

STZ (Streptozotosin) ile Diyabet Oluşturulmuş Ratların Böbrek Dokusunda Silibinin'in HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) ve TLR-2 (Toll Like Receptor 2) Genlerinin mRNA Düzeylerine Etkisi

Effect of Silibinin on mRNA Levels of HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) and TLR-2 (Toll-Like Receptor 2) Genes in Kidney of STZ (Streptozotocin) Induced Diabetic Rats

¹Tuğba Semerci Sevimli, ²Murat Sevimli, ¹Nurten Özçelik, ¹İbrahim Onaran, ²Dilek Bayram
¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye
²Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

Özet: Silibinin, Silybum marianum (Deve dikeni) adı verilen bitkiden elde edilen bir flavanoiddir. Bu deneysel çalışmada; hücre koruyucu, antiinflamatuvar, antikanserojen, antioksidan etkileri olan ve proteüiniriyi azalttığı bilinen Silibininin, STZ ile diyabet oluşturulan ratların böbreklerinde HIF-1 α ve TLR2 genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıp, histokimyasal olarak da inceledik. Çalışmamızda 5 grup vardı: Kontrol Grubu, Diyabet Grubu (STZ 65 mg/kg, i.p. tek doz), Diyabetik Grup+100mg/kg Silibinin Tedavi Grubu, Diyabetik Grup+200mg/kg Silibinin Tedavi Grubu, Silibinin grubu (5 rata 100 mg/kg silibinin, 5 rata 200 mg/kg silibinin). Böbreğin biri HIF-1 α ve TLR2 genlerinin ekspresyon seviyeleri için değerlendirilirken, diğer böbrek histopatolojik olarak değerlendirildi. Histolojik olarak ilaç alan gruplarda, diyabetik gruplara kıyasla Diyabetik Nefropati (DN) bulguları açısından anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Alınan doku örneklerinden elde edilen total RNA'lar kullanılarak RT-PCR metodu ile 2 adet hedef gen ve bir adet kalibratör genin ifadesindeki değişiklikler incelendi. Elde edilen bulgular kontrol grubu ve diğer gruplardaki örnekler ile karşılaştırılmıştır. 2- $\Delta\Delta$ CT yöntemi ile kat değişimleri hesaplandığında ve eşik -2/2 olarak alındığında TLR2 geninde değişimler tespit edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p< 0,05). Silibinin'in diyabetli ratların böbrek dokusunda oluşan hasara karşı yeteri kadar etkili olmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Silibinin, HIF-1 α , TLR2

Semerci Sevimli T. Sevimli M. Özçelik N. Onaran İ. Bayram D. (2017). STZ (Streptozotosin) ile Diyabet Oluşturulmuş Ratların Böbrek Dokusunda Silibinin'in HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) ve TLR-2 (Toll Like Receptor 2) Genlerinin mRNA Düzeylerine Etkisi, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 39(1), 6-12, doi:10.20515/otd.04872

Abstract: Silibinin is a flavonoid that derived from the plant named Silybum marianum. In this experimental study, we compared and histochemically examined the effect of Silibinin on the expression levels of HIF-1 α and TLR2 genes in the kidneys of STZ-diabetic rats before and after the treatment. There were 5 groups in this study: Control Group, Diabetes Group (STZ 65 mg/kg, i.p. single dose), Diabetic Group+100mg/kg Silibinin Treatment Group, Diabetic Group +200mg/kg Silibinin Treatment Group, Silibinin group (100 mg/kg silibinin on 5 rats, 200 mg/kg silibinin on 5 rats). The changes in the expression of two target genes and one calibrator gene were examined using the RT-PCR method. No statistically significant difference was found when the fold changes were calculated using 2- $\Delta\Delta$ CT method (p>0,05). No significant change was observed in the groups taking drugs histologically when compared to diabetic groups. It was seen that Silibinin is not quite effective on the damage formed in the kidney tissue of diabetic rats according to Diabetic Nephropaty findings. Also silibinin is not effective on the mRNA levels of diabetic rat kidneys.

Keywords: Diabetes, Silibinin, HIF-1 α , TLR2

Semerci Sevimli T. Sevimli M. Özçelik N. Onaran İ. Bayram D. (2017) Effect Of Silibinin On Mrna Levels Of Hif-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha) And Tlr2 (Toll-Like Receptor 2) Genes In Kidney Of Stz (Streptozotocin) Induced Diabetic Rats, *Osmangazi Journal of Medicine*, 39(1), 6-12, doi:10.20515/otd.04872

1. Giriş

Diabetes mellitus (DM); insülin salgısının eksikliği ve/veya insülin direnci ile oluşan, karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetik hastaların çoğu iki büyük grupta yer almaktadır. Tip 1 diyabet, otoimmün veya bilinmeyen nedenlerle ortaya çıkarken; tip 2 diyabet, insülin salgısında bozulma ve/veya insülin direnci nedeni ile insülin etkisinde azalma ile kendini göstermektedir. Diyabetik hastaların doku ve organlarında morfolojik ve fonksiyonel birçok değişiklik olmaktadır. Akut komplikasyonlar yaşamı tehdit edebilirken, kronik komplikasyonlar daha uzun sürede damar hastalıklarına neden olabilmektedir (1-7).

Gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliğinin en sık sebebinin diyabetik nefropati (DN) oluşturduğunu ve görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Burada görülen böbrek hasarının temel sebepleri, diyabetin neden olduğu ve hipergliseminin indüklediği metabolik ve hemodinamik değişikliklerdir. Ancak artan kanıtlar bu faktörlerin ötesinde daha kompleks mekanizmaların ve immün sistem aracılı inflamatuvar süreçlerin diyabet ve komplikasyonlarının patofizyolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Birçok çalışma diyabetik böbreklerde belirgin şekilde lökosit infiltrasyonu, artan kemokinler, adezyon molekülleri, enzimler, büyüme faktörleri ve nükleer faktörlerin ekspresyonunu göstermektedir (8). Hiperglisemi tarafından tetiklenen metabolik, hemodinamik değişiklikler ve genetik yatkınlık glomerüler mezangial hücrelerde fonksiyonel değişikliklere neden olan başlıca etkenlerdir (9). Diyabetik hastalarda enfeksiyonlara yakalanma sıklığı yüksektir. Bu durumun en önemli nedenleri; bağışıklık sisteminin bozukluğu, nöropati ve damar yapılarında meydana gelen bozukluklardır (10). TLR (Toll like receptors)'ler çeşitli patojen ajanlara karşı doğal immün cevabın oluşumunda NF-K β (Nuclear factor κ B) ve interferon düzenleyici faktör bağımlı sinyal yolları aracılığıyla rol oynayan transmembran proteinlerdir (11). İnflamasyon ve enfeksiyon alanlarında doku metabolizmasında çeşitli değişiklikler gözlenir. Bu değişikliklerin sonucu olarak da hipoksi gözlenmektedir. HIF (Hypoxia-Inducible Factor) memeli hücrelerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve

hücrelerin hipoksiye karşı verdiği cevaplarda önemli roller üstlenmektedir. Hücreler azalmış oksijen konsantrasyonlarına artan HIF aktivitesi ile cevap vermektedir. Bunun sonucunda ise; kanser gelişimi, anjiyogenezis, hücre sağkalımı, glikoz metabolizması ve invazyon ile ilişkili bir çok genin ekspresyonu artmaktadır. HIF aracılı bu değişen gen ekspresyonlarının ise kronik böbrek hasarında etkili olduğu görülmektedir (12, 13). Diyabetik hastalarda kan şekeri regülasyonu, komplikasyonların gelişimini önlemek açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak düzenli bir tedavi politikası ve bakım gerektiren böyle bir hastalık ile yaşamak ve sonuç olarak komplikasyonlardan korunmak her zaman mümkün olamamaktadır. Tüm hastalarda tam olarak tedaviye uyum gözlenememekte ve sonuçları hem kişiler hem de ülkemiz ekonomisi açısından olumsuzluklarla dolu kronik komplikasyonlar geliştirmektedir. Diğer yandan bir zamanlar hiperglisemi kontrolünde oldukça sık kullanılan bazı ilaçların ciddi yan etkilerinin ortaya çıkması sonucu, ülkemiz de dahil birçok ülkede yasaklanması ve kullanımdan kaldırılması sentetik moleküllerin güvenilirliklerini bir kez daha sorgulamamıza neden olmakta ve bizi de çalışmamızda kullanmayı planladığımız fitoterapötik ajan araştırmalarına yönlendirmektedir.

Silibinin, *Silybum marianum* (Deve dikeni) adı verilen bitkiden elde edilen bir flavanoiddir. Hücre koruyucu, antiinflamatuvar, antikanserojen, antioksidan etkileri olan ve proteinürüyü azalttığı bilinen bu etken madde, çalışmamızda kullanmayı planladığımız fitoterapötik ajandır (14).

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratların böbrek dokularında Silibinin'in, HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha) ve TLR-2 (Toll Like Receptor 2) genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisini tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıp, histokimyasal olarak da göstermektir.

2. Gereç ve Yöntem

Deneysel uygulamalar, Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirildi (Karar no: 04.04.2007/12).

Deney hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen Wistar cinsi toplam 56 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C)'da yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 4-6 hafta süreyle beslendiler. Daha sonra kontrol (n=10), diyabetik (n=12), diyabetik+100 mg/kg Silibinin (Sigma, ABD) (n=12), diyabetik+200 mg/kg Silibinin (n=12), Silibinin [100 mg/kg (n=5)+200 mg/kg (n=5)] olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Deneysel diyabet modeli 0.01 M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde taze olarak hazırlanmış STZ (Santa Cruz, ABD) çözeltisinden 65 mg/kg olacak şekilde tek doz i.p. olarak insülin enjektörü kullanılarak uygulanmıştır. 24 ve 48. saatlerde kuyruk veninden kan alınıp glukometre (Optium Xceed© Abbott, ABD) ile kan glukoz değerleri ölçüldü. Kan glukoz değeri 200 mg/dl olan ratlar diyabetik olarak değerlendirildi. 3., 4. ve 5.gruptaki ratlara hergün Silibinin günde tek doz olarak gavajla 4 hafta süreyle uygulandı. Ratlar enjeksiyon uygulanmasını takiben 4. haftada intramusküler (im.) olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamine, Türkiye)-% 2'lik ksilazin (Alfazyne, Türkiye) anestezisi altında deney sonlandırıldı.

Dokuların alınması

Doku örnekleri, hayvan deneylerinin sonlanması ile birlikte hayvanların sakrifiye edilmesi ile elde edildi. Hayvanlardan alınan sağ böbrekler histolojik çalışmalar için fiksasyon kaplarına alınırken, sol böbrekler steril koşullarda ve kontaminasyon riski en az düzeye indirilecek şekilde qRT-PCR çalışması için alındı. Bu böbreklerden hücresel stresin neden olabileceği RNA yıkımını en aza indirecek şekilde, buz üzerinde ve steril koşullarda, bir kenarı yaklaşık 0,5 mm uzunlukta olacak şekilde parçalar elde edildi. Ardından her bir parça yaklaşık 1 ml RNA Later (Qiagen, Almanya) solüsyonu içeren ependorf tüplere alındı. Ependorf tüpler moleküler çalışmaların yapılacağı merkeze gidene kadarki sürede -20°C'de saklandı.

Doku örneklerinin lizisi ve homojenizasyonu

Doku örneklerinin lizisi ve homojenizasyonu için TissueLyser LT (Qiagen, Almanya) sistemi kullanılmıştır. RNA Later solüsyonu içerisindeki böbrek dokuları, içerisinde 900 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Almanya) bulunan 2ml'lik steril ependorf tüplere alındı. Ardından 5 mm çapındaki çelik bilyeler her bir tüpe eklenip işlemler tamamlandı.

cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu için RNeasy total RNA isolation kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. cDNA eldesi için öncelikle gDNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Yaklaşık 5 µg RNA üzerine, 2 ml GE buffer ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz free su eklendi. 42°C'de 5 dk inkübe edildi. Ardından revers transkripsiyon karışımı hazırlandı. 10 µl gDNA eliminasyon karışımı içeren tüplere 10 µl revers transkripsiyon karışımı eklendi. 42°C'de 15 dk inkübe edilip -20°C de saklandı.

qRT-PCR

PCR komponent karışımı 5 ml'lik tüp içerisinde hazırlandı RT² SYBR Green Mastermix 12,5 µl, cDNA synthesis Reaction 1 µl, RT2 QPCR Primer Assay (10mM stok) 1 µl, RNaz free water 10.5 µl toplam 25 µl olacak şekilde hazırlandı. 25 mikrolitre PCR komponent karışımı rotor disk kuyucuklarına yüklendi. Ardından RT-PCR cihazı 95°C'de 10 dk, 40 döngü 95°C'de 15 s 60°C'de 30 s olacak şekilde programlandı. 72°C'de 10 dk tutulduktan sonra 4°C'de bırakıldı.

Histolojik İnceleme

%10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilen uygulanan doku örnekleri tespitten sonra bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra; dehidratasyon, şeffaflandırma, emdirme, gömme işlemlerinden geçirildi. Hazırlanan parafin bloklardan, kızaklı mikrotom (Leica, Almanya) kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlar Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan örnekler binoküler mikroskopta (Olympus, Japonya) incelendi ve fotoğraflar elde edilerek değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada sürekli değişkenler için t testi ve Varyans Analizi yapıldı. Anlamlılık düzeyi

P<0.05 olarak alındı. İstatistiksel analizler SPSS 12.0 programında yapıldı.

3. Bulgular

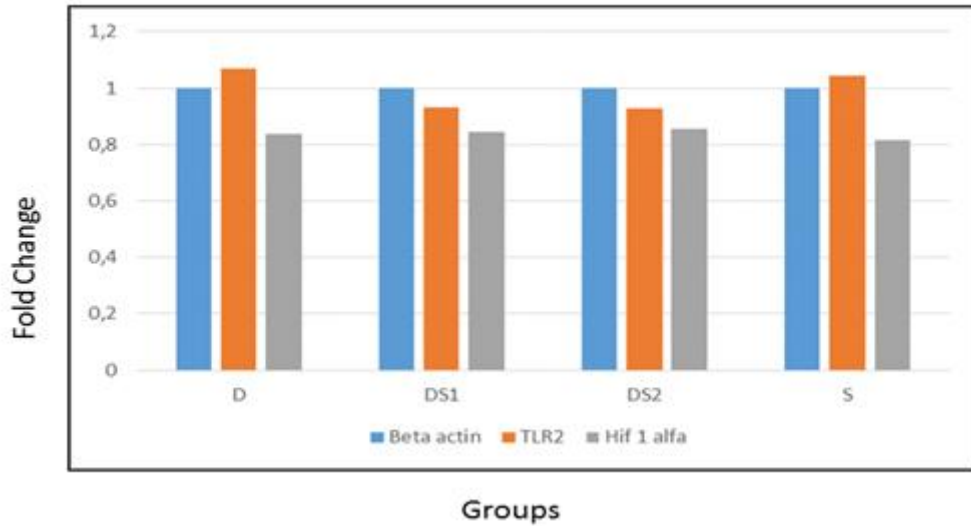
Histolojik Bulgular

Işık mikroskobu incelemelerinde kontrol grubuna ait böbrek dokularında, glomerül ve tübül yapıları normal olarak izlendi (Resim 1a). Diyabet grubuna ait böbrek dokularında kortekste proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu, glomerüllerde dejenerasyon ve hemorajik alanlar izlendi. Medulla bölgesinde ise; tübüllerde dilatasyon ve çok miktarda hemorajik alan görüldü. Hem korteks hem medulladaki tübüllerin çoğunda, vakuolar dejenerasyon izlendi (Resim 1b). Diyabet + Silibinin 100 μ g/kg grubuna ait böbrek dokularında glomerüllerde diyabetik gruptakine benzer bulgulara rastlandı. Burada da kortekste tübül dilatasyon ve vakuolar dejenerasyon, glomerüler dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonunun devam ettiği görüldü. Medulladaki tübüllerde de dilatasyon ve vakuolar dejenerasyon izlendi. Diyabetik gruba kıyasla korteks ve medulladaki hemorajik alanlarda azalma

olduğu görüldü (Resim 1c). Diyabet + silibinin 200 μ g/kg grubuna ait böbrek dokusu histolojik kesitlerinde Diyabet + Silibinin 100 μ g/kg grubuna benzer bulgulara rastlandı. Farklı olarak kanama odaklarında bir miktar azalma olduğu gözlemlendi (Resim 1d). Silibinin 100 μ g/kg ve 200 μ g/kg gruplarında da kontrol grubuna benzer şekilde normal histolojik bulgulara rastlandı (Resim 1e,1f).

RT-PCR Bulguları

RT-PCR çalışması sonucunda 3 adet gen değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular her bir gen için tek tek değerlendirilerek sonuçlar hesaplanmıştır. RT-PCR çalışmasından elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir (15). Tüm sonuçların uygun bir şekilde grafiksel sunumu amacıyla çalışmamızdaki kantitatif RT-PCR sonuçları kat değişimi grafiğinde gösterilmektedir (Grafik 1). Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık eşik değeri olarak p<0,05 kullanılmış ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).



Grafik 1. HIF-1 α ve TLR-2 genlerinin ekspresyonuna ait kantitatif RT-PCR Kat değişimi.

4. Tartışma

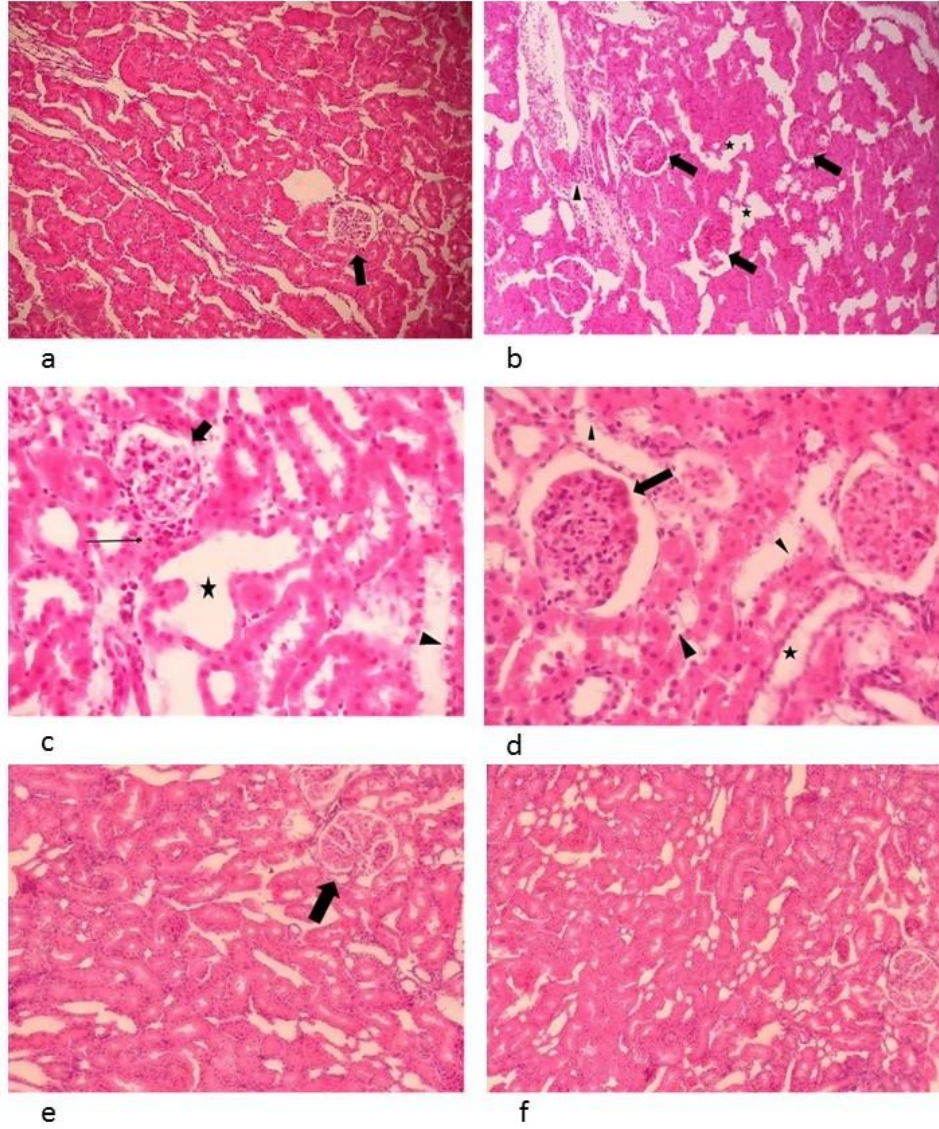
Çalışmamızda hem literatüre DN iyileşmesi ile ilgili bilimsel katkılar sağlamak, hem de hiçbir yan etkisi olmayan Silibinin maddesinin DN üzerindeki etkisini göstermek için, wistar albino sıçanlar kullanarak STZ ile diyabet modeli oluşturduk. Sonrasında

Silibinin ile 28 günlük bir tedavi programı uyguladık. Sağ böbrek dokusunda HIF 1 α ve TLR-2 genlerinin ekspresyon düzeylerini RT-PCR metodu ile analiz edip, diğer böbreği de histokimyasal olarak inceledik.

Xu, Chen ve ark. artan VEGF düzeylerinin; kapiller bazal membranda ayrışmaya,

glomerüler filtrasyon hızında artışa, proteinüriye, glomerüllere makrofaj ve mononükleer hücre göçüne ve ekstraselüler matriks birikimine neden olarak DN'de görülen glomerüloskleroza neden olabildiğini bildirmişlerdir (16). Chen, Okahara ve ark. farelerle yaptıkları bir çalışmada; artan GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) sinyalizasyonunun, HIF 1 α yolağı aracılığıyla adipoz inflamasyonunu indüklediği ve insülin duyarlılığını bozduğu gözlenmiştir (17). Xu, Chen ve ark., Tang, Yi ve ark. Yaptıkları çalışmalarda HIF-1 α düzeylerinin diyabetik nefropatide upregüle olduğunu bildirmişlerdir (18, 19). Çalışmamızda HIF-1 α mRNA düzeylerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında diyabetik grupta literatür verilerinin aksine anlamlı bir upregülasyon görülemedi. Çalışmamızda STZ ile diyabet indüklendikten sonra 28 günlük bir sürede değerlendirmeler yapılmıştır. Bu süre farklı çalışmalarda daha uzun veya daha kısa olarak tespit edilmiş, çalışma planı yapılırken diyabete bağlı komplikasyonlar nedeni ile hayvan kaybı göz önünde bulundurularak optimum bir süre belirlenmeye çalışılmıştır. Bu anlamda HIF-1 α düzeylerinde artışın olmaması ilk olarak deney süresinin kısa olması ve diyabetik nefropati sonucunda ortaya çıkacak genetik düzenlemelerin oluşumu için yeterli süre sağlanamaması ile ilişkilendirilebilir. Ancak histolojik veriler diyabet modeli oluşumunun ardından 28 günlük sürede diyabetik nefropatinin geliştiğini ve sürenin böbreklerde patoloji oluşumu için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle HIF 1 α düzeyleri ya literatürdeki verilerin aksine diyabetik nefropatide anlamlı şekilde yükselmektedir ya da bu yükselme patolojinin daha geç dönemlerinde gerçekleşmektedir. Bu durum da diyabetik nefropatide hipoksik koşulların oluşumu için daha fazla zamana ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir. Toll benzeri reseptörler (TLR),

patojenle ilişkili immün yanıtta önemli bir rol oynayan moleküler reseptörlerdir. Aktivasyonları sitokin/ke-mokinlerin üretimi ile sonuçlanan inflamatuvar cevabın başlatıldığı sinyal kaskadını aktifleştirmektedir. Rajamani ve Jialal 2014 yaptıkları çalışmada; Tip 1 ve tip 2 DM'de TLR-2 ve 4'ün arttığını, TLR-2 ve TLR-4'teki genetik eksikliğin diyabetik nefropatide iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir (20). Sawa, Takata ve ark. diyabetik fare glomerülüsü ve renal korteksinde TLR-2 mRNA ekspresyonlarını ölçüp, diyabetik olmayan sıçanlara göre oldukça yüksek olduğunu gözlenmişlerdir (21). Zikou, Tellis ve ark. diyaliz olmayan kronik böbrek patogenezi hastalarında proinflamatuvar durumu göstermek için bir çalışma yapmış, diyaliz olmayan kronik böbrek patogenezi hastalarda TLR-2 ve TLR-4'ün ekspresyonları arttığı ve diyabeti etkilediği sonucuna varmışlardır (22). Çalışmamızda, TLR-2 geninin ekspresyonunun kontrol grubuna göre diyabet grubunda artması beklenirken birbirine yakın çıkmıştır. Bu durum diyabetik nefropati patogenezinde inflamasyonun 28 günden daha uzun sürede oluşabileceği fikrini vermektedir. Bu çalışmanın literatürde Silibinin ile HIF-1 α ve TLR-2 gen ifadesi değişikliklerini tanımlayan ilk çalışma olduğunu düşünüyoruz. Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular çeşitli etkenler nedeniyle sınırlıdır. HIF'ler, TLR'ler ve bunların sinyal iletim mekanizmasındaki moleküller önemli terapötik hedeflerdir ancak bununla ilgili olarak ileride yapılacak çalışmalarla; bu verilerin daha fazla hayvan modeli ve daha uzun sürelerde çalışılması, diyabet patogenezi sürecine katıldığı bildirilen bütün genlerin değil genomdaki bütün ifadelerinin araştırılması, yapılan gen ifadesi çalışmalarının eş zamanlı protein analiz çalışmalarıyla desteklenmesi, ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.



Resim 1: Histological sections of kidney tissues. (a) Kontrol grubu, korteksten görünüm. Ok normal yapıdaki bir glomerulusu gösteriyor. Kesitte her hangi bir kanama odağı veya inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülüyor. Tüm tübüler yapılar doğal görünümde. Hidropik dejenerasyon veya tübüler dilatasyon yok. (b) Diyabet grubu, korteksten görünüm Oklar glomerüler sklerozisi gösteriyor yıldız tübüler dilatasyonu işaret ediyor.ok uçları ise kanama odaklarını göstermekte. Kortekste yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonları görülüyor. (c) 100 mg/kg silibinin ile tedavi edilen diyabetik grup, korteksten görünüm. Diyabetik gruptakine benzer bulgular görülüyor. Kalın ok glomerüler sklerozu, ince ok inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, yıldız tübüler dilatasyonu, ve ok ucu hidropik dejenerasyonu gösteriyor. (d) 200 mg/kg silibinin ile tedavi edilen diyabetik grup, korteksten görünüm. Diyabetik gruptakine benzer bulgular görülüyor. Ok glomerüler sklerozisi, ok ucu hidropik dejenerasyonu, yıldız tübüler dilatasyonu işaret ediyor. Ayrıca yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonları görülüyor. (e) 100 mg/kg silibinin grubu, korteksten görünüm. Kontrol grubu ile benzer bulgular görülüyor. Tüm yapılar doğal görünümde. Ok normal bir glomerül yapısını gösteriyor. (f) 200 mg/kg silibinin grubu, korteksten görünüm. Kontrol grubu ile benzer bulgular görülüyor. Tüm yapılar doğal görünümde.

- ❖ Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4397D115 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Jorgens, V. (2006). Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. *HORMONES-ATHENS-*, 5(4), 310.
2. Zimmet, P. Z., Magliano, D. J., Herman, W. H., & Shaw, J. E. (2014). Diabetes: a 21st century challenge. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2(1), 56-64.
3. Lu, J., Jaafer, R., Bonnavion, R., Bertolino, P., & Zhang, C. X. (2014). Transdifferentiation of pancreatic α -cells into insulin-secreting cells: From experimental models to underlying mechanisms. *World journal of diabetes*, 5(6), 847.
4. Lin, H. P., Chan, T. M., Fu, R. H., Chu, C. P., Chiu, S. C., Tseng, Y. H., ... & Chen, H. S. (2015). Applicability of adipose-derived stem cells in Type 1 diabetes mellitus. *Cell transplantation*, 24(3), 521-532.
5. Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, 42(12), 698-702.
6. Chowdhury, T. A., Shaho, S., & Moolla, A. (2014). Complications of diabetes: progress, but significant challenges ahead. *Annals of translational medicine*, 2(12).
7. Hu, C., Sun, L., Xiao, L., Han, Y., Fu, X., Xiong, X., ... & Kanwar, Y. S. (2015). Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy. *Current medicinal chemistry*, 22(24), 2858-2870.
8. Martínez-Castelao, A., Navarro-González, J. F., Górriz, J. L., & de Alvaro, F. (2015). The concept and the epidemiology of diabetic nephropathy have changed in recent years. *Journal of clinical medicine*, 4(6), 1207-1216.
9. Ullah, F., Afridi, A. K., Rahim, F., Ashfaq, M., Khan, S., Shabbier, G., & ur Rahman, S. (2015). Knowledge of diabetic complications in patients with diabetes mellitus. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 27(2), 360-363.
10. López-Revuelta, K., Abreu, A. A. M., Gerrero-Márquez, C., Stanescu, R. I., Marín, M. I. M., & Fernández, E. P. (2015). Diabetic Nephropathy without Diabetes. *Journal of clinical medicine*, 4(7), 1403-1427.
11. Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialal, I. (2010). Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care*, 33(4), 861-868.
12. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*, 80(2), 51-60.
13. Takiyama, Y., & Haneda, M. (2014). Hypoxia in diabetic kidneys. *BioMed research international*, 2014.
14. Křen, V., & Walterova, D. (2005). Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomedical Papers*, 149(1), 29-41.
15. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
16. Xu, X., Chen, P., Zheng, Q., Wang, Y., & Chen, W. (2011). Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1 α and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice*, 93(1), 63-69.
17. Chen, S., Okahara, F., Osaki, N., & Shimotoyodome, A. (2015). Increased GIP signaling induces adipose inflammation via a HIF-1 α -dependent pathway and impairs insulin sensitivity in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(5), E414-E425.
18. Girgis, C. M., Cheng, K., Scott, C. H., & Gunton, J. E. (2012). Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8), 372-380.
19. Tang, S. C., Yiu, W. H., Lin, M., & Lai, K. N. (2015). Diabetic nephropathy and proximal tubular damage. *Journal of Renal Nutrition*, 25(2), 230-233.
20. Rajamani, U., & Jialal, I. (2014). Hyperglycemia induces Toll-like receptor-2 and-4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *Journal of diabetes research*, 2014.
21. Sawa, Y., Takata, S., Hatakeyama, Y., Ishikawa, H., & Tsuruga, E. (2014). Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *PLoS one*, 9(5), e97165.
22. Zikou, X., Tellis, C. C., Rousouli, K., Dounousi, E., Siamopoulos, K. C., & Tselepis, A. D. (2015). Differential membrane expression of toll-like receptors and intracellular cytokine induction in peripheral blood monocytes of patients with chronic kidney disease and diabetic nephropathy. *Nephron Clinical Practice*, 128(3-4), 399-406.