



Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri

Nigar Vardı*, Mustafa Iraz*, Feral Öztürk*, Muharrem Uçar*, Mehmet Gül*,
Mukaddes Eşrefoğlu*, Ali Otlu*

*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD. Malatya

Amaç: Bu çalışma, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik rat modelinde, sıçan böbreklerinde oluşan histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkilerinin araştırılması amacıyla planlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan Sprague-Dawley cinsi; 15 adet erişkin dişi sıçan: kontrol, diyabet (D) ve melatonin ile tedavi edilen diyabet (DM) gruplarına ayrıldı. Deneysel diyabet D ve DM gruplarında tek doz STZ'nin (45 mg/kg) intraperitoneal uygulanması ile oluşturuldu. Diyabet oluşturulduktan sonra, DM grubuna 8 hafta her gün 10 mg/kg melatonin i.p. olarak uygulandı. Deneyin sonunda sıçanların kan-glikoz seviyeleri ölçüldü. Örnekler rutin doku takibinden sonra, parafine gömüldü. Histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamaların ardından, kesitler ışık mikroskopta incelendi.

Bulgular: Diyabet grubundaki sıçanların, kontrol ve DM grubuna göre kan-glikoz düzeyleri önemli derecede yükselirken, vucut ağırlıkları belirgin şekilde azaldı. Diyabete bağlı olarak gelişen temel histolojik değişiklikler glomerul ve tubül bazal membranları ile epitel hücrelerinde gözlemlendi. Uygulanan melatonin tedavisiyle, bu bulguların önemli ölçüde hafiflediği tesbit edildi.

Sonuç: Kronik melatonin uygulaması STZ ile sıçanlarda oluşturulan diyabetin neden olduğu böbrek hasarını azalttı. Bu yüzden melatoninin diyabetik böbrek hasarının gelişimini önleyeceğini veya bulguları hafifleteceğini düşünmekteyiz. Yine de diyabetik komplikasyonlar üzerindeki pozitif etkisini göstermek için uzun süreli kullanımlar ile ilgili daha ileriki çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Deneysel diyabet, Melatonin, Böbrek, Histolojik değişiklikler.

Improving Effects of Melatonin on the Histologic Alterations of Rat Kidneys Induced by Experimental Diabetes

Objective: This study was designed to investigate the improving effects of melatonin on renal histological alterations in streptozotocin (STZ)- induced diabetic rat model.

Material and Methods: Fifteen Sprague-Dawley adult female rats were divided into three groups: control, diabetic (D) and diabetic treatment with melatonin (DM) groups. Experimental diabetes was induced by single dose STZ (45 mg/kg) intraperitoneally. After administration of STZ, the DM group began to receive a 10 mg/kg i.p. dose of melatonin per day. These enjection were continued until the end of the study (8 week). At the end of experimentation, blood glucose levels were determined and following routine tissue process kidneys were embedded in paraffin. Histochemical and immunohistochemical stains were applied and the specimens examined by light microscope.

Results: After 8 week, the rats in diabetes group had significantly lower body weight and significantly higher blood glucose levels than the rats of control and DM group. The main histological changes resulting from diabetes were detected in glomerular and tubular basal membrane and epithelial cells (glycogen accumulation, swelling and vacuolization). We observed the positive improving effects of melatonin treatment on these findings.

Conclusion: We concluded that chronically administration melatonin reduced renal injury in STZ- induced diabetic rats. Therefore, we believe that melatonin might be used to prevent development of diabetic renal damage. However, further researches are needed on long-term uses of melatonin in order to show its positive effects on diabetic complications.

Key Words: Experimental diabetes, Melatonin, Kidney, Histological alterations.

Diyabetes Mellitus çevresel ve genetik birçok faktörden etkilenecek oluşmuş, kronik bir hiperglisemi durumudur. Hiperglisemi, pankreatik beta hücrelerinden salınan insülin hormonunun yokluğu, azlığı veya insülin reseptörlerinin cevapsızlığı sonucu meydana gelir.¹ Günümüzde hastaların yaklaşık %30-40'ında izlenen nefropati diyabetin en önemli komplikasyonları arasında gösterilmektedir.² Glomeruler, tubuler ve tubulointerstitiyel yapı değişikliklerini içeren diyabetik böbrek hasarının gelişim mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.³ Ancak hipergliseminin (glikoz otooksidasyonu ve protein glikozilasyonu ile) serbest oksijen radikallerinin hızını artırması ve koruyucu antioksidan kapasiteyi düşürmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin diğer diyabetik komplikasyonlar gibi böbrek üzerinde de etkisi olabileceği bildirilmektedir.^{4,5} Düşen antioksidan kapasitenin daha fazla hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktiflerin oluşumunu hızlandırıp, doku hasarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir.⁵ Bu yüzden son yapılan çalışmalar, diyabet ve aktif oksijen radikallerinin üretimi arasındaki ilişki üzerine yoğunlaşmaktadır.^{4,5}

Pineal bezin temel hormonu olan melatonin hem oksijen süpürücü hem de endojen antioksidan sistemi stimüle etme özelliği ile güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir.^{6,7} Melatonin bu özelliklerinden dolayı diyabetin radikaller aracılı böbrek hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.⁷

Bu çalışmanın amacı, diyabette görülen patolojilerin antioksidan uygulanmasıyla düzelebileceğine dair görüşler doğrultusunda, deneysel diyabet modelinde gelişebilecek histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkilerinin histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilen Sprague Dawley cinsi, 15 adet erişkin dişi sıçan kullanıldı. Denekler rastgele her biri 5 sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı; Kontrol, diyabet oluşturulup tedavi edilmeyenler (D) ve diyabet oluşturulup, melatonin ile tedavi edilenler (DM).Tüm sıçanların deney öncesi kan şekerleri ölçüldü. Diyabet oluşturulacak D ve DM grup sıçanlara 45 mg/kg tek doz streptozotocin (STZ) (Sigma, USA) pH: 4,5 olan sitrat tamponu içinde, intraperitoneal (i.p) yoldan uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. D ve DM gruba uygulanan STZ

enjeksiyonundan 72 saat sonra alınan kanda Elite Glukometre (Bayer) el glukometresiyle kan şekerleri ölçüldü. Kan şekerleri 270 mg/dl ve üzerinde olanlar çalışmaya dahil edildiler. DM grubundaki sıçanlara her gün etanolde çözülüp, serum fizyolojik ile sulandırılan 10 mg/kg melatonin i.p enjeksiyonla verildi.⁴ Sekiz haftalık deney süresinde; tüm hayvanlar standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. Deney sonunda üretan (1,2-1,4 gr/kg) anestezisi altında sıçanların böbrekleri alınarak % 10 nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonrasında parafine gömülen dokulardan alınan 5 µm'lik kesitlere; hematoksilen eozin (H-E), periyodik asit Schiff+hematoksilen (PAS-H), Gomorinin gümüşlemesi ve anti laminin boyama yöntemleri uygulanarak, ışık mikroskopunda incelendiler.

Histolojik Değerlendirme:

Kesitler histolojik olarak; tubül bazal membranı, epitel hücreleri (hücre şişmesi, vakuolleşme ve glikojen birikimi) ve glomeruler yapı (Bowman mesafesi darlığı, kapiller bazal membran ve retiküler lif yoğunluğu) açısından incelendi. Değişiklikler, histopatolojik durumlarına göre hafif,¹ orta² ve şiddetli³ olarak değerlendirildi. Maksimum skor 24 olarak belirlendi. Her bir kesitin skorlaması yapıldı ve her grup için ortalama değerler saptandı.

İstatistik

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 13.0 programı ile Kruskal Wallis Veryans Analizi ve Mann Whitney -U testi kullanılarak yapıldı. Tüm sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

BULGULAR

Vücut Ağırlıkları ve Kan- Glikoz Değerleri

Sıçanların deneyin başlangıç ve sonundaki vücut ağırlıkları ile kan-glikoz değerleri aritmetik ortalama ± standart hata olarak Tablo I'de verildi.

D ve DM grubunun başlangıçtaki ağırlıkları benzerdi. Deneyin sonunda D grubundaki sıçanlar ağırlık kaybederken (-13.6 ± 3.7), DM grubu (+17.4± 4.5) kontrol grubuna benzer şekilde (+21.8±2.4) ağırlık kazandı. Ağırlık kazanımı açısından D ile DM ve D ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05). DM ile kontrol grubu arasındaki fark ise anlamsızdı (p>0.05).

Deneyel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri

Tablo I. Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları ve kan-glikoz değerleri

	Kontrol (n=5)	D (n=5)	DM (n=5)
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	183.40±13.6	167.8±15.38	166.0±8.36
Final vücut ağırlığı (gr)	205.50±14.37	154.20±17.70 ^a	183.4±11.18 ^b
Başlangıç kan-glikoz değerleri(mg/dl)	125.8±8.97	444.80±39.50	416.0±55.03
Final kan- glikoz değerleri (mg/dl)	125.2±8.67	493.2±28.27 ^c	333.6±33.9 ^d

STZ enjeksiyonunu takiben 3. Gün başlangıç olarak alındı.

^a Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.01).

^b D grubuna göre anlamlı olarak bulundu (p<0.05).

^c Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.01)

^d D grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.05)

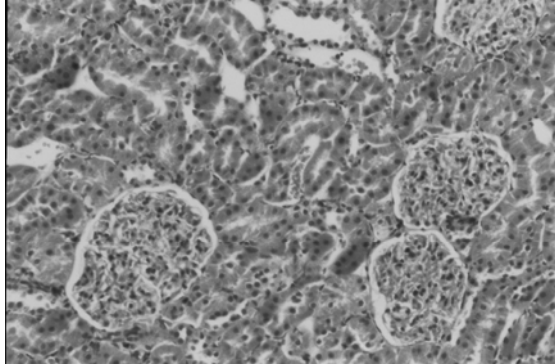
D grubunda STZ enjeksiyonundan deneyin sonuna kadar hiperglisemi izlendi. Melatonin tedavisi ile diyabetik sıçanların kan-glikoz seviyelerinde belirgin bir düşme izlendi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Yani melatonin STZ'nin neden olduğu hiperglisemi olgusunu önemli derecede hafifletti ancak kontroller düzeyine düşürmedi. Nitekim kan-glikoz düzeyleri bakımından DM ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05).

HİSTOLOJİK BULGULAR

Tübüler Değişiklikler

Kontrol grubunda, böbrek tübüleri normal histolojik görünümdeydi (Resim 1). D grubunda, bazı tübül epitellerinde hidropik değişiklikleri gösteren hücre şişmesi ve sitoplazmanın soluklaşması, bazılarında da bazal vakuolizasyon izlendi (Resim 2-3). DM grubundaki kesitlerde ise hidropik değişiklikler gösteren tübüllere rastlanmasına rağmen, D grubuna göre alandaki sayıları oldukça azalmıştı (Resim 4).

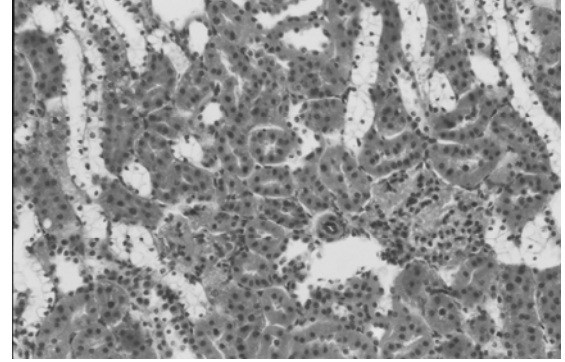
Resim 1: Kontrol grubunda, normal böbrek histolojisi. H-E X 66.



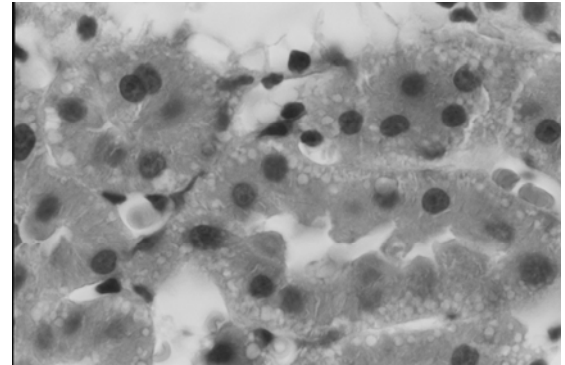
PAS+H ile boyanan kesitlerde, D grubunda, DM ve kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin bir bazal membran kalınlaşması izlenmedi. Ancak D grubunda,

özellikle korteksin medullaya yakın bölümlerindeki tübül epitellerinin sitoplazmalarında PAS(+) reaksiyon veren farklı çaplarda vakuoller şeklinde glikojen birikimi dikkat çekiciydi (Resim 5). Bazı tübüller neredeyse tamamen glikojenle dolmuştu. DM grubunda ise glikojen içeren tübüllerin hem sayısında hem de glikojen içeriklerinde belirgin bir azalma gözlemlendi (Resim 6).

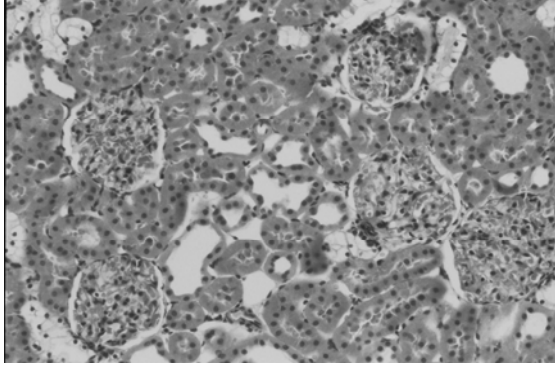
Resim 2: D grubunda, tübül epitelinde izlenen hidropik değişiklikler ve glomerüllerin etrafında ayırt edilemeyen Bowman mesafesi. H-E X66.



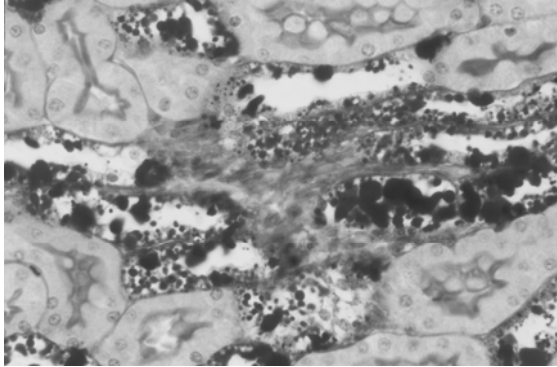
Resim 3: D grubunda, tübüllerin bazalinde izlenen vakuolizasyon. H-E X 333.



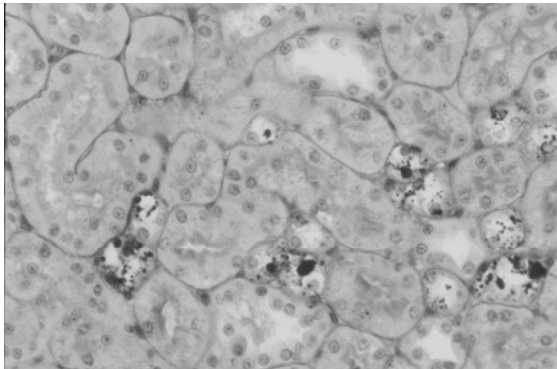
Resim 4: DM grubunda hidropik değişiklikler gösteren tübül sayısında azalma ve belirgin Bowman mesafesi. H-E 66.



Resim 5: D grubunda dikkat çeken glikojenle dolu tübüller. PAS-H X 132.

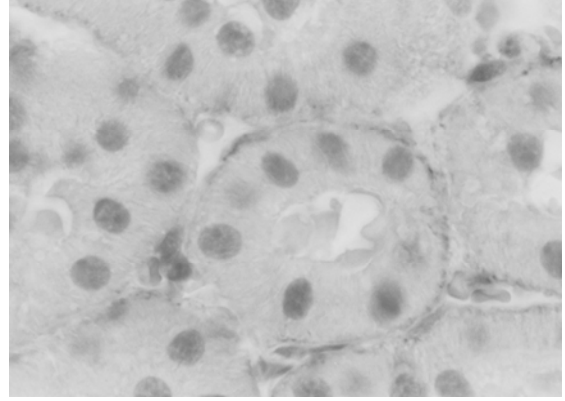


Resim 6: DM grubunda glikojen içeren tübül sayısında azalma. PAS-H X 132.

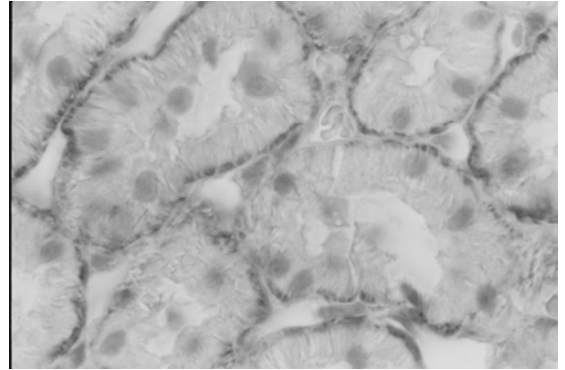


Anti-laminin immun boyama yöntemi ile kontrol grubundaki tübül bazal membranlarında hafif bir pozitif boyanma izlendi (Resim 7). D grubunda tübül bazal membranlarında boyanma şiddetli pozitif (Resim 8), DM grubunda ise orta pozitif olarak değerlendirildi (Resim 9).

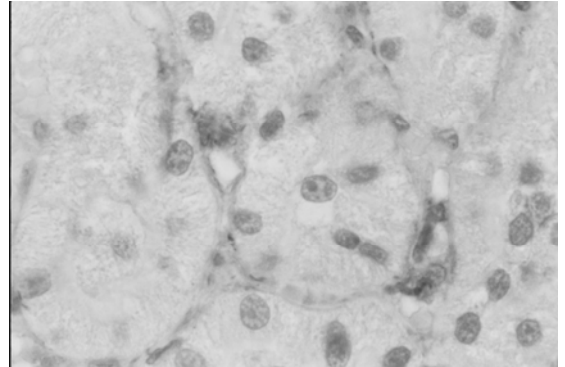
Resim 7: Kontrol grubunda anti-laminin immun boyaması ile tübül bazal membranı. X 333.



Resim 8: D grubunda anti-laminin immun boyaması ile tübül bazal membranı. X 333.



Resim 9: DM grubunda anti-laminin immun boyaması ile tübül bazal membranı. X 333.



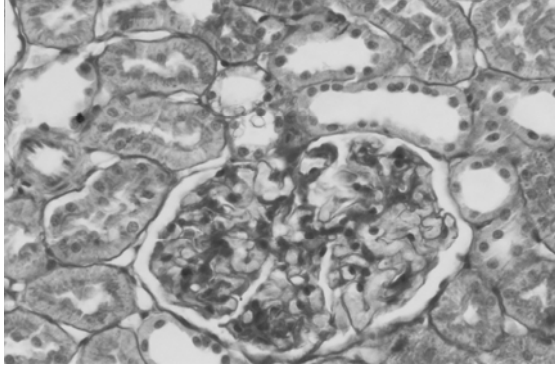
Glomerüllerdeki değişiklikler

Kontrol grubunda glomeruller normal histolojik görünümdeydi (Resim 1). D grubundaki glomerullerin çoğunda Bowman mesafesi izlenmeyecek kadar daralmıştı ve bazılarında da kapiller lümenleri seçilemedi (Resim 2). PAS+H boyama yöntemi ile

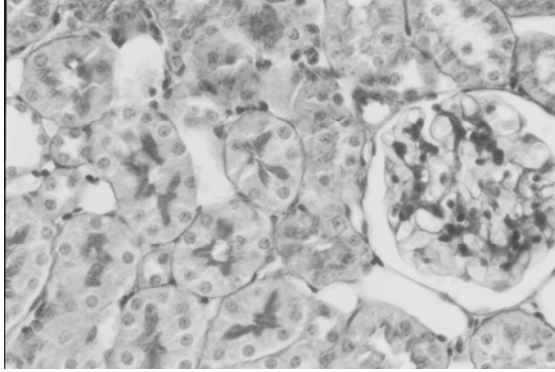
DeneySEL Diyabetin SıçAN BÖBREKLERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MELATONİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ

kapiller bazal membranında kalınlaşma yer yer belirgindi (10). DM grubunda ise glomerul görünümü kontrollere benzerdi (Resim 11).

Resim 10: D grubunda glomerül kapillerlerinde kalınlaşma (ok). PAS-H X 132.



Resim 11: DM grubunda glomerül kapillerleri ve Bowman mesafesi. PAS- H X 132.

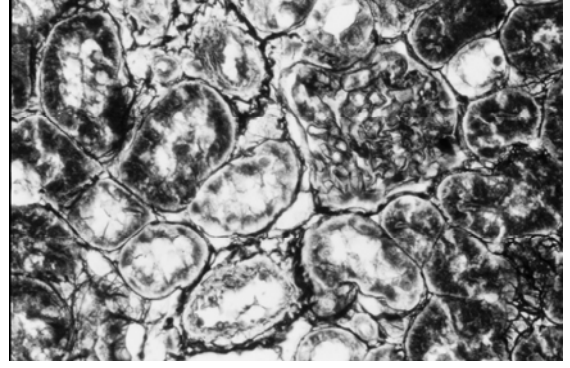


Gümüşleme metodu ile boyanan kesitlerde, D grubundaki glomerül kapillerleri etrafındaki retiküler lif yoğunluğu, melatonin uygulananlar ve kontrollere göre artmış olduğu izlendi (Resim 12-13-14).

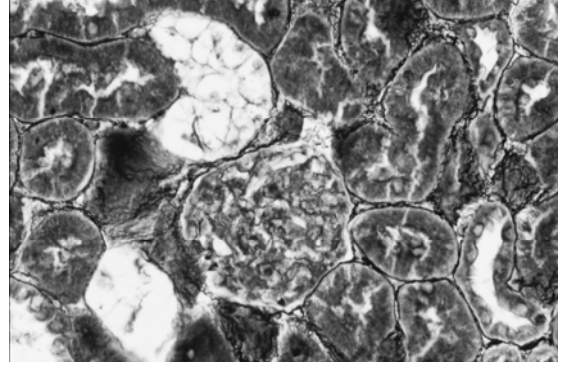
Anti- laminin immun boyama yöntemi ile tüm gruplarda glomerul bazal membranları zayıf olarak boyandı (gösterilmedi).

Bulgular tablo II'de gösterildi. Histolojik bulguların her grup için aritmetik ortalama±standart hata değerleri: kontrol grubu 5.0±0.0, diyabet grubu 19.4±1.5 ve diy+mél grubu 12.4±1.4 olarak tesbit edildi. Kontrol ile D grubu ($p<0.01$), D ile DM grubu ($p<0.05$) ve kontrol ile DM grubu ($p<0.01$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

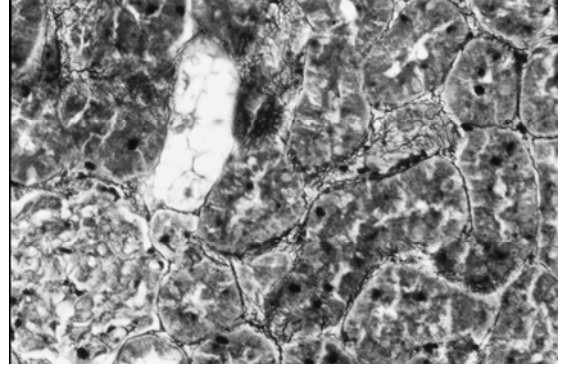
Resim 12: D grubunda gümüşleme metodu ile glomerul kapillerlerinin görünümü. X 132.



Resim 13: DM grubunda gümüşleme metodu ile glomerül kapillerlerinin görünümü. X 132.



Resim 14: Kontrol grubunda gümüşleme metodu ile glomerül kapillerlerinin görünümü. X 132.



TARTIŞMA

Diyabette çeşitli dokularda oksidatif stresin arttığı ve artmış oksidatif stresin içinde böbrek hasarının da bulunduğu diyabetik komplikasyonların patogeneğinde temel rolü oynadığı düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar^{8,9} oksidatif stres inhibisyonunun diyabetik nefropati bulgularının hafiflemesine neden olduğunu rapor etmiştir.

Tablo II. Işık mikroskopik bulgular

	Kontrol (n=5)			D(n=5)			DMI(n=5)		
	Hafif 1	Orta 2	Şiddetli 3	Hafif 1	Orta 2	Şiddetli 3	Hafif 1	Orta 2	Şiddetli 3
Tübüllerdeki değişiklikler									
1-Bazal membran									
-Laminin yoğunluğu	5	-	-	-	2	3	1	4	-
-PAS(+)	5	-	-	3	2	-	5	-	-
2-Epitel hücreler									
-Vakuolizasyon	-	-	-	-	1	4	2	3	-
-Glikojen birikimi	5	-	-	-	2	3	2	3	-
-Hücre şişmesi	-	-	-	-	1	4	1	4	-
Glomerullerdeki değişiklikler									
1-Bowman mesafesi darlığı	-	-	-	-	1	4	2	3	-
2-Bazal membran PAS(+)	5	-	-	-	2	3	3	2	-
3-Retiküler lif yoğunluğu	5	-	-	1	4	-	3	2	-

DeneySEL çalışmaların çoğunda diyabet oluşturmak için, beta (β) hücrelerine olan spesifik toksitesini nedeniyle diyabetojenik ajan olarak kabul edilen STZ kullanılmaktadır.^{4,5,9,10} Bu çalışmada, tek doz STZ'nin (45 mg/kg) i.p. enjeksiyonu ile diyabetik sıçan modeli oluşturuldu. STZ enjeksiyonunu takiben 48-72 saat sonra hiperglisemi meydana gelmektedir. Bizde daha önce yapılan çalışmalarla^{4,5} uyumlu olarak STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra yapılan ölçümlerde hiperglisemiyi saptadık.

Cam ve ark.⁹ ve Aksoy ve ark.¹¹ 4 ve 6 haftalık deney sonunda diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda Cam ve ark.⁹ ve Aksoy ve ark. 'nın¹¹ çalışmalarıyla uyumlu olarak, diyabet grubundaki sıçanların kilo kaybettiğini saptadık. Ancak Cam ve ark.⁹ ve Aksoy ve ark.¹¹ melatonin tedavisinin diyabetiklerde vücut ağırlığı üzerine önemli bir etkisi olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise DM grubu, D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde kilo kazandı. Andallu¹² diyabetik sıçanlarda vücut ağırlık kaybının doku proteinlerinin aşırı yıkımına bağlı olduğunu bildirmiştir. Melatonin ile vücut ağırlıklarının düzelmesinde, bizce muhtemelen hipergliseminin belli oranda kontrol altına alınması ve bu şekilde yıkımın azalmasının rolü olabilir.

Çalışmamızda, melatonin tedavisi diyabetik sıçanların kan-glikoz seviyesi kontroller düzeyine indirmese de önemli derecede düzelttiğini gözlemledik. Bu sonuçlar melatoninin kan-glikoz seviyesini düşürdüğünü rapor eden Anwar,¹⁰ Montilla,¹³ Andersson¹⁴ ve Görgün¹⁵ ile uyumludur. Bazı yazarlar, melatoninin hiperglisemi üzerindeki etki mekanizmasını açıklamaya çalışmışlardır. Shima¹⁶ 2-deoxy-D-glukozun intraserebroventriküler enjeksiyonu ile oluşan hiperglisemiyi melatoninin baskıladığını rapor etmiştir. Melatonin bu etkisini otonom sinir sistemi

yoluyla kan glikozunu düzenleyen hipotalamik suprakiazmatik nukleus (SCN) üzerinden yaptığını bildirmiştir. Çünkü SCN'de yüksek seviyede melatonin reseptörü tespit edilmiştir ve SCN'nin melatoninin aktifleştirdiği anti-hiperglisemik bir alan olabileceğini düşünmüşlerdir.^{16,17} Anhe¹⁷ melatoninin, hızlı trozin fosforilasyonuna neden olarak hipotalamik suprakiazmatik bölgede insülin reseptörü β -subunit tirozin kinazın aktivasyonunu hızlandırdığını bildirmiştir. Maitra'da¹⁸ melatoninin, katokolaminerjik cevaptaki rolüyle kan-glikoz seviyesini düşürebileceğini rapor etmiştir. Hücre içinde biriken STZ'nin, reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak pankreatik β hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir.^{14,19} Andersson¹⁴ melatoninin, STZ'nin hücre içinde oluşturduğu serbest radikalleri nötralize etme yeteneğine sahip olduğunu ve bunun sonucu (DNA polimeraz aktivitesinin ve NAD yokluğunun azalmasını sağlayarak) nekrozu önlediğini, ayrıca melatoninin β hücre hasarını takiben iyileşme sürecini de hızlandırdığını bildirmiştir. Nitekim Andersson¹⁴ STZ ile 7.8 ± 1.3 ng/mg'a düşen insülin içeriğinin melatonin ile 19.2 ± 1.4 ng/mg'a yükseldiğini tespit etmiştir. Yapılan otoradyografik ve moleküler çalışmalar pankreatik adacıklarda ve çoğunlukla β hücrelerinde melatonin reseptörü olduğunu ispatlamıştır. Melatoninin farmakolojik olarak etkilerini reseptörleri aracılığı ile gösterdiği düşünüldüğünde STZ'nin neden olduğu β hücre hasarının nispeten geri dönüşünde bu hücrelerdeki melatonin reseptörlerinin de etkisi olabilir.²⁰

Diyabetes Mellitusta en belirgin tubüler lezyon proksimal tubüllerin distal bölümünde ve henle kulpunun çıkan kısmındaki epitel hücrelerinin glikojen depolamasıdır. Renal tubüler hücreler glikoz seviyesinin renal eşğin üzerine çıkmasıyla glikozu aşırı miktarlarda resorbe ederler ve glikojen olarak

biriktirirler.²¹ Bizde çalışmamızda özellikle korteksini medullaya yakın bölümlerinde tübül epitel hücre sitoplazmasında farklı çaplarda yoğun PAS(+) glikojen birikimine rastladık. Melatonin verilen grupta ise tübül glikojen miktarı diyabet grubuna göre azalmıştı. Kanımızca bu azalma hipergliseminin şiddetinin azalmasına bağlıdır.

Patolojik olgularda ve deneysel diyabetik nefropatide ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikimi ile oluşan glomerular ve tübül bazal membran kalınlaşması çeşitli araştırmacılarca belirtilmektedir.^{9,22-25}

Ayo²⁶ yüksek glikoz içeren medyumlarda, kültüre edilen hücrelerin tip IV kollagen, laminin ve fibronektin sentezinin kontrollere göre %50-60 arttığını göstermiştir. Catherwood²⁷ yüksek glikoz içeren medyumlardaki mezengial hücrelerin normal seviyede glikoz içeren medyumlardaki hücrelere göre şiddetli oksidatif strese maruz kaldığını bildirmiştir. Ayrıca artan oksidatif stresle birlikte ekstrasellüler matriks proteinlerinin mRNA seviyeleri de yükselmiştir. Ancak medyuma antioksidanların ilavesi ekstrasellüler matriks proteinlerinin gen ekspresyonu önemli derecede geriye döndürmüştür.²⁷ Rainer Lehman,²² diyabette artmış oksidatif stresin içinde transforming büyüme faktörünün de (TGF- β) bulunduğu sitokinleri indüklediğini bildirmiştir. TGF- β 'nın hem matriks sentezinin stimülasyonu, hem de matriks degradationunun inhibisyonu ile güçlü bir fibrojenik aktivasyona sahip olduğu bilinmektedir. Nitekim insanlarda ve diyabetik hayvan modellerinde, glomerül ve tübülointerstisyel alanda TGF- β mRNA ve protein seviyesi önemli derecede arttığını bildirilmektedir.²⁵

Çalışmamızda, PAS, gümüşleme ve anti-laminin yöntemleri ile glomerul ve tübüllerdeki ekstrasellüler matriks bileşenlerinin diyabetteki değişimini inceledik. D grubu, kontrol ve DM grubu ile karşılaştırıldığında artan glomerular bazal membran kalınlaşması PAS ve gümüşleme yöntemi ile tesbit edildi. Anti-laminin ile yapılan immunohistokimyasal boyamada ise diğer gruplara göre diyabetiklerde glomerular bazal membran bakımından önemli bir değişiklik izlenmedi. Ancak bu boyama yöntemi ile tübül bazal membranlarının STZ uygulanan grupta kontrol ve DM grubuna göre daha kuvvetli pozitif boyandığı izlendi. Melatonin ile tedavi edilen grupta hem glomerül hem de tübül bazal membranında belirgin bir değişiklik izlenmedi. Bu sonuçlar oksidatif stresin, tübül ve glomerular bazal membran proteinlerinin sentezini artırabileceğini düşündürmektedir. HA ve ark.²⁸ STZ ile oluşturdukları diyabetik sıçanlarda

izlenen artmış TGF- β ve fibronektinin kronik olarak melatonin ve taurin verilmesiyle önlediğini bildirmiştir.

Çalışmamızda STZ verilen grupta izlediğimiz hidropik değişiklikleri gösteren hücre şişmesi ve intrasitoplazmik vakuolizasyon, melatonin grubunda hafifledi. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak Cam ve ark.⁹ diyabetik sıçanlarda izlenen diffuz hidropik değişikliklerin, melatonin grubunda sadece belli alanlarla sınırlandırıldığını bildirmişlerdir. Böbrek gibi glikoz girişi insüline bağımlı olmayan dokularda, kan-glikoz konsantrasyonu yükseldiğinde normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolu işlerlik kazanarak, sorbitol oluşumuna neden olur. Sorbitol plazma membranından diffüze olamadığından, hücre içinde birikir ve hücre membran bütünlüğünü bozar. Ayrıca osmotik etki yaparak hücrenin su alıp şişmesine neden olur. Hücrenin şişmesi morfolojik ve fonksiyonel yapı değişikliklerinde beraberinde getirir.²⁹ Melatoninin diyabette ortaya çıkan hidropik değişiklikleri önlemesi, onun hücre membranını stabilize etme ve yüksek lipofilikliği sayesinde hücrenin tüm komponentlerini hasardan koruyabilme özelliği ile ilgili olabilir.⁷

Sonuç olarak, kronik melatonin uygulaması STZ ile oluşturulan sıçanlarda diyabetin neden olduğu böbrek hasarını azalttı. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, antioksidan kullanımının kan-glikoz seviyesinin kontrolünde ve diyabetik komplikasyonların önlenmesi veya hafifletilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Diyabetin kontrolünde sentetik ya da biyolojik antioksidanların kullanımını gelecek için bir umut olabilir. Yine de diyabetik komplikasyonlar üzerindeki pozitif etkisini göstermek için uzun süreli kullanımlar ile ilgili daha ileriki çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Yenigün M. Her Yönü İle Diabetes Mellitus. Haseki Hastanesi Vakfı Yayını II. 1995:15.
- 2- Catalano C, Marshall SM. Epidemiology of end-stage renal disease in patients with diabetes mellitus: from thr dark ages to the middle ages. Nephrol Dial Transplant 1992; 7: 181-190.
- 3- Carl-David A, Stenram U, Torffvit o et al. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropaty in rats. Journal of Diabetes Its Complications 2002; 16: 395-400.
- 4- Vural S, Sabuncu T, Arslan SO et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. J Pineal Res 2001; 31: 193-198.
- 5- Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin C on streptozocin-induced diabetes mellitus. J Pineal Res 2002; 32: 225-230.
- 6- Tan DX, Reiter RJ, Manchester KC et al. Chemical and physical properties and potential mechanism: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem 2002; 2(2): 181-97.
- 7- Vijayalaxmi TCR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. Journal of Clinical Oncology 2002; 20(10): 2575- 2601.
- 8- Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Revesall of hyperglisemia and diabetic nephropaty. Effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. Journal of Diabetes and Its Complications 2004; 18: 282-288.

Vardı ve ark

- 9- Cam M, Yavuz O, Güven A et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 2003; 35:212-220.
- 10- Mamdouh Anwar M, Meki Abdel-Rahim MA. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2003; 135: 539-547.
- 11- Aksoy N, Vural H, Sabuncu T et al. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function* 2003; 21: 121-125.
- 12- Andallu B, Varadacharyulu NC. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. Cu. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338: 3-10.
- 13- Montilla PL, Vargas JF, Tuncel IF et al. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 1998; 25: 94-100.
- 14- Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1 β -induced damage of rodent pancreatic B-cell. *J Pineal res* 2001; 30: 157-165.
- 15- Görgün MF, Öztürk Z, Gmstaş K et al. Melatonin administration effects plasma total sialic acid and lipid peroxidation levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2002; 65: 695-700.
- 16- Shima T, Chun SJ, Nijima A et al. Melatonin suppress hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neuroscience Letters* 1997; 226: 119-122.
- 17- Anhe GF, Caperuto LC, Pereira DS et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem* 2004; 90(3): 559-66.
- 18- Maitra SK, Dey M, Dutta S et al. Influences of graded dose of melatonin on the levels of blood glucose and adrenal catecholamines in male roseringed parakeet (*Psittacula krameri*) under different photoperiods. *Arch Physiol Biochem* 2000; 108: 444-450.
- 19- Rao VSN, Santos FA, Silva RM et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. *Vascular Pharmacology* 2002; 38: 127-130.
- 20- Peschke E, Fauteck JD, MuBhoff U et al. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigation. *J Pineal Res* 2000; 28: 156-164.
- 21- McCance KL, Huether Sc. *Pathophysiology The Biologic Basis for Disease in Adults and Children* : In: McCance KL. *Altered Cellular and Tissue Biology*. Second edition. Mosby 1994; 73.
- 22- Lehman R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta* 2000; 297: 135-144.
- 23- ztrk F, Iraz M, Eşrefoğlu M, ve ark. Deneysel diyabetin şan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *İnn Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 12(1): 1-4.
- 24- Singh LP, Crook ED. Hexosamine regulation of glucose-mediated laminin synthesis in mesangial cells involves protein kinases A and C. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 646-654.
- 25- Reeves BR, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy.. *PNAS* 2000; 97(14): 7667-7669.
- 26- Ayo SH, Radnik RA, Gloss WF et al. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990; 136: 1339-1348.
- 27- Catherwood MA, Powell LA, Anderson P et al. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 2002; 61: 599-608.
- 28- HA H, YU MR, KIM KH. Melatonin and taurinereducer early glomerulopathy in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 944-950.
- 29- Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complication. *JAOA* 2000; 100(10): 621-634.

Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr. Nigar Vardı

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya