

Streptozotosinle İndüklenen Diabetik Ratlarda Ginkgo Biloba (EGb 761) Ekstresinin Nefropati Üzerine Etkileri*

Ümit KILIÇ¹, Meryem ÇAM², Aysel GÜVEN³, Mesut ERBAŞ⁴

ÖZ

Bu çalışma, streptozotosin (STZ) ile indüklenen diabetik ratların, böbreklerinde oluşan histolojik değişiklikler üzerine ginkgo bilobanın etkilerinin araştırılması amacıyla planlandı. Çalışmada Wistar Albino cinsi 40 adet erişkin erkek rat kullanıldı. Ratlar, kontrol, diabetik grup, Ginkgo verilen diabetik grup ve çözücü verilen grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deneysel Diabet, diabetik ve Ginkgo biloba verilen diabetik gruplarda tek doz STZ'nin (60 mg/kg) intraperitoneal uygulanmasıyla oluşturuldu. Diabet oluşuktan sonra, Ginkgo biloba grubuna 40 gün süresince her gün 100 mg/kg ginkgo biloba ekstresi oral olarak verildi. Deney süresince ratların kan-glikoz seviyeleri ve vücut ağırlıkları takip edildi. 40. gün ratlar eter anestezisi altında dekapite edilerek böbrekler alındı. Dokular rutin takip sonrası, parafine gömüldü. Histokimyasal boyama sonrası, kesitler ışık mikroskopta incelendi. Diabet grubundaki ve Ginkgo verilen gruptaki ratların, kontrol ve çözücü verilen gruba göre kan- glikoz seviyeleri önemli oranda artarken, vücut ağırlıklarında önemli oranda azaldı. Diabetik grupta glomerüllerde mezengial matriks genişlemesi bazal membran kalınlaşması, glomerüloskleroz, tübüllerde vakuolizasyon, tübüler nekroz, hidropik dejenerasyon ve hücre şişmesi gibi temel histolojik değişiklikler gözlemlendi. Uygulanan Ginkgo biloba ekstresi ile bu bulguların önemli derecede azaldığı tespit edildi. Ginkgo biloba ekstresi (EGb 761), Streptozotosinle ratlarda oluşturulan diabetin sebep olduğu böbrek hasarlarını azalttı. Bu yüzden Ginkgo biloba ekstresinin diabetik böbrekte görülen patolojik bulguları azaltacağını ya da gelişimini önleyebileceğini düşünmekteyiz. Yinede diabetik komplikasyonlar üzerindeki yararlı etkisini gösterebilmek için uzun süre kullanımıyla ilgili, ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel diabet; ginkgo biloba; böbrek; diabetik nefropati; streptozotosin.

The Effects of Ginkgo Biloba Extracts on the Nephropathy of Diabetic Rats Induced By Streptozotocine (STZ) ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effects of Ginkgo biloba extracts on the kidneys of diabetic rats induced by streptozotocine (STZ). 40 adult male Wistar albino rats were examined. Rats were divided into four groups as control, diabetic group, Ginkgo biloba administered diabetic group and group exposed to solvent only. Experimental diabetes was induced by intraperitoneal application of 60 mg/kg STZ to diabetes group and Ginkgo biloba administered diabetes group. After the induction of diabetes, every day 100 mg/kg Ginkgo biloba extract was administered orally to the ginkgo group for 40 days. Throughout the experiment blood glucose levels and body masses of the rats was monitored. On the 40th day rats were decapitated under ether anesthesia and their kidneys were removed. The tissue samples were embedded in paraffine. After histochemical staining the sections were investigated under lightmicroscopy. While blood glucose level of the diabetes group was significantly higher compared with the control and solvent groups, the body mass significantly decreased. Basic glomerular and tubular histologic changes caused by diabetes, like thickening of the basal membrane, expansion of the mesenchymal matrix, glomerulosclerosis, tubular necrosis, hydropic degeneration, cellular swelling, vacuolization, were observed. These changes were observed significantly less in the Ginkgo biloba group. Ginkgo biloba extract (Egb 761) decreased kidney damage in diabetic rats induced with STZ. We therefore believe that Ginkgo biloba extracts may help preventing the development of kidney damage and decrease the amount of pathologic findings in diabetes. Further studies are still necessary to demonstrate the efficacy of long term Ginkgo biloba use on diabetic complications.

Keywords: Experimental diabetes; ginkgo biloba; kidney; diabetic nephropathy; streptozotocine.

¹ Düzce Üniversitesi SHMYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İlk ve Acil Yardım Programı

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

³ Sanko Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

⁴ Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Anesteziyoloji AD

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ümit KILIÇ, umitkili@duzce.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 15.08.2016 Kabul Tarihi / Accepted: 14.03.2017

* Bu çalışma IX. Ulusal Histoloji & Embriyoloji Kongresi'nde poster olarak yayınlanmıştır. 20-23 Mayıs 2008 - Adana

GİRİŞ

Diabetes Mellitus, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenerek oluşan, kronik bir hiperglisemi durumudur. Hiperglisemi, insülin hormonunun azlığı, yokluğu veya insülin direnci sonucunda oluşur (1). Diabetik nefropati, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının en önemlisidir (2). Diabetes Mellitus'un uzun dönemli komplikasyonlarından olan diabetik nefropati, erken dönemde glomerül ve tübül bazal membranlarının kalınlaşması, glomerül mezangiumunda ekstrasellüler matriks elemanlarının birikmesi, glomerül ve tübül epitellerinde hipertrofi ile ilgili yapısal değişimleri içerir (3,4).

Glomerüller bazal membranda kalınlaşma, ekstrasellüler matriks genişlemesi sonucu, glomerüller hiperfiltrasyon ve mikro albuminüri olduğunu gösteren çalışmalar vardır (5). Diabetik böbrek hasarında görülen tübüler, tübülointertisyel ve glomerüller yapı değişikliklerinin gelişim mekanizması tam olarak anlaşılammıştır (6).

Diabetes Mellitus'la ilişkili birçok deneysel çalışmada renal kan akımında böbrek boyutunda, glomerüller filtrasyon hızında ve böbrek fonksiyonlarında belirgin artışa bağlı olarak böbrek lezyonlarında, idrarla albüminin atılmasında artış olduğu bildirilmiştir (7-9).

İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM) ve İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM)'lu hastalarda görülebilen mikroalbuminüri böbrek hasarının erken bir bulgusu olarak kabul edilir (10,11).

Hiperglisemiye bağlı olarak, serbest oksijen radikallerinin artması ve antioksidan kapasitenin düşmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin, diğer diabetik komplikasyonlar gibi böbrekte de önemli etkilerinin olabileceği bildirilmektedir (12,13).

Antioksidan kapasitenin düşmesinin daha fazla hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktiflerin oluşumlarını hızlandırarak, doku hasarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ginkgo biloba dünyanın bilinen eski ağaç türlerinden birisidir. Ginkgo biloba ekstrelerinin (Egb 761) uzun yıllardır geleneksel Çin tıbbında, dolaşım bozuklukları, ürogenital sistem hastalıkları, akciğer ve beyin hastalıklarında tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (14).

Ginkgo biloba ekstrelerinin (Egb 761) yaşlı hastaların kulak çınlamasında, yorgunluk durumlarında, konsantrasyon ve hafıza sorunlarında, anksiyetede ve depresif şikayetlerde, baş dönmesinde olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. Egb 761 ilaç olarak multi infarkt ya da dejeneratif demansta da kullanılmaktadır (15). Ginkgo biloba ekstresinin (Egb 761), kardiovasküler sistem üzerinde eritrosit ve trombositlere, arter, ven ve kapiller yapılar, kapiller perfüzyona etkileri olduğu bildirilmektedir (14). Ginkgo biloba ekstresinin içerdiği en önemli maddeler flavonoidler ve terpenoidlerdir. Egb 761'in etkisi, içerdiği bir maddeye ya da, birden çok maddenin kombine etkilerine bağlı olarak ortaya çıkabilir (15,16). Günümüzde kullanılan standart Ginkgo biloba ekstresi (Egb 761) içinde % 24 oranında flavon glikozidler, % 6 oranında terpenoidler ve çeşitli organik asitler bulunur. Flavon glikozidler; quersetin, kempferol ve izorhamnetin bileşiklerinden oluşur. Bunların güçlü antioksidan

özellikleri vardır. Ortamda bulunan süperoksit, hidroksil ve peroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak hücreleri lipid ve protein oksidasyonuna karşı korurlar (15,17).

Terpenoidler; bilobalid ve ginkgolidler'den oluşur. Ginkgolid-B, platelet aktive edici faktörün (PAF) kuvvetli inhibitörüdür (15,18,19).

Ginkgo biloba ekstresi, dokularda kan dolaşımını artırarak hücrelerin oksijen alımını artırır ve ortamda bulunan toksinlerin temizlenmesini sağlar. Bunun yanında güçlü antioksidan, anti inflamatuvar ve nöron koruyucu özelliğinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde de yararlı olabileceğini vurgulayan çalışmalar bulunmaktadır (15,20,21).

Bu çalışmanın amacı, diabetik nefropatide görülen patolojilerin antioksidan uygulanmasıyla düzelebileceğine dair düşünceler doğrultusunda, streptozotosinle indüklenen deneysel diabet modelinde böbreklerde gelişebilecek histolojik değişiklikler üzerine Ginkgo biloba ekstresinin koruyucu etkilerinin histokimyasal olarak incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya başlamadan önce Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulundan Etik Komite onayı alınmıştır (11.07.2006 No: 100/26). Çalışmada, Wistar Albino cinsi, 40 adet yetişkin erkek rat kullanıldı. Denekler her biri 10'ar Rat'tan oluşan 4 gruba ayrıldı (1. grup; kontrol grubu, 2. grup; diabet grubu, 3. grup; Ginkgo biloba verilen diabetik grup; Bu gruba diabet oluşumu sonrası 100 mg/kg/gün Ginkgo biloba verildi. 4. grup; Çözücü verilen grup).

Tüm gruplar, deney süresince normal rat yemi ve su ile beslendi. Başlangıçta ve deney sonunda ağırlıklarına ve kan glikoz seviyelerine bakılarak kaydedildi. İkinci ve 3. gruptaki ratların enjeksiyon öncesi kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları bakılarak kaydedildi. 60 mg/kg streptozotosin enjeksiyondan 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kanda el glikometresi ile glikoz seviyelerine bakıldı. Kan Glikoz seviyesi 250 mg/dl üzerinde olan ratlar diabet kabul edilerek çalışmaya alındı. Kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları her 10 günde bir bakılarak kaydedildi. İkinci gruptaki ratlar antidiabetik hiçbir ajan verilmeden deney süresince normal rat yemi ve su ile beslendi. Üçüncü gruptaki ratlara diabet oluşmasıyla birlikte deney süresince 100 mg/kg/gün Ginkgo biloba (Egb 761) verildi. Ginkgo biloba ekstresinin damla formu hergün ratların suluklarına koyuldu ve oral olarak almaları sağlandı. Bu gruba Ginkgo dışında hiçbir ajan verilmeden deney süresince normal rat yemi ve su verildi. Deney başlangıçta 3 aylık bir dönem için planlandı. Diabetik ratların genel durumu değerlendirilerek deney 40. gün sonunda sonlandırıldı. Ratlar dekapite edilmeden vücut ağırlıkları ve kan glikoz seviyeleri kaydedildi. Tüm gruplardaki ratlar eter anestezisi altında dekapite edildi. Böbrekler hızlı bir şekilde alınarak %10'luk formaldehitte tespit edildi. Dokular rutin doku takibine alınarak, parafine gömüldü. Bloklardan LEICA 2245 mikrotom cihazıyla 3 µ'lik kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilin-eozin (HE), gomori trikrom ve periyodik asit schiff (PAS) ile boyanarak Olympus BX50 ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Histolojik Değerlendirme

Kesitler ışık mikroskobu ile incelendi. Tüm gruplarda glomerüloskleroz, tübüler nekroz, mezengial matriks artışı, bazal membran kalınlaşması, hidropik dejenerasyon, hücre şişmesi, vakuolleşme gibi glomerüller ve tübüler değişiklikler, histopatolojik durumlarına göre hasar yok 0, hafif 1, orta 2 ve çok 3 olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

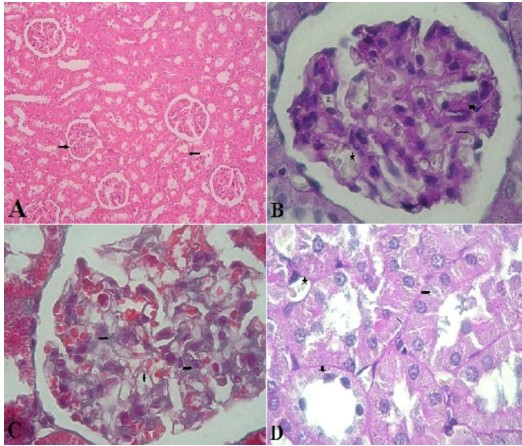
İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS for Windows 11.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi. Grup içi karşılaştırmalar Wilcoxon testi ile gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Ratların deney başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlıkları ve kan-glikoz değerleri Tablo 1’de verildi. Tüm ratların başlangıçtaki ağırlıkları benzerdi. Deneyin sonunda diabetik gruptaki ve Ginkgo grubundaki ratlar ağırlık kaybederken, kontrol grubundaki ve çözücü verilen gruptaki ratlar benzer şekilde ağırlık kazandı. Ağırlık kazanımı açısından çözücü ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ağırlık kaybı açısından diabet ile Ginkgo grubu arasındaki farkda istatistiksel olarak anlamlı değildi. Deney süresi boyunca hem diabetik grupta hem de ginkgo verilen grupta hiperglisemi izlendi. Ginkgo verilen gruptaki ratların kan-glikoz seviyelerinde belirgin bir düşme izlenmedi. Yani Ginkgo bilobanın streptozotosin’in neden olduğu hiperglisemide önemli bir etkisi olmadı. Kan-glikoz düzeyleri bakımından kontrol grubu ile ginkgo verilen grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

Tablo 1. Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları ve kan-glikoz değerleri

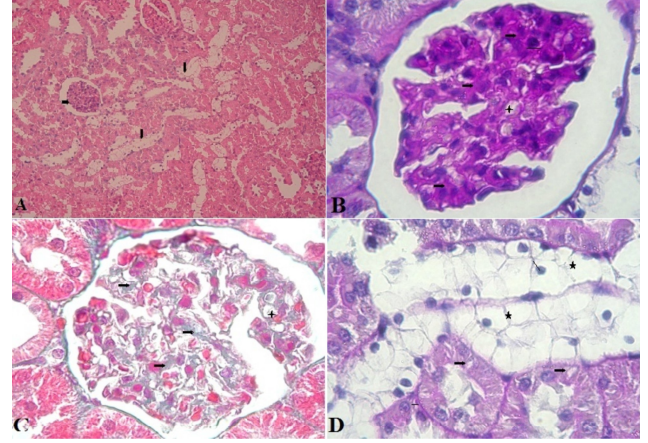
	Kontrol	Diabet	Ginkgo	Çözücü
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	324,7±14	320,5±24	318,8±18	326,1±10
Final vücut ağırlığı (gr)	372,9±19	290,0±12	298,5±11	372,2±12
Başlangıç kan glikoz değerleri	102,3±5	292,9±19	288,5±26	99,6±4
Final kan glikoz değerleri (mg/dl)	102,0±3	357,0±45	349,6±35	100,1±3



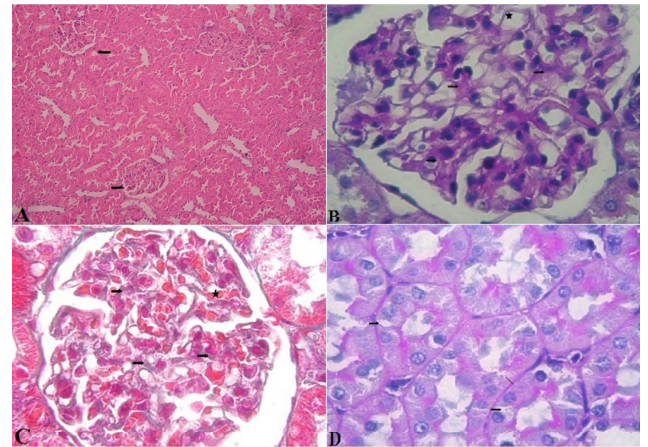
Resim 1. Kontrol grubu; (A). Glomerül (→), Tübül (←). (B). Glomerül, kapiller (★) bazal membran (—) mezengial hücre (→) görülüyor. PASX1000. (C). Glomerülden, intertisyel mezengial alan (→), kapiller (★) Gomori TrikromX1000. (D). Proksimal tübül (→), distaltübül (←), kapiller (★), bazal lamina (↘) PASX1000.

Glomerüllerdeki Değişiklikler

Kontrol grubunda ve çözücü verilen grupta glomerüller normal histolojik görünümdeydi (Resim 1-A, Resim 1-B, Resim 1-C). Diabetik grubun glomerüllerinde PAS boyama yöntemi ile bazal membranda kalınlaşma yer yer belirgindi (Resim 2-B). Diabetik grupta gomori trikrom boyası ile glomerüllerde ekstraselüler matriks artışı (kollojen lif artışı) görüldü. (Resim 2-C). Glomerüllerin bazıları sklerotik olarak izlendi (Resim 2-A, Resim 2-B). Ginkgo grubunda ise glomerül görünümü kontrollere benzerdi (Resim 3-B).



Resim 2. Diabetik grup; (A). Glomerülo skleroz (→) ve tübüler hidropik dejenerasyon (I) görülüyor. HEX200. (B). Glomerülden intertisyel mezengial matriks artışı (→) ve bazal membran kalınlaşması (—) kapiller (★). PASX1000. (C). Diabetik grup; Glomerülden, mezengial matriks artışı (→) kapiller (★) Gomori TrikromX1000. (D). Diabetik Grup; Proksimal tübülerde vakuolizasyon (→) ve hidropik dejenerasyon (★) görülüyor. Heterokromatik çekirdek (↘), Bazal lamina (—) PASX1000.



Resim 3. (A). Ginkgo grubu; Kontrolde yakın görünüm glomerül (→), tübül (←) HEX200. (B). Kontrolde yakın görünümde glomerül intertisyel matriks alanları (→) bazal membrana (—), kapiller (★) PASX1000. (C). Ginkgo grubu; Glomerülden, kontrolde yakın görünümde, mezengial matriks alanları (→), kapiller (★) Gomori TrikromX1000. (D). Ginkgo grubu; Kontrolde yakın görünümle birlikte yer yer tübüler vakuolizasyon görülüyor (→). Bazal lamina (↘) PASX1000.

Diabetik grupta proksimal tübülü başlangıç olarak yaptığımız ölçümlerde glomerül boyutlarının kontrol grubuna oranla belirgin olarak genişlediğini tespit ettik ($p<0,01$). Ginkgo grubunda da glomerül ölçümlerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,05$). Ginkgo grubu ile diabetik grup karşılaştırıldığında glomerül ölçümleri açısından anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu ile çözücü grup arasında glomerül ölçümleri açısından istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo2).

Değerlendirme tüm gruplarda patolojik bulgulara göre derecelendirildi. Patoloji ya da hasar yok (0), az (1), orta (2), çok (3) olarak Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 2. Deney Hayvanlarının Glomerül Ölçümleri

	Kontrol	Diabet	Ginkgo	Çözücü
Glomerül Ölçümleri (µm)	110,05±3	123,33±3	114,93±3	109,75±3

Tablo 3. Tübüller ve glomerüldeki histolojik değişiklikler

	Kontrol (n=10)	Diabet (n=10)	Ginkgo (n=10)	Çözücü (n=10)
Tübüler Nekroz	0	2	1	0
Hidropik Dejenerasyon	0	3	1	0
Glomerülo Skleroz	0	2	1	0
GBM kalınlaşması	0	2	1	0
Mezengial Matriks Genişlemesi	0	2	1	0

Tübüler Değişiklikler

Böbrek tübüleri kontrol ve çözücü verilen gruplarda, normal histolojik görünümde izlendi (Resim 1-A, Resim 1-D). Diabetik grupta, proksimal tübülde tübüler nekroz, bazı yerlerde hidropik dejenerasyon, bazılarında vakuolizasyon, tübül hücre stoplazmalarında belirgin soluklaşma ve apoptozise giden hücrelerde heterokromatik çekirdekler izlendi (Resim 2-A, Resim 2-D). Ginkgo verilen gruptaki kesitlerde, diabetik grupta görülen patolojilerin tümünde kontrole yakın görünümde azalma gözlemlendi (Resim 3-D). Ginkgo verdiğimiz grupta diabetik grupta görülen hidropik dejenerasyon, ekstrasellüler matriks genişlemesi, glomeruloskleroz, tübüler nekroz, bazal membran kalınlaşması, gibi patolojilerde azalma gözlemlendi (Resim 3-A, Resim 3-B, Resim 3-C, Resim 3-D).

TARTIŞMA

Diabet, yaygın görülen ciddi bir metabolik hastalıktır. Fonksiyonel ve yapısal birçok patolojiye neden olur. Bunların en önemlilerinden birisi de diabetik nefropatidir. Metabolik stres sonucunda diabetin komplikasyonları oluşmakta ve bu metabolik stres oksidatif olayların artmasına neden olmaktadır. Diabette, birçok dokuda oksidatif stresin arttığı ve diabetik komplikasyonların patogenezesinde temel rolü oynadığı düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda oksidatif stresin baskılanmasının diabetik nefropatide görülen bulguların azalmasında önemli olduğu bildirilmiştir (22,23).

Oksijen kullanımının doğal sonucu olarak oluşan serbest oksijen radikalleri, mitokondriyal elektron transportu, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon gibi reaksiyonlarda meydana gelir. Oksidatif stres, prooksidan/antioksidan dengesinin prooksidanlar tarafına kayması sonucu gelişir (24,25). Oksidatif DNA hasarının, yaşlanma, Alzheimer hastalığı, diabet, ateroskleroz, otoimmün inflamatuvar hastalıklar ve kanserde arttığını gösteren araştırmalar bulunmaktadır (26,27).

Diabette, glikozilasyonun artması nedeniyle, glikozillenen proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur (28,29). Serbest radikal düzeyindeki artışa bağlı olarak, antioksidanların kan ve doku düzeyinde düşme meydana gelir. Serbest radikaller parçalanmaya dayanıklı protein oluşumunu artırır ve damar duvarlarında bulunan proteoglikanların yapısında

değişime neden olurlar. Diabetes Mellitusta kapiller bazal membranının majör elemanları olan heparin sülfat, laminin ve fibronektin gibi moleküller bozulur. Parçalanmaya dayanıklı proteinler, kapiller bazal membranı kalınlaştırarak önce endotel hücre fonksiyonlarında bozulmaya, sonra endotel hücre tahribatına neden olur (30,31).

Diabetiklerin morbiditesinde ve mortalitesinde büyük bir öneme sahip olan nefropatide, çoğunlukla glomerül ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, mezangial matrikste, glomerülosklerozda ve mezangial hücrelerde önemli bir artış gözlenir. Diabetik glomerüloskleroz glomerül içinde ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikmesi ile karakterizedir (11,23,32).

Deneyisel çalışmaların çoğunda diabet oluşturmak için, pankreas beta (β) hücrelerine olan spesifik toksitesi nedeniyle diabetojenik ajan olarak kabul edilen STZ (Streptozotosin) kullanılmaktadır (12,13,23,33-35). Bizde çalışmamızda 60 mg/kg streptozotosin uygulayarak diabet oluşturduk. STZ enjeksiyonundan 40 gün sonra böbrek dokularını alarak inceledik.

Daha önce yapılan çalışmalarda, STZ ile indüklenen diabetik hayvanlarda erken dönemde ekstrasellüler matrikste (ECM) Tip IV kollagen, laminin, fibronektin, artışında, hipergliseminin rol oynadığı gösterilmiştir (36). Yapılan doku kültürü çalışmalarında yüksek glikoz içeren medyumlardaki mezengial hücrelerin normal glikoz içeren medyumlardakilere göre şiddetli oksidatif strese maruz kaldığı ve tip IV kollagen, laminin ve fibronektin sentezinin kontrollere göre %50-60 oranında arttığı, artan oksidatif stresle birlikte ekstrasellüler matriks proteinlerinin mRNA seviyelerinde yükseldiği gösterilmiştir (37,38).

Diabette oksidatif stresteki artışın, içinde TGF- β 'nında (Transforming büyüme faktörü) bulunduğu sitokinleri indüklediği bildirilmiştir. TGF- β 'nın matriks sentezinin stimülasyonu ve degradasyonunun inhibisyonu ile güçlü bir fibrojenik aktivasyona sahip olduğu, diabetik hayvan modellerinde ve insanlarda, glomerül ve tübülointerstisyel alanlarda TGF- β , mRNA ve protein seviyelerinde, önemli derecede arttığı bildirilmektedir (11,32).

Bu çalışmada diabetik grupta, glomerül bazal membranında belirgin kalınlaşma ile birlikte, ECM birikimine bağlı olarak glomerül boyutlarında önemli bir artış olduğu saptandı.

Bazı araştırmacılar, insanlarda tip 1 diabette mezengial matriks hacminde önemli bir artış gözlemişlerdir. Laboratuvar hayvanlarında deneyisel olarak oluşturulan tip 1 diabette de glomerül mezengiumunda ve interstisyel alanlarda artış, tübüler vakuolizasyon gibi benzer bulgulara rastlanmıştır (39,40). Çalışmamızda bu çalışmalardaki bulgulara paralel olarak, diabetik grupta glomeruloskleroz, mezengial matriks artışı tübüler vakuolizasyon ve hidropik dejenerasyon tespit edildi.

Böbrekte, glikoz girişi insüline bağlı değildir. Normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolu kanda glikoz yoğunluğunun artmasıyla aktif hale gelerek, sorbitol oluşumuna sebep olur. Plazma membranında diffüze olmayan sorbitol, hücre içinde birikerek membran bütünlüğünü bozar ve osmotik etkiyle hücrenin su olarak

şişmesine neden olur. Bu durum morfolojik ve fonksiyonel yapı değişikliklerine yol açar (41).

Biz de diabetik rat böbreklerinde tübülde vakualizasyon ve hidropik dejenerasyon tespit ettik.

Serbest oksijen türevlerinin meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya serbest oksijen radikallerini yakalayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Diabette serbest radikallerin artmış olduğu ve serbest radikal bağlayıcı sistemlerin fonksiyonunun azaldığı öne sürülerek, diabette antioksidanlara olan ihtiyacın artacağı savunulmuştur (42,43).

Diabette serbest radikallerin etkinliğinin bilinmesi dolaylı olarakta diabet hastalığının tedavisinde ya da oluşumunun önlenmesinde antioksidanların kullanılabilirliği fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (29,44).

Yüksek glikoz içeren medyumlarda kültüre edilen hücrelerin fibronektin, tip IV kollojen ve laminin sentezinin arttığı, ancak medyuma antioksidanların ilavesi ile ekstrasellüler matriks proteinlerinin gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (38).

Streptozotosin ile oluşturulan diabetik rat modelinde antioksidan olan melatonin kullanımının böbrekte görülen patolojik değişiklikleri azalttığı rapor edilmiştir (23).

Antioksidan ajan olan sarımsak yağı ve melatoninin streptozotosinle indüklenmiş diabetik ratlarda kullanımı sonucu nefropatide, retinopatide ve nöropatide antioksidan sistemle serbest radikaller arasında oluşan dengesizliği engelleyebileceği bildirilmiştir (33).

Ginkgo biloba ekstraktı (Egb 761) %24 ginkgo flavone glikozit ve %6 terpenoid içerir. Ginkgo biloba ekstraktı (GBE) güçlü serbest radikal yakalayıcıdır (Süperoksit anyon hidroksil, peroksil ve nitrik oksit) (15,16).

Ginkgo biloba ekstraktı (Egb 761), C ve E vitaminleri gibi antioksidanların yaşlanma ile mtDNA'da meydana gelen oksidatif hasarı ve mitokondriyal glutatyon oksidasyonunu engellediği saptanmıştır. Ayrıca beyin ve karaciğer mitokondriyelerinde yaşlanma ile meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri azalttığı gösterilmiştir (45).

Tip 2 diabetiklerde Ginkgo biloba ekstresinin 3 ay süreyle oral alımı eritrosit membranlarında Malondialdehit (MDA) seviyelerini önemli oranda azalttığı, fibrinojen seviyelerini düşürdüğü, retinopatili hastalarda retinal kapiller kan akımını arttırdığı saptanmıştır (46).

Ginkgo biloba'nın antioksidan özelliği ile superoksit anyonlarını temizleyebileceği ve "endotelium derived relaksing factor"ün (EDRF) yarı ömrünü uzatarak güçlü antiagregan ve vazorelaksan bir etki gösterebileceği bildirilmiştir (47).

Egb 761'in koruyucu etkilerinin görülebilmesi için gerekli tedavi süresinin 4-6 hafta olduğu bildirilmektedir (47). Biz de çalışmamızda 40 gün süreyle Ginkgo biloba ekstresi verdik.

Ratlarda termal travma ile oluşturulmuş oksidatif hasarda ginkgo biloba ekstresinin karaciğer ve böbrekte koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (48).

Endotoksin ile ratlarda oluşturulan renal hasarda, Ginkgo Biloba Ekstresi (Egb 761) ve E vitamini kullanımı lipid

peroksidasyon seviyelerini azaltarak antioksidan enzim aktivitesini arttırmıştır. Endotoksemik ratlarda Egb 761 tedavisi böbrekte mononükleer hücre infiltrasyonunu azaltmıştır. Ayrıca dejeneratif değişiklikler, tübül ve glomerül büzülmenin önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (49).

Bazı çalışmalarda GBE'nin rat mezengial hücrelerinde ECM (ekstrasellüler matriks) birikimini ve hücre hipertrofini azalttığı ve bu yolla diabetik nefropatide glomeruloskleroza geciktirmede önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (50).

GBE'nin rat mezengial hücrelerde glomeruloskleroza karşı koruyucu bir ajan olduğu ve oksidatif stres yoğunluğunu azalttığı bildirilmiştir (51).

İskemi reperfüzyon (I/R) yapılmış renal hasarlı ratlarda böbrekte iskeminin patogeneğinde reaktif oksijen metabolitlerinin artışının rol oynadığı belirtilmiş ve bulgular serbest oksijen radikallerinin I/R'de rol oynadığını ve Ginkgo biloba kullanımının muhtemelen antioksidan etkisiyle böbreği koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (52). Diabetik nefropati olan ratlarda, etanolik Ginkgo biloba yaprağı ekstresinin renal fibrozisi önlediği ve bunun büyük olasılıkla Akt/Mtor sinyal yollarını inhibe etme yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (53).

GBE'nin deneysel diabet ve hipoksik ratlarda nefroprotektif etkileri incelenmiş, bowman kapsülü bazal membran kalınlaşması, idrar boşluğu, kapiller yumak, glomerül volümünün artması gibi böbrekteki morfolojik değişiklikleri azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak hipoksi kaynaklı ince yapı hasarını azalttığı bildirilmiştir (54).

1 mg/kg Sisplatin (CDDP) ile yapılan bir çalışmada, 100 mg/kg Ginkgo biloba ekstresinin CDDP'den 90 dk. önce uygulanmasıyla nefrotoksisite bulgularını düzelttiği görülmüştür (55).

Ginkgo biloba ekstresinin başka ilaçların oksidatif yolla oluşturduğu toksik yan etkilere karşı koruyuculuğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bunlardan biri de gentamisin nefrotoksisitesidir (56).

Bazı araştırmacılar GBE'nin diabetik nefropatide farmakolojik hedefler üzerine koruyucu etkiye sahip olduğunu ve erken diabetik nefropatinin önlenmesi için potansiyel bir ilaç olduğunu bildirmişlerdir (57).

GBE'nin glikozla indüklenen rat mezengial hücrelerinde ECM'nin bozulmasını arttırarak ve ECM sentezini baskılayarak ECM birikimini ertelediği gösterilmiş ve diabetik nefropati tedavisi ve önlenmesinde potansiyel bir ilaç olduğu bildirilmiştir (58).

Bazı araştırmacılar siklosporinin uyardığı serbest oksijen radikalleri oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu GBE'nin engellediğini rapor etmişlerdir (59).

Çalışmamızda Ginkgo biloba verilen diabetik ratlarda hiperglisemi ve kilo kaybı, tedavi edilmeyen diabetik grupla anlamlı farklılık göstermezken, glomerül boyutlarının anlamlı olarak küçük olduğu tespit edildi. Ayrıca Ginkgo biloba verdiğimiz diabetik ratlarda, glomeruloskleroza, mezengial matriks artışı, bazal membran kalınlaşması ve tübülde vakuolizasyon, hidropik dejenerasyon, tübül nekroz gibi patolojilerde önemli oranda azalma saptandı. Bu grupta histolojik olarak kontrol grubuna yakın görünüm izlendi.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre streptozotosin ile oluşturulmuş diabetik nefropatide GBE'nin kısmen koruyucu olduğu görülmüştür. Bu araştırma, bu alanda yapılmış ilk çalışmalardan biridir. GBE'nin diabetik nefropatideki koruyucu etkinliğini ortaya çıkarabilmek amacıyla daha farklı dozlarda, farklı deney sürelerinde ve daha fazla kriter bakılarak çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJFP, Roemen THM, Vusse GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J.* 2003; 371(3): 753-60.
- American Diabetes Association: Diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2000; 23(1): S69-72.
- Cortes P, Dumler F, Goldman J, Levin NW. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozotocin- induced diabetes in rats. *Diabetes.* 1987; 36(1): 80-7.
- Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blandz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int.* 1991; 39(6): 1176-83.
- Sakharova OV, Taal MW, Brenner BM. Pathogenesis of diabetic nephropathy: focus on transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10(6): 727-38.
- Agardh CD, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. *J Diabetes Complications.* 2002; 16(6): 395-400.
- Hirose K, Qsterby R, Nozawa M, Jorgen H, Gundersen G. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int.* 1982; 21(5): 689-95.
- Cha T, Thara Y, Yamato E, Yoneda H, Ikegami H, Noma Y, et al. Renal handling of glycated albumin in non-insulin-dependent diabetes mellitus with nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 1991; 12(3): 149-56.
- Gambaro G, Cavazzana AO, Luzi P, Precoli A, Borsatti A, Crepaldi G, et al. Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int.* 1992; 42(2): 285-91.
- Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients. *N Engl J Med.* 1984; 311(2): 89-93.
- Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta.* 2000; 297(1-2): 135-44.
- Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res.* 2001; 31(3): 193-8.
- 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(4): 225-30.
- McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of Ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med.* 2001; 7(5): 70-86, 88-90.
- Ginkgo Biloba Monograph *Alternative Medicine Review.* 1998; 3(1): 54-7.
- O'Hara MA, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med.* 1998; 7(6): 523-36.
- Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract Egb761. *Biochem Pharmacol.* 1995; 49(11): 1649-55.
- Braquet P. The ginkgolides: Potent platelet-activating factor antagonists isolated from Ginkgo biloba L: Chemistry, Pharmacology and clinical applications. *Drugs of the future.* 1987; 12(7): 643-99.
- Smith PF, MacLenman K. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: A review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol.* 1996; 50(3): 131-9.
- Leubuisson DA, Lorey L, Rigal G. Treatment of senile macular degeneration with ginkgo biloba extract. A preliminary double-blind drug vs placebo study. *Presse Med.* 1986; 15(31): 1556-8.
- Liebrott T, Miollan M, Berchadsky Y, Drieu K, Culcasi M, Pietri S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (Egb761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95(5): 368-77.
- Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy. Effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *J Diabetes Complications.* 2004; 18(5): 282-8.
- Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustundag N. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin- induced diabetic rats. *J Pineal Res.* 2003; 35(3): 212-20.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17(10): 1195-214.
- Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* 2004; 26(5): 533-42.
- Mecocci P, Mc Garvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age- dependent increases in human brain. *Ann Neurol.* 1993; 34(4): 609-16.
- Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Di Mario F, Bonvicini P, et al. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut.* 1998; 42(3): 351-6.
- Akgül E, İlhan N, İlhan N, Halifeoğlu İ. Tip II Diabetes mellitusta lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri. *Türk Biyokimya Dergisi.* 1999; 24(3): 28-33.
- Cengiz M, Cengiz S. Tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini uygulamasının eritrosit glutatyon ve HbA1c

- düzeyleri üzerine etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2000; 31(4): 211-5.
30. Barnett AH. Origin of the microangiopathic changes in diabetes. *Eye (Lond)*. 1993; 7(2): 218-22.
 31. Aiello LM, Northrup J, Keyt B, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113(12): 1538-44.
 32. Reeves BR, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(14): 7667-9.
 33. Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003; 135(4): 539-47.
 34. 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(3): 157-65.
 35. Rao VS, Santos FA, Silva RM, Teixeira MG. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38(3): 127-30.
 36. Parving HH, Andersen AR, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, Svendsen PA. Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987; 294(6585): 1443-7.
 37. Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Gloss WF, Kreisberg JI. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol*. 1990; 136(6): 1339-48.
 38. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose- induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002; 61(2): 599-608.
 39. Sanai T, Sobka T, Johnson T, El-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, et al. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2000; 43(1): 91-100.
 40. Osterby R, Bangstad HJ, Nyberg G, Rudberg S. On glomerular structural alterations in type-1 diabetes. Companions of early diabetic glomerulopathy. *Virchows Arch*. 2001; 438(2): 129-35.
 41. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complication. *J Am Osteopath Assoc*. 2000; 100(10): 621-34.
 42. Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF rebase in diabetic rat aorta by oxygen free radical. *Am J Physiol*. 1992; 263(2): 257-65.
 43. Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49(3): 481-93.
 44. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Torello R. A preliminary note on inhibiting effect of Alpha-tocopherol on protein glycation. *Diabet Metab*. 1988; 14(1): 40-2.
 45. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. 2000; 49(5): 427-35.
 46. Huang SY, Jeng C, Kao SC, Yu JJ, Liu DZ. Improved haemorrhological properties by Ginkgo biloba extract (Egb 761) in type 2 diabetes mellitus complicated with retinopathy. *Clin Nutr*. 2004; 23(4): 615-21.
 47. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo Biloba. *The Lancet*. 1992; 340(8828): 1136-9.
 48. Sakarcan A, Sehirli O, Velioglu-Ovunc A, Ercan F, Erkan G, Gedik N, et al. Ginkgo biloba extract improves oxidative organ damage in a rat model of thermal trauma. *J Burn Care Rehabil*. 2005; 26(6): 515-24.
 49. Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Kuzey GM. Protection of endotoxin- induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. *J Appl Toxicol*. 2005; 25(1): 8-12.
 50. Wang JY, Yin XX, Wu YM, Tang DQ, Gao YY, Wan MR, et al. Ginkgo biloba extract suppresses hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat mesangial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2006; 27(9): 1222-30.
 51. Tang D, Zhang Z, Gao Y, Wei Y, Han L. Protective effects of serum containing Ginkgo biloba extract on glomerulosclerosis in rat mesangial cells. *J Ethnopharmacology*. 2009; 124(1): 26-33.
 52. Sener G, Sener E, Sehirli O, Oğünç AV, Cetinel S, Gedik N, et al. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion- induced renal injury in rats. *Pharmacol Res*. 2005; 52(3): 216-22.
 53. Lu Q, Zuo WZ, Ji XJ, Zhou YX, Liu YQ, Yao XQ, et al. Ethanol Ginkgo biloba leaf extract prevents renal fibrosis through Akt/mTOR signaling in diabetic nephropathy. *Phytomedicine*. 2015; 22(12): 1071-8.
 54. Welt K, Weiss J, Martin R, Hermsdorf T, Drews S, Fitzl G. Ginkgo biloba extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. *Phytomedicine*. 2007; 14(2-3): 196-203.
 55. Fukaya H, Kanno H. Experimental studies of the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on cisplatin- induced toxicity in rats. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1999; 102(7): 907-17.
 56. Niadu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin- induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine*. 2000; 7(3): 191-7.
 57. Lu Q, Yin XX, Wang JY, Gao YY, Pan YM. Effects of Ginkgo biloba on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28(6): 818-28.
 58. Ji L, Yin XX, Wu ZM, Wang JY, Lu Q, Gao YY. Ginkgo biloba extract prevents glucose induced accumulation of ECM in rat mesangial cells. *Phytother Res*. 2009; 23(4): 477-85.
 59. Barth SA, Inselmann G, Engemann R, Heidemann H. Influences of ginkgo biloba extract on cyclosporin induced lipid peroxidation in human liver microsomes in comparison to vitamin E, glutathione and acetylcystein. *Biochem Pharmacol*. 1991; 41(10): 1521-6.