor PN, Koch KA, et al. Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephron Physiology* 2007; 106(4): 76- 81.
111. Qiao G, Kong J, Uskokovic M, Li YC. Analogs of 1 alpha, 25- dihydroxyvitamin D(3) as novel inhibitors of renin biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2005; 96(1): 59- 66.
112. Li YC. *Vitamin D and the Renin-Angiotensin System. Vitamin D. Third ed: Elsevier* 2011: 707- 723.
113. Resnick LM, Muller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension. Relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Annals of internal medicine* 1986; 105(5): 649- 654.
114. Burgess ED, Hawkins RG, Watanabe M. Interaction of 1,25- dihydroxyvitamin D and plasma renin activity in high renin essential hypertension. *American journal of hypertension. Am J Hypertens* 1990; 3(12): 903- 905
115. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation* 2002; 110(2): 229- 238.
116. Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D. Calcium-independent and 1,25(OH)2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney international* 2008; 74(2): 170- 179.
117. Klaus G. Renoprotection with vitamin D: specific for diabetic nephropathy? *Kidney international* 2008; 73(2): 141- 143.
118. Andersen S. Reno-protective effects of angiotensin II receptor blockade in type I diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney international Supplement* 2000; 57: 601- 606.
119. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358(23): 2433- 2446.
120. Muller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2006; 1(2): 221-228.
121. Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E, Melandri G, Branzi A, Magnani B. Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors. *Journal of clinical pharmacology* 1993; 33(1): 40- 45.

122. Roig E, Perez-Villa F, Morales M, Jimenez W, Orus J, Heras M, et al. Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *European heart journal* 2000; 21(1): 53- 57.
123. Azizi M, Menard J, Bissery A, Guyenne TT, Bura-Riviere A, Vaidyanathan S, et al. Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a 66 combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption. *JASN* 2004; 15(12): 3126- 3133.
124. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney International*. 2006; 69(1) 105- 113.
125. Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins J. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98(9):1966-70.
126. Deb DK, Sun T, Wong KE, Zhang Z, Ning G, Zhang Y, et al. Combined vitamin D analog and AT1 receptor antagonist synergistically block the development of kidney disease in a model of type 2 diabetes. *Kidney International* 2010; 77(11): 1000-9.
127. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008; 52(2): 249-55.
128. Kadowaki S, Norman AW. Dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas. *The Journal of Clinical Investigation* 1984; 73(3): 759-66.
129. Gedik O, Akalin S. Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* 1986; 29(3): 142-5.
130. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980; 209(4458): 823- 825.
131. C. Cade AWN. Rapid normalization/stimulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 of insulin secretion and glucose tolerance in the vitamin D-deficient rat. *Endocrinology*. 1987; 120(4): 8.
132. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003; 17(3): 509- 511.

133. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European cytokine network*. 2006; 17(1): 4-12.
134. McGill AT, Stewart JM, Lithander FE, Strik CM, Poppitt SD. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutrition Journal* 2008; 7: 4.
135. Goldner WS, Stoner JA, Thompson J, Taylor K, Larson L, Erickson J, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in morbidly obese patients: a comparison with non-obese controls. *Obesity Surgery* 2008; 18(2): 145- 150.
136. Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, et al. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90(7): 4119- 4123.
137. Saxe AW, Gibson G, Gingerich RL, Levy J. Parathyroid hormone decreases in vivo insulin effect on glucose utilization. *Calcified Tissue International*. 1995; 57(2): 127- 132.
138. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International Journal of Clinical Practice* 2003; 57(4): 258- 261.
139. Procopio M, Magro G, Cesario F, Piovesan A, Pia A, Molineri N, et al. The oral glucose tolerance test reveals a high frequency of both impaired glucose tolerance and undiagnosed Type 2 diabetes mellitus in primary hyperparathyroidism. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 2002; 19(11): 958- 961
140. Kumar S, Davies M, Zakaria Y, Mawer EB, Gordon C, Olukoga AO, et al. Improvement in glucose tolerance and beta-cell function in a patient with vitamin D deficiency during treatment with vitamin D. *Postgraduate medical journal*. 1994; 70(824): 440- 443.
141. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1993; 329(14): 977- 986.
142. Songer TJ, Zimmet PZ. Epidemiology of type II diabetes: an international perspective. *Pharmacoeconomics* 1995; 8: 1– 11.

143. Hawa MI, Picardi A, Costanza F, D'Avola D, Beretta Anguissola G, Guglielmi C, et al. Frequency of diabetes and thyroid autoantibodies in patients with autoimmune endocrine disease from Cameroon. *ClinImmunol* 2006; 118: 229–232.
144. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005; 523: 151– 161.
145. Altınparmak MR, Apaydın S. Diabetik nefropati. İn: Yenigün M, Altuntaş Y. Her yönüyle diabetes mellitus. 2. baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevi, 2001: 337- 402.
146. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J SteroidBiochemMolBiol* 2005; 97: 93- 101.
147. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant: ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol, and tamoxifen and relevance to anticanceraction. *FEBS J* 1993; 326: 285– 288.
148. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145– 2154
149. Sakamaki Y, Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, Takaishi H, Okada Y, et al. Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-induced albuminuria and glomerulosclerosis, *Nephron Exp Nephrol* 2010; 115: 22– 32.
150. Erken HA, Genç O, Erken G, Ayada C, Gündoğdu G, Doğan H. Ozone partially prevents diabetic neuropathy in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2015; 123(2): 101- 105.
151. Akkoc H, Kelle I, Tunik S, Bahceci S, Sencar L, Ayaz E, et al. Protective effect of ethylpyruvate on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Gastroenterol Belg* 2012; 75(3): 336- 341.
152. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipidperoxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 668– 676.
153. Gurel A, Atli H, Kaya N, Onalan E, Kuloglu T, Aygen B. Effects of vitamin D on kidney histology and trpv1 channels in doxorubicin-induced nephropathy. *Int J ClinExpMed.* 2015; 8(8): 13548-13555.
154. Elsherbiny NM, Al-Gayyar MM, Abd El Galil KH. Nephroprotective role of dipyrindamole in diabetic nephropathy: Effect on inflammation and apoptosis. *Life Sci.* 2015 Dec 15;143:8-17.

155. Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol.* 2004; 96(3): 77- 88.
156. Sun HL, Sun L, Li YY, Shao MM, Cheng XY, Ge N, et al. ACE-inhibitor suppresses the apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in renal tubular in experimental diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009; 117(7): 336- 44. doi: 10.1055/s-0028-1112148.
157. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; 35: 159- 169.
158. Bouillon R, Moody T, Sporn M, Barrett JC, Norman AW. NIH deltanoids meeting on vitamin D and cancer conclusion and strategic options. *J Steriod Biochem Mol Biol* 2005; 97: 3- 5.
159. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 574– 581.
160. GuoQing-Hua, Ju-Ming L, PanChang-Yu, Zhao-Hui L, ZouXiao-Man, Yi-Ming M. The kidney expression of matrix metalloproteinase-9 in the diabetic nephropathy of Kkaymice *Journal of Diabetes and Its Complications* 2008; 22: 408– 412.
161. Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *Journal of Pathology* 2003; 4: 537– 546.
162. Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Chemical Biology* 1998; 2: 466– 471.
163. Schaefer L, Han X, August C. Differential regulation of glomerular gelatinase B (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1) in obese Zuckerrats. *Diabetologia* 1997; 4: 1035– 1043.
164. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I. Abnormal gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in glomeruli from diabetic rats. *Renal Physiology and Biochemistry* 1994; 17: 316– 325.
165. Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Kidney Diseases* 1998; 32: 544– 550.
166. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 2008; 172: 299– 308.

- 167.** Lauhio A, Sorsa T, Srinivas R, Stenman M, Tervahartiala T, Stenman UH, et al. Urinary matrix metalloproteinase-8, -9, -14 and the irregulators (TRY-1, TRY-2, TATI) in patients with diabetic nephropathy. *Ann Med* 2008; 40: 312– 320.
- 168.** Thrailkill KM, ClayBunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine* 2009; 35: 1–10.
- 169.** Lu Y, Liu S, Zhang S, Cai G, Jiang H, Su H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p Aktand cell cycle progression. *Mol Cells* 2011; 31: 225– 230.
- 170.** Perng DW, Chang KT, Su KC, Wu YC, Chen CS, Hsu WH, et al. Matrix metalloprotease-9 induces transforming growth factor-beta(1) production in airway epithelium via activation of epidermal growth factor receptors. *Life Sci* 2011; 89: 204– 212.
- 171.** Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, et al. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycinere strains matrix metalloproteinase activity: specificstructural motifscontrol protein oxidation. *J Biol Chem* 2004; 279: 6209– 6212.
- 172.** Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorousacid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): anoxidative mechanism for restraining proteolytic a activity during inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278: 28403– 28409.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi 1992-2003 yılları arasında Elazığ'da tamamladım. 2003-2009 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimimi aldım. 2009-2010 yılları arasında Mardin ili Derik ilçesinde, 2010-2012 yılları arasında ise Elazığ ili Maden ilçesinde doktor olarak çalıştım. 2012 yılından bu yana İç Hastalıkları Tıpta Uzmanlık Eğitimimi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda sürdürmekteyim. Orta düzeyde İngilizce bilmekteyim.

