

## DeneySEL Diyabetik Ratlarda Ardiç (*Juniperus communis* L.) Yağının Nefropati Üzerine Etkileri

Turan YAMAN<sup>1\*</sup>, Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye.

<sup>2</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Van, Türkiye.

Geliş Tarihi: 21.05.2018

Kabul Tarihi: 25.11.2018

**Özet:** Hiperglisemi aracılı oksidatif stres diyabetik nefropatinin (DN) patogeneğinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik ratlarda ardiç (Juniper berry; JB) yağının renoprotektif etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, 40 adet erkek Wistar albino rat rastgele seçilerek; kontrol, diyabetes mellitus (DM), DM+akarboz, DM+ardiç yağı ve ardiç yağı olmak üzere beş gruba ayrıldı. DeneySEL diyabet, tek dozluk (55 mg/kg, periton içi [i.p]) STZ enjeksiyonu ile oluşturuldu. DM+ardiç ve ardiç grubu ratların yemlerine 50 ml/kg JB yağı katılarak verildi. 28 günlük deneme süresi sonunda ratlar sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alındı. Böbrek dokusunda histopatolojik değişiklikler, immunohistokimyasal olarak caspase-3 (Kaspaz-3) ekspresyonu, biyokimyasal olarak malondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) konsantrasyonları ve katalaz aktiviteleri çalışıldı. Serumda ise üre ve kreatinin düzeyleri incelendi. DM grubu ratlarda, histopatolojik olarak tubulus epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz, glomerular yapıda bozulma gözlemlenirken, immunohistokimyasal olarak tubul epitel hücrelerinde caspase-3 immun reaktivitesi yüksek saptandı. Biyokimyasal olarak DM grubu ratların böbrek dokusunda, MDA konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ve GSH konsantrasyonu ve katalaz aktivitesi anlamlı olarak düşük bulundu. Ayrıca DM grubunda serum üre ve kreatinin konsantrasyonları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. DM+ardiç grubu ratlarda ise, ardiç tedavisi sonucu histopatolojik değişikliklerin düzeldiği, caspase-3 immun reaktivitesinin azaldığı ve biyokimyasal parametrelerin iyileştiği tespit edildi. Sonuç olarak, ardiç yağının deneySEL diyabetik ratlarda böbreği koruyucu etkileri olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Ardiç yağı, Diyabetik nefropati, Caspase-3, Rat.

### Effects of *Juniperus communis* L. Oil on Nephropathy in Experimental Diabetic Rats

**Abstract:** Hyperglycaemia-mediated oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The present study investigated the renoprotective effect of Juniper (Juniper berry; JB) oil in rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes. For this, 40 male Wistar albino rats were divided into five groups, namely, control, diabetes mellitus (DM), DM+acarbose, DM + JB oil and JB oil groups. Experimental diabetes was established by injecting the rats with a single dose (55 mg/kg) of STZ intraperitoneally. The rats in the DM+ardiç oil and ardiç oil groups received 50 ml JB oil/kg diet. After 28 days, the rats were sacrificed and their blood and tissue samples were obtained. Histopathological changes, caspase-3 immunoexpression, malondialdehyde MDA and glutathione (GSH) concentration and catalase activities in the kidney tissues of the rats were examined. Moreover, serum urea and creatinine levels were examined. Histopathologically, the rats in the DM group showed degeneration and necrosis of tubular epithelial cells and destruction of glomerular structures. Immunohistochemically, these rats showed increased caspase-3 immunoreactivity in the tubular epithelial cells. Biochemically, MDA concentration was significantly higher in the kidney tissue of the rats in the DM group than that of the rats in the control group. GSH concentration and catalase activities were significantly lower in the kidney tissue of the rats in the DM group than that of the rats in the control group. Moreover, serum urea and creatinine levels were significantly higher in the rats in the DM group than those in the control group. The rats in the DM + JB oil group showed an improvement in STZ-induced histopathological changes. Moreover, these rats showed decreased caspase-3 immunoexpression in the kidney tissue and improved biochemical parameters. Thus, these results indicate that JB oil exerts protective effects in the kidneys of diabetic rats.

**Keywords:** Juniper oil, Diabetic nephropathy, Caspase-3, Rat.

### Giriş

Diyabetes mellitus (DM); insülin sekresyonu, aktivasyonu veya her ikisindeki defekt sonucu şekillenen hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir bozukluktur (Huang ve ark., 2005). DM'nin patogeneğinde önemli rol oynayan kronik hiperglisemi (Kikkawa ve ark., 2003), reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olur (Subash-

Babu ve ark., 2014). Artan serbest radikaller antioksidant savunma bileşenlerini tüketerek hücreSEL fonksiyonların bozulmasına ve membranlarda oksidatif hasara yol açtığı ve lipid peroksidasyonuna yatkınlığı arttırabildiği belirtilmiştir (Larkins ve Dunlop, 1992). Diyabetik nefropati (DN), son dönem böbrek yetmezliğinin

önemli bir nedeni olup (Li ve ark., 2009), DM'un en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biridir (Kikkawa ve ark., 2003). Tip 1 diyabetli hastaların yaklaşık %25-35'i (Rossing ve ark., 1995) ve tip II diyabetli hastaların %5 ile 10'unda (Lewis, 1999) DN gelişmektedir. DN'nin gelişmesinde ve ilerlemesinde hiperglisemi aracılı hemodinamik ve metabolik anormallikler ve oksidatif stresin rol oynadığı belirtilmiştir (Tan ve ark., 2007).

ROS, renin-angiotensin sistemi (RAS) aktivasyonu ve diyabetteki renal hücre apoptozisi arasındaki bağlantıyı kuvvetle göstermektedir (Bhatti ve ark., 2005; Brezniceanu ve ark., 2008). ROS, mezangiyal ve tubuler hücreler ile podositlerde apoptoze neden olmaktadır (Brezniceanu ve ark., 2008; Ha ve Lee, 2000; Winiarska ve ark., 2009). Farklı kaspazlar, özellikle caspase-3 ve -9, proksimal tubuler epitel hücrelerinin yüksek glukoz ile indüklenen apoptozunda önemli bir rol oynamaktadır (Allen ve ark., 2003). Bu nedenle, hem glisemik kontrol hem de antioksidant potansiyele sahip bir ajanın, diyabetik böbrek hasarına karşı koruyucu olarak düşünülebileceği belirtilmiştir (Das ve Sil, 2012; Manna ve ark., 2008; Palsamy ve Subramanian, 2011).

Polifenolik bileşiklerin, STZ ile uyarılan diyabetik ratlarda oksidatif strese bağlı diyabetik komplikasyonların tedavisi ve önlenmesinde potansiyel birer antioksidant olduğu ve nefropatiye karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Craven ve ark., 1997; Palsamy ve Subramanian, 2011). Juniperus (ardıç); *Cupressaceae* familyasından olup, ağaç, ağaççık veya çalı şeklinde monoik veya dioik bir bitkidir (Benson, 1962). Juniper berry; *J.Communis*'un meyvesi olup, bileşenleri üzerine yapılan araştırmalarda polifenoller, polifenol esterleri ve monoteren hidrokarbonları izole edilmiştir (Ochacka ve ark., 1996; Shahidi ve ark., 1992). Ardıç meyvesi yağında yüksek konsantrasyonda bulunan  $\alpha$ -pinene, p-cymene ve  $\beta$ -pinene gibi bileşenlerin, geniş bir farmakolojik etkinlik yelpazesine sahip olduğu belirtilmiştir (Filipowicz ve ark., 2003).

Sunulan bu çalışmada, STZ ile indüklenen diyabetik ratlarda ardıç yağının nefropati üzerine koruyucu etkinliği histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırıldı.

## Materyal ve Metot

**Deney hayvanları:** Çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 2-3 aylık yaşta 40 adet erkek rat (Wistar

albino) kullanıldı. Ratların bakımı, 12 saatlik ideal aydınlık ve 12 saatlik ideal karanlık ortamında, uygun sıcaklıkta, rat bakımı için tasarlanmış polipropilen özel kafeslerde yapıldı ve ad libitum olarak yem ve musluk suyu verildi.

**Bitki materyali ve yeme katılması:** Bitki materyali olarak ticari olarak elde edilen ardıç meyvesi (Juniper Berry) yağı kullanıldı. Ardıç yağı ratların yemlerine 50 ml/kg oranında katılarak verildi (Yeşilbağ ve ark., 2014).

**Streptozotosin ile diyabet modeli:** Diyabet oluşturmak amacıyla sodyum sitrat tamponu (0.1 M. pH: 4.5) içinde hazırlanan streptozotosin (STZ) 55 mg/kg tek doz (Banerjee ve ark., 2013) olarak bir gece aç bırakılan ratlara sağlıklı kontrol grubu hariç intraperitoneal olarak uygulandı. Diyabet oluşturulmayan gruplara ise sitrat tamponu aynı miktarda ratlara intraperitoneal enjekte edildi. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örnekleri Accu-Check Active kan glikoz monitörü ile değerlendirilerek ratların açlık kan şekerleri ölçüldü. 200 mg/dl üzerinde olanlar diyabet kabul edilerek deneye alındı. STZ uygulamasına bağlı olarak pankreastan yoğun insülin salgılanarak öldürücü hipoglisemi gelişmesi olasılığı vardır. Bunu önlemek için ratlara STZ uygulanmasından hemen sonra tek seferlik olmak üzere içme suyu olarak %10'luk dekstroz çözeltisi verildi. Ayrıca diyabet durumlarının kontrolü amaçlı 7., 14., 21. ve 28. günlerde de tokluk kan glukoz değerleri için ölçümler yapıldı.

**Deney protokolü:** Her bir grupta 8 deney hayvanı olacak şekilde aşağıdaki gibi 5 gruba ayrıldı. Çalışma 28 gün boyunca devam ettirildi.

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki ratlar normal su ve standart pelet yem ile beslendi.
2. Ardıç yağı grubu (ardıç): Bu gruptaki ratlar 50 ml/kg oranında ardıç yağı katılmış pelet yem ile beslendi.
3. Diyabetik grup (DM): Bu gruptaki ratlara tek doz STZ (55 mg/kg bw i.p) uygulandı ve standart pelet yem ile beslendi.
4. Diyabet+ardıç yağı grubu (DM+ardıç): Bu grup ratlara tek doz STZ (55 mg/kg bw i.p) uygulanmasından 3 gün sonra (ratların kan glukoz değerleri 200 mg/dL olacak şekilde) yemlerine 50 ml/kg oranında ardıç yağı katılmış pelet yem ile beslendi.
5. Diyabet+ ilaç kontrol grubu (DM+akarboz): Bu grup ratlara tek doz STZ (55 mg/kg bw i.p) uygulanmasından 3 gün sonra (ratların kan glukoz değerleri 200 mg/dL olacak şekilde) intragastrik

yolla 20 mg/kg akarboz (Glucobay, Bayer) günde bir defa uygulandı.

**Histopatolojik inceleme:** 28 günlük deneme süresi sonunda, ötenazi sonrası ratların nekropsileri yapılarak alınan böbrek doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna konuldu. Doku örnekleri tespit edildikten sonra rutin takip yapılarak paraffin bloklara gömüldü ve mikrotomla (Leica RM 2135) 4µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H.E.) ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DS-R12) incelendi. Histopatolojik olarak glomeruluslarda konjesyon, glomerular atrofi, tubulus dejenerasyonu ya da nekrozu gibi diyabetik nefropatide olduğu bildirilen bulgular incelendi (Yaman ve ark., 2017). Histopatolojik bulgular, lezyonun şiddetine göre semikantitatif olarak; (-): lezyon yok; (+): hafif; (++) orta; (+++): şiddetli şeklinde değerlendirildi.

**İmmunohistokimyasal inceleme:** Caspase-3 ekspresyonu streptavidin-peroxidase metoduna (ABC) göre caspase-3 ticari antikoruyla streptavidin/biotin immunoperoxidaz kit (Histostain-Plus Bulk Kit; Zymed, South San Francisco, CA, USA) kullanılarak boyandı. Hazırlanan kesitler adezivli lamlar üzerine alındıktan sonra, ksilen ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler PBS (phosphate buffer solution) ile yıkandıktan sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 20 dakika tutularak endojen peroxidaz inaktive edildi. Antijen retrieval solüsyonuna (sitrata buffer) konulup üzeri kapatıldıktan sonra 20 dakika süreyle ikişer kez ısıya tabi tutuldu. Fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Dokular yeniden PBS ile yıkandıktan sonra 20 dakika protein bloking (nonimmun serum) ile bloke edildi. Her bir doku caspase-3 (ThermoFisher Scientific, USA; 1/100 sulandırma) poliklonal antikoruna damlatılıp +4°C de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Kesitler PBS ile yıkanıp biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroxidaz da 20 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra diaminobenzidine (DAB) damlatılıp 1-2 dakika bekletildi. Daha sonra tüm dokular Mayer's hematoksilende 1-2 dk bekletilip musluk suyunda yıkandı. Tekrar alkol ve ksilen serilerinden geçirilen kesitler entellan kullanılarak kapatıldı. Boyama işlemini doğrulamak için negatif kontroller kullanıldı; Bu slaytlar primer antikorlar yerine PBS ile reaksiyona sokuldu. Kesitler ışık mikroskopunda (Nikon 80i-DS-R12) incelendi ve fotoğraflandı.

**Biyokimyasal incelemeler:** Nekropsi sırasında biyokimya testleri için gerekli olan kan enjektörler yardımıyla hayvanların kalbinden alınarak biyokimya tüplerine aktarıldı. Alınan kan 4000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Bu serumlar çalışma gününe kadar -80°C de saklandı. Çalışma günü serumlar oda ısısında bekletilerek erimeleri sağlandı. Daha sonra bu serumlardan üre, kreatinin, magnezyum, fosfor, klor, potasyum, sodyum, demir ve demir bağlama kapasitesi Abbott marka ticari kitler kullanılarak architect ci16200 model otoanalizörde çalışıldı.

**Böbrek dokusunda oksidan ve antioksidanların ölçümü:** Rat böbrekleri fosfat tamponunda (0.1 mol/L, pH=7.4) homojenize edildi. Örnekler 20 dakika 10000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant çalışma gününe kadar -80°C de saklandı. Çalışma günü böbrek dokusundan katalaz aktivitesi (Lartillot ve ark., 1988), GSH (Beutler ve ark., 1963) ve MDA (Ledwozyw ve ark., 1986) konsantrasyonları spektrometrik olarak ölçüldü.

**İstatistiksel analiz:** Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. Gruplar arası ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılarak ANOVA ile yapıldı. Gruplar arası ortalamaların karşılaştırılmasında SPSS (23.00, Chicago, IL) kullanıldı. P<0.05 istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

**Histopatolojik bulgular:** Kontrol ve ardıç grubu ratların böbrek kesitlerinin incelemesinde normal histolojik yapı gözlemlendi (Şekil 1-A). DM grubu ratların böbreklerinde ise özellikle glomerulus ve tubuluslarda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bazı glomeruluslarda konjesyon, mezengiyal hücrelerde dejenerasyon, nekroz ve glomerular atrofi mevcuttu. Bu değişikliklerin gözlemlendiği glomeruluslarda glomeruler yumak ile Bowman kapsülü arasındaki boşluğun genişlemiş olduğu görüldü. Bazı glomeruluslarda ise sklerozis tespit edildi. Tubulus epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz, tubuler dilatasyon, intraluminal döküntüler tespit edildi. Ayrıca kortekste dejenere olmuş tubuller ve glomeruller arasında yer yer yangısal hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 1-B). DM+akarboz grubu ratların böbreklerinde bu bulguların önemli oranda azaldığı belirlendi (Şekil 1-C). DM+ardıç grubundaki ratların böbreklerinde, DM grubunda şekillenen bulguların önemli oranda azaldığı, tubulus epitel hücrelerindeki dejenerasyon

ve nekrozların önemsenmeyecek düzeyde olduğu tespit edildi. Özellikle glomeruluslardaki değişikliklerin büyük ölçüde oluşmadığı görüldü (Şekil 1-D).

**İmmunohistokimyasal bulgular:** Kontrol ve ardıç grubu ratların böbreklerinde caspase-3 immün ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 1-A). DM grubu ratların kesitlerinde özellikle kortekste immün-pozitif reaksiyonların olduğu gözlemlendi. Caspase-3 ekspresyonu ağırlıklı olarak proksimal ve konvalent tubulus epitel hücrelerinde mevcuttu.

Glomerulusların ise bazı etkilenen kısımlarında mezengiyal hücrelerde, podositlerde ve Bowman kapsülünde reaksiyon tespit edildi. Medullar bölgede ise bazı hücrelerde sporadik olarak immün-reaktivite izlendi (Şekil 2-B). DM+akarboz grubu ratların böbrek kesitlerinde caspase-3 immün ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 3-C). Ardıç yağı ile tedavi edilen grupta caspase-3 immün ekspresyonunun sadece bazı distal ve proksimal tubul epitel hücrelerinde olduğu gözlemlenirken, glomeruluslarda ise tek tük hücrede reaksiyon tespit edildi (Şekil 2-D).

**Tablo 1.** Böbrek dokusunda MDA, GSH konsantrasyonları ve katalaz aktivitesi.

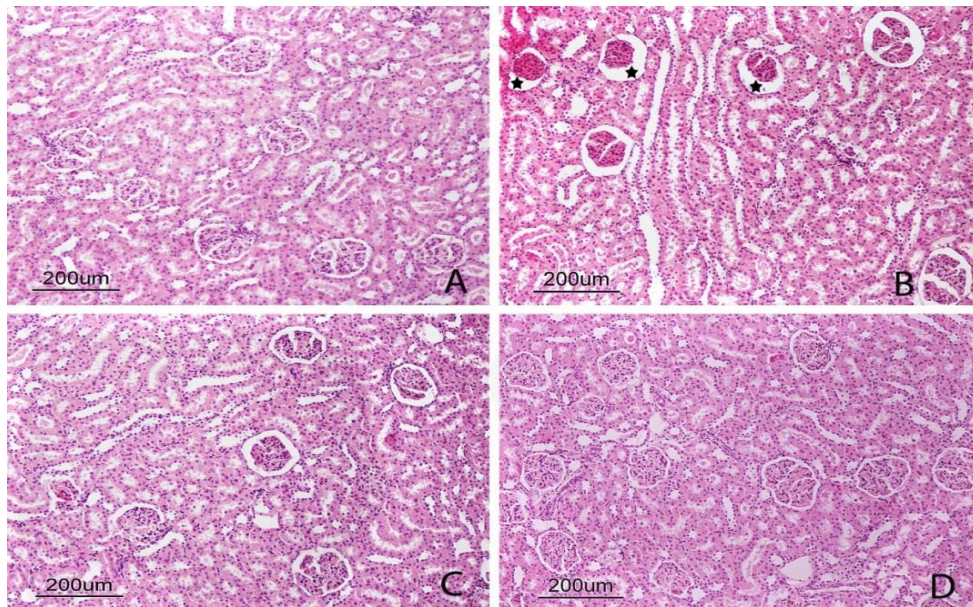
	Kontrol	DM	Ardıç yağı	DM + Ardıç	DM + akarboz
MDA (nmol/gr doku)	0.338±0.0351 <sup>a</sup>	0.391±0.0331 <sup>b</sup>	0.354±0.037 <sup>a,b</sup>	0.329±0.043 <sup>a</sup>	0.331±0.014 <sup>a</sup>
GSH (umol/gr protein)	0.027±0.004 <sup>a</sup>	0.016±0.011 <sup>b</sup>	0.031±0.008 <sup>a</sup>	0.028±0.005 <sup>a</sup>	0.035±0.001 <sup>a</sup>
CAT (U/gr doku)	0.779±0.093 <sup>a</sup>	0.701±0.034 <sup>b</sup>	0.758±0.060 <sup>a,b</sup>	0.711±0.036 <sup>a,b</sup>	0.725±0.028 <sup>a,b</sup>

Sonuçlar ortalaması±standart hata olarak verildi. Her satırdaki farklı harfler istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.05). CAT: katalaz; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon.

**Tablo 2.** Deney gruplarındaki biyokimyasal parametreler.

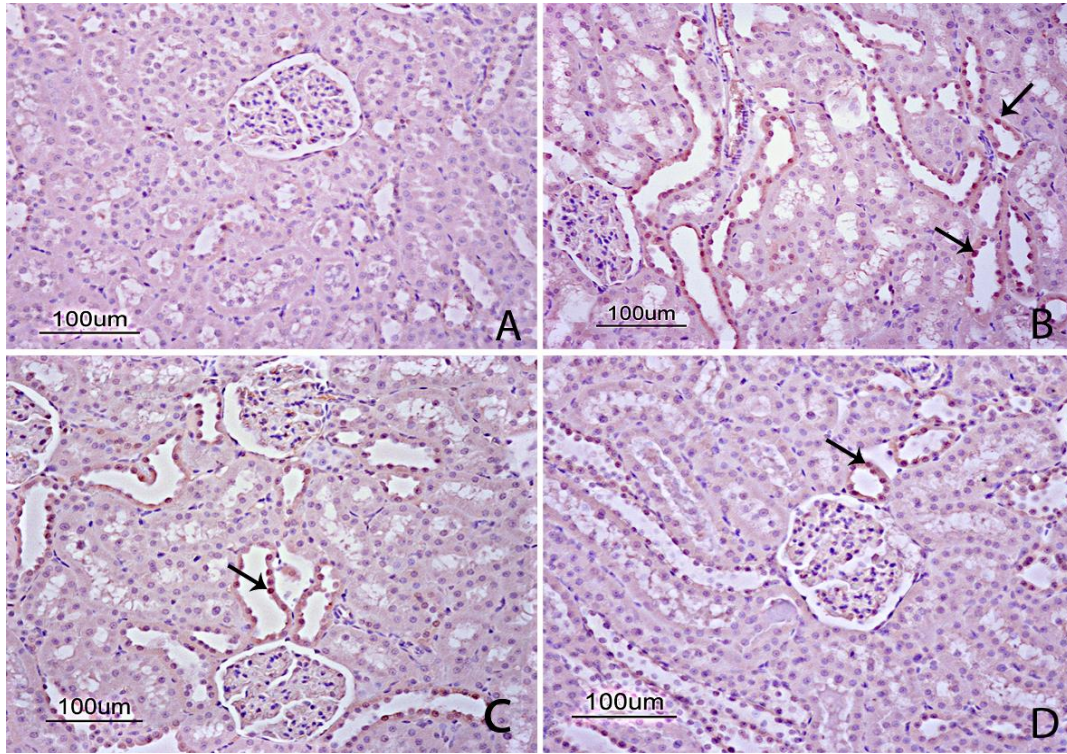
	Kontrol	DM	Ardıç yağı	DM + Ardıç	DM + akarboz
Üre (mg/dl)	54.75±5.37 <sup>a</sup>	99.57±10.54 <sup>b</sup>	47.57±5.38 <sup>a</sup>	54.95±13.95 <sup>a</sup>	53.00±8.15 <sup>a</sup>
Kreatinin (mg/dl)	0.52±0.11 <sup>a,b</sup>	0.74±0.05 <sup>d</sup>	0.48±0.02 <sup>a</sup>	0.60±0.07 <sup>b,c</sup>	0.65±0.09 <sup>c,d</sup>
UIBC (g/dl)	273.66±9.87 <sup>a</sup>	249.42±27.38 <sup>a</sup>	291.66±49.34 <sup>a</sup>	306.5±68.29 <sup>a</sup>	261.6±54.47 <sup>a</sup>
Fe (ug/dl)	240.00±20.18 <sup>a,b</sup>	161.00±28.84 <sup>c</sup>	267.83±28.18 <sup>b</sup>	218.57±41.16 <sup>a</sup>	250.50±28.57 <sup>a,b</sup>
Mg (mg/dl)	2.77±0.44 <sup>a</sup>	3.26±0.37 <sup>a</sup>	2.98±0.31 <sup>a</sup>	2.86±0.44 <sup>a</sup>	3.54±0.77 <sup>a</sup>
Fosfor (mg/dl)	9.83±0.80 <sup>a</sup>	7.35±0.55 <sup>b</sup>	8.10±1.13 <sup>b</sup>	7.17±1.50 <sup>b</sup>	8.78±1.71 <sup>a,b</sup>
Klor (mmol/L)	101.25±4.03 <sup>a,c</sup>	95.14±4.05 <sup>b</sup>	103.28±1.70 <sup>c</sup>	97.00±4.54 <sup>a,b</sup>	101.00±5.14 <sup>a,b</sup>
Potasyum (mmol/L)	5.90±2.56 <sup>a,b,c</sup>	5.67±0.97 <sup>b</sup>	4.60±0.50 <sup>c</sup>	5.74±0.72 <sup>a,b</sup>	5.56±1.01 <sup>a,b</sup>
Sodyum (mmol/L)	145.50±5.25 <sup>a</sup>	137.42±3.25 <sup>b</sup>	145.28±5.31 <sup>a</sup>	137.85±4.48 <sup>b</sup>	143.60±3.20 <sup>a</sup>

Sonuçlar ortalaması±standart hata olarak verildi. Her satırdaki farklı harfler istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (P<0.05).



**Şekil 1.** A) Kontrol grubu; Böbreğin normal histolojik görünümü. B) DM grubu; glomeruluslarda atrofi ve glomerüler boşlukta genişleme (yıldızlar). C) DM + akarboz grubu; glomeruluslarda atrofi. D) DM + ardıç grubu; glomerulusların normal yapısı izlenmekte. H & E X10.





**Şekil 2. A)** Kontrol grubu; caspase-3 immun-ekspresyonu gözlenmemekte. **B)** DM grubu; tubul epitelinde caspase-3 immun-ekspresyonları izlenmekte (oklar). **C)** DM + akarboz grubu; tubul epitel hücrelerinde caspase-3 immun-ekspresyonu izlenmekte (ok). **D)** DM + ardıç grubu; az sayıda tubul epitelinde caspase-3 immun-ekspresyonu izlenmekte (ok). ABC teknik (anti-caspase-3).

**Biyokimyasal bulgular:** STZ uygulanan DM gurubu ratların böbrek dokusunda MDA seviyesi kontrolden anlamlı olarak yüksek bulundu. STZ ile birlikte ardıç yağı verilen grupta MDA seviyesi DM grubundan anlamlı olarak düşüktü. DM gurubu ratların böbrek dokusunda GSH konsantasyonu ve katalaz aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulundu. STZ ile birlikte ardıç yağı verilen DM + ardıç grubunda GSH konsantasyonu anlamlı olarak yüksek bulunurken, katalaz aktivitesindeki yükselme anlamlı değildi (Tablo 1).

Diyabet (DM) grubunda serum üre ve kreatinin seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti. DM + ardıç grubunda serum üre ve kreatinin seviyesi DM grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. DM grubunda demir, sodyum ve klor konsantasyonları kontrol grubundan anlamlı olarak düşük saptandı (Tablo 1).

## Tartışma ve Sonuç

Diyabetik nefropatinin (DN) gelişmesinde ve ilerlemesinde hiperglisemi aracılı oksidatif stres önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, hipergliseminin antioksidan savunma sisteminin azalmasına neden olarak reaktif serbest radikallerin üretimini arttırdığı ve oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (Matough ve ark., 2012; Sellamuthu ve ark., 2013). Bundan dolayı glisemik kontrol,

DN'nin tedavisinde oksidatif stresin azaltılması için odak hedef olmaya devam etmektedir (Palsamy ve Subramanian, 2011). Hipergliseminin zararlı etkilerine karşı korumada ve aynı zamanda glukoz metabolizması üzerindeki olumlu etkilerden dolayı diyabet tedavisinde antioksidant aktiviteye sahip bitkiler ile bu bitkilerden elde edilen bazı etken maddelerin diyabetik koşulları düzeltebileceği ön görülmüştür (Nicolle ve ark., 2011). Sunulan bu çalışmada, ardıç yağının STZ ile indüklenen DN'de hipergliseminin neden olduğu oksidatif strese karşı renoprotektif potansiyeli araştırılmıştır. STZ uygulaması dolaylı olarak serbest radikal üretimini ortaya çıkaran lipid peroksidasyonda bir artmayla sonuçlanmaktadır (Lalenti ve ark., 1993). Serbest radikallerin etkisi sonucu MDA düzeyinde artış meydana gelir. Artan MDA düzeyi oksidatif membran hasarının önemli bir göstergesidir (Freeman ve Crapo, 1981). STZ uygulanmış ratların böbrek dokusunda MDA seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Madhuri ve Naik, 2017). Sunulan bu çalışmada, STZ uygulanmış rat böbrek dokusunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi anlamlı olarak yüksek bulundu. Ardıç yağı uygulaması sonucu DM+ardıç grubu ratların böbrek dokusunda MDA düzeyleri, diabetik grupla karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma meydana geldiği görüldü. Bu sonuçlar, ardıç yağının serbest radikalleri azaltarak lipid peroksidasyonunu

baskıladığını ve böbreklerde membran lipidlerini oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermektedir.

Diyabetik nefropatide, değişen derecelerde olmakla birlikte, hem glomerüler hem de tubulointerstisyel hasar meydana gelmektedir (Fioretto ve ark., 1998). Glomerulopati, glomerulus bazal membranlarda kalınlaşma, glomerüler epitel hücreleri (podosit) kaybı, glomerulosklerozis (Dalla ve ark., 2001; Forbes ve ark., 2008), glomerular atrofi ve Bowman boşluğunda genişleme (Mauer ve ark., 1984) ile karakterizedir. Tubuluslarda ise tubuler dilatasyon ve atrofi (de Haan ve ark., 2005), epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz (Uyar ve ark., 2017; Yaman ve ark., 2017) bildirilen histopatolojik bulgulardır. Sunulan bu çalışmada DM grubu ratlarda benzer sonuçların gözlenmesi, ratların DN'den dolayı muzdarip olduğunu gösterdi (Liu ve ark., 2008). Bununla birlikte, ardıç yağı ile tedavi sonucunda DM+ardıç grubunda glomerüler atrofi, glomeruloskleroz ve tubulointerstisyel hasarı önemli ölçüde azaldığı görüldü. Reaktif oksijen türlerindeki artışın renal hücre apoptozisine neden olarak DN'yi indükleyebileceği belirtilmiştir (Wagener ve ark., 2009). Renal proksimal tubuler hücrelerin, STZ ile indüklenen diyabetik farelerde (Haan ve ark., 2005), ratlarda (Kelly ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2004) ve diyabetik hastalarda (Kumar ve ark., 2004) apoptozis sergiledikleri bildirilmiştir. Caspase'ların, apoptozisin indüksiyonunda ve DN'de merkezi bir rol oynadıkları vurgulanmıştır (Wagener ve ark., 2009). Sunulan bu çalışmada, DM grubu ratlarda, tubulus epitel hücrelerinde görülen caspase-3 ekspresyonun, ardıç yağı ile tedavi edilen grupta önemli derecede azaldığı görüldü. Yapılan çalışmalar, antioksidanların ve sitoprotektif proteinlerin, renal hücrelerin ROS ile indüklenen apoptozuna ve diyabetik nefropatinin gelişmesine karşı koyabildiğini göstermiştir (Das ve Sil, 2012; Wagener ve ark., 2009). Bunun muhtemel nedeninin bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin, serbest radikallere karşı süpürücü etkisi olduğu ve güçlü antioksidan role sahip oldukları bildirilmiştir (Sakulnarmrat ve Konczak 2012; Yaman ve ark., 2016).

Nefropati, diyabetle ilişkili mikrovasküler komplikasyonlardan biridir (Reutens, 2013). STZ'nin indüklediği diyabetik ratlarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum üre ve kreatin seviyesinde artma ve osmotik diürez ve ekstraselüler sıvı volümünde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Madhuri ve Naik, 2017; Sheela ve ark., 2013). Sunulan bu çalışmada, diyabetik ratlarda artan üre ve kreatin seviyelerinin tedavi grubunda anlamlı şekilde azalması, ardıç yağının diyabete bağlı gelişen mikrovasküler komplikasyonları azaltarak nefropatiye karşı koruyucu etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Kimyasal olarak indüklenen toksisiteye karşı en önemli koruyucu biyomolekül

olan GSH, GPx'in varlığında hidrojen peroksidin indirgenmesine aracılık eder (Rajarajeswari ve Pari; 2011). Diyabetik ratlarda GSH seviyesinde gözlenen azalma oksidatif stresten dolayı GSH kullanımındaki artmayı gösterir (Dormandy, 1980). Sunulan çalışmada, daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak STZ uygulanmış rat böbrek dokusunda GSH konsantrasyonunun anlamlı olarak azaldığı bulundu. GSH konsantrasyonundaki azalmanın diyabetik komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (Lee ve ark., 2000; Obrosova ve ark., 2003). Diyabetik ratlara ardıç yağı uygulaması, GSH seviyesinin diyabetik grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmesine sebep olmuştur. GSH seviyesinde bu artma diyabetik ratlarda oksidatif stresin azalmasından sorumlu olan faktörlerden biri olabilir.

Ardıç tedavi grubu ile DM+akarboz grubunun histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçları arasında anlamlı bir farklılık mevcut değildi. Tablo 1'de görüldüğü gibi MDA ve GSH konsantrasyonları ile katalaz aktivitesi değerleri arasında anlamlı farklılık oluşmadığı belirlendi. Tablo 2'de ise iki grubun değerleri karşılaştırıldığında, bazı parametrelerin yakın olduğu gözülürken bazılarının ise farklı olduğu tespit edildi. Dolayısıyla, ardıç yağının tek başına tedavi alternatifi olarak değil, belki ilaçlara yardımcı olarak kullanılabilmesi düşünülebilir.

Sonuç olarak, STZ ile oluşturulan deneysel diyabetik nefropati modelinde histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular doğrultusunda, ardıç yağının antioksidan özelliği sayesinde böbrek dokusunu koruyucu etkileri olduğu gösterildi.

## Kaynaklar

- Allen DA, Harwood SM, Varaganam M, Raftery MJ, Yaqoob MM, 2003: High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J*, 17(8), 908-910.
- Benson L, 1962: Plant taxonomy, methods and principles. Ronald Press. New York, NY.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM, 1963: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-890.
- Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT, Welch WJ, Maric C, 2005: Mechanisms of antioxidant and prooxidant effects of  $\alpha$ -lipoic acid in the diabetic and non-diabetic kidney. *Kidney Int*, 67(4), 1371-1380.
- Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC, Chénier I, Godin N, Zhang SL, Filep JG, Ingelfinger JR, Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer RK, 1997: Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF- $\beta$ , and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 8, 1405-1414.

- Dalla VM, Saller A, Mauer M, Fioretto P, 2001: Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Nephrol*, 14(4), 51–57.
- Das J, Sil PC, 2012: Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. *Amino acids*, 43(4), 1509-1523.
- de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH, 2005: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, 544-551.
- Dormandy TL, 1980: Free radical reactions in biological systems. *Ann R Coll Surg Engl*, 62, 188-194.
- Dunlop M, 2000: Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 77, 3-S12.
- Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka JR, 2003: Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytother Res*, 17(3), 227-231.
- Fioretto P, Stehouwer CD, Mauer M, Chiesura-Corona M, Brocco E, Carraro A, Bortoloso E, van Hinsbergh VW, Crepaldi G, Nosadini R, 1998: Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: studies of endothelial function and renal structure. *Diabetologia*, 41(2), 233–236.
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME, 2008: Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, 57, 1446–1454.
- Freeman BA, Crapo JD, 1981: Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung and lung mitochondria. *J Biol Chem*, 256, 10986-10992.
- Ha H, Lee HB, 2000: Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int*, 58(Suppl. 77), 19-25.
- Harris DC, 2001: Tubulointerstitial renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10, 303–313.
- Huang THW, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y, 2005: Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR-c and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol*, 207, 160–169.
- Kelly DJ, Stein-Oakley A, Zhang Y, Wassef L, Maguire J, Koji T, Thomson N, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE, 2004: Fas-induced apoptosis is a feature of progressive diabetic nephropathy in transgenic (mRen-2)27 rats: attenuation with renin-angiotensin blockade. *Nephrology (Carlton)*, 9, 7-13.
- Kikkawa R, Koya D, Haneda M, 2003: Progression of diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis*, 41(3), 19–21.
- Kumar D, Robertson S, Burns KD, 2004: Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem*, 259, 67-70.
- Lalenti S, Moncada M, Rosa D, 1993: Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Brit J Pharmacol*, 110, 701- 706.
- Larkins RG, Dunlop ME, 1992: The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 35, 499–504.
- Lartillot S, Kedziora P, Athias A, 1988: Purification and characterization of a new fungal catalase. *Prep Biochem*, 18(3), 241-246.
- Ledwozyw A, Michalak J, Stepień A, Kadziółka A, 1986: The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 155(3), 275- 83.
- Lee YM, Kim H, Hong EK, Kang BH, Kim SJ 2000: Water extract of 1:1 mixture of Phellodendron cortex and Aralia cortex has inhibitory effects on oxidative stress in kidney of diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 73, 429–36.
- Lewis JB, 1999: Diabetic nephropathy in patients with type II diabetes. *Geriatr Nephrol Urol*, 9(3), 167–175.
- Li J, Qu X, Bertram JF, 2009: Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*, 175(4), 1380-1388.
- Liu G, Sun Y, Li Z, Song T, Wang H, Zhang Y, Ge Z, 2008: Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 370(4), 651-656.
- Madhuri K, Naik PR, 2017: Modulatory effect of garcinol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Arch Physiol Biochem*, 123(5), 322-329.
- Manna P, Sinha M, Sil PC, 2008: Amelioration of cadmium-induced cardiac impairment by taurine. *Chem Biol Interact*, 174, 88-97.
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J, 2012: The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 12(1), 5.
- Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC, 1984: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest*, 74, 1143-1155.
- Motshakeri M, Ebrahimi M, Goh YM, Othman HH, Hair-Bejo M, Mohamed S, 2014: Effects of brown seaweed (Sargassum polycystum) extracts on kidney, liver, and pancreas of type 2 diabetic rat model. *J Evid Based Complementary Altern Med*. Article ID 379407.
- Nicolle E, Souard F, Faure P, Boumendjel A, 2011: Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure activity relationship. *Curr Med Chem*, 18(17), 2661-2672.
- Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J, 2003: Early oxidative stress in diabetic kidney: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, 34, 186-95.
- Ochacka Jr, Asztemborska M, Zook, Dr, Sybilska D, Perez G, Ossicini L, 1996: Enantiomers of monoterpenic hydrocarbons in essential oil from Juniperus communis. *Phytochemistry*, 44, 869-873.
- Palsamy P, Subramanian S, 2011: Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 719-731.
- Rajarajeswari N, Pari L, 2011: Antioxidant role of coumarin on streptozotocin-nicotinamide-induced

- type 2 diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 25, 355-361.
- Reutens AT, 2013: Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin North Am*, 97, 1-18.
- Rossing P, Rossing K, Jacobsen P, Parving HH, 1995: Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes*, 44(7), 739-743
- Sakulnarmrat K, Konczak I, 2012: Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and in vitro inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Food Chem*, 134(2), 1011-1019.
- Sellamuthu PS, Arulselvan P, Muniappan BP, Fakurazi S, Kandasamy M, 2013: Mangiferin from *Salacia chinensis* prevents oxidative stress and protects pancreatic  $\beta$ -cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food*, 16(8), 719-727.
- Shahidi F, Wanasundara PK, Wanasundara PD, 1992: Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32, 67-103.
- Sheela N, Jose MA, Sathyamurthy D, Kumar BN, 2013: Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats. *Iran J Kidney Dis*, 7, 117-123.
- Subash-Babu P, Alshatwi AA, Ignacimuthu S, 2014: Beneficial antioxidative and antiperoxidative effect of cinnamaldehyde protect streptozotocin-induced pancreatic beta-cells damage in wistar rats. *Biomol Ther (Seoul)*, 22(1), 47-54.
- Tan AL, Forbes JM, Cooper ME, 2007: AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*, 27(2), 130-143.
- Uyar A, Yaman T, Keles OF, Alkan EE, Celik I, Yener Z, 2017: Protective effects of *Bryonia multiflora* extract on pancreatic beta cells, liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats: histopathological and immunohistochemical investigations. *Indian J Pharm Educ Res*, 51(3), Suppl:S403-11.
- Wagener FADTG, Dekker D, Berden JH, Scharstuhl A, Van der Vlag J, 2009: The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis*, 14(12), 1451-1458.
- Winiarska K, Szymanski K, Gorniak P, Dudziak M, Bryla J, 2009: Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*, 91, 261-270.
- Yaman T, Uyar A, Celik I, Alkan EE, Keles OF, Yener Z, 2017: Histopathological and immunohistochemical study of antidiabetic effects of *Heracleum persicum* extract in experimentally diabetic rats. *IJPER*, 51(3), 450-457.
- Yaman T, Yener Z, Celik I, 2016: Histopathological and biochemical investigations of protective role of honey in rats with experimental aflatoxicosis. *BMC Complement Altern Med*, 16(1), 232.
- Yeşilbağ D, Cengiz SS, Cetin I, Meral Y, Biricik H, 2014: Influence of juniper (*Juniperus communis*) oil on growth performance and meat quality as a natural antioxidant in quail diets. *Br Poult Sci*, 55(4), 495-500.

\*Yazışma Adresi: Turan YAMAN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye.

E-mail: turanyaman@yyu.edu.tr