



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİYABETİK NEFROPATİ OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA PİOGLİTAZONUN ANTİOKSİDAN
PARAMETRELERE VE PATOLOJİK
SÜREÇLERE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MÜNİRE KURU

DANIŞMAN

Doç. Dr. Engin GÜNEY

AYDIN-2009

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**DİYABETİK NEFROPATİ OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA PİOGLİTAZONUN ANTİOKSİDAN
PARAMETRELERE VE PATOLOJİK
SÜREÇLERE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MÜNİRE KURU

DANIŞMAN

DOÇ. DR. Engin GÜNEY

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından TPF-08006 nolu proje ile desteklenmiştir.

AYDIN-2009

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini aktaran, değerli hocam ve tez danışmanım İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Engin GÜNEY'e, uzmanlık eğitimim süresince büyük emekleri ve katkıları olan, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol gösteren, her aşamada yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Zahit BOLAMAN, Prof. Dr. Ali Önder KARAOĞLU, Prof. Dr. Taşkın ŞENTÜRK, Prof. Dr. M.Hadi YAŞA, Prof. Dr. Hulki Meltem SÖNMEZ, Doç. Dr. Gürhan KADIKÖYLÜ, Doç. Dr. Sabri BARUTÇA, Doç. Dr. Yavuz YENİÇERİOĞLU, Doç. Dr. Harun AKAR, Doç. Dr. Vahit YÜKSELEN, Doç. Dr. Nezh MEYDAN, Yrd. Doç. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU'na, tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Mukadder SERTER'e, asistanlık dönemim boyunca bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Mediha AYHAN'a, ayrıca Uzm.Dr. Adil COŞKUN, Uzm. Dr. Handan YÜCETÜRK ve Uzm. Dr. Özgür TANRIVERDİ'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| I. GİRİŞ ve AMAÇ..... | 1 |
| II. GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| A. Diabetes Mellitus..... | 2 |
| B. Diyabetik Nefropati..... | 3 |
| 1. Patogenez..... | 4 |
| a. Genetik..... | 4 |
| b. Hiperglisemi..... | 4 |
| c. Oksidatif stres..... | 6 |
| d. Büyüme faktörleri..... | 7 |
| e. Hemodinamik faktörleri..... | 8 |
| f. Renin anjiyotensin aldesteron sistemi..... | 9 |
| 2. Diyabetik nefropatide patolojik değişiklikler..... | 9 |
| C. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller..... | 11 |
| 1. Oksidatif stres ve serbest oksijen radikalleri ile ilişkili hastalıklar..... | 11 |
| 2. Antioksidan mekanizmalar..... | 11 |
| a. Enzim yapısında antioksidanlar..... | 12 |
| a.1. Süperoksid dismutaz..... | 12 |
| a.2. Katalaz..... | 12 |
| a.3. Glutasyon peroksidaz..... | 13 |
| a.4. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz..... | 13 |
| a.5. Glutasyon redüktaz..... | 14 |
| a.6. Paraoksanaz..... | 14 |

| | |
|---|----|
| b. Enzim yapısında olmayan antioksidanlar..... | 14 |
| 3. Serbest radikallerle oluşan hücrel hasarlar..... | 14 |
| 4. Diyabet ve oksidatif stres ilişkisi..... | 15 |
| D. Tiazolidindionlar ve Metabolik etkileri..... | 18 |
| 1- Glisemik kontrol üzerine etkileri..... | 24 |
| 2- İnsülin direnci üzerine etkileri..... | 25 |
| 3- Pankreas insülin sekresyonu üzerine etkileri..... | 25 |
| 4- Lipid profili üzerine etkileri..... | 25 |
| 5- Arteriyel inflamasyon, ateroskleroz, endotel fonksiyonları üzerine etkileri..... | 26 |
| III. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 27 |
| IV. BULGULAR..... | 31 |
| V. TARTIŞMA..... | 42 |
| VI. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 49 |
| VII. ÖZET..... | 50 |
| VIII. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)..... | 52 |
| IX. KAYNAKLAR..... | 54 |

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 : Birinci hafta kan glukoz düzeyi (mg/dl) ortalamaları

Tablo II: Dördüncü hafta kan glukoz düzeyi (mg/dl) ortalamaları

Tablo III:Glomerülde fokal nekroz derecesi

Tablo IV: Bowman kapsül aralığında genişleme derecesi

Tablo V: Tübül epitelinde dejenerasyon derecesi

Tablo VI: Tübül epitelinde nekroz derecesi

Tablo VII: Tübül dilatasyonu derecesi

Tablo VIII: İnterstisyel inflamasyon derecesi

Tablo IX: Konjesyon derecesi

Tablo X: Damar duvarında kalınlaşma derecesi

Tablo XI: Diyabetik kontrol ile pioglitazon alan grubun patolojik değişiklikleri

Tablo XII: SOD, CAT, GSH, MDA, NO, TNF- α , IL-6 düzeyleri

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Diyabetik nefropatinin moleküler mekanizması

Şekil 2: Diabetes mellitus'ta artmış oksidatif stresin mekanizması

Şekil 3: Tiazolidindion türevi ilaçların kimyasal yapıları

Şekil 4: Beyaz adipoz dokuda tiazolidindionların etkisinin hücresel modeli

Şekil 5: Tiazolidindionların dokulardaki etkileri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LDL : Düşük dansiteli lipoprotein

HDL : Yüksek dansiteli lipoprotein

DN: Diyabetik nefropati

TZD: Tiazolidindionlar

KC: Karaciğer

SYA: Serbest yağ asitleri

SVO: Serebrovasküler olay

SOR: Serbest oksijen radikalleri

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

SOD: Süperoksit dismutaz

KAT: Katalaz

GSH: Glutatyon

G6PDH: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NO: Nitrik oksit

eNOS: Endotelyal nitrik oksit

GSSG: Okside glutatyon

PON: Paraoksonaz

RAAS: Renin anjiyotensin aldosteron sistemi

PAS: Periodic acid Schiff

PKC: Protein kinaz C

TGF- β : Transforming growth factor- β

VEGF: Vasküler endotelyal growth factor

GBM: Glomerüler bazal membran

Agt: Anjiyotensin

ACE: Anjiyotensin converting enzim

ECM: Ekstraselüler matriks protein

TNF- α : Tumör necrosis factor alfa

IL-6: İnterlökin 6

CRP: C reaktif protein

MDA: Malonildialdehit

Ec-SOD: Ekstrasellüler süperoksit dismutaz

FDA: Gıda ve İlaç Dairesi

PPAR γ : Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama

RXR: Retinoid X reseptör

AGE: İleri glikasyon son ürünleri

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliği

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

HT: Hipertansiyon

AR: Aldoz redüktaz

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Hafif konjesyon bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

Resim 2: Konjesyon, interstisyel inflamasyon (yıldız), ve Bowman kapsül aralığında genişleme (oklar) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

Resim 3: Tübüler dilatasyon ve dejenerasyon (kısa oklar) ile fokal glomerüler nekroz (uzun oklar) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

Resim 4: Olağan tübül yapıları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

Resim 5: Yoğun interstisyel inflamasyon, tübül dejenerasyonu ve dilatasyonu gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

Resim 6: İnterstisyel inflamasyon, tübül dejenerasyonu, tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma (ok) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) sistemik bir hastalık olup diyabetik nefropati (DN), yaygın komplikasyonlarından biridir. DN, son dönem böbrek yetmezliği nedenlerindedir^{1,2}. Diyabetin komplikasyonlarından korunma için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Oksidatif stresin, diyabet komplikasyonlarının gelişmesinde ve ilerlemesinde anahtar rol oynadığı yaygın olarak tanımlanmıştır. Reaktif oksijen radikalleri, oksidatif streste önemli rol oynamaktadır. Ayrıca diyabette antioksidan mekanizmaların oluşması da azalır³. Bu konuda çeşitli tedavi stratejileri üzerine çalışmalar devam etmektedir. Peroksisom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR) gama aktivatörleri olan tiazolidindionlar (TZD)'ın antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bazı çalışmalarda gösterilmiştir⁴. Biz bu çalışmada, streptozosin ile diyabet oluşturulan ratların böbrek dokusunda TZD tedavisinin antioksidan ve inflamatuvar parametrelere doku düzeyinde etkisinin tespiti ve DN'nin patolojik değişikliklerinin tedavi ile gösterdiği değişikliklerin incelenmesini amaçladık.

I. GENEL BİLGİLER

A. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. Diyabet, kronik hiperglisemi sonucu gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalpte ve damar sisteminde kronik komplikasyonlara yol açan, bu organların fonksiyonlarını bozan ve sakatlıklara yol açabilen bir hastalıktır.

Diyabetin ortaya çıkmasında değişik patogenetik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Tip 1 diyabetin oluşmasında primer olay otoimmün mekanizma ile veya bilinmeyen bir şekilde beta hücrelerinin harabiyeti ile insülin eksikliğinin ortaya çıkması; tip 2 diyabette ise beta hücre yetersizliğine bağlı insülin sekresyonunda bozulma ve hedef dokulardaki insülin direnci nedeniyle insülin etkisindeki azalmadır⁵.

Diyabet, genetik yatkınlığın varlığında çevresel nedenlerle kolayca tetiklenen bir hastalıktır. Bu yüzden riskli toplulukların belirlenmesi ve önleme çalışmaları önem kazanmaktadır⁶.

Diyabetik hastalarda morbidite ve mortaliteye yol açabilecek çok sayıda kronik komplikasyon görülebilir. Bunlar genellikle hiperglisemi başladıktan uzun süre sonra ortaya çıkarlar. Tip 2 diyabette bazı hastalarda tanı sırasında da komplikasyonlar bulunabilir. Komplikasyonların gelişim nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak hiperglisemi varlığında aldoz redüktaz (AR) enzimi ile glukozun sorbitole dönüşümü söz konusudur. Sorbitol bir doku toksinidir ve retinopati, nöropati, nefropati ve aort hastalıklarının oluşumunda suçlanmaktadır⁷.

Diyabetin kronik komplikasyonlarının önemli bir kısmını vasküler komplikasyonlar oluşturmaktadır. Bu da tutulan damarlara göre mikrovasküler veya makrovasküler komplikasyonlar şeklinde seyredebilir.

Mikrovasküler komplikasyonlar, küçük kapiller ve arteriyollerde bazal membran kalınlaşması ile gider (retinopati, nefropati, nöropati). Nefropati tip 1 diyabette daha sık görülür. Sıkı kan şekeri regülasyonu mikrovasküler komplikasyonların gelişimini azaltmakta veya geciktirmektedir.

Makrovasküler komplikasyonlar ise ateroskleroz ve buna bağlı olarak ortaya çıkan myokard enfarktüsü, serebrovasküler olaylar (SVO), gangren şeklindedir.

B. DİYABETİK NEFROPATİ

Diyabetik nefropati, süreklilik gösteren mikroalbüminüri, erken kan basıncı yükselmesi, glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nda düşme, yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite riski ile karakterizedir⁸. DN'li tip 1 diyabetik hastalarda %85-99, tip 2 diyabetiklerde %63 oranında diyabetik retinopati de saptanmaktadır⁹.

Tip 1 diyabetiklerde, diyabet süresiyle ilişkili olarak artan mikroalbüminüri ve proteinürinin, 25-30 yıllık toplam insidansı %35-40 olarak bildirilmiştir¹⁰. Mikroalbüminürik hastaların 1/3'ünde albümin atılımı normal sınırlar içine dönerken, 1/3'ünde aşikar proteinüriye ilerler^{11,12}. Proteinürik hastaların %10-50'sinde son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişirken, %40-50'si kardiyovasküler komplikasyonlarla erken dönemde kaybedilir¹³. Birçok çalışma mikroalbüminüri-proteinüri gelişme insidansının tip 1 ve 2 diyabetiklerde birbirine yakın değerlerde olduğunu ortaya koymuştur^{11,14}. Gelişmiş ülkelerde, yeni tanı almış SDBY nedenleri içindeki DN oranı %30-40 civarındadır¹⁵. Ülkemizde de 2005 Türk Nefroloji Derneği verilerine göre SDBY nedenleri arasında %25.3'lük oranla DN birinci sırayı almaktadır. Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DN gelişimini etkileyen risk faktörleridir¹⁶. Glisemik kontrol bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyetteki yüksek protein, albüminüri varlığı, sigara kullanımı prognozu kötüleştirmektedir¹⁷. Genetik yatkınlık varlığında, hemodinamik ve metabolik faktörler arasındaki karmaşık etkileşim DN gelişimini kolaylaştırmaktadır¹⁸.

Diyabetik nefropati patogenezinde, glukozun direk toksik etkileri, polyol yolu aktivasyonu, protein, lipid, lipoprotein, aminoasitlerin glikasyonu ve ileri glikasyon ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, çeşitli büyüme faktörlerinin artmış aktivitesi ve renin-anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) rol oynamaktadır. DN gelişimi için hiperglisemi gerekli olsa da yeterli değildir; bazı hastalarda kötü glisemik kontrol olmasına rağmen nefropati gelişmez. Bu durum patogeneizde diğer faktörlerin de rolünü ortaya koymaktadır. DN gelişiminde hipertansiyon (HT) da kritik öneme sahiptir. Glomerüler kapillerlere geçen basınç, destek hücrelerinde mekanik strese neden olur ve kollajen gibi matriks elemanlarının sentezini uyarır¹⁹. Hem hiperglisemi hem de mekanik stres önemli bir intrasellüler medyatör olan protein kinaz C (PKC) aracılığıyla sitokinler ve büyüme faktörlerini [örneğin transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ve vascular endothelial growth factor (VEGF)]

uyararak hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Hipergliseminin ortaya çıkmasıyla başlayan DN gelişim süreci ilk aşamalarında klinik bulgu vermeyebilir.

1. Patogenez

a. Genetik

Diyabetiklerin sadece bir kısmında nefropati gelişiyor olması, DN gelişiminde genetik yatkınlığın önemini ortaya koymaktadır¹⁰. Tip 1 ve 2 DM'lu ikizler ve ailelerle yapılan çalışmalar, DN gelişiminde genetik yatkınlığın önemli rolünü desteklemektedir^{18,19}. Her iki diyabet tipinde de DN'nin ailesel kümelenme gösterdiği ortaya konmuştur. Tip 1 diyabetik olan kardeşlerden birinde proteinüri varsa diğer kardeşte proteinüri gelişme riski yüksek bulunmuştur⁸.

Bazı genler çeşitli enzim, hormon, sitokin, büyüme faktörü, lipid ve yapısal komponentlerin üretim ve fonksiyonunu düzenlemektedir. DN gelişimine yatkınlık yaratabilecek aday genlerden bazıları anjiyotensinojen, anjiyotensin converting enzim (ACE), Agt (anjiyotensin) II-tip 1 reseptör, nitrik oksit sentaz, endotelin-1, apolipoprotein E, AR, ileri glikasyon son ürün reseptörü, perlecan, nefrin ve TGF- β 1 genleridir²⁰. En çok üzerinde durulan ACE gen polimorfizminin, DN ve retinopati ile ilişkisi konusunda farklı sonuçlar bildirilmiştir^{8,20}.

b. Hiperglisemi

Kronik hiperglisemik bir tablo olan DM'ta, glukozun aracılık ettiği çok sayıda metabolik olay komplikasyonların gelişmesinde rol oynamaktadır. Böbrek hasarı gelişiminde, birbirinden bağımsız etkileri olduğu düşünülen bu metabolik olayların birbirleriyle etkileşim içinde olduğu son zamanlarda anlaşılmıştır. Hiperglisemi ile yapımı artan serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin bu metabolik yolların aktivasyonu ve karşılıklı etkileşiminde anahtar faktör olduğu gösterilmiştir²¹.

1. Glukozun direk toksik etkileri (glukotoksisite): Glukoz, hücelere doğrudan toksik etkide bulunur. Hücre proliferasyonu, hücre dışı matriks (ECM) birikimine neden olan kollajen, fibronektin, laminin, TGF- β 1 sentez artışı ve mezangiyal hücelerde azalmış heparan sülfat sentezine bağlı proteinüri, glukozun direk toksik etkileri arasında sayılabilir²².

2. Polyol yolu aktivasyonu: Glukoz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında, AR enzimi tarafından sorbitole dönüştürülür. Hiperglisemide bu dönüşüm artar. NADPH, nitrik oksit (NO) sentezi ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol alan

glutasyon yapımında kullanılır. Hiperglisemide NADPH tüketiminin artması ile NO yapımı azalır, serbest radikallere bağlı vasküler hasar gelişir. Hücre içinde artan sorbitol etkisiyle miyoinozitol ve Na^+K^+ ATPaz aktivitesi azalır. Sodyum hücre içinde birikir, ozmoregülasyon bozulur, hücre ödemi ve fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar. Sorbitol ayrıca, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) varlığında, sorbitol dehidrogenaz enzimiyle fruktoza dönüştürülür. Fruktozun non-enzimatik glikozillenmesi sonucu ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşur ve doku hasarına neden olur²³.

3. Non enzimatik glikozillenme ve ileri glikasyon ürünleri: İleri glikasyon son ürünleri, bir enzim aracılık etmeksizin, aminoasit, lipid ve lipoproteinlerin kendiliğinden indirgenmesiyle oluşur²⁴. Maillard reaksiyonu adı verilen bu sürecin ilk basamağında oluşan Schiff bazlar, moleküler yeniden düzenlenme sonucu Amadori cisimlerine dönüşür. Son 2-3 aydaki glisemik kontrol hakkında fikir veren hemoglobin A1c, bir Amadori cisimidir. Bu ürünlerin oluşumundan sonraki aşama, geri dönüşümsüz AGE'nin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Amadori cisimlerinin, sonraki basamağa ilerlemesi, hipergliseminin düzeyine bağlıdır²³. AGE düzeylerinin, tüm insanlarda yaşlanma ile, serum ve cilt, lens gibi kollajen içeren dokularda arttığı gösterilmiştir²⁵. AGE üretimi, diyabetiklerde, diyabetik olmayanlara göre en az iki kat artmıştır. Diyabetik nefropatili olguların serum ve skleroze glomerüllerindeki AGE düzeylerinin artmış olduğu, glomerüldeki AGE varlığının diyabetik renal hastalığın başlatıcısı ve DN klinik seyriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir²⁶.

Artmış AGE oluşumu, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Deneysel çalışmalarda, ileri glikozile albüminin diyabetik olmayan hayvanlara uzun süre verilmesinin, DN'dekine benzer şekilde, kollajen, laminin ve TGF- β 1 gen aktivasyonu ile ilişkili glomerüler değişikliklere ve proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir²⁶. AGE'lerin DN'deki moleküler mekanizmaları tam aydınlatılamamış olmakla birlikte, yapılan çalışmalarla bazı etkileri ortaya konmuştur:

- Büyüme faktörleri, ECM proteinleri ve inflamatuvar sitokinlerin genetik indüksiyonu ile hücre proliferasyonunu artırır.
- AGE'ler kollajen ve diğer matriks proteinlerine bağlanarak, vasküler geçirgenliği artırır ve bölgeye mononükleer hücre göçüne neden olur²⁷.
- NO yapımını azaltarak, endotel disfonksiyonuna yol açar ve ateroskleroz sürecinde rol alır.
- Endotel, mezangiyal, damar düz kas hücreleri ve makrofajlar üzerinde bulunan özel AGE reseptörüne bağlanarak lipid peroksidasyon artışına yol açar²⁶.

- Lipid peroksidasyon artışı, vasküler geçirgenliği artırarak, bölgeye mononükleer hücre göçüne yol açar.

- Lipid peroksidasyon artışıyla, oksidatif strese duyarlı nükleer faktör kappa B (NF-kB), TGF- β 1 gen aktivasyonuna neden olur. Sonuçta ECM üretimi artar, yıkımı azalır.

Deneysel çalışmalarda, AGE üretimi aminoguanidin ile inhibe edildiğinde, diyabete bağlı mikrovasküler komplikasyonların ve plazma lipid bozukluklarının önemli ölçüde azaldığı ve AGE'lerin proteinlere bağlanmasını engelleyen phenacylthiazolium bromide ile DN'deki renal hasarın gerilediği, vasküler kompliyansın yeniden sağlandığı gösterilmiştir²⁸.

4. Protein kinaz C aktivasyonu: Hiperglisemide aktive olan PKC, böbrek hücrelerinde fibronektin, tip IV kollajen, TGF- β 1 sentezini artırır. Ang II de, tip 1 reseptör aktivasyonu ile mezangiyal ve tübüler hücrelerde PKC'yi aktive eder. PKC aktivasyonu glomerüloskleroz ile sonuçlanır^{29,30}.

c. Oksidatif stres

Hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan reaktif oksijen ürün oluşumunun arttığı, hem diyabetik hasta monosit ve granülositlerinde, hem de yüksek glukoz maruz bırakılan normal monosit ve granülositlerde gösterilmiştir³¹. Glukozun otooksidasyonu, AGE'ler, prostoglandinler ve agt II reaktif oksijen ürünlerinin ana kaynaklarıdır. Diyabette gözlenen artmış SOR yapımına rağmen plazma ve hücre içi antioksidan enzim (glutatyon, E vitamini, askorbik asit, katalaz, süperoksid dismutaz) kapasitesi azalmıştır. Hücre hasarına yol açan reaktif oksijen ürünleri ve bu hasarı önlemekle görevli antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması tip 2 diyabetteki vasküler değişikliklerin esas sorumlusudur^{22,32}. Nefropati dahil, diyabetin tüm mikro ve makrovasküler komplikasyonları bu vasküler değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır².

Kornatowska ve arkadaşları, 21 proteinürik, 14 normoalbuminürik tip 2 diyabetik hasta ve 19 sağlıklı gönüllüde, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi arasındaki farkları incelemiştir. Kontrol grubuna kıyasla, lipid peroksidasyonu tüm diyabetik hastalarda yüksek, antioksidan (süperoksid dismutaz ve katalaz) enzim aktivitesi tüm diyabetik hastalarda düşük bulunmuştur³³. Diyabetikler arasında yapılan karşılaştırmada, bu olumsuz sonuçların proteinürisi olanlarda daha belirgin olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, diyabete artan ve vasküler komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynayan oksidatif stresin nefropati gelişmesiyle şiddetlendiği sonucuna varmışlardır²¹.

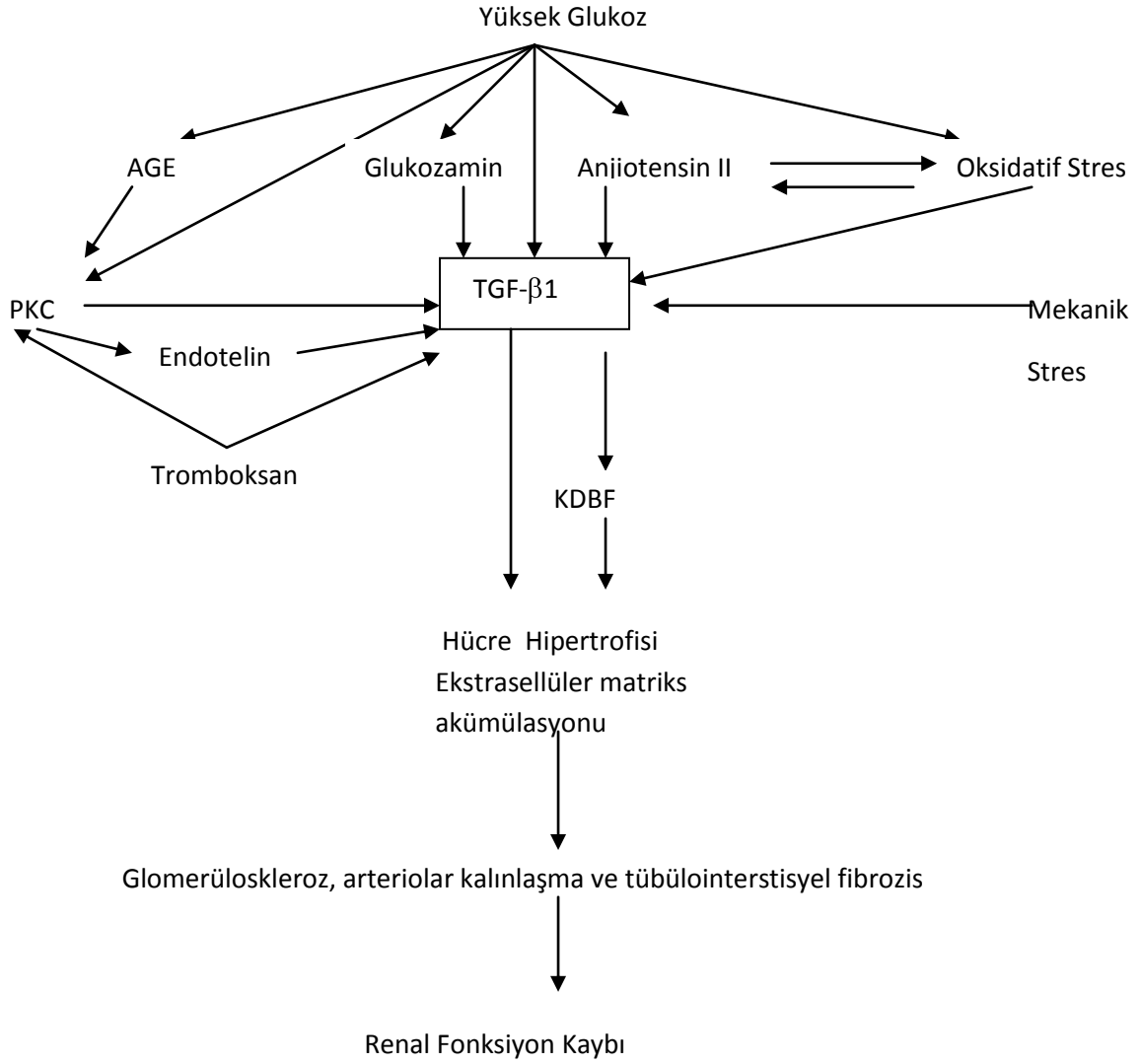
Craven ve arkadaşları deneysel çalışmalarında, kontrol grubundaki sağlıklı farelere göre, diyabetik farelerde böbrek ağırlığı, glomerüler hacim, üriner albümin atılımı ve glomerüler TGF- β 1 üretiminin arttığını, bu olumsuz gelişmelerin C vitamini verilen grupta anlamlı olarak düşük bulunduğunu bildirmişlerdir³⁴.

SOR'nin, nefropati gelişimi üzerindeki başlıca etkileri aşağıda sıralanmıştır:

- SOR'nin yol açtığı lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan bazı prostoglandinler, şiddetli renal vazokonstriksiyona neden olmaktadır.
- SOR, glomerülde seçici geçirgenliği sağlayan hücrelerden biri olan podositlerde, VEGF sentezini artırmaktadır. VEGF, podositlerin makromoleküllere olan geçirgenliğini artırarak proteinüriye yol açmaktadır³⁵.
- SOR ayrıca, membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla vasküler geçirgenliği artırmaktadır²⁶.
- SOR, tip 2 DM'ta sık görülen hiperlipidemi ile beraber olduğunda, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu ve ateroskerozu hızlandırabilmektedir.
- SOR, NF-kB aracılığıyla büyüme faktörleri ve sitokin genlerinin uyarılmasına yol açmaktadır. TGF- β 1 geni bu uyarıya artmış ECM protein sentezi ile cevap vermektedir²¹.
- Hiperglisemi varlığında SOR, PKC aktivasyonu ile başlayan yolları uyarmaktadır^{35,36}.

d. Büyüme faktörleri

Renal hasarın ilerleyici atrofiye neden olduğu pek çok nefropatiden farklı olarak DM'ta, proteinürinin geliştiği ve GFR'nin azaldığı evrede bile, nefronda hipertrofi mevcuttur. DN, glomeruloskleroz ve mezangiyal matriks artışı ile karakterizedir. Büyüme faktörlerinin, DN gelişiminde oynadığı rol genel kabul görmüştür. TGF- β 1'in DN'de yapımı ilk ve en yüksek oranda artan büyüme faktörü olduğu saptanmıştır³(Şekil 1).



Şekil 1: Diyabetik nefropatinin moleküler mekanizması.

AGEs, ileri glikasyon son ürünleri; KDBF, konnektif doku büyüme faktörü; ECM, ekstrasellüler matriks; PKC, protein kinaz C; TGF- β 1, transforming growth faktör beta 1

e. Hemodinamik Faktörler:

Hiperfiltrasyon ve artmış intraglomerüler basınç gibi hemodinamik mekanizmalar renal hasarın ortaya çıkması ve ilerlemesiyle ilişkilidir. Efferent arterioller vazokonstriksiyona kıyasla rölatif afferent arterioller vazodilatasyon, sistemik basıncı glomerüler kapiller ağa yansıtarak, intraglomerüler basıncı artırır. Bu hemodinamik değişiklikler artmış proteinüri ve

hızlanmış glomerüloskleroz ile birliktelik gösterir. Deneysel çalışmalarda intraglomerüler basıncın düşürülmesiyle renal hasarlanmanın önemli ölçüde yavaşladığı gösterilmiştir³⁷.

f. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi (RAAS)

Diabetes mellitus'ta dolaşımdaki RAAS genellikle baskılanmış veya normal olmasına karşın, böbrek dokusunda yer alan lokal RAAS uyarılmıştır. Renal interstisyumdaki Agt II düzeyleri plazmadakine göre bin kat yüksektir. Hiperglisemi, doku Agt II düzeylerini artırarak oksidatif stres ve endotelial disfonksiyonuna neden olur ki bu süreç vazokonstriksiyon, tromboz, inflamasyon, vasküler remodeling, TGF- β 1 aracılıklı ECM birikimi ile sonuçlanır. Çok sayıda deneysel çalışmada, ACE inhibisyonu veya Agt II-tip 1 reseptör blokajıyla renal histopatolojik değişikliklerin geri döndürülebildiği gösterilmiştir³⁸.

2. Diyabetik Nefropatide Patolojik Değişiklikler

Diyabetik nefropati, özellikle tip 1 DM'ta oldukça sık rastlanan bir komplikasyondur. DM'taki renal patolojik değişiklikler, intrarenal ve ekstrarenal arterlerde arterioskleroz ve glomerül kapiller yumağındaki mikroanjiyopatik değişiklikler sonucunda ortaya çıkar. Dört tip lezyon tanımlanmıştır⁹:

- 1- Afferent ve efferent arteriyollerin arteriyosklerozu
- 2- Renal arter ve dallarının arteriyosklerozu
- 3- Glomerüloskleroz
- 4- Peritübüler glikojen, yağ ve mukopolisakkarit birikimi

Diyabetteki glomerüler lezyonlar başlıca 3 çeşit olarak tanımlanmıştır:

- 1- Diffüz glomerüloskleroz: Birçok glomerülü tutar. Kapiller yumağın bazal membranında kalınlaşma ve mezangiyumda bazal membrana benzer madde artımı vardır. Bu bölgeler homojen pembe, PAS (+) boyanır. Zamanla glomerül kapiller lümeninde daralma, tüm glomerülde fibröz dokuya dönüşüm sonucu işlev kusuru gelişir ve böbrek yetmezliğine neden olur.
- 2- Nodüler glomerüloskleroz: Glomerülün periferinde, yuvarlak, PAS (+) hyalin bir kitle vardır. Bu hyalin nodülde mezangiyal hücre nükleusları yer alır. Bu nodüllere "Kimmelstiel-Wilson nodülü" denir. Büyüyen nodül, kapilleri Bowman kapsülüne doğru sıkıştırır. Sonunda glomerül iskemiye bağlı tahrip olur.

3- Eksüdatif lezyon: Diyabete özgü olmayan ve en az rastlanan lezyondur. Bowman kapsülü içinde, glomerüler yumağın kapsüler yüzeyine bağlı eozinofilik bir madde birikimi olur.

Glomerül kapiller bazal membranını kalınlaştıran ve glomerüllerde toplanan maddeler glikoprotein yapısındadır ve PAS (+) boyanır. Adeta glikoproteinin depolanması vardır. Diyabetik glomerüllerin bazal membranında; hem glikoprotein miktarı artmıştır, hem de glikoproteinin içeriği değişmiştir.

Diyabetik nefropati gelişimi klinik ve patolojik olarak 5 evreye ayrılır^{39,16}:

1. Evre (hiperfiltrasyon): Hiperfonksiyon ve hipertrofi evresidir. GFR normal değerlerin %20-40'ı oranında artmıştır. Nefronlarda hipertrofi ve hücre proliferasyonu gelişmiş olup idrarda mikroalbumin saptanmamaktadır. DN'nin klinik sendromu oluşmadan önce glomerül hemodinamiğinde değişiklikler olmaktadır. Bu evrede böbreğe gelen kan miktarı ve glomerüler kapillerdeki basınç artar. Bunların sonucu olarak glomerül filtratı da artar. Bu değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayan etkenler hiperglisemi ve intrarenal mikrosirkülasyondaki vazodilatasyondur. Böbreklerde yapısal olarak glomerüler hipertrofi vardır. Bazal membran ve mezangiyum normaldir. Ana patofizyolojik değişikliklerin glomerüldeki genişleme ve intraglomerüler basıncın artması olduğu ileri sürülmektedir. Bu evrede oluşan değişiklikler reverzibl olduğu için bu aşamada tanı ve tedavi son derece önemlidir.

2. Evre (sessiz dönem): GFR, hiperfiltrasyon evresine göre azalmış olmakla birlikte halen normalin üzerinde veya normaldir. İdrarda albumin atılımı normaldir. Ana yapısal değişiklik, bazal membran kalınlaşması ve mezangiyal genişlemedir. Böbrek fonksiyonları henüz normaldir. Histopatolojik olarak kapiller bazal membranında belirgin, diffüz bir kalınlaşma, mikroanevrizmalar, nodüller ve diffüz glomerüloskleroz gözlenir.

3. Evre (gizli nefropati): Başlangıç DN evresidir. Mikroalbuminüri görülmeye başlar. İdrarla albumin atılımı 30-300 mg/gün arasındadır. GFR yılda yaklaşık 1.1 ml/dk azalır. Tip 2 DM hastalarının çoğu tanı konduğunda bu dönemdedir.

4. Evre (aşikar nefropati): Belirgin diyabetik nefropati evresidir. Glomerüllerde tıkanıklıklar ve mezangiyal yayılma artmıştır. Günde 300 mg'ı aşan albuminüri ve 500 mg'ı aşan proteinüri vardır. Bu evrede GFR yılda 10-12 ml/dk azalır. Hastaların çoğu hipertansiftir. HT varlığı prognozu kötüleştirir.

5. Evre (son dönem böbrek yetmezliği): Üremik evredir. Terminal böbrek yetmezliği sahneye hakimdir⁴⁰. Tip 1 DM hastalarının %50'si, tip 2 DM hastalarının ise %20-30'u, 10 yıl içinde evre IV'ten V'e ilerler. Bu dönemde hastaların renal replasman tedavisine gereksinimi vardır⁹.

C. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

Oksidatif stres terimi genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu ve hemen hemen tüm patolojik durumlarla ilişkisi olan reaksiyonlar serisi olarak tanımlanmaktadır⁴¹. Canlı organizmadaki serbest radikallerin başlıca ana kaynağı oksijendir. SOR, normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir.

Normal koşullar altında SOR'nin fizyolojik seviyesi/reaktivitesi detoksifikasyon mekanizmalarıyla hassas bir şekilde dengelenir ve bu dengede özellikle antioksidan savunma mekanizmaları önemli rol oynamaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) gibi bazı enzimler, glutatyon (GSH), tiyoller, E ve C vitamini gibi antioksidan vitaminler, selenyum gibi eser elementler ve ürik asit, bilirubin gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler antioksidan savunma mekanizmalarının en önemlileridir⁴².

1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarı ile İlişkili Hastalıklar

Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik renal yetmezlik, bazı kanser türleri, nöro-dejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuar distress sendromu, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunur. SOR ile makromoleküller (protein, DNA, lipit, karbonhidrat) arasındaki etkileşimler reversibl ve irreversibl oksidatif değişikliklere neden olabilir:

2. Antioksidan Mekanizmalar

Oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan veya kısmen tamir eden moleküllere "antioksidanlar" denir⁴³. Vücut, oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarı engellemek için antioksidan vitaminler, GSH, antioksidan enzimler ve sülhidrillerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. Genel olarak antioksidan vitaminler (E vitamini, beta karoten gibi) serbest radikalleri ve tek oksijeni direk olarak yakalayarak (trapping) etkisiz hale

getirirler. GSH ve diğer tiyol kaynakları ise hücrel oksidasyon ve redüksiyonda önemli rol oynarlar. SOD, KAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimler SOR'lerin bir elektron redüksiyonunu katalizlerler. Antioksidanların hücrel düzeyleri bir çok fizyolojik, patolojik ve besinsel faktörlerden etkilenir. Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler⁴²:

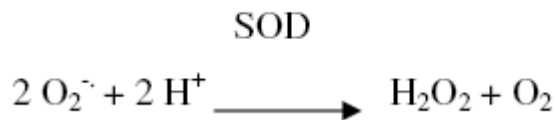
1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya ortamdan uzaklaştırılması
2. Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması
3. O_2^- , H_2O_2 (hidrojen peroksit) gibi bazı SOR'lerinin ortamdan uzaklaştırılması
4. Zincir reaksiyonunun kırılması
5. Tek oksijen üzerine çöpçü veya söndürücü etki gösterilmesi

Antioksidanları etki mekanizmalarına veya organizmadaki lokalizasyonlarına göre sınıflandırmak mümkündür⁴².

a. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

a.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

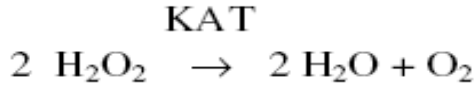
Süperoksit dismutaz enzimi, vasküler endotelde bulunan en önemli antioksidan enzimlerden biridir ve endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında bol miktarda bulunur. Normalde damar duvarında süperoksit radikallerini detoksifiye ederek lipid peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini önler. Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta O_2 meydana geldiği ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığı için, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim oluşturmaktadır⁴³.



Süperoksit radikali kendi başına çok toksik olmamasına rağmen, serbest radikal zincir reaksiyonuna yol açabildiği için ortamdan uzaklaştırılması önemlidir.

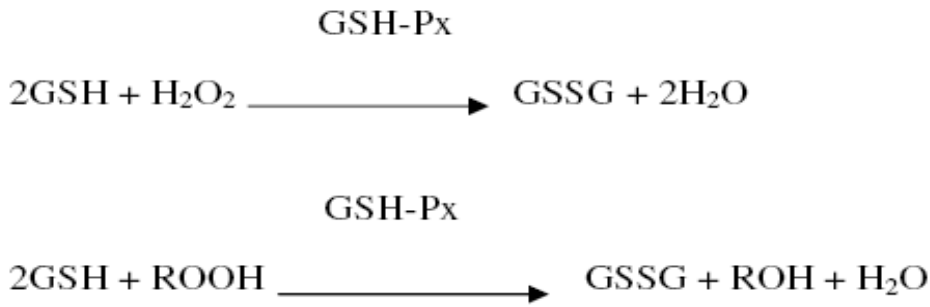
a.2. Katalaz (KAT)

Katalaz başlıca peroksizomlarda lokalize ve yapısında 4 “hem” prostetik grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşan H_2O_2 bir radikal olmamasına karşın en reaktif SOR olan OH^- radikalinin öncüsü olduğu için birçok SOR'den daha fazla oksidatif hasara neden olur. KAT hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar.



a.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalizler.



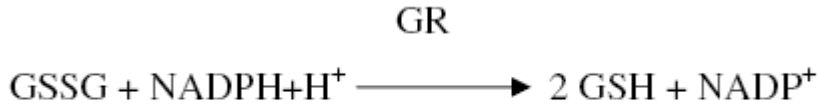
Her iki reaksiyonda da GSH hidrojen vericisi olarak kullanılır. Enzimin aktivitesi özellikle karaciğer ve eritrositlerde yüksektir⁴⁴.

a.4. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz, pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup intrasellüler NADPH'ın da başlıca kaynağıdır. Üretilen NADPH ise serbest radikallerin detoksifikasyonunda rol oynayan GSH-Px enziminin aktivitesi için gerekli olan indirgenmiş GSH sağlamaktadır⁴⁵. Son yapılan çalışmalarda G6PD'ın vasküler endotelial hücreler ve düz kas hücrelerinde de serbest radikallere karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca G6PD'ın vasküler endotelial hücrelerde NADPH'ı kofaktör olarak kullanan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesi için de gerekli olduğu ve eksikliğinde eNOS'ın yeterli aktivite gösteremeyerek süperoksit radikali üretmeye başladığı ve sonuçta LDL oksidasyonunun tetiklenebileceği gösterilmiştir⁴⁶.

a.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz enzimi NADPH varlığında okside glutasyon (GSSG)' nun tekrar redükte GSH'a dönüşümünü katalizleyerek antioksidan aktivitenin devamını sağlar.



a.6. Paraoksonaz (PON)

Paraoksonaz adını ilk kez bir organofosfat olan paration'un vücuttaki aktif metaboliti olan paraoksonu hidrolize etmesinden almıştır. Başlıca karaciğerde sentezlenen PON enziminin aktivite ve stabilitesi için Ca^{+2} iyonu gereklidir⁴⁷. Son yıllarda ateroskleroz etyopatogenezinde rolü olduğu öne sürülen mekanizmalardan birisi lipoprotein oksidasyonudur. Hücre dışı ezimlerinden biri olan PON ile lipoprotein oksidasyonu arasındaki ilişki ilgi çeken yeni araştırma alanlarından birisidir⁴⁸. PON'ın, HDL-K'ün bir bileşeni olduğunu ve ateroskleroz gelişim sürecindeki ilk adım olan LDL'nin okside olmasını önleyerek ateroskleroz gelişimini engellediği veya azalttığı öne sürülmüştür. Sonuçta PON lipit peroksidasyonunu azaltır, LDL ve HDL'yi oksidasyondan korur ve bu özelliği ile ateroskleroz riskini de azaltmış olur.

b. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

C vitamini, E vitamini, A vitamini, glutasyon, ürik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin, bilirubin.

3. Serbest radikallerle oluşan hücresel hasarlar

Toksik etkilerinin yanı sıra, oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonun ayrılmaz bir parçasıdır. Tepkimelerin bir kısmında üretilen radikaller tekrar

kullanılmaktadır. Önemli ölçüde birikime izin verilmez. Ancak radikal üretiminde artış veya eliminasyonunda azalma olduğunda toksik etki görülmeye başlar⁴³.

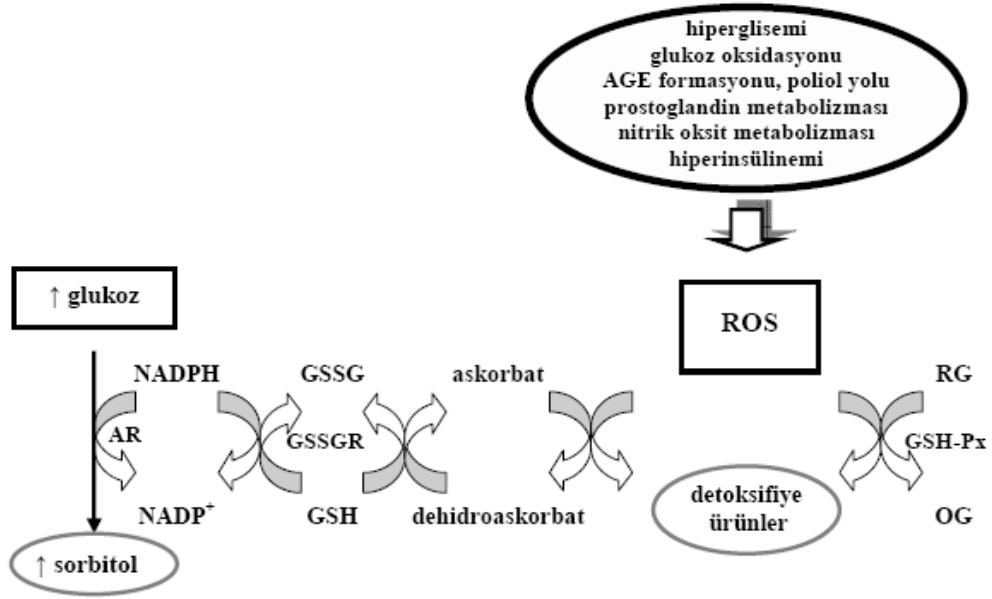
Oksidatif stres öncelikle lipid peroksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyonu; yağların, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tanımlanabilir. Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulur, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girer. Kalsiyumun hücre içinde artmasına bağlı olarak proteazlar aktive olur ve hücre iskeletinde hasar meydana gelir. Kalsiyum, endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına da neden olur. Lipid peroksidasyonlarının son ürünleri; hidrokarbon gazlar ve toksik aldehitlerdir. Aldehitlerden malonildialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır.

4. Diyabet ve Oksidatif Stres İlişkisi:

Hiperglisemi, diyabetik komplikasyonların gelişimi için major risk faktörüdür. Pek çok çalışma hiperglisemi nedeniyle serbest oksijen radikallerinin arttığını ve bu durumun endotel hasarından sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur⁴⁹ (Şekil 2).

Diabetes mellitus'ta uzun süreli hiperglisemi nedeni ile hücre dışı proteinlerin nonenzimatik glikasyonuna bağlı olarak serbest radikal üretiminde artış olmaktadır^{32,50}. Hiperglisemide sorbitol yolunun aktivasyonuna bağlı olarak artan triozfosfatların oksidasyonu sonucu α -oksaldehit ve H_2O_2 gibi reaktif ürünler oluşmaktadır. Bu nedenle DM'ta serbest radikal aktivitedeki aşırı artışa bağlı olarak oksidatif stres gelişimi doğaldır⁴⁹. Glikozile protein oksidasyonu ile serbest radikallerin sentezinde artış, süperoksit dismutaz temizleyici gücünün azalması ve indirgenmiş glutatyonun yokluğu, DM'ta artan oksidatif stresin kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bunlardan başka metabolik stres, sorbitol yolundaki aktivite değişiklikleri, inflamatuvar araçların düzeylerindeki değişimler ve hipoksi ile iskemik reperfüzyon sonucu lokalize doku hasarı, oksidatif stresi artıran nedenler arasında gösterilmektedir⁵¹.

Serbest radikal aktivitesi, koruyucu enzimler veya temizleyici sistemler ile inhibe edilir. Normal koşullarda A, E ve C vitaminleri ile karoten ve glutatyon, antioksidan maddeler olarak rol oynamaktadırlar. Bunların yanı sıra süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerini; katalaz, H_2O_2 radikallerini; glutatyon peroksidaz ise H_2O_2 radikallerini ve lipid peroksidlerini detoksifiye ederek endojen antioksidan savunma sistemini oluşturmaktadırlar⁵².



Şekil 2: Diabetes mellitus'ta artmış oksidatif stresin mekanizması

Normal koşullarda serbest radikallerin üretimi ile temizlenmesi arasında bir denge bulunmakta, tip 2 DM'lu olgularda ise temizleyicilerdeki azalma sonucu serbest radikallerde artış meydana gelmektedir. DM'ta glisemik kontrolün bozulmasına bağlı olarak hücrel antioksidan düzeyi azalmaktadır. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik, DM'un kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır^{41,49,50}.

Diabetes mellitus'ta antioksidan enzimlerin durumuna ilişkin olarak yapılan pek çok çalışmada birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. DM'lu sıçanlarda serbest radikal temizleyici enzimler ölçülmüş ve glutatyon peroksidaz, KAT ve SOD aktivitelerinde azalma gözlenmiştir⁵³.

Diabetes mellitus'un kronik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında uzun süreli hiperglisemi ve insülin direncinin rolü ile ilişkili çok sayıda mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlar; AGE hipotezi, AR (polyol yolu) hipotezi, oksidatif stres hipotezi, psödohipoksi hipotezi, gerçek hipoksi hipotezi, değişmiş lipoprotein metabolizması ile ilişkili hipotez ve artmış PKC hipotezleridir. AGE oluşumunun yol açtığı oksidatif stres, gliko-oksidasyonla AGE oluşumunu hızlandırmaktadır. Oksidatif stresi artıran ve AGE oluşumunu hızlandıran

polyol yolu aktivasyonu, damar duvarında doku PKC aktivasyonuna neden olmakta ve retina, lens, glomerül ile sinir dokusunda miyoinozitol düzeyinde ve PKC aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır.

Malonilaldehide, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrensek membran özelliklerini değiştirebilir. Bu etkiler MDA'in niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar. Ayrıca MDA, MDA-asetaldehyd ve MDA-protein yapılarına karşı oluşan antikorlar otoimmün hasara neden olabilirler⁵⁴.

Tümör Nekroz Faktör (TNF- α)

Yağ dokusundan salgılanan çok fonksiyonlu bir sitokindir. İnflamasyon, septik şok, otoimmün hastalıklar, obezite ve insülin direnci ile birliktelik gösterir. TNF- α , iki serin kinazı etkileyerek insülin reseptör fonksiyonunu bozar (insülin direnci). İki formu vardır; solubl form ve membrana bağlı form. Ayrıca iki reseptörü vardır; p55 ve p75. TNF- α , akut inflamasyon ve obezitede yükselir. PAI-1'in in vivo ve in vitro salınımını indükler. Sonuç olarak TNF- α ;

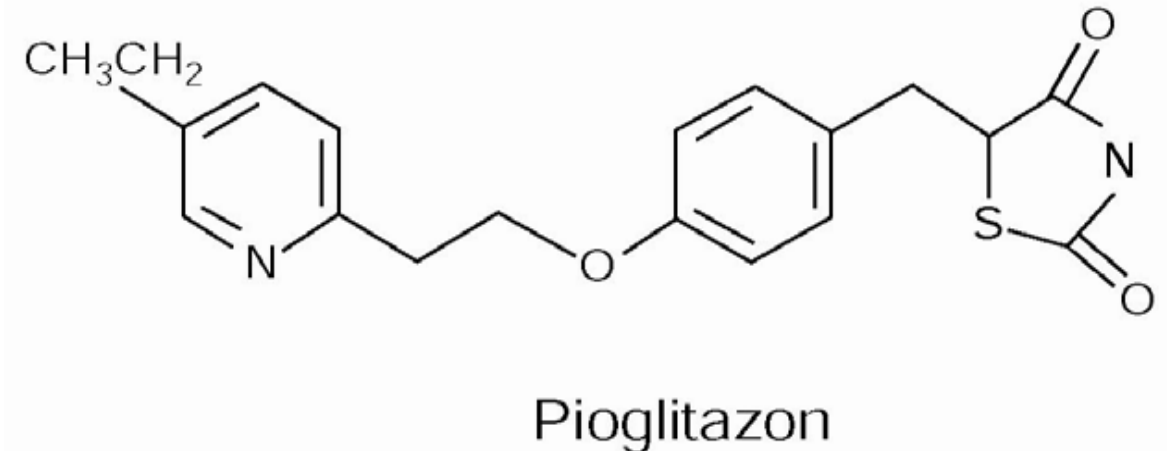
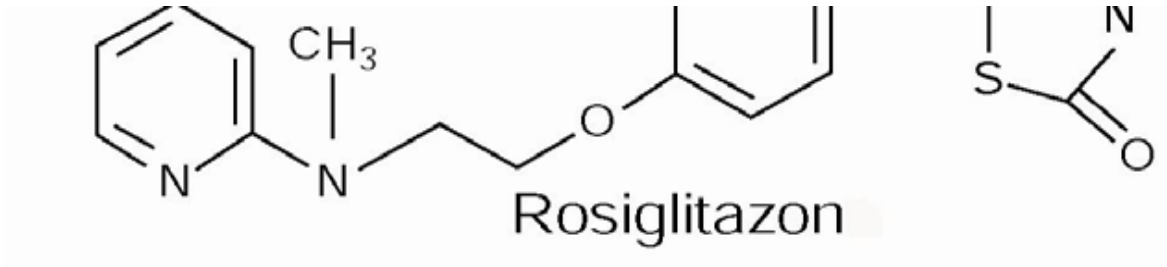
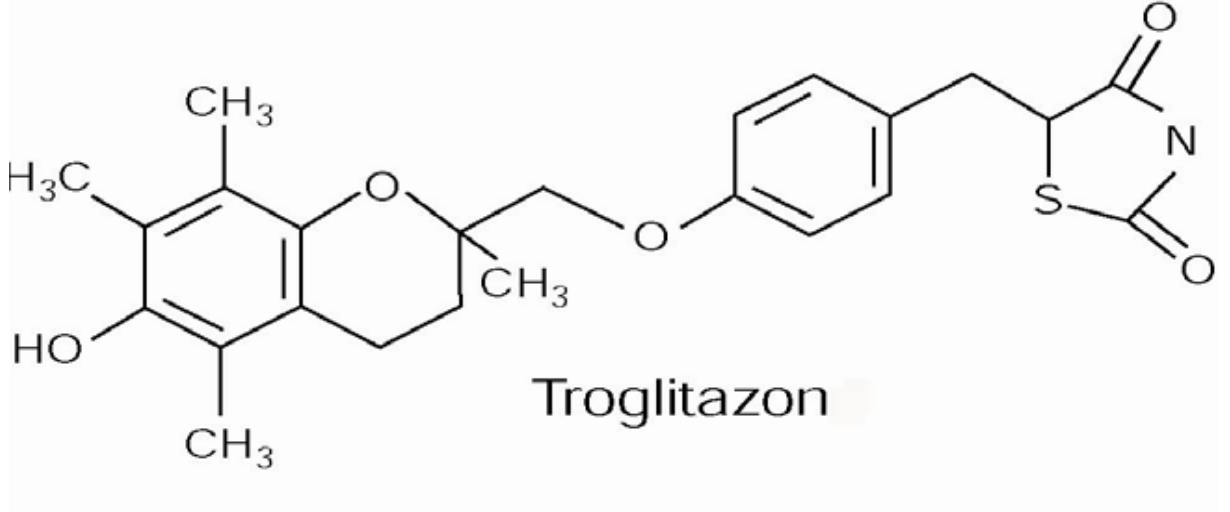
- a. İştahı azaltarak kilo kaybı
- b. Lipolize ve adipositlerin apopitozise ilerlemesi
- c. İnsülin direnci
- d. GLUT 4 inhibisyonu
- e. İnsülin reseptör sentezinde azalma
- f. PPAR –alfa fonksiyonlarında inhibisyona yol açmaktadır⁵⁵.

İnterlökin 6 (IL-6)

Adipoz dokudan salgılanan proinflamatuvar sitokinlerdendir. Plazma düzeyleri vücut kitlesi ve insülin direnciyle korelasyon gösterir. Deney hayvanlarına intraventriküloserebral IL-6 uygulamasının vücut yağ kitlesinde azalmayla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bir akut faz proteini olan C reaktif protein (CRP) sentezi IL-6 tarafından uyarılır ve plazma CRP düzeyi ile insülin direnci, obezite ve endotel disfonksiyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Obez olgularda tromboembolik olay sıklığında artışla, adipoz doku kitlesi arasındaki muhtemel ilişkinin IL-6 üzerinden olabileceği düşünülmektedir⁴.

D. TIAZOLIDİNDİONLAR ve METABOLİK ETKİLERİ

Tiazolidindionlar tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan insülin duyarlılaştırıcı ajanlardır. İnsülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. Bu bileşikler ortak olarak bir tiazolidin-2-4-dion yapısına sahiptir ve her birinin farklı bir yan zinciri vardır⁴⁰ (Şekil 3).



Şekil 3: Tiazolidindion türevi ilaçların kimyasal yapıları

Ana halka antidiyabetik etkiden sorumlu halkadır ve bu halka üzerinde yapılan substitüsyonlar genellikle antidiyabetik etkinlikten çok, ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmektedir (Şekil 3). Yapılan çalışmalar, TZD'ların, başka bir deyişle glitazonların, glukoz düzeylerini düşürücü etkinliklerini insülinin varlığında gerçekleştirdiklerini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada insülin üretmeyen ratlarda, TZD'lar, eksojen insülin verilinceye kadar etkinlik gösterememişlerdir. Glitazonların antihiperglisemik etkilerinin yanısıra, lipid metabolizması, endotel fonksiyonu, oksidatif stres ve vasküler inflamasyon üzerinde de pozitif etkileri vardır⁵⁶.

Tiazolidindionlar, 1970'lerin sonlarında lipid düşürücü ilaçlar için tarama sürecinde keşfedilmişlerdir. Ciglitazon orjinal bileşiktir. İnsülin dirençli diabetes mellitusun hayvan modelinde hiperglisemi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi azalttığı bulunmuştur. 1980'lerde glitazon yapısı içeren birçok türev sentez edilmiştir. Troglitazon bu grupta pazara ilk sunulan ilaçtır. Bununla birlikte nadiren idiosinkratik karaciğer (KC) toksisitesinin gelişimi sonucu KC yetmezliği ve ölüme yol açtığından Mart 2000'de piyasadan kaldırılmıştır^{57,58,59}.

Halen kullanılmakta olan pioglitazon ve rosiglitazonun her ikisi de Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1999 yılında Tip 2 DM tedavisi için onaylanmışlardır. Rosiglitazon ve pioglitazonun 2 milyondan fazla hastada kullanımında belirgin KC toksisitesi için kanıt bulunamamıştır⁶⁰.

Tiazolidindionlar esasen antilipidemik ve antihiperglisemik potansiyelleri için klofibrin asit analoglarının taranması sırasında, moleküler hedefleri bilinmeksizin geliştirilmişlerdir. Daha sonraları çekirdek hormon reseptörlerinin bir üyesi olan PPAR γ 'nın doğrudan ligandı oldukları bulunmuştur⁵⁷. İnsülin duyarlılığını geliştirerek glisemik kontrolü sağlayan TZD'lar, lipofilik olduklarından çekirdeğe girebilirler ve peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama'ya (PPAR γ) bağlanır ve onu aktive ederler; PPAR γ agonisti gibi davranırlar⁶¹.

Peroksizomlar, ökaryotik hücrede bulunan, pek çok fonksiyona sahip organellerdir. Hidrojen peroksit yıkımı dışında yağ asidi oksidasyonu, kolesterol biyosentezi ve yıkımı, gliserolipid sentezinde yer alırlar. Çeşitli değişken yapıları kimyasallar peroksizomları proliferate edebilirler ve bunlar "peroksizom proliferatörleri" olarak adlandırılırlar. Bu peroksizom proliferatörlerinin gen transkripsiyonundaki etkilerinde aracılık

yapan nükleer reseptörler 1990 yılında bulunmuştur ve peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler (PPAR) adını almışlardır^{62,63}.

Nükleer reseptörler bir ligand ile aktive olduklarında spesifik DNA parçalarına bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedirler. PPAR'ler diğer nükleer hormon reseptörleri gibi öncelikle hedef genin promotor bölgesindeki spesifik bölgeye bağlanırlar. PPAR'in de içinde bulunduğu bazı nükleer hormon reseptörleri DNA'ya Retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturarak bağlanırlar. Ligandın bağlanması ile transkripsiyonu aktive ederler⁶³.

Üç farklı PPAR alt tipi tanımlanmıştır:

- PPAR α
- PPAR β (δ)
- PPAR γ

PPAR α en fazla kahverengi yağ dokusu ve karaciğer olmak üzere böbrek, kalp ve iskelet kasında; PPAR β (δ) en çok barsak, böbrek, kalp olmak üzere pek çok dokuda bulunur. PPAR γ ise başlıca adipoz doku (bu reseptör ağırlıklı olarak, adiposit diferansiasyonu ve adiposit spesifik genlerin ekspresyonunun regüle edildiği adipositlerde eksprese edilir) olmak üzere kolon, immun sistem ve retina da eksprese olur. PPAR γ insanlarda beyaz yağ dokusundan ve kemirgenlerde beyaz ve kahverengi yağ dokularından yüksek düzeyde salınır. PPAR γ izoformları kalp, vasküler düz kas, monositler, dalak, böbrek, karaciğer, barsak, adrenal ve iskelet kas dokusunda bulunmaktadır. PPAR γ yağ dokusunda yağ asitlerinin depolanmasında etkilidir. Anabolik durumlarda adipoz dokuya etki ile lipogenezi artırır^{64,65}.

İnsanlarda PPAR γ ' nın üç alt tipi tanımlanmıştır:

- PPAR γ 1
- PPAR γ 2
- PPAR γ 3

Bu alt tiplerin dağılımında predominant formun PPAR γ 1 olduğu saptanmıştır. Belirgin miktarda PPAR γ 2 eksprese eden tek doku adipoz dokudur. PPAR γ 3 ekspresyonu ise makrofaj ve kolonla sınırlıdır. Normal kilolu kişilerde PPAR γ ekspresyonu subkutan yağ dokusunda fazla iken obez kişilerde ekspresyonun visseral yağ dokusunda fazla olması ilgi çekicidir.

Böbreklerden bu 3 PPAR subtipleri (PPAR α , PPAR β (δ), PPAR γ) eksprese edilmektedir. PPAR α mezangiyal hücreler, proksimal tübül ve medullada henlenin çıkan

kolundan eksprese edilir⁶⁶. PPAR β (δ) ise düşük derecede eksprese edilir. PPAR γ mezangiyal hücreler, proksimal tübül hücreleri, medüller toplayıcı kanallardan ve kortikal fibroblastardan yüksek miktarlarda eksprese edilir. PPAR γ daha efektiftir. Yakın zamana kadar PPAR γ aktivasyonunun böbrekte glomerul ve özellikle mezangiyumda etkili olduğu düşünülmekteydi. Ancak tübülointerstisyumun patolojik açıdan daha prediktif olduğu son zamanlarda çalışmalarda gösterilmiştir^{36,67}. Tübüler disfonksiyonda albümin reabsorbsiyonunun etkilenmesi sonucu nefropatiye katkısı gözlenmiştir. PPAR γ aktivasyonu ile albüminin tübüler geri emilimi normoglisemiklerde de artmış, üriner albümin atılımı azalmıştır. Bu etkileri TZD'in antiinflamatuvar, antifibrotik, antiproliferatif, antioksidan etkilerine sekonder olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir⁶⁸.

Pioglitazonun 15, 30 ve 45 mg'lık tabletleri mevcuttur ve oral olarak hızlı ve iyi absorbe olur. Açlık sırasında uygulandığında pioglitazon serumda 30 dakika içinde ölçülebilir. Pik konsantrasyona 2 saat içinde ulaşır. Pioglitazonun yemekle birlikte alınması pik konsantrasyona ulaşma süresini 3-4 saat kadar geciktirir ancak emilimini azaltmaz. Pioglitazon'un yarılanma ömrü 3-7 saattir; aktif metabolitleriyle kombinasyon halinde ise yarılanma ömrü 16-24 saattir. Sürekli serum konsantrasyonuna 7 gün içinde ulaşır. %99'undan fazlası albümin olmak üzere, proteine bağlanır^{40,69}.

Retinoid X reseptörü ile bir heterodimer oluşturmakta olan PPAR γ , TZD'lar ile indüklendiği zaman, heterodimerde yapısal değişiklik meydana gelmekte ve koreseptör bileşeninin yeri değişmektedir. Bu, PPAR γ -RXR kompleksinin DNA ile etkileşimine yol açarak hedef genlerde PPRE'ye (PPAR γ yanıt elemanları) bağlanmasını ve bu genlerin transkripsiyonunun değişmesine yol açar⁶⁵. PPRE'ler lipid metabolizması ve enerji dengesi ile ilgili durumları kodlayan, lipoprotein lipaz, yağ asidi taşıyıcı protein, adiposit yağ asidi bağlayan protein, açil-koA sentaz, malik enzim, glukokinaz ve GLUT 4 glukoz taşıyıcısı gibi bazı genleri kapsamaktadır. Sözü edilen genlerin transkripsiyonunun artması sonucunda glukoz metabolizması için gerekli olan çeşitli proteinlerin ya da glukoz taşıyıcılarının sentezleri artmaktadır. Ayrıca, PPAR γ reseptörlerinin TZD'lar tarafından uyarılmasıyla oluşan bir diğer fizyolojik olay ise, olgunlaşmamış yağ hücrelerinin olgunlaştırılmasıdır. İn vitro çalışmalar PPAR γ 'nın ektopik olarak üretimini bir TZD'nin varlığında yağ hücresinin farklılaşmasını indüklediğini göstermiştir⁶⁴.

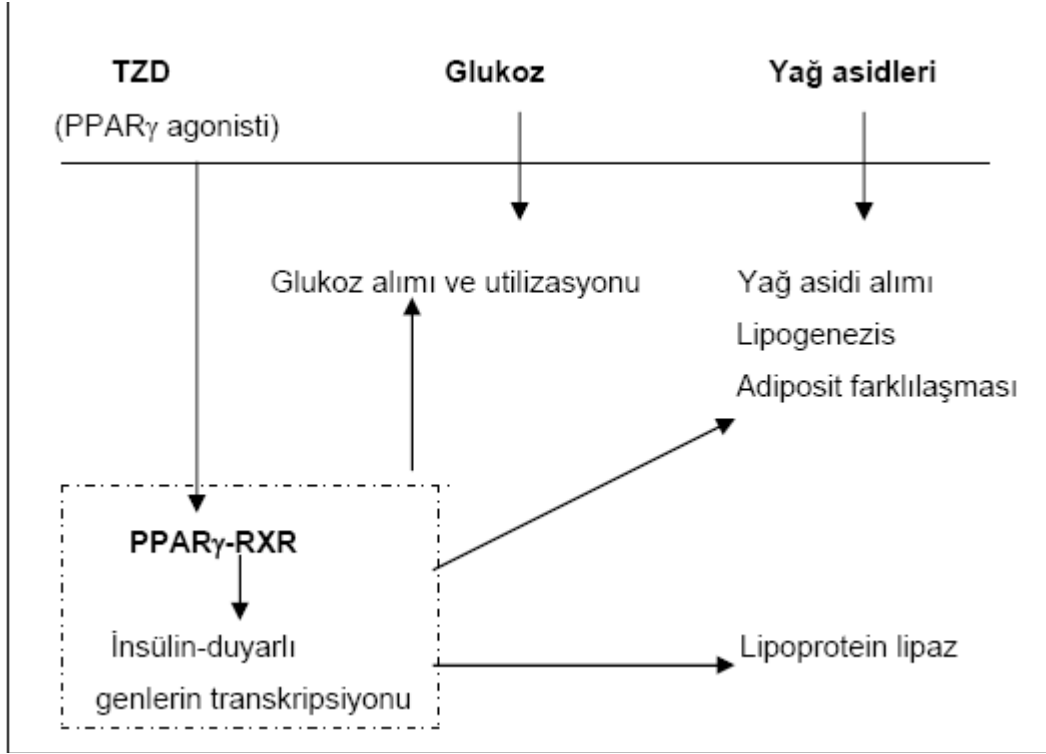
İnsüline dirençli bir dizi hayvan modeli üzerine yapılan çalışmalar TZD'ların hiperglisemi ve hiperinsülinemi düzeylerini düşürdüğünü ve karaciğer, iskelet kası ve yağ

dokusunda insülin duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Kan şekeri kontrolü hipoglisemi olmadan sağlanmaktadır. Serbest yağ asidi düzeyleri düşmekte ve trigliseridler azalmaktadır. Bu etkilerin hem hiperinsülinemik hayvan modellerinde hem de diyabetik olmayan bazı hayvanlarda gözlenmesi glukoz düşürücü etkisinden bağımsız olarak işleyen bir mekanizmayı akla getirmektedir. Aynı zamanda TZD' ların kan şekerini düşürerek insülin salgısını azalttığı gösterilmiştir^{57,70}.

Tiazolidindionların glukoz ve yağ metabolizması üzerine etkileri, insülin direnci ile kaynağı yağ dokusu olan serbest yağ asitlerinin veya kas dokusuna gelen trigliseridlerin aracı olduğu karaciğer ve kastaki lipid birikimi arasındaki ilişki nedeniyle önemlidir. TZD' ların glukoz homeostazı üzerindeki etkileri bir ölçüde azalmış serbest yağ asitleri yoluyla olmaktadır ve böylece serbest yağ asitlerinin oksidasyon için glukoz ile yarıştığı Randle döngüsünü de kapsamaktadır. Serbest yağ asitleri (SYA), periferik dokularda insülinin etkisini inhibe ederek insülin direncine katkıda bulunabilmektedir. TZD' lar yağ dokusuna SYA alımını artırır ve SYA mobilizasyonunun insülinle düzenlenen inhibisyonunu artırır⁴⁰.

Beyaz adipoz dokuda TZD' ların etkisinin hücresel modeli şekil 4' de görülmektedir. Bu şekilde adipogenezi arttıran TZD' ların, genelde obez olan tip 2 DM' lu hastalara tedavide sağlayacakları yarar şüpheyle de karşılanabilir. Terapötik dozlarda, kemirgen hayvan modellerinde yağlanmayı artırdıkları ve kiloda artışa neden oldukları bilinmektedir. Bu artış subkutan yağ dokusu artışı ile ilişkilidir. Bu etkilerinin, primer olarak artmış insülin duyarlılığına, daha fazla yağ hücresi diferansiyasyonuna ya da her ikisine birden bağlı olabileceği düşünülmektedir. Hiperglisemik ve/veya bozuk glukoz toleransı olan hayvan modellerinin dokularının invitro ve ex vivo doku çalışmaları, TZD' ların insüline cevap veren esas dokularda insülin duyarlılığını artırdığını ve TZD' ların uyardığı glukoz yıkımının öncelikle çizgili kas hücrelerinde olduğunu göstermektedir. Glukoz kullanımında TZD aracılı artışı açıklayan iskelet kasında, adipoz dokuya oranla, eser miktarda PPAR γ vardır⁷¹. Bu çelişkiyi açıklamak için TZD' ların, yağ asitlerinin yağ dokusu tarafından alınmasını artırarak iskelet kasından uzaklaştırdıkları hipotezi öne sürülmüştür. Böylece yağ asitlerinin sistemik kullanımının ve kas tarafından yağ asidi alımının azalması ile insülin direncinde düzelme olur. Özetle; PPAR γ aktivitesine sekonder olarak fazla enerjinin depo edilmesi insülin duyarlılığında iyileşmeye neden olur^{64,71}. Yani TZD' ların hipoglisemik

etkileri, hipolipidemik etkilerine sekonderdir. Ancak TZD'ların iskelet kaslarına glukoz uptake'inin artırılmasında direk rollerinin olduğu da gösterilmiştir.



Şekil 4: Beyaz adipoz dokuda tiazolidindionların etkisinin hücresel modeli

Tiazolidindionlar'lar insülin sinyal yollarını (fosfatidil inositol-3-kinaz gibi) aktive ederek de glukoz homeostazını olumlu etkilemektedirler. Ayrıca glikojen sentaz gibi enzimlerin aktivitelerini değiştirebilmektedirler ve kas hücreleri ve adipositlerde glukoz taşıyıcı translokasyonu artırabilmektedirler. Yapılan çalışmalar tümör nekrozis faktör α (TNF α)'nın insülin direncinde mediyatör olduğunu göstermektedir⁷¹. TZD'lar insülin direncinin patogenezinde rol oynayan bu adiposit sitokininin etkilerini de antagonize etmektedirler⁴⁰. TZD'ların antidiyabetik etkilerinin, hedef organları (yağ hücreleri, çizgili kas ve karaciğer hücreleri) insülinin etkisine duyarlı hale getirdiği kabul edilmektedir. Bu etkinin insülin bağımlı olduğu bilinmektedir. Çünkü TZD'lar insülin yokluğunda kan şekerini düşürmekte etkili değildir (Şekil 5).

| Yağ dokusu | İskelet kası | Karaciğer |
|---------------------|---------------------|----------------|
| ↑Glukoz alımı | ↑Glukoz alımı | ↓Glikoneogenez |
| ↑Yağ asidi alımı | ↑Glikoliz | ↓Glikojenoliz |
| ↑Lipogenez | ↑Glukoz oksidasyonu | ↑Glukoz alımı |
| ↑Glukoz oksidasyonu | ↑Glikogenez | ↑Lipogenez |

Şekil 5: Tiazolidindionların dokulardaki etkileri

Metabolik Etkiler

1- Glisemi Kontrolü Üzerine Etkileri

Amerika Birleşik Devletlerinde FDA, pioglitazon ve rosiglitazonun tip 2 diyabet tedavisinde monoterapi olarak ve metformin, sülfonilüre ya da insülinle kombinasyon halinde kullanımını onaylamıştır.

Tiazolidindionlar tip 2 diyabetiklerde insülin duyarlılığını anlamlı olarak artırmaktadırlar. Tek başlarına kullanıldıklarında açlık kan glukozunu ve HbA1c (glikozile hemoglobin)' yi anlamlı olarak azaltmaktadırlar ve HbA1c deki bu düşüş uzun sürelidir^{60,72}. Glisemik kontrolü iyileştirmesine ilave olarak hem pioglitazon hem de rosiglitazon insülin direnç sendromunun komponentlerinin bir çoğunu iyileştirir^{72,73}. TZD'ların antihiperglisemik etkisi yavaş gelişir, maksimum etkinin oluşması 2-3 ay alabilmektedir.

2- İnsülin Direnci Üzerindeki Etkileri

Plazma glukozunu düşürmesinin yanında TZD'lar aynı zamanda Tip 2 DM'lu hastalarda uygun glisemik kontrole ulaşmak için gerekli olan insülin dozunu ve/veya dolaşımdaki insülin düzeylerini düşürür. İnsülin direncinin derecesindeki bu azalma periferik glukoz uptake'nde bir artışa neden olur. Hepatik bazal glukoz yapımı azalır. Tip 2 DM hastalarında yükselmiş plazma insülin konsantrasyonlarına rağmen başlangıca göre hepatik glukoz üretim hızı da artmıştır. Pioglitazon uygulaması insülin direnci olan hayvanlarda insülin duyarlılığında artışa yol açmaktadır. Bu durumun yağ dokusunda artmış insülin reseptör sayıları ve glukoz transporteri GLUT 4'ün artmış intrinsek aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

3- Pankreatik İnsülin Sekresyonuna Etkileri

Tiazolidindionlar plazma insülin düzeyinde sürekli olarak bir azalmaya neden olurlar ve bu da artmış insülin duyarlılığını gösterir. Bu ajanlar direk olarak beta hücresi insülin sekresyonunu uyarmasa da, çalışmalar insülin direnci olan insan ve hayvanlarda normal insülin yanıtını tekrar oluşturduklarını göstermektedir.

Tip 2 DM'ta beta hücre fonksiyonunda karakteristik azalmanın, insülin direncinin zararlı etkisinin bir parçası olduğu varsayılmaktadır. İnsülin direnci beta hücre sekretuar fonksiyonunu artırır ve beta hücrelerinin metabolik aktivitesini ve amilin sekresyonunu artırır. Amilinin artmış sekresyonu adacıklarda amilin depolanmasının artması ve beta hücrelerinde destrüksiyonla sonuçlanabilir. Genetik olarak programlanmış beta hücrelerinin artmış metabolik aktivitesi artmış apoptoza yol açabilir. TZD'ların insülin direncini azaltarak Tip 2 DM'lu hastalarda beta hücre kaybının hızını azalttığı varsayılmaktadır. Ishida ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada pioglitazonun oksidatif stresi azaltarak insülinin sekretuar kapasitesini iyileştirdiği ve beta hücre kaybını azalttığı gösterilmiştir⁷⁴.

4- Lipid Profili Üzerindeki Etkileri

Birçok tip 2 DM hastasında kompleks dislipidemi vardır. İnsülin direnci ve bunun sonucu hiperinsülinemi, artmış plazma trigliserid düzeyleri, azalmış yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol düzeyleri ve küçük yoğun aterosjenik düşük dansiteli lipoprotein kolesterol partiküllerinin baskın olmasıyla birlikte görülebilmektedir. TZD'lar lipid metabolizmasını anlamlı olarak modifiye etmektedirler⁵⁷. TZD tedavisi sırasında serbest yağ asidlerinin konsantrasyonlarında azalma da oluşur. TZD'ların lipid metabolizması üzerindeki etkileri sınıf içi farklılık gösterir. Yapılan çalışmalarda pioglitazonun lipid parametreleri üzerinde rosiglitazondan daha belirgin yararlı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Van Wijk ve arkadaşları, 5000'den fazla hastayı kapsayan çalışmalarında pioglitazonun, trigliserid, total kolesterol ve LDL kolesterol üzerinde rosiglitazondan daha fazla derecede yararlı etkileri olduğunu bildirmiştir⁷⁵. Goldberg ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada pioglitazonun rosiglitazona kıyasla HDL kolesterolü daha çok artırdığını ayrıca LDL partikül boyutu ve konsantrasyonunda daha olumlu etki gösterdiklerini saptamışlardır⁷⁶.

5 -Arterial İnflamasyon, Ateroskleroz ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Vasküler düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve makrofajlarda da bulunan PPAR γ aktivasyonunun aterosklerotik süreç basamaklarını direk olarak etkilediği çok sayıdaki çalışma ile gösterilmiştir. Bu etkilerin çoğu antiaterojeniktir. TZD'ların vasküloprotektif etkilerinin çoğu insülin direncini kırıcı/antihiperglisemik etkilerinden bağımsız olarak (direk) ortaya çıkmaktadır^{77,78}. "*Pleiotropik etkiler*" olarak adlandırılan bu etkiler özellikle antiaterosklerotik/düz kas proliferasyonunu önleyici etki açısından son derece ilgi çekicidir ve bu konudaki klinik araştırmalar devam etmektedir. Bu yönde, kardiyovasküler sonuçları değerlendirecek büyük randomize çalışmalara gerek vardır. Yapılan bir insan çalışmasında 3-6 aylık pioglitazon tedavisi sonrasında karotis ultrasonu ölçümlerine göre karotis arteri intimal media kalınlığında anlamlı bir azalma bulunmuştur. TZD'ların koroner tıkanmaya balon kateter ile müdahaleden sonra, koroner stent implantasyonlarından sonra hasarlanan bölgelerde oluşan intimal hiperplaziyi önledikleri gösterilmiştir. Bu bulgular TZD'ların Tip 2 diyabetik hastalarda anjiyoplasti ya da stent uygulanmasından sonra oluşabilecek restenozu azaltabileceğini göstermektedir⁷⁹.

Tiazolidindionların intrasellüler antioksidan aktivitesi dikkate değerdir⁸⁰. Bu özellik koruyucu antioksidan etkilerini yansıtır. Bu ajanlar serbest radikaller üzerinde direk antioksidan temizleyici etki göstermezler. Fakat oksidatif stresin oluşumuna neden olan hiperglisemik durumlardan birkaç mekanizmayı bloke ederek etki gösterirler. Son yıllarda TZD'ların ve özellikle pioglitazonun potent glikasyon ve protein çapraz bağlanmasının inhibitörü ve güçlü antioksidan olduğu görülmüştür⁸¹.

Diyabetik hastalar inflamasyonun ılımlı şeklini içerirler⁸². Diyabette inflamasyon, oksidatif stresin üretimine neden olan hiperglisemi ile ayrıca ilişkilidir. TZD'lar, antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir ve bunun, hipoglisemik etkilerinden bağımsız olabileceği diyabetik hastalarda doğrulanmıştır⁶⁸.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 40 adet 200-250 gram ağırlığında erkek Wistar cinsi rat kullanıldı. Ratlar 4 haftalık uyum süresinden sonra her bir kafese (28x28x16 cm boyutunda polikarbon kafes) 5 rat olmak üzere yerleştirildi.

Ratlar 4 gruba ayrıldı.

1. Grup: Kontrol grubu
2. Grup: Diyabetik Kontrol grubu
3. Grup: 10 mg Pioglitazon alan grup
4. Grup: 30 mg Pioglitazon alan grup

Ratlar deneysel çalışmaya başlamadan 10 gün önce ısısı 18°C- 22°C arasında sabit tutulan özel odaya alındılar. Beş rat bir kafeste olacak şekilde yerleştirildiler ve standart diyet (pelet) yem ile beslendiler. Ratların su ve yem alımları serbest bırakıldı. Bütün ratların çalışma öncesinde kan şekerleri ölçüldü. 30 rata 50 mg/kg streptozotocin tek doz halinde intraperitoneal uygulandı. Streptozotocin, sodium citrate buffer (1 ml/kg) tamponu içinde çözdürüldü. Diğer 10 rata intraperitoneal citrate buffer verilerek kontrol grubu oluşturuldu. 48 saat boyunca içme sularına 15 g/L dekstrozu solüsyonu eklendi. Sıçanların diyabetik olup olmadığı 3. günde kuyruk venlerinden alınan kan ile kan glukoz düzeyleri ölçülerek kontrol edildi. Glukoz düzeyi glukometre cihazı ile (Accucheck Go, Roche) ölçüldü. Kan glukoz düzeyi 250 mg/dl ve üzerinde olan 30 rat çalışmaya alındı. Streptozotocin ile diyabet oluşturulan ratların bir kısmına pioglitazon (Glifix®) (10mg/kg ve 30mg/kg) yiyeceklerine karıştırılarak verildi. Her hafta ratların kan glukoz düzeyleri ölçüldü. 10 rat çalışma süresince olası diyabetik komplikasyonlar sonucunda kaybedildi. Kontrol grubunda 8, diyabetik kontrol grubunda 7, 10 mg pioglitazon alan grupta 9, 30 mg pioglitazon alan grupta 6 rat, 4 haftalık çalışma süresini tamamladı. Toplam 30 rat kurban edildi. Xylacin anestezisi kullanıldı. Sağ böbrek patolojik inceleme, sol böbrek ise biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi için eksize edildi. Böbrek dokuları taze doku olarak analize kadar -80 °C'de korundu. Çalışmamız için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır.

Biyokimyasal Ölçümler: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT)) ve MPO aktivitelerinin ve indirgenmiş glutatyon (GSH), malonaldehide (MDA), nitrik oksit (NO) düzeylerinin ölçümleri manuel yöntemlerle gerçekleştirildi. TNF- α , IL-6 düzeylerinin ölçümleri ELISA kitleri kullanılarak yapıldı.

Dokuların Homojenizasyonu: B.Braun marka homojenizatörde, doku homojenizasyon tamponu ile yapıldı. Doku homojenizasyon tamponu (1mM, pH=7,4); phenylmethylsulfonylfluoride (C₇H₇FO₂₅, SIGMA, Katolog numarası P-7626), di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrate (Na₂HPO₄.2H₂O, MERCK, katalog numarası K25979680), potasyumdihydrogenphosphat (H₂KPO₄, MERCK, Katalog numarası A986373), ethylenediaminetetraacetic asid disodyum (EDTA) ,C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂. 2H₂O, SIGMA, katalog numarası E-1644) kullanılarak hazırlandı.

Dokuda MDA Tayini: Dokuda TBARS (tiobarbitürik asit ile reaksiyon veren ürünler) ölçümü yapılarak indirek olarak değerlendirildi. Dokuda analiz Drapper ve Hadley'e göre yapıldı. %1 fosforik asit (Phosphoric acid MERCK 1.00563 kullanılarak) ve %0,6 TBA (2-Thiobarbutiric Acid, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2-thiol, SIGMA, katalog numarası T-5500) kullanılarak hazırlandı. MDA standardı; Malonaldehide bis (dimethyl acetal), ALDRICH, AL-108383 kullanılarak hazırlandı. Örnekler ve standartlar Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okuma yapılarak değerlendirildi.

Dokuda İndirgenmiş GSH Tayini: Beutler'e göre yapıldı. Presipite edici solüsyon; glasiyal metaphosphoric acid (RIEDEL-de HAEN 04103), disodyum EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂. 2H₂O, SIGMA, katalog numarası E-1644) ve sodyum klorür (NaCl, J.T.Baker) kullanılarak hazırlandı. Disodyum phosphate solüsyonu; di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄, MERCK, katalog numarası F368386) ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; DTNB 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoic Acid) (C₁₄H₈N₂O₈S₂, SIGMA, katalog numarası D-8130) ve sodium sitrat (C₆H₅Na₃O₇. 2H₂O, SIGMA, katalog numarası S-4641) ile hazırlandı. Glutatyon standardı; Glutathione Reduced Form, (C₁₀H₁₇N₃O₆S, SIGMA, katalog numarası G-4251) kullanılarak hazırlandı. Standartlar ve örnekler Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okutuldu.

Dokuda KAT Aktivitesi Tayini: Hugo Aebi yöntemine göre yapıldı. Tampon (50 mM pH=7) ; potasyumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄ MERCK, katalog numarası A986373) ve di-

Sodyumhidrojenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK, katalog numarası K25979680) ile hazırlandı. H_2O_2 'li tampon; hazırlanmış olan tampona hidrojen peroksit (H_2O_2 , RIEDEL, RH18312) eklenmek suretiyle hazırlandı. Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H_2O_2 'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorban değişimi Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 240 nm'de izlenip, 15 saniyedeki absorban değişimi saptanarak formüle göre hesaplama yapıldı.

Dokuda NO metaboliti Tayini: NO'nun parçalanma ürünlerinden olan nitrat'ın düzeyi saptanarak, bu şekilde indirek yolla, NO düzeyi hakkında fikir sahibi olundu. Yöntem olarak Najwa K. Cortas ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre; Kadmiyum (FLUKA, Katalog numarası 20890) granülleri kullanıldı. Glisin-NaOH tamponu; glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, MERCK, katalog numarası K23214990) ve sodyum hidroksit (NaOH, PROLABO, katalog numarası EMB 45053) kullanılarak hazırlandı. Glisin NaOH tamponu içindeki CuSO_4 çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, RIEDEL, RH12849-1) kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hydrochloric acid %37 (HCl, MERCK, katalog numarası K24016914) ve sulfonilamid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, SIGMA, katalog numarası S-9251) ile hazırlandı. NED çözeltisi; (N0(1-Naphtyl) Ethyl-Enediamine dihydrochloride, ALDRICH 22,248 kullanılarak) hazırlandı. Standartlar sodyum nitrit (NaNO_2 , SIGMA, katalog numarası S-3421) kullanılarak hazırlandı. Örnekler ve standartlar ELISA mikroplate reader'de 540 nm'de okutuldu.

Dokuda SOD Aktivite Tayini: Sun Yi ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı. SOD assay reaktifi: 0,3 mM Xanthine solüsyonu (Xanthine, SIGMA SIX7375), 0,6 mM EDTA solüsyonu (EDTA, ALDRICH 31788), 150 μmol NBT (SIGMA SIN6639), 400 mM Na_2CO_3 solüsyonu (MERCK 1.06392), BSA solüsyonu (Bovine serum albümin, SIGMA SIA7906) ile hazırlandı. Xanthine oxidase solüsyonu: Xanthine oxidase (SIGMA SIX4376) 2 mM amonyum sülfat çözeltisi (Ammonium sulfate, RIEDEL RH31119) içinde çözündürülerek hazırlandı. Örneklerdeki reaksiyon, ortama 0,8 mM CuCl_2 eklenmesiyle durduruldu. Absorbans ölçümü Shimadzu UV 160 A spektrofotometrede 560 nm'de yapıldı.

Dokuda TNF α ve IL-6 Tayini: ELISA kit kullanılarak yapıldı.

Patolojik inceleme: %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda fikse edilen doku örneklerinden rutin doku takip işlemi sonrası parafin bloklar hazırlandı. Her doku örneğinden alınan 4 mikrometre kalınlıktaki kesitlerden rutin hematoksilen eozin boyalı preparatlar

yanında, Mason Trikrom, Methenamin Silver, PAS-Alcian Blue, histokimyasal boyaları uygulanarak ışık mikroskopunda incelendi. Böbrek dokuları; glomerülde skleroz, glomerülde fokal nekroz, bowman kapsül kalınlığı ve genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, interstisyel enflamasyon, damar duvarında kalınlaşma, interstisyumda fibrozis parametreleri yönünden incelendi. Bu parametreler semikantitatif skorlama yanında morfometrik ölçümlerle ortaya kondu. Böbrek dokusunda izlenen patolojik lezyonlar;

(-) Etkilenme olmayanlar

(+) Orta derecede etkilenme olanlar

(++) Şiddetli derecede etkilenme olanlar, olarak belirtildi.

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi için Ki-Kare Testi, Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Böbrek dokularının patolojik incelemesi sonucu elde ettiğimiz veriler arasında farklılığı değerlendirmek amacıyla Ki-Kare Testi kullanıldı. Böbrek dokusunda antioksidan ve inflamatuvar parametrelerin ölçüm değerlerinin ortalamaları arasında farklılığı değerlendirmek amacıyla ise Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U Testi yapıldı. Değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ koşulu arandı. Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS 14 programı kullanıldı.

BULGULAR

Ratlar streptozosin enjeksiyonundan 3 gün sonra bakılan kan glukoz düzeylerine göre çalışmaya alındı. Kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl'in üzerinde tespit edilenler diyabetik olarak kabul edildi. 4 grup oluşturuldu. Ratlar; kontrol, diyabetik kontrol, 10 mg pioglitazon verilmesi planlanan diyabetik grup ve 30 mg pioglitazon verilmesi planlanan diyabetik grup olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Kontrol grubunun kan glukoz düzeyleri normaldi. Her bir grupta 10'ar rat mevcuttu. Ancak çalışma sonunda 10 rat diyabetik komplikasyonlar neticesinde kaybedildi. Değerlendirme 30 rat üzerinde yapıldı.

Birçok çalışmada diyabetik nefropati oluşması için geçmesi gereken sürenin en az 3 hafta olarak belirtilmesi nedeniyle ratlar 4 hafta sonra sakrifiye edildi. 4. hafta sonunda ratların kan şekerleri tekrar ölçüldü.

Kan Glukoz Düzeyi Açısından Karşılaştırmalar:

Ratların birinci ve dördüncü hafta ölçülen kan glukoz düzeyi ortalamaları istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo I, II).

Tablo I : Birinci hafta kan glukoz düzeyi (mg/dl) ortalamaları

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| K.G.D.ort | 126 | 557 | 431 | 453 |
| Std.D. | 15,8 | 71,1 | 72,1 | 77,2 |
| Minimum | 106 | 406 | 320 | 330 |
| Maximum | 162 | 600 | 544 | 538 |

Std.D: Standart deviasyon K.G.D. ort : Ortalama kan glukoz düzeyi (mg/dl)

Tablo II: Dördüncü hafta kan glukoz düzeyi (mg/dl) ortalamaları

| | Kontrol | Diyabetik Kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|-------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| K.G.D. ort | 131 | 464 | 459 | 387 |
| Std.D. | 15,7 | 84,4 | 42,8 | 173,5 |
| Minimum | 108 | 323 | 394 | 155 |
| Maximum | 154 | 579 | 511 | 530 |

Std.D: Standart deviasyon K.G.D. ort : Ortalama kan glukoz düzeyi (mg/dl)

Kontrol grubu ile diyabetik kontrol grubun kan glukoz düzeyi ortalamaları arasında istatikselsel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.001$). Diyabetik kontrol grubu ile 10 mg pioglitazon alan gruplar arasında kan şekerleri ortalamaları bakımından istatikselsel açıdan anlamlı bir fark yoktu. Diyabetik kontrol ile 30 mg pioglitazon alan ratların kan şekerleri ortalamaları arasında da istatikselsel olarak anlamlı fark yoktu. Ayrıca 10 mg ve 30 mg pioglitazon alan diyabetik gruplar arasında da istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Böbrek Dokularının Patolojik İnceleme Sonuçları:

Patolojik olarak ratların böbrek dokuları glomerüler fokal nekroz, bowman kapsül aralığında genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, tübül dilatasyonu, interstisyel inflamasyon, konjesyon, damar duvarında kalınlaşma, interstisyel fibrozis, glomeruloskleroz açısından incelendi. Resim 4'te olağan tübül yapısı gösterilmiştir.

Kontrol ve diyabetik kontrol grupları arasında glomerüler fokal nekroz, tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatikselsel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0.033$, $p=0.013$, $p=0.003$).

Diyabetik kontrol ile 10 mg ilaç alan gruplar arasında tübül epitelinde nekroz, damar duvarında kalınlaşma, glomerüler fokal nekroz açısından istatikselsel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0.040$, $p=0.007$, $p=0.031$). Diyabetik kontrol grubunun %57'sinde glomerüllerde fokal nekroz açısından şiddetli derecede etkilenme mevcutken, 10 mg alan grupta şiddetli derecede etkilenme yoktu. Tübül epitelinde nekroz diyabetik kontrol grubunun %14.3'ünde izlenmezken 10 mg ilaç alan grubun %66.7'sinde nekroz izlenmedi. Damar

duvarında kalınlaşma açısından ise diyabetik kontrol grubun %85.7'sinde şiddetli derecede etkilenme varken 10 mg ilaç grubunda bu oran %11.1 idi.

Diyabetik kontrol ile 30 mg ilaç grupları arasında tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0.027$, $p=0.008$). Diyabetik kontrol grubunda ratların %71.4'ünde tübül dilatasyonu, %85.7'sinde damar duvarında kalınlaşma şiddetli derecede gözlenirken 30 mg ilaç alan diyabet grubunda ise şiddetli derecede lezyon saptanmadı. Glomerüler fokal nekroz açısından değerlendirildiğinde ise diyabetik kontrol grubu ile 30 mg ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasa da diyabetik kontrol grubunun %57'sinde şiddetli derecede lezyon görülürken 30 mg ilaç alan diyabetik grupta şiddetli derecede etkilenme saptanmadı. Ayrıca diyabetik kontrol grubunda glomerüler fokal nekroz açısından hiç etkilenme görülmemeyenlerin oranı % 14.3 iken 30 mg ilaç alan diyabet grubunda ise ratların % 66.7'sinde hiç etkilenme yoktu.

10 mg ile 30 mg ilaç grubu karşılaştırıldığında tüm patolojik değişiklikler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Ancak damar duvarında kalınlaşma açısından incelendiğinde 30 mg grubunda ratların %66.7'sinde etkilenme olmadığı halde 10 mg grubun ise sadece %22'sinde etkilenme saptanmadı (Tablo III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X).

Bowman kapsül aralığında genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, interstisyel inflamasyon, konjesyona bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Grupların hiçbirinde glomerüloskleroz ve interstisyel fibrozis izlenmedi (Resim 1 ve 2).

Tablo III: Glomerülde fokal nekroz derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 5 (%62.5) | 1 (%14.3) | 4 (%44.4) | 4 (%66.7) |
| + % | 3 (%37.5) | 2 (%28.6) | 5 (%55.6) | 2 (%33.3) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 4 (%57.1) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |

(-) Etkilenme olmayanlar (+) Orta derecede etkilenme (++) Şiddetli derecede etkilenme

Tablo IV: Bowman kapsül aralığında genişleme derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 4 (%50.0) | 0 (%0.0) | 4 (%44.4) | 1 (%16.7) |
| + % | 3 (%37.5) | 6 (%85.7) | 4 (%44.4) | 4 (%66.7) |
| ++ % | 1 (%12.5) | 1 (%14.3) | 1 (%11.1) | 1 (%16.7) |

Tablo V: Tübül epitelinde dejenerasyon derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 3 (%37.5) | 0 (%0.0) | 1 (%11.1) | 2 (%33.3) |
| + % | 5 (%62.5) | 5 (%62.5) | 8 (%88.9) | 4 (%66.7) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 2 (%28.6) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |

Tablo VI: Tübül epitelinde nekroz derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 3 (%37.5) | 1 (%14.3) | 6 (%66.7) | 4 (%66.7) |
| + % | 5 (%62.5) | 6 (%85.7) | 2 (%22.2) | 2 (%33.3) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 1 (%11.1) | 0 (%0.0) |

Tablo VII: Tübül dilatasyonu derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 1 (%12.5) | 0 (%0.0) | 7 (%77.8) | 1 (%16.7) |
| + % | 7 (%87.5) | 2 (%28.6) | 2 (%22.2) | 5 (%83.3) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 5 (%71.4) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |

Tablo VIII: İnterstisyel inflamasyon derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 5 (%62.5) | 4 (%57,1) | 4 (%44.4) | 4 (%66.7) |
| + % | 3 (%37.5) | 3 (%42,9) | 5 (%55,6) | 1 (%16,7) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 1 (%16.7) |

Tablo IX: Konjesyon derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 1 (%12.5) | 0 (%0.0) | 6 (%66.7) | 0 (%0.0) |
| + % | 7 (%87.5) | 7 (%100) | 3 (%33.3) | 6 (%100) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |

Tablo X: Damar duvarında kalınlaşma derecesi

| | Kontrol | Diyabetik kontrol | 10 mg pioglitazon | 30 mg pioglitazon |
|------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - % | 4 (%50) | 1 (%14.3) | 2 (%22.2) | 4 (%66.7) |
| + % | 4 (%50) | 0 (%0.0) | 6 (%66.7) | 2 (%33.3) |
| ++ % | 0 (%0.0) | 6 (%85.7) | 1 (%11.1) | 0 (%0.0) |

Diyabetik kontrol grubu ile pioglitazon alan grup olarak karşılaştırıldığında, tübül dilatasyonu, tübül epitelinde nekroz, glomerüler fokal nekroz ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,023$, $p=0,034$, $p=0,005$, $p=0,001$) (Tablo XI). Damar duvarında kalınlaşma açısından değerlendirildiğinde, diyabetik kontrol grubunun %85.7'sinde şiddetli derecede lezyon görülürken, ilaç grubunun sadece %6.7'sinde şiddetli lezyon görüldü. Tübül epitelinde nekroza bakıldığında diyabetik kontrol grubun %14.3'ünde lezyon saptanmazken, ilaç grubunun %66.7'sinde lezyon izlenmedi. Tübül dilatasyonu açısından ise diyabetik kontrol grubunda şiddetli lezyon görülme oranı %71.4 saptanırken, ilaç grubunun ise %13.3'ünde şiddetli lezyon izlendi. Glomerüler fokal nekroz diyabetik kontrol grubunun %57.1'inde şiddetli derecede saptanırken, ilaç grubunda şiddetli lezyona rastlanmadı (Resim 3,5 ve 6).

Tablo XI: Diyabetik kontrol ile pioglitazon alan grubun patolojik değişiklikleri

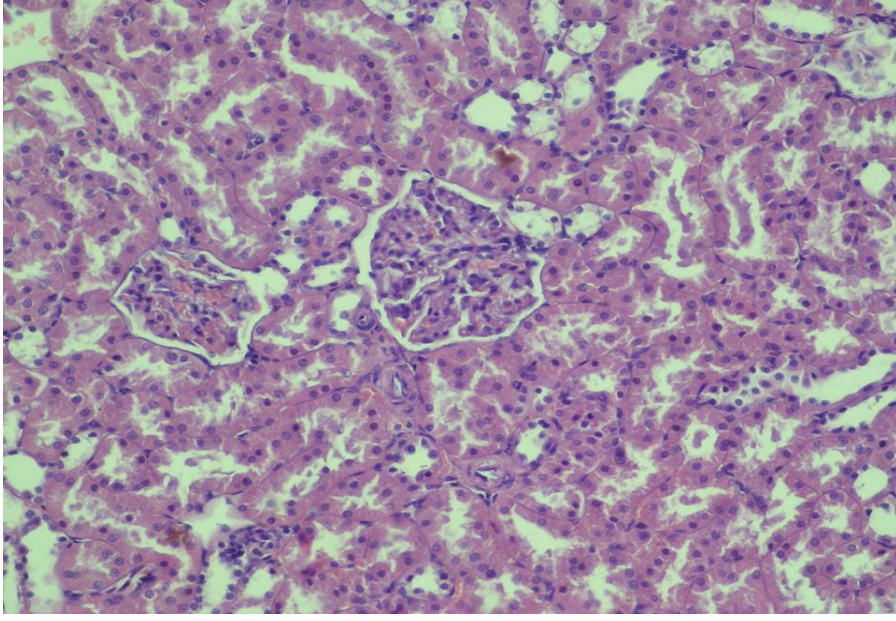
| | Diyabetik Kontrol | | | İlaç Grubu | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | - % | + % | ++ % | - % | + % | ++ % |
| Damar duvarında kalınlaşma | 1 (%14.3) | 0 (%0) | 6 (%85.7) | 6 (%40) | 8 (%53.3) | 1 (%6.7) |
| Tübül epitelinde nekroz | 1 (%14.3) | 6 (%85.7) | 0 (%0.0) | 10 (%66.7) | 4 (%26.7) | 1 (%6.7) |
| Tübül dilatasyonu | 0 (%0.0) | 2 (%28.6) | 5 (%71.4) | 1 (%6.7) | 12 (%80) | 2 (%13.3) |
| Glomerülde fokal nekroz | 1 (%14.3) | 2 (%28.6) | 4 (%57.1) | 8 (%53.3) | 7 (%46.7) | 0 (%0.0) |
| Bowman aralığında genişleme | 0 (%0.0) | 6 (%85.7) | 1 (%14.3) | 5 (%33) | 8 (%53.3) | 2 (%13.3) |
| Konjesyon | 0 (%0.0) | 7 (%100) | 0 (%28.6) | 0 (%0.0) | 12 (%80) | 3 (%20) |
| Tübül epitelinde dejenerasyon | 0 (%0.0) | 5 (%71.4) | 2 (%28.6) | 3 (%20) | 12 (%80) | 0 (%0.0) |
| İntertisyel İnflamasyon | 4 (%57.1) | 3 (%42.9) | 0 (%0.0) | 8 (%53.3) | 6 (%40) | 1 (%6.7) |

Doku Düzeyinde Antioksidan ve İnflamatuvar Belirteçler

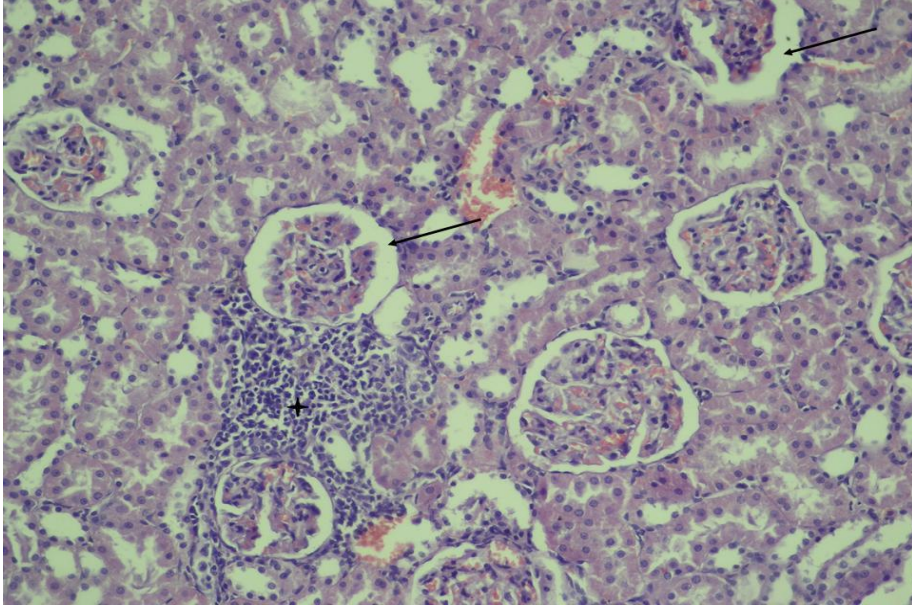
Kontrol ve diyabetik kontrol grubun MDA ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.011$). Ancak diyabetik kontrol grup ile ilaç grupları arasında MDA ortalamaları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Aynı şekilde diyabetik kontrol ve ilaç gruplarının SOD, CAT, GSH, NO, TNF- α ve IL-6 ortalamaları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo XI: SOD, CAT, GSH, MDA, NO, TNF- α , IL-6 düzeyleri

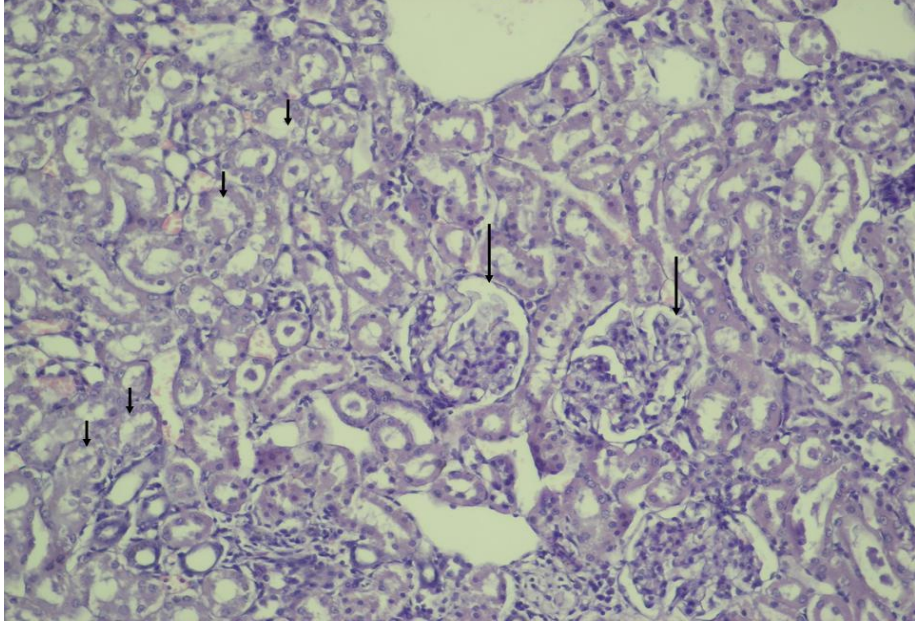
| | SOD U/mg protein | CAT k/s/mg protein | GSH mg/g protein | MDA nmol/mg protein | NO pg /mg protein | TNF-α pg /mg protein | IL- 6 ng/g protein |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|------------------------------|
| Kontrol | 6,1 \pm 2,7 | 1,8 \pm 0,6 | 61,5 \pm 41,8 | 1,3 \pm 0,5 | 51,3 \pm 111,5 | 191,8 \pm 73,11 | 348,7 \pm 137,9 |
| D. Kontrol | 5,1 \pm 4,81 | 1,5 \pm 0,6 | 56,6 \pm 31,0 | 2,8 \pm 1,5 | 16,6 \pm 11,8 | 183,7 \pm 36,8 | 323,3 \pm 93,3 |
| 10 mg piog | 6,9 \pm 3,1 | 1,7 \pm 0,7 | 92,3 \pm 114,7 | 2,1 \pm 1,1 | 15,1 \pm 8,8 | 207,8 \pm 86,6 | 329,7 \pm 146,7 |
| 30 mg piog | 5,7 \pm 2,9 | 2,6 \pm 2,2 | 74,5 \pm 47,8 | 1,7 \pm 0,6 | 22,8 \pm 28,0 | 198,1 \pm 68,3 | 358,2 \pm 46,2 |



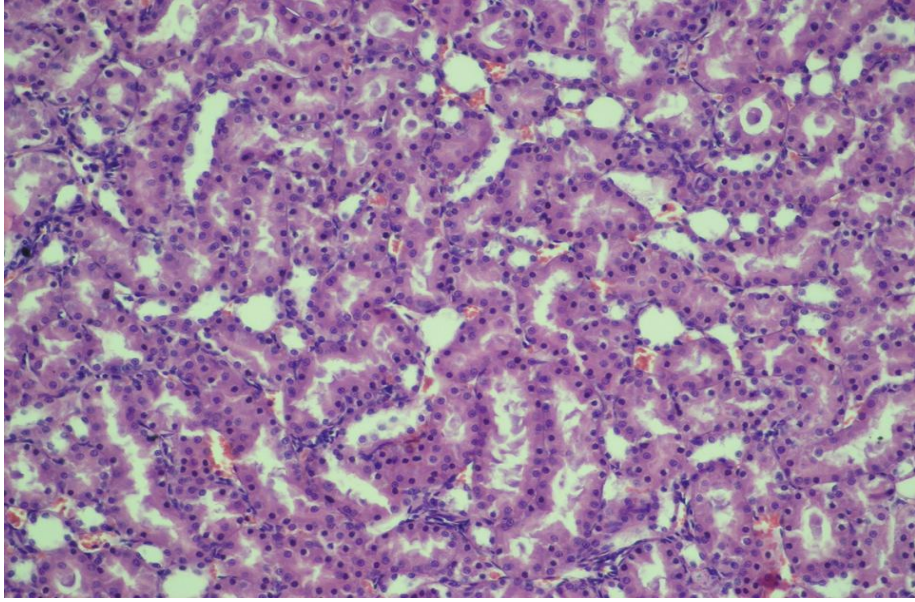
Resim 1: Hafif konjesyon bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).



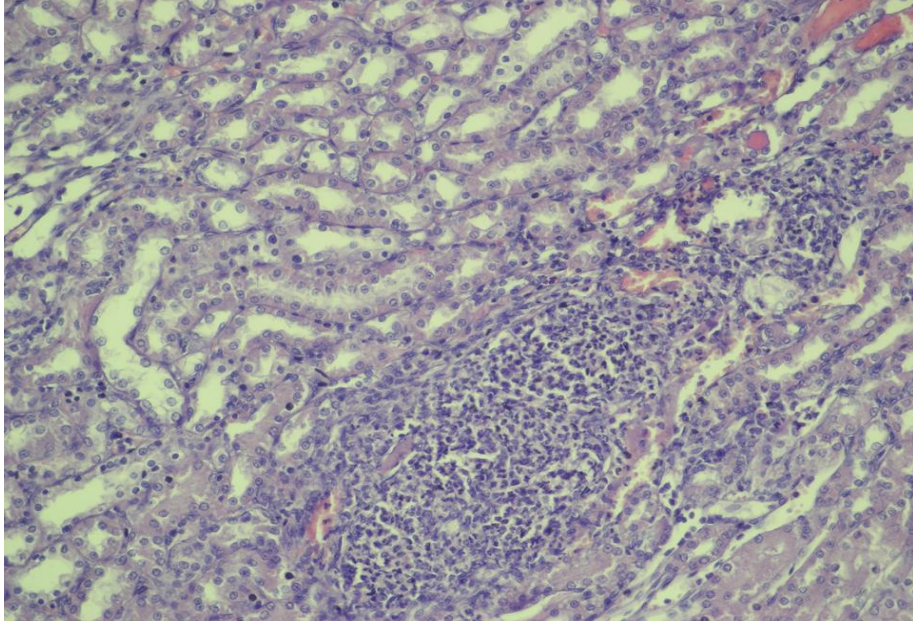
Resim 2: Konjesyon, interstiyel inflamasyon (yıldız), ve Bowman kapsül aralığında genişleme (oklar) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).



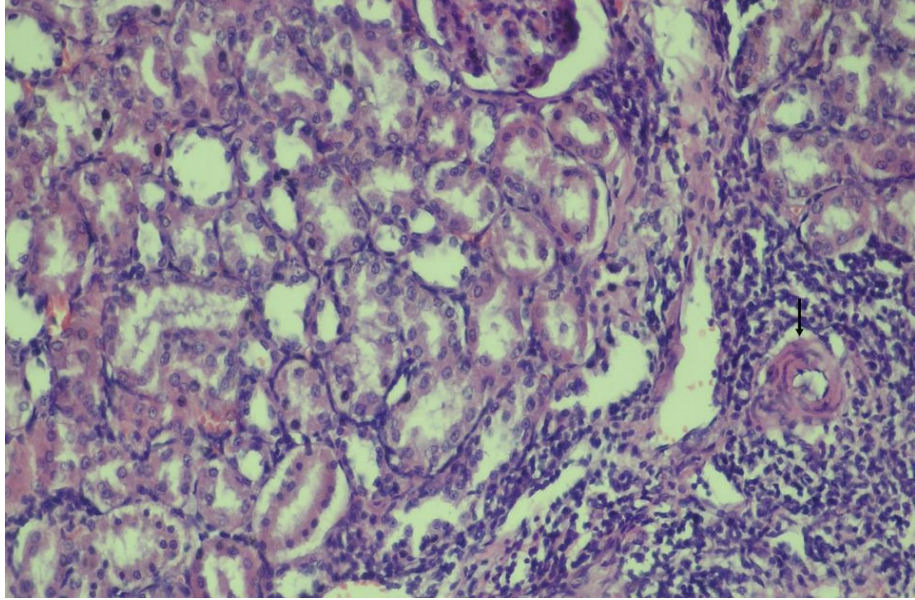
Resim 3: Tübüler dilatasyon ve dejenerasyon (kısa oklar) ile fokal glomerüler nekroz (uzun oklar) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).



Resim 4: Olağan tübül yapıları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).



Resim 5: Yoğun interstisyel inflamasyon, tübül dejenerasyonu ve dilatasyonu gösteren böbrek dokusu (HE, x200).



Resim 6: İnterstisyel inflamasyon, tübül dejenerasyonu, tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma (ok) bulguları gösteren böbrek dokusu (HE, x200).

TARTIŞMA

Diyabet, genetik yatkınlığın varlığında çevresel nedenlerle kolayca tetiklenen bir hastalıktır. Diyabetik hastalar morbidite ve mortaliteye yol açabilecek çok sayıda kronik komplikasyonlara adaydır. Diyabetik komplikasyonlar genellikle hiperglisemi başladıktan uzun süre sonra ortaya çıkarlar ancak tip 2 diyabette bazı hastalarda tanı sırasında da komplikasyonlar bulunabilir. Makro ve mikrovasküler komplikasyonlar ilerleyici olarak seyretmektedir^{83,84}. Makrovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalarda ölüm nedenleri arasında başta yer alır.

Son yıllarda bir çok hastalığın patogenezinin sorumlu tutulan serbest radikaller, diyabetin komplikasyonları açısından da önem kazanmıştır. Oksidatif stres terimi genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu ve hemen hemen tüm patolojik durumlarla ilişkisi olan reaksiyonlar serisi olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikallerin başlıca ana kaynağı oksijendir. SOR, normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir⁴². Normal koşullar altında SOR'nin fizyolojik seviyesi/reaktivitesi detoksifikasyon mekanizmalarıyla hassas bir şekilde dengelenir ve bu dengede özellikle antioksidan savunma mekanizmaları önemli rol oynamaktadır. SOD, GSH-Px ve KAT gibi bazı antioksidan enzimler, GSH, tiyoller, E ve C vitamini gibi antioksidan vitaminler, selenyum gibi eser elementler ve ürik asit, bilirubin gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler antioksidan savunma mekanizmalarının en önemlilerindedir. Pek çok çalışmada, tip 2 diyabetik hastalarda serum ekstrasellüler süperoksit dismutaz (ec-SOD) konsantrasyonlarının kontrollere oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar, hiperglisemi nedeniyle serbest oksijen radikallerinin arttığını ve bu durumun endotel hasarından sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur.

Diabetes Mellitus'ta uzun süreli hiperglisemi nedeni ile hücre dışı proteinlerin nonenzimatik glikasyonuna bağlı olarak serbest radikal üretiminde artış olmaktadır^{32,50}. Glikozile protein oksidasyonu ile serbest radikallerin sentezinde artış, süperoksit dismutaz temizleyici gücünün azalması ve indirgenmiş glutatyonun yokluğu, DM'ta artan oksidatif stresin kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bunlardan başka metabolik stres, sorbitol yolundaki aktivite değişiklikleri, inflamatuvar aracılardan düzeylerindeki değişimler ve hipoksi ile iskemik reperfüzyon sonucu lokalize doku hasarı, oksidatif stresi arttıran nedenler arasında gösterilmektedir⁵¹. Normal koşullarda serbest radikallerin üretimi ile temizlenmesi arasında

bir denge bulunmakta, tip 2 DM'lu olgularda ise temizleyicilerdeki azalma sonucu serbest radikallerde artış meydana gelmektedir. DM'ta glisemik kontrolün bozulmasına bağı olarak hücrel antioksidan düzeyi azalmaktadır. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik, DM'un kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır.

Diabetes Mellitus'ta antioksidan enzimlerin durumuna ilişkin olarak yapılan pek çok çalışmada birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Diyabet oluşturulan sıçanlarda serbest radikal temizleyici enzimler ölçülmüş ve glutasyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir⁴⁹.

Son dönem böbrek yetmezliği nedenlerinde ilk sırayı alan diyabetik nefropati, DM'un üzerinde en çok çalışılan komplikasyonlarından olmuştur. Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DN gelişimini etkileyen risk faktörleridir¹⁶. DN patogenezinde, glukozun direk toksik etkileri, polyol yolu aktivasyonu, protein, lipid, lipoprotein, aminoasitlerin glikasyonu ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, çeşitli büyüme faktörlerinin artmış aktivitesi ve RAAS rol oynamaktadır. Hücre hasarına yol açan reaktif oksijen ürünleri ve bu hasarı önlemekle görevli antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasının tip 2 diyabetteki vasküler değişikliklerin esas sorumlusu olduğu düşünülmektedir²².

Kornatowska ve arkadaşları, 21 proteinürik, 14 normoalbuminürik tip 2 diyabetik hasta ve 19 sağlıklı gönüllüde, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi arasındaki farkları incelemiştir. Kontrol grubuna kıyasla, lipid peroksidasyonu tüm diyabetik hastalarda yüksek, antioksidan (süperoksit dismutaz ve katalaz) enzim aktivitesi düşük bulunmuştur. Diyabetikler arasında yapılan karşılaştırmada, bu olumsuz sonuçların proteinürisi olanlarda daha belirgin olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, diyabetle artan ve vasküler komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynayan oksidatif stresin, nefropati gelişmesiyle şiddetlendiği sonucuna varmışlardır³³.

Craven ve arkadaşları ise deneysel çalışmalarında, kontrol grubundaki sağlıklı farelere göre, diyabetik farelerde böbrek ağırlığı, glomerüler hacim, üriner albumin atılımı ve glomerüler TGF- β 1 üretiminin arttığını, bu olumsuz gelişmelerin antioksidan özelliği olan C vitamini verilen grupta anlamlı düşük bulunduğunu bildirmişlerdir³⁴.

Diyabetik mikroanjiyopati, diyabetik hastalarda görülen en karakteristik morfolojik değişikliktir ve vasküler bazal membranın genişliğinde artış gözlenir. En belirgin böbrek lezyonu glomerüllerde ve damarlarda belirlenir. Glomerüloskleroz mezangiyal alanda eozinofilik, PAS pozitif mezangiyal matriksin diffüz olarak artmasına bağlıdır. En sık gözlenen lezyondur. Diffüz mezangiyal matriks artışı ve glomerül kapiller bazal membranda kalınlaşma tipik bulgular arasındadır. Arteriyoloskleroz diyabetik nefropatide sık ve erken görülen bir değişikliktir. Diyabette damarsal hastalığın artışının glomerüldeki değişikliklerin ağırlığı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bu değişiklikler erken dönemde olup damar duvarında kalınlaşma olarak tespit edilir. Tübüler değişiklikler genellikle glomerül değişikliklerinin derecesini yansıtan bir bulgudur. Tübül bazal membranında kalınlaşma, dilatasyon ve epitelde nekroz görülür. İnterstisyel fibrozis diyabetik böbreklerde olağandır ve kronik inflamatuvar infiltrasyonla birliktedir¹⁸.

Diyabetik nefropatideki patolojik değişikliklerin pioglitazon ile geçirdiği süreçleri içeren sınırlı birkaç çalışma mevcuttur. Tanimoto M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, glomerüler hiperfiltrasyonun mekanizmasında eNO'in etkisi incelenmiştir. Pioglitazon 10 mg/kg tedavisi uygulanan ratlarda glomerüler ve bowman kapsül volümü ölçülmüştür. Ec NOS ve İNOS proteinlerinin glomerüllerden eksprese edildiği saptanmıştır. Tedavi sonrası bowman kapsül volümünde iyileşme, glomerüler damar endotelinde ec NOS salınımında azalma, İNOS'un ise saptanamadığı bildirilmiştir. Kan şekerleri değişiklikleri önemsiz olarak değerlendirilmiştir⁸⁵.

Dobrian AD ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise pioglitazonun hipertansif ve antioksidan etkisini inceleyen çalışmalarında renal NO ekspresyonunu artırarak etki yaptığı gösterilmiştir⁸⁶. Okada T. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, pioglitazon verilen ratlarda glomerüler hipertrofi ve mezangiyal matrix ekspansiyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir⁸⁷.

Çalışmamızda kontrol ve diyabetik kontrol grupları arasında glomerüler fokal nekroz, tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol ile 10 mg ilaç alan gruplar arasında ise tübül epitelinde nekroz, damar duvarında kalınlaşma, glomerüler fokal nekroz açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol grubunun %57'sinde glomerüllerde fokal nekroz açısından şiddetli derecede etkilenme mevcutken, 10 mg alan grupta şiddetli derecede etkilenme yoktu. Tübül epitelinde nekroz diyabetik kontrol grubunun %14.3'ünde

izlenmezken 10 mg ilaç alan grubun %66.7'sinde lezyon izlenmedi. Damar duvarında kalınlaşma açısından ise diyabetik kontrol grubun %85.7'sinde şiddetli derecede etkilenme varken 10 mg ilaç grubunda bu oran %11.1 idi. Bu durum pioglitazonun düşük dozda da etkili olabildiğini, böbrek lezyonlarının oluşumunu yavaşlattığını düşündürdü.

Diyabetik kontrol ile 30 mg ilaç grupları arasında tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol grubunda ratların %71.4'ünde tübül dilatasyonu, %85.7'sinde damar duvarında kalınlaşma şiddetli derecede gözlenirken 30 mg ilaç alan diyabet grubunda ise şiddetli derecede lezyon saptanmadı. Glomerüler fokal nekroz açısından değerlendirildiğinde ise diyabetik kontrol grubu ile 30 mg ilaç grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasa da diyabetik kontrol grubunun %57'sinde şiddetli derecede lezyon görülürken 30 mg ilaç alan diyabetik grupta şiddetli derecede etkilenme saptanmadı. Ayrıca diyabetik kontrol grubunda glomerüler fokal nekroz açısından hiç etkilenme görülme oranı % 14.3 iken 30 mg ilaç alan diyabet grubunda ise ratların % 66.7'sinde glomerüler fokal nekroz gözlenmedi. 30 mg pioglitazon alan diyabetik ratların diyabetik kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamasının sebebi ise rat sayısının yetersiz olmasına bağlı olabileceği düşünüldü.

10 mg ile 30 mg ilaç grubu karşılaştırıldığında tüm patolojik değişiklikler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Bu da bize ilacın düşük dozda da böbrek lezyonlarının oluşumunu yavaşlatmada etkili olduğunu göstermektedir.

Diyabetik kontrol grubu ile pioglitazon alan grup olarak karşılaştırıldığında, tübül dilatasyonu, tübül epitelinde nekroz, glomerüler fokal nekroz ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Damar duvarında kalınlaşma açısından değerlendirildiğinde, diyabetik kontrol grubunun %85.7'sinde şiddetli derecede lezyon görülürken, ilaç grubunun sadece %6.7'sinde şiddetli lezyon görüldü. Tübül epitelinde nekroza bakıldığında diyabetik kontrol grubun %14.3'ünde lezyon saptanmazken, ilaç grubunun %66.7'sinde lezyon izlenmedi. Tübül dilatasyonu açısından ise diyabetik kontrol grubunda şiddetli lezyon görülme oranı %71.4 saptanırken, ilaç grubunun ise %13.3'ünde şiddetli lezyon izlendi. Glomerüler fokal nekroz diyabetik kontrol grubunun %57.1'inde şiddetli derecede saptanırken, ilaç grubunda şiddetli lezyona rastlanmadı.

Bowman kapsül aralığında genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, interstisyel inflamasyon, konjesyona bakıldığında gruplar arasında fark saptanmadı. Ancak diyabetik kontrol grubu ile ilaç verilen grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, bu lezyonların görülme oranı, ilaç alan grupta diyabetik gruba göre oldukça düşüktü. Glomerüloskleroz ve interstisyel fibrozis 4 grupta da saptanmadı. Bu durum, bu lezyonların oluşumu için yeterli sürenin geçmediği şeklinde yorumlandı.

Tüm bu bulgular glomerüler lezyonlar, damar duvarı kalınlaşması ve tübül değişiklikleri açısından pioglitazonun DN'yi yavaşlattığı veya önlediği konusunda ümit verici olduğunu düşündürdü.

Tiazolidindionlar, primer etkileri periferik insülin direncini düşürmek olan ajanlardır. Primer etkilerini peroksizomal proliferatörle aktifleştirilmiş reseptörler (PPAR) olarak adlandırılan spesifik reseptörleri aktif hale getirerek gösterirler. PPAR α , PPAR β (δ), PPAR γ olmak üzere üç alt tipi vardır. TZD'ların antidiyabetik etkilerinin PPAR γ alt tipine bağlanma ve onu aktif hale getirme yeteneğiyle yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. TZD'ların lipid profili, vasküler sistem üzerinde de etkileri mevcuttur. Vasküloprotektif etkilerinin çoğu insülin direncini kırıcı/antihiperглиsemik etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda da diyabetik grup ile ilaç grubunun kan şekerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bu da bize pioglitazonun kan şekerini düşürücü etkisinden bağımsız olarak DN gelişimini yavaşlattığı veya önleyebildiğini düşündürdü.

Tiazolidindionların intrasellüler antioksidan aktivitesi dikkate değerdir. Bu özellik koruyucu antioksidan etkilerini yansıtmaktadır. Bu ajanlar serbest radikaller üzerinde direk antioksidan etki göstermezler. Fakat oksidatif stresin oluşumuna neden olan hiperглиsemik durumlardan birkaç mekanizmayı bloke ederek etki gösterirler. Bu etkilerini gösteren birçok çalışma yapılmıştır.

Volkovova K ve arkadaşları pioglitazonun diyabetik ratlarda böbrekte GSH-Px aktivitesini % 60 oranında artırdığını, katalaz ve SOD aktivitesinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir⁸⁸. Son yıllarda TZD'nin ve özellikle pioglitazonun potent glikasyon ve protein çapraz bağlanmasının inhibitörü olan güçlü antioksidan olduğu Rahbar S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir⁸¹. Zhang XF ve arkadaşları diyabetik ratların böbreklerinde MDA seviyelerinin arttığını bulmuşlardır⁵³. Faure ve arkadaşları ile Vantyghe ve

arkadaşları, DM'lu yetişkinlerde düşük düzeyde metabolik dekompozisyon olsa bile MDA düzeyinin oksidatif stres sonucu arttığını rapor etmişlerdir^{89,90}. Biz de çalışmamızda pioglitazonun antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini doku düzeyinde ve patolojik olarak inceledik. Çalışmamızda kontrol grup ile diyabetik kontrol grubun MDA değerleri ortalamaları arasında anlamlı fark saptandı. Ancak diyabetik kontrol ile ilaç alan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

Gumieniczek A.'nın ratlar üzerinde yaptığı çalışmada kan glukozu kontrol grubunda aynı kalırken, diyabetik ratlarda çalışma süresince yüksek saptanmıştır. Pioglitazon alan grupta glukoz seviyesi tedaviden etkilenmemiştir. Böbrek dokusunda SOD, CAT seviyesine bakılmış ve SOD diyabetiklerde kontrollere göre özellikle düşük olarak bulunmuş, pioglitazon tedavisinden etkilenmemiştir. CAT diyabetik ratlarda yüksek saptanmış olup pioglitazon alan grupta ise tedavi sonrası anlamlı düşme gözlenmiştir¹. Yine Gumieniczek A.'nın ratlar üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada 1mg/kg pioglitazon verilen ratlarda diyabetik olanların böbreklerinde glutatyon redüktaz ve glutatyon seviyesi azalmıştır. Pioglitazon verilen grupta ise normal düzeylerde saptanmıştır. GSHPx düzeyinde anlamlı farklılık saptanmamıştır⁹¹. Çalışmamızda ise diyabetik kontrol grubu ile pioglitazon alan grubun SOD, CAT, MDA, GSH ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık bulunmadı.

Diyabetik hastalar inflamasyonun ılımlı şeklini içerirler. Diyabette inflamasyon oksidatif stresin üretimine neden olan hiperglisemi ile ayrıca ilişkilidir. İnflamasyonda mevcut bazı yollar hiperglisemi ile aktive olur. TZD'lar antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir ve bunun hipoglisemik etkilerinden bağımsız olabileceği diyabetik hastalarda doğrulanmıştır. Desfaits ve arkadaşları tip 2 diyabette monositlerden TNF- α salınımında belirgin bir artış olduğunu göstermiştir⁵⁵. Agarwal R.'nin yaptığı başka bir çalışmada ise diyabetik insanlarda inflamatuvar parametreler (IL-6, TNF- α) ve lipid oksidasyon parametresi olan MDA değerlendirilmiştir. Pioglitazon verilen grupta tedavi sonrası MDA'da bir değişiklik olmazken IL-6 düzeyinde anlamlı düşüş saptanmıştır. TNF- α düzeylerine ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır⁶¹. Gumieniczek A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyabetik tavşanlarda 4 ve 8 hafta pioglitazon tedavisi sonrası total antioksidan status (TAS), askorbik asit (AA), IL-6 seviyelerine bakılmıştır. AA ve TAS diyabetik tavşanlarda azalmıştır. Pioglitazon tedavisi alanlarda anlamlı artış olmuştur. Diyabetiklerde IL-6 seviyesi artarken tedavi alanlarda

azalmıştır⁵⁵. Jyoti Chaudhry ve arkadaşları, alloxan ile diyabetik hale getirilen ratlarda pioglitazon tedavisinin GSHPx'i artırırken, GSH'u azalttığını göstermişlerdir. NO diyabetik olanlarda artarken tedavi grubunda gerilediği görülmüştür². Çalışmamızda TNF- α ve IL-6 değerleri ortalamaları arasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Sonuçta diyabetik grupta glomerüler fokal nekroz, tübül epitelinde nekroz, tübül dilatasyonu, damar duvarı kalınlaşması gibi patolojik süreçler izlenirken pioglitazonun bu bulguları geriletmediği saptandı. Bu etki anti-gliseremik etkisinden bağımsızdı. Ancak doku düzeyinde bakılan antioksidan ve inflamatuvar parametrelerde ilaç alan ve almayan gruplar arasında bir farklılık saptanmadı. Bu sonuca göre pioglitazonun diyabetik nefropati gelişimini önleyici etkisi olabileceği ancak antioksidan sistem üzerindeki etkisini saptamak için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Pioglitazon tedavisi antiglisemik etkisinden bağımsız olarak DN sürecini yavaşlatmaktadır. Glomerüler, tübüler ve vasküler sistemde olumlu etkileri mevcuttur. Bu etkisinin oksidatif parametreler üzerinden olabileceği düşünülmüş ancak çalışmamızda anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında diyabet hastalarında oral antidiyabetik olarak pioglitazon tedavisinin glisemik kontrolün yanısıra nefropati gelişimini önleyici etki göstermesi antidiyabetik ilaç seçiminde önemli bir veri olabileceği gibi, diyabetik nefropatiyi önlemek için başka ilaç kullanım gereksinimini de önleyebilecektir.

ÖZET

Amaç: Diyabetik Nefropati, Diabetes Mellitus'un yaygın komplikasyonlarından biridir ve böbrek yetmezliğinin en sık nedenlerindedir. Bu yüzden diyabetik nefropati gelişmesini önlemeye yönelik çalışmalar yoğun şekilde sürmektedir. Oksidatif stres, diyabetik nefropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. PPAR γ reseptör aktivatörleri olan tiazolidindionların antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada tiazolidindion tedavisi ile diyabetik nefropati gelişiminin engellenmesi ve bu süreçteki oksidatif stres belirteçlerinin doku düzeylerinin ölçülmesi planlandı.

Yöntem: Çalışmada streptozotocin ile diyabet oluşturulan ratların bir kısmına pioglitazone (10mg/kg veya 30mg/kg) verildi. 4 haftalık çalışma süresini tamamlayan 30 ratın böbrek dokuları oksidatif stres ile ilgili parametrelerin değerlendirilmesi ve patolojik inceleme için sakrifiye edildi.

Bulgular: Kontrol ve diyabetik kontrol grubu arasında glomerüler fokal nekroz, tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol ile 10 mg ilaç alan gruplar arasında tübül epitelinde nekroz, damar duvarında kalınlaşma, glomerüler fokal nekroz açısından anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol ile 30 mg ilaç grubu arasında tübül dilatasyonu ve damar duvarında kalınlaşma açısından anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol grubu ile pioglitazon alan gruplar arasında, tübül dilatasyonu, tübül epitelinde nekroz, glomerüler fokal nekroz ve damar duvarında kalınlaşma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diyabetik kontrol grubu ve ilaç alan gruplar arasında kan glukozu açısından farklılık saptanmadı. Diyabetik kontrol grubu ile ilaç alan gruplar arasında malonildialdehit, TNF- α , süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, nitrik oksit ve IL-6 ortalamaları arasında farklılık saptanmadı.

Sonuç: Pioglitazonun diyabetik ratlarda antiglisemik etkisinden bağımsız olarak glomerüler fokal nekroz, tübül epitelinde nekroz, tübül dilatasyonu, damar duvarı kalınlaşması gibi lezyonları geriletmediği saptandı. Ancak doku düzeyinde antioksidan parametrelerde pioglitazonun olumlu bir etkisi saptanmadı. Bu sonuca göre pioglitazonun diyabetik nefropati gelişimini önleyici etkisi olabileceği, ancak bu etkinin hangi

mekanizmalarla oluřtuđunu anlayabilmek için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu söylenbilir.

Anahtar Kelimeler: Pioglitazon, antioksidanlar, diyabetik nefropati

İletişim Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakóltesi İ Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye. munire_kuru@yahoo.com.tr

SUMMARY

Aim: Diabetic nephropathy is one of the common complications of diabetes mellitus and among the most common causes of renal failure. Hence, efforts to prevent development of diabetic nephropathy is going on intensively. Oxidative stress plays important role in development and progression of diabetic complications such as DN. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of thiazolidinedione, a PPAR γ receptor activator, has been demonstrated in some studies. The current study aimed to prevent development of diabetic nephropathy with pioglitazone treatment and to measure tissue levels of oxidative stress markers in this process.

Method: In the present study, some rats made diabetic by streptozocine received pioglitazone (either 10 mg/kg or 30 mg/kg). Renal tissues of 30 rats completing 4-weeks of study were sacrificed for evaluation of related parameters and pathological examination.

Results: Significant difference was found in glomerular focal necrosis, tubular dilatation and thickening on vascular wall between the control and diabetic groups. Significant difference was found in necrosis in tubular epithelium, thickening on vascular wall, and glomerular focal necrosis between the diabetic control group and the group receiving 10 mg of drug. Significant difference was found in tubular dilatation and thickening on vascular wall between the diabetic group and the group receiving 30 mg of drug. Significant difference was found in tubular dilatation, necrosis in tubular epithelium, glomerular focal necrosis and thickening on vascular wall between the diabetic control group and the group receiving pioglitazone. No difference was found in blood glucose between the diabetic control group and the groups receiving drug. No difference was found in averages of malonyldialdehyde, TNF- α , superoxide dismutase, catalase, glutathione, nitric oxide and IL-6 between the diabetic control group and the groups receiving drug.

Conclusion: It was found that pioglitazone led to regression in such lesions as glomerular focal necrosis, necrosis on tubular epithelium, tubular dilatation, and thickening of vascular wall independent of its anti-glycemic effect in diabetic rats. However, no positive effect was found of pioglitazone on oxidant parameters at the tissue level. In the view of this conclusion, it can be suggested that pioglitazone may have protective effect on development

of diabetic nephropathy but further studies are needed to to reveal through which mechanisms this effect occurs.

Key Words: Pioglitazone, antioxidant, diabetic nephropathy

Communication Address: Adnan Menderes University Medical School,
Department of Internal Medicine, Aydın, Türkiye. munire_kuru@yahoo.com.tr

KAYNAKLAR

- 1- Gumieniczek A. Effect of the new thiazolidinedione-pioglitazone on the development of oxidative stress in liver and kidney of diabetic rabbits. *Life Sci* 2003; 74: 553-562.
- 2- Chaudhry J, Ghosh NN, Roy K, Chandra R. Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sci* 2007; 70: 1135-1142.
- 3- Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 2002; 61: 599-608.
- 4- Gumieniczek A, Hopkala H, Rolinski J, Bojarska-Junak A. Interleukin-6 and oxidative stress in plasma of alloxan-induced diabetic rabbits after pioglitazone treatment. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 81-91.
- 5- Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. Diyabetes Mellitus Tanı, Epidemiyoloji ve Sınıflandırma, Cerrahpaşa İç Hastalıkları, 1. Baskı İstanbul: Elma Basım, 2005: 1086-1089.
- 6- Gerich, JE. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes Mellitus: Impaired Insulin Secretion versus Impaired Insulin Sensitivity. *Endocrine Reviews* 1998; 19: 491-503.
- 7- Unger RH, Foster DW. Diabetes mellitus-complications of diabetes. In: Williams RH, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, Wilson JD (Eds.). *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998; 1013-1022.
- 8- Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2509-2517.
- 9- Vora JP, Ibrahim HAA. Clinical manifestations and natural history of diabetic nephropathy. In: Johnson RJ, Feehally J (Eds.). *Comprehensive Clinical Nephrology*. Mosby, 2nd ed. Spain: Elsevier Limited, 2003: 425-37.
- 10- Marshall SM. Recent advances in diabetic nephropathy. *Postgrad Med J* 2004; 80: 624-633.
- 11- Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003; 63: 225-232.
- 12- Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348: 2285-2293.

- 13- Ruggenenti P, Fassi A, Parvanova-Ilieva A, Bruno S, Petrov-Iliev I, Brusegan V, et al. Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 351:1941-1951.
- 14- Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *BMJ* 1997; 314: 783-788.
- 15- American Diabetes Association. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2002; 25: 85-96.
- 16- Altıparmak MR, Apaydın S. Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). Her yönüyle diabetes mellitus. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 383-399.
- 17- Earle KA, Porter KK, Otsberg J, Yudkin JS. Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 286-290.
- 18- Cooper ME. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 1998; 352: 213-219.
- 19- Pickup J, Williams G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. In: Pickup J, Williams G (Eds.). *Textbook of diabetes*. 2nd ed. Edinburg: Blackwell Science, 1997; 1-21.
- 20- Araz M, Yılmaz N, Güngör K, Okan V, Kepekçi Y, Aynacıoğlu AŞ. Angiotensin-converting gene polymorphism and microvascular complications in Turkish type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2001; 54: 95-104.
- 21- Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005; 12: 146-154.
- 22- Lee HB, Yu MR, Yang Y, Ziang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 241-245.
- 23- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315-1321.
- 24- Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 822-832.
- 25- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993; 91: 2463-2469.
- 26- Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM. Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 664-668.

- 27- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15: 1835.
- 28- Wautier JL, Chappey O, Wautier MP, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor mediated endothelial dysfunction in diabetic vasculopathy: SRAGE blocks hyperpermeability. *J Clin Invest* 1996; 97: 238.
- 29- Isshiki K, Haeda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49: 1022-1032.
- 30- Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 45: 147-151.
- 31- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 2000; 49: 2170-2177.
- 32- Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 65-70.
- 33- Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2829-2832.
- 34- Craven PA, Derubertis FR, Kagan VE, Mehlem M, Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1405-1414.
- 35- Lee EY, Chung CH, Kim JH, Hong SY. Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1496-1503.
- 36- Panchapakesan U, Chen XM, Pollock CA. Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy relevance to renoprotection. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; 1: 33-43.
- 37- Price DA, Porter LE, Gordon M, Fisher ND, De'Oliveira JM, Laffel LM et al. The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2382-2391.
- 38- Tomohiro T, Kumai T, Sato T, Takeba Y, Kobayashi S, Kimura K. Hypertension aggravates glomerular dysfunction with oxidative stress in a rat model of diabetic nephropathy. *LifeSci* 2007; 80: 1364-1372.

- 39- Nuhad İ, Bryan B, Piotr S. Renal Disease and Hypertension in NIDDM. *Kidney int* 1999; 55: 1-28.
- 40- Hardy E, Jabbour SA. Tip 2 diyabetin patogenezi, *Textbook of Type 2 Diabetes* Ed.: B.J. Goldstein, D. Müler-Wieland (Türkçe çevirisi) 1.Baskı İstanbul: AND Yayıncılık 2004; 117-130.
- 41- Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritshler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 189-212.
- 42- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 819-1928.
- 43- Kenneth B, Beckman KB, Ames BN, et al. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.
- 44- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003; 52: 581-7.
- 45- Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 1999; 276: 1121-1131.
- 46- Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J* 2001; 15: 1771-1773.
- 47- Avıram M, Rosenblat M, Bısgaier CL, Newton RS, Primoparmo SL ve La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its function: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.
- 48- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
- 49- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
- 50- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.

- 51- Lipinski B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 203-210.
- 52- Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci* 1997; 60: 667-679.
- 53- Zhang XF, Tan BK. Antihyperglycaemic and antioxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 358-363.
- 54- Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 303-308.
- 55- Desfaits, A, Seri O, Renier G. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion and TNF production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care* 1998; 21: 487-491.
- 56- Vergès B. Clinical interest of PPARs ligands. *Diabetes Metab* 2004; 30: 7-12.
- 57- Day C. Thiazolidinediones: anew class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 1999; 16: 179-192.
- 58- Gitlin N, Julie NL, Spurr CL. Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. *Ann Intern Med* 1998; 129: 36-37.
- 59- McCarthy KJ, Routh RE, Shaw W, Welbourne TC, Johnson JH. Troglitazone halts diabetic glomerulosclerosis by blockade of mesangial expansion. *Kidney Int* 2000; 58: 2341-2350.
- 60- Lebovitz HE. Rationale for and role of thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 90: 34-41.
- 61- Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet* 2000; 355: 1008-1010.
- 62- Motojima K. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): Structure, mechanisms of activation and diverse functions. *Cell Structure and Function* 1993; 18: 267-277.
- 63- Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999; 354: 141-148.
- 64- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator- activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 649-688.
- 65- Guan Y, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 2001; 60: 14-30.
- 66- Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension* 2001; 37: 722-727.

- 67- Tang SC, Leung JC, Chan LY, Tsang AW, Lai KN. Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1633-1643.
- 68- Agarwal R. Anti-inflammatory effects of short-term pioglitazone therapy in men with advanced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 10: 290-296.
- 69- Gillies PS, Dunn CJ. Pioglitazone. *Drugs* 2000; 60: 333-343.
- 70- Fujiwara T, Yoshioka S, Yoshioka T, Ushiyoma I, Horikoshi H. Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes* 1988; 37: 1549-1558.
- 71- Stumvoll M, Haring H. Insulin resistance and insulin sensitizers. *Hormone Research* 2001; 55: 3-13.
- 72- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* 2001; 24: 710-719.
- 73- Phillips LS, Grunberger G, Miller E, Patwardhan R, Rappaport EB, Salzman A. Once- and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 308-315.
- 74- Ishida H, Takizawa M, Ozawa S, Nakamichi Y, Yamaguchi S, Katsuta H et al. Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress. *Metabolism* 2004; 53: 488-494.
- 75- Van Wijk jP, Koning E, Martens EP, Rabelink TJ. Thiazolidinediones and blood lipids in type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23: 1744-1749.
- 76- Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005; 28: 1547-1554.
- 77- Ceriello A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 510-518.
- 78- Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, et al. Structure, endothelial function, cell growth and inflammation in blood vessels of angiotensin II infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma). *Circulation* 2002; 105: 2296-2302.

- 79- Dandona P, Aljada A. A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2002; 90: 27-33.
- 80- Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance. *Diabet Med* 2004; 21: 1249-1252.
- 81- Rahbar S, Natarajan R, Yerneni K, Scott S, Gonzales N, Nadler JL: Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta* 2000; 301: 65-77.
- 82- Ohga S, Shikata K, Yozai K, Okada S, Ogawa D, Usui H et al. Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 1141-1150.
- 83- Khaw KT, Wareham N, Luben R, et al. Glycated haemoglobin, diabetes and mortality in men in Norfolk cohort of European prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 2001; 322: 15-18.
- 84- Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: a metaregression analysis of published data from 20 studies of 95, 783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999; 22: 233-240.
- 85- Tanimoto M, Fan Q, Gohda T, Shike T, Makita Y, Tomino Y. Effect of pioglitazone on the early stage of type 2 diabetic nephropathy in KK/Ta mice. *Metabolism* 2004; 53: 1473-1479.
- 86- Dobrian AD, Schriver SD, Khraibi AA, Prewitt RL. Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension* 2004; 43: 48-56.
- 87- Okada T, Wada J, Hida K, Eguchi J, Hashimoto I, Baba M et al. Thiazolidinediones ameliorate diabetic nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms. *Diabetes* 2006; 55: 1666-1677.
- 88- Volkovova K, Chovathova V, Jucovicova M, Koszeghyova L, Bobek P. Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats. *Physiol Res* 1993; 42: 251-255.
- 89- Faure P, Corticelli P, Richard MJ, Arnaud J, Coudray C, Halimi S et al. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clin Chem* 1993; 39: 789-793.

- 90- Vantyghem MC, Balduyck M, Zerimech F, Martin A, Douillard C, Bans S et al. Oxidative markers in diabetic ketoacidosis. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 732-736.
- 91- Gumieniczek A. Effects of pioglitazone on hyperglycemia-induced alterations in antioxidative system in tissues of alloxan-treated diabetic animals. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 56: 321-326.