



Mehmet YILMAZ^{1, a}
Mesut AKSAKAL^{2, b}
Mehmet GÜVENÇ^{3, c}
Gözde ARKALI^{2, d}

¹ Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Yoğun Bakım Ünitesi,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Mustafa Kemal
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Hatay, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-9953-0401

^b ORCID: 0000-0002-6230-2413

^c ORCID: 0000-0002-9716-0697

^d ORCID: 0000-0002-0850-7557

Geliş Tarihi : 11.11.2019
Kabul Tarihi : 21.01.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Mesut AKSAKAL
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

maksakal@firat.edu.tr

Diyabet Oluşturulan Ratların Böbrek Dokusunda Oksidatif Stres ve Apoptozis Üzerine Perilil Alkolün Koruyucu Etkileri

Bu çalışmada diyabet oluşturulan ratların böbrek dokusunda oksidatif stres ve apoptozis üzerine perilil alkolün etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 40 adet rat eşit olarak rastgele 4 gruba ayrılmıştır. 1. Grup (kontrol), 2. Grup (Diyabet; STZ 50 mg/kg i.p, tek doz), 3. Grup (Perilil Alkol; Perilil Alkol 50 mg/kg/gün p.o, 7 gün), 4. Grup (Diyabet+Perilil Alkol; STZ 50 mg/kg i.p, tek doz+Perilil Alkol 50 mg/kg/gün, p.o 7 gün). Çalışma sonunda böbrek dokusu örneklerinde bazı biyokimyasal parametreler malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve apoptotik indeks markerları olan Bax ve Bcl-2 seviyeleri Western blot analizleri ile ölçülmüştür. Çalışma sonucunda diyabet oluşturulan grupta MDA seviyesi kontrol grubuna göre artmış (P<0.01); GSH seviyesi, GSH-Px ve CAT aktiviteleri ise azalmıştır (P<0.05). Diyabet grubuyla kıyaslandığında, Diyabet+Perilil Alkol grubunda MDA düzeyi azalmış (P<0.01); GSH, GSH-Px ve CAT aktiviteleri ise yükselmiştir (P<0.05). Bax protein düzeyleri Diyabet grubunda kontrol grubuna göre artış göstermiş; fakat Diyabet+Perilil Alkol grubunda azalmıştır (P<0.05). Bcl-2 seviyesi ise Diyabet+Perilil Alkol grubunda artış göstermiştir (P<0.05). Bax/Bcl-2 oranı ise Diyabet grubunda artmış olmasına rağmen (P<0.05), Diyabet+Perilil Alkol grubunda azalmıştır.

Sonuç olarak, perilil alkolün diyabetin erken döneminde oluşan oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etkinliği artırdığı, bununla birlikte apoptotik indeks göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranını azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, perilil alkol, apoptozis, oksidatif stres, böbrek

Protective Effects of Perilyl Alcohol on Oxidative Stress and Apoptosis in Kidney Tissues of Diabetic Rats

The aim of this study was to investigate the effects of perilyl alcohol on renal tissue oxidative stress and apoptosis in diabetic rats. For this purpose, 40 rats were divided into 4 groups with 10 rats per group. The experimental groups were Group 1 (control), Group 2 (Diabetes; STZ 50 mg/kg ip, Single Dose), Group 3 (Perilyl Alcohol; Perilyl Alcohol 50 mg/kg po, 7 days), and Group 4 (Diabetes+Perilyl Alcohol; STZ 50 mg/kg ip, Single Dose+Perilyl Alcohol 50 mg/kg po 7 days). Biochemical parameters malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH), Glutathione Peroxidase (GSH-Px), Catalase (CAT) and Bax and Bcl-2 levels were measured at the end of the study. Results showed that MDA level increased in diabetic group compared to control group (P<0.01); GSH, GSH-Px and CAT levels decreased (P<0.05). In the diabetes + perilyl alcohol group; Compared with the diabetes group, MDA level was decreased (P<0.01); GSH, GSH-Px and CAT levels increased (P<0.05). As a result of Western blot analysis, Bax protein levels increased in Diabetes group; but decreased in the Diabetes+Perilyl Alcohol group (P<0.05). Bcl-2 level increased in Diabetes+Perilyl Alcohol group (P<0.05). Although Bax/Bcl-2 ratio increased in Diabetes group (P<0.05), it decreased in Diabetes+Perilyl Alcohol group.

As a result, it was found that perilyl alcohol decreased oxidative stress and increased antioxidant activity in early stage of diabetes, but also decreased Bax / Bcl-2 ratio which is an indicator of apoptotic index.

Key Words: Diabetes, perilyl alcohol, apoptosis, oxidative stress, kidney

Giriş

Diyabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu yetersizliği, insülin etki mekanizmasındaki bozukluklar sonucu oluşan hiperglisemi ile karakterize pek çok sistemi etkileyen ciddi bir metabolik hastalıktır (1).

Yapılan araştırmalar, hipergliseminin reaktif oksijen radikalleri (ROS) arttırması sonucu oluşan oksidatif stresin, DM ye bağlı komplikasyonların gelişimine neden olduğunu göstermiştir (2). Hiperglisemi, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının ROS üretimini arttırması sonucu oksidatif stres artışına neden olur (3-7).

Böbrek dokusunda oksidatif stresin artması, böbrek dokusunda hasara ve böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olmakta ve bu durum böbrek hücreleri apoptozisi ile ilişkilendirilmektedir (8). Apoptozis, belli genler tarafından düzenlenen ve programlanmış hücre ölümü şeklindedir. Bcl-2 geni bir apoptozis inhibitördür ve Bcl-2'nin endojen bir antagonisti olan Bax geni ise apoptozis promotörüdür. Bax'ın Bcl-2'ye oranı (Bax / Bcl-2) ise, apoptotik bir uyarının ardından hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü belirleyen bir gösterge olarak kabul edilir (9).

Yuichi Kikuch ve ark. (10)'nın yapmış olduğu çalışmada, diabetes mellitusun erken evresinde yüksek düzeyde glikozun proksimal tübüllerde apoptotik değişiklikleri indüklediği, ancak glomerüllerde ve distal tübüllerde apoptik değişikliklere neden olmadığı bildirilmiştir. Diyabetik nefropatinin ilerlemesinin bir kısmına apoptozisin aracılık ettiği ve diyabetin erken evresinde kan glukoz seviyesini kontrol etmenin hem proksimal tübüllerdeki apoptotik hücre ölümüne hem de diyabetik nefropatinin ilerlemesine karşı koruma sağlayabileceği ifade edilmiştir.

Monoterpenler; kokulu karışımlar olan ve bitkilerden elde edilen uçucu yağların başlıca bileşenleri olup; narenciye, kiraz, nane ve otların uçucu yağlarında bulunurlar. Besleyici özellikleri olmamalarına rağmen yiyecek ve içeceklerde tat katkı maddeleri olarak kullanılırlar (11, 12). Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, monoterpenlerin antikarsinojenik, antioksidan, kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (13). Bu nedenle monoterpenler, nontoksik, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilmekte ve yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak düşünülmektedir (14).

Bir monoterpen olan perillil alkolün (P.A) antioksidan ve antiinflamatuvar potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (15, 16). Yapılan bir çalışmada (17), P.A'nın dopaminerjik nöronların modülasyonu ile ilişkili antidemans etkileri de rapor edilmiştir. Ayrıca in vitro çalışmalar (18) sonucunda, nöroblastomaların ve lösemilerin tedavisinde de etkisinin olduğu ifade edilmektedir. P.A'nın apoptotik süreçte yer alan çeşitli proteinlerin düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (19, 20). Perillil alkol, normal hücreleri etkilemeksizin kanser hücrelerinde aktif olarak apoptozu uyarmakta ve tümör hücrelerini etkilemektedir (21).

Oksidatif stres ve apoptosis, DM'nin sebep olduğu komplikasyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Literatür araştırmaları sonucunda, P.A'nın diyabetes mellitusa karşı koruyucu etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada diyabetin erken döneminde böbrek dokusunda oluşan oksidatif stres ve apoptozis üzerine P.A'nın koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın "05.10.2016 tarihli 163 karar nolu izni ile yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları yetiştirme ünitesinden temin edilen 40 adet 2 aylık 250-300 gr ağırlığında erkek Wistar-Albino ırkı rat kullanıldı ve araştırmanın deneysel kısmı Fırat Üniversitesi Hayvan Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütüldü.

Ratlar standart şartlarda (25±2 derece sabit ısı, %60-65 düzeyinde nem ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık) ve standart rat yemi ile ad-libitum olarak beslendi. Ratlar 1 hafta içinde ortama adapte olduktan sonra uygulamalara başlandı. Ratlar eşit şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

(I) Kontrol Grubu (n: 10); Bu gruptaki ratlara serum fizyolojik 7 gün boyunca standart hacimde oral (gavaj) uygulandı.

(II) Perillil Alkol (P.A) Grubu (n: 10); 7 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral (gavaj) olarak P.A uygulandı

(III) Diyabet Grubu (D.M) (n: 10); tek doz streptozotosin (50mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı ve 3 gün sonra kan glikoz seviyesi 270 mg/dL olan ratlar diyabetli kabul edildi.

(IV) Diyabet + Perillil Alkol (D.M+P.A) Grubu (n: 10); tek doz streptozotosin (50 mg/kg; i.p.) uygulandıktan 72 saat sonra kan glukoz seviyesi 270 mg/dl olan ratlara 7 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral (gavaj) PA uygulandı.

Deneysel süreç toplamda 10 gün sürdü. Çalışmanın sonunda son uygulamadan 24 saat sonra ratlar anestezisi altında sakrifiye edilerek böbrek dokuları alındı ve fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra her bir doku örneği alüminyum folyoya sarılıp polietilen poşetlere konularak -20 °C de saklandı.

Oksidatif stres parametre analizleri için, doku örnekleri 1/10 oranında Tris tampon (pH 7.4) ile sulandırılarak homojenizatörde homojenize edildi. Dokuda total protein tayini Lowry metodu (22) kullanılarak yapıldı. Dokuda üretilen malondialdehit (MDA) miktarı lipid peroksidasyon (LPO) seviyesinin göstergesi olarak kullanılmıştır. MDA düzeyi Placer ve ark. (23)'ün tanımladığı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. MDA'nın tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu pembe renkli kompleks 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek, MDA seviyesi nmol/g protein olarak ifade edildi. Doku glutatyon (GSH) düzeyi Sedlak ve Lindsay (24)'ün tanımladığı yöntemle göre belirlendi. 5,5-ditiyör-bis [2-nitrobenzoik asit] sulfidril gruplarıyla reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli kompleksin renk yoğunluğu, ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğundan, örnekler 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve GSH düzeyi nmol/g olarak ifade edildi. Dokuda katalaz (CAT) aktivitesi Goth (25)'ün tanımladığı yöntemle göre belirlendi. Doku, hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren substrat ile inkübe edildiğinde, H₂O₂ katalaz aktivitesi ile H₂O ve O₂'ye parçalanır. Ortama ilave edilen amonyum molibdat H₂O₂ ile birleşerek reaksiyonu sonlandırır. Bu süre içerisinde meydana gelen renk değişimi 405 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülerek, katalaz enzim aktivitesi kU/g protein olarak ifade edildi. Dokuda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Lawrence ve ark. (26)'nın tanımladığı yöntemle göre belirlendi. Örneklerin DTNB solüsyonu ile oluşturduğu sarı renk kompleksinin spektrofotometrede 412 nm'de okunarak, GSH-Px enzim aktivite düzeyi, IU/g protein olarak ifade edildi.

Western blot analizlerinde ise; dokular soğuk RIPA lizis buffer ile homojenize edildikten sonra, 14000 rpm de +4 derece santifürj edildi ve süpernatantı ayrıldı. Örneklerdeki total protein miktarları Smith ve ark. (27) tanımladığı yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Örnekler her kuyucukta eşit miktarlarda

protein (50 µg) olacak şekilde %12'lik poliakrilamid jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü (28) ve SDS-PAGE'in ardından spesifik proteinler western blotlama tekniği ile poliviniliden diflorit (PVDF) membrana aktarıldı (29). Nonspesifik bağlanmaları engellemek için PVDF membranlar, %5'lik süt tozu ile bloklandı ve TBS-T ile 5'er dk 3 kez yıkandı. Membranlar uygun primer (Bcl-2, Bax ve Betaaktin) antikorlarıyla bir gece inkübasyona bırakıldı ve 5'er dk 3 kez TBS-T ile yıkandı. Sekonder antikorlarda 1 saat inkübasyona bırakılan membranlar tekrar 5'er dk 3 kez TBS-T ile yıkandıktan sonra kemilüminesan konjugat (ECL) kullanılarak elde edilen bantlar kemilüminesans görüntüleme sisteminde (Biorad ChemiDoc™ XRS+) görüntüledi (30, 31). Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları uygun analiz sistemi (Biorad Image Lab™ Software version 5.2.1, Biorad Laboratories, Inc, USA) ile ölçüldü. Protein ekspresyon düzeyleri internal kontrol olarak kullanılan beta aktine göre normalize edildi.

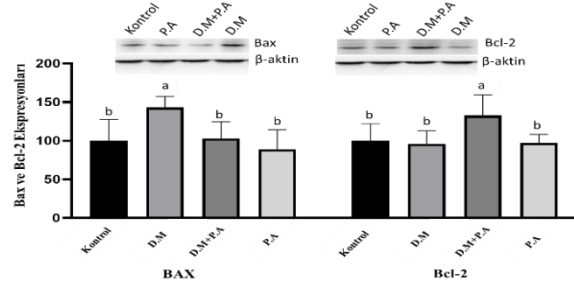
İstatistiksel Analiz: Yapılan analizler sonucu elde edilen tüm verilerde gruplara ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk analizi yapıldı tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde ise SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics 22) kullanıldı (32).

Bulgular

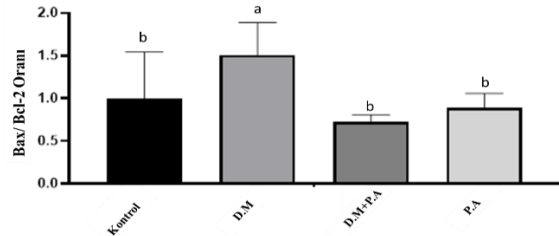
Biyokimyasal analizlere ait veriler Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde; diyabet grubu MDA düzeyi kontrol grubu MDA düzeyinden yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Bununla birlikte, D.M+P.A grubundaki MDA düzeyleri, diyabet grubundakiler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmış bulunmuştur ($P<0.01$). Diyabet grubu GSH düzeyi, kontrol grubundakine göre önemli ölçüde azalmış bulunmuştur ($P<0.05$). Fakat D.M+P.A grubundaki GSH düzeyleri, D.M grubundaki ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0.05$). Diyabet grubu GSH-Px ve CAT aktiviteleri, kontrol grubundakine göre önemli ölçüde azalmış bulunmuştur ($P<0.05$). Bununla birlikte; D.M+P.A grubundaki GSH-Px ve CAT aktiviteleri diyabet grubundakiler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde

arttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). Sadece P.A uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre MDA ve GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri yönünden bir farklılık tespit edilememiştir.

Gruplara ait Western blot analizi sonucunda elde edilen Bax ve Bcl-2 bantları ve bu bantların yoğunlukları hesaplanarak elde edilen veriler Şekil 1'de, Bax/Bcl-2 oranı ise Şekil 2'de yer almaktadır. D.M grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında böbrek dokusu Bax protein ekspresyonu artmış ($P<0.05$) bulunmuştur. D.M+P.A grubundaki Bax protein düzeyinin diyabet grubundakine kıyasla anlamlı şekilde azaldığı ($P<0.05$) tespit edilmiştir. D.M grubu ile kıyaslandığında D.M+P.A grubundaki Bcl-2 protein düzeyinin arttığı ($P<0.01$), Bax/Bcl-2 oranının da azalma gösterdiği ($P<0.01$) tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında D.M grubundaki Bax/Bcl-2 oranının arttığı ($P<0.05$) görülmüştür. D.M grubu kıyaslandığında D.M+P.A grubundaki Bax/Bcl-2 oranının azaldığı ($P<0.01$) bulunmuştur.



Şekil 1. Diyabetik Rat Böbrek Dokusunda Bax ve Bcl 2 Ekspresyonları (Kontrolün Yüzdesi) (Veriler Ortalama, SH şeklinde verilmiştir. $P<0.05$)



Şekil 2. Böbrek Dokusu Bax/Bcl-2 Oranı (Kontrolün Katları)(Veriler Ortalama,SH şeklinde verilmiştir. $P<0.01$)

Tablo 1. Diyabetik rat böbrek dokusunda bazı oksidan ve antioksidan parametreler

Grup	MDA (nmol/g prot)	GSH (nmol/g prot)	GSH.Px (IU/g prot)	CAT (ku/g prot)
Kontrol	2.21±0.16 ^b	1.28±0.13 ^a	24.00±1.15 ^a	66.81±3.32 ^a
Diyabet (D.M)	3.70±0.29 ^a	0.91±0.03 ^b	18.65±1.27 ^b	52.69±2.34 ^b
Diyabet+Perilil Alkol (D.M+P.A)	2.73±0.18 ^b	1.13±0.07 ^{ab}	24.11±0.99 ^a	64.91±2.10 ^a
Perilil Alkol (P.A)	2.13±0.14 ^b	1.04±0.04 ^{ab}	25.28±1.36 ^a	65.85±3.40 ^a
Önemlilik	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

^{a, b}: Aynı sütun içerisinde değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir. (Veriler Ort ± SH şeklinde verilmiştir)

Tartışma

Diyabetes mellitus, pankreas beta hücrelerinin fonksiyon kaybı sonucu oluşan hiperglisemi ile karakterize; karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasının bozukluğu ile seyreden metabolik bir hastalıktır (33). Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, bazı monoterpenlerin antikarsinojenik, antioksidan, kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (13). Bu çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda oksidan/antioksidan parametreler ve apoptotik markerlar araştırılarak perill alkolün koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmalarda deneysel diyabet modeli oluşturmak amacıyla birçok yöntem (cerrahi, farmakolojik, genetik) deney hayvanlarında uygulanmaktadır. Bunlardan en yaygını ise Streptozotosin (STZ) uygulamasıdır. Streptozotosinin pankreasın β hücrelerinde hasara neden olarak hiperglisemi oluşturmaktadır (34). Motawi ve ark. (35) streptozotosin ile indüklenen diyabetin hiperglisemiye neden olduğunu ve böbrek fonksiyonlarını bozduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada benzer şekilde tek doz STZ (50 mg/kg; ip) uygulandıktan 3 gün sonra kan glikoz değerleri 270 mg/dL üzerine çıktığı tespit edilmiştir.

Hiperglisemi, dokularda ROS üretimini artırarak oksidatif strese neden olmaktadır. Diyabette, oksidatif stres ROS'un artmasından kaynaklanabileceği gibi CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasından da kaynaklanabilmektedir (36). Hücrede lipid peroksidasyonun artışı sonucu MDA düzeyinde bir artış olmaktadır. Hücrede lipid peroksidasyonunun artması, membran permeabilitesinde bozukluklara ve hasara neden olarak birçok patolojik olgunun oluşmasına zemin hazırlamaktadır (37). Bu çalışmada diyabet grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında, böbrek dokusu MDA düzeyinde bir artış görülmüş olup, Obrosova ve ark. (38) ve Kataya ve ark. (39)'nın yaptığı çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir. Yixiao ve ark. (40) hipoksi-reoksijenasyon hasarı oluşturulmuş böbrek hücrelerinde in vitro olarak yaptıkları çalışmalarında PA uygulamasının MDA düzeyini düşürerek oksidatif hasarı azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmayla, Perill Alkolün böbrek hipoksi-reoksijenasyon tedavisinde potansiyel bir terapötik madde olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır (40). Bu çalışmada ise D.M+P.A grubunda D.M grubuna göre MDA düzeyinin önemli ölçüde azaldığı ($P<0.01$) ve bunun Yixiao Xua ve ark. (40)'nın yaptıkları çalışma ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Hiperglisemi dokularda oksidatif hasara yol açmaktadır. Diyabetli canlılarda artan glikozun otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının arttığı ve bunun sonucu olarak katalaz aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir (41). Bu çalışmada D.M grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında katalaz aktivitesinde önemli bir azalış ($P<0.05$) tespit edilmiş olup daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (42). Khan ve ark. (16) hepatik oksidatif stres oluşturdukları ratlarda, koruyucu olarak farklı

dozlarda PA uygulamışlar ve bunun katalaz aktivitesinde azalmayı engellediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada diyabet grubunda kontrol grubuna göre azalma gösteren CAT aktivitesinin D.M+P.A grubunda ise kontrol grubuyla aynı seviyelerde olduğu görülmüş olup bu durumun Khan ve ark. (16) yaptığı çalışmayla benzediği görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada deneysel diyabet oluşturulan ratlarda indirgenmiş GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (42, 43). Bu çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabet grubundaki GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüş olup literatürde yer alan bilgilerle benzerlik göstermektedir. Diyabet grubuyla karşılaştırıldığında ise D.M+P.A grubundaki GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin diyabet grubundaki gibi önemli şekilde azalmadığı görülmektedir. Jahangir ve ark. (45) ferrik nitrotriasetat (Fe-NTA) ile nefrotoksite oluşturdukları ratlarda farklı dozlarda perill alkol uygulamasının GSH düzeyinde azalmayı önlediğini belirtmektedirler. Bu çalışmada D.M+P.A grubunda GSH düzeylerinin azalmamış olması Jahangir ve ark. (45) yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir. Khan ve ark. (16) hepatik oksidatif stres oluşturdukları ratlarda, koruyucu olarak farklı dozlarda P.A uygulamasının GSH-Px aktivitesindeki azalığı engellediğini göstermekte olup; bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Hücrelerde apoptosisi indükleyen birçok uyarıcı vardır. Hücrelerin bu uyarılara duyarlılığı proapoptotik ve antiapoptik proteinlerin ekspresyonu ve uyarının derecesine göre değişiklik gösterir. Bazı durumlarda oksidatif stres gibi hücresel stresi takiben açığa çıkan intrinsik faktörler apoptosisi başlatır. İntrinsik sinyaller sonucu başlayan apoptosisi genel olarak mitokondrideki sitokrom c ve kardiyoipin'in etkileşimi sonucu gerçekleşir. Apoptozisin düzenlenmesinde yer alan Bcl-2 ailesinin antiapoptik üyeleri mitokondri membranının dış kısmında yer alırlar ve hücrenin yaşamını devam ettirmesini sağlarlar. Bax gibi Bcl-2 ailesinin proapoptik üyeleri ise mitokondri membranı ile direkt ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler (10). Deneysel böbrek hasarı oluşturulmuş yuratlarda Bax protein ekspresyonunun arttığı, buna karşın Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir (45, 46). Diyabetes mellitusun en önemli komplikasyonlarından biri olan diyabetik nefropatide de böbrek dokusunda Bax protein ekspresyon düzeyinin arttığı buna karşın Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (47, 48). Yapılan başka çalışmalarda ise, kan şekeri seviyesindeki düzensizliklerin glomerüler mezenseyal hücreleri (49), vasküler endotel hücreleri (50) ve insülin salgılayan hücre dizilerinde (INS-1 hücreleri) (51) apoptozu tetikleyen etkileri olduğunu gösterilmiştir. diabetes mellitusun erken evresinde Diyabetik nefropatiye sebep olacak apoptotik değişiklikler konusunda yapılan çalışmalar, oldukça kısıtlıdır. Kikuch ve ark. (10)'nın ratlarda yaptıkları bir çalışmada, diyabetin erken döneminde, apoptozisle bağlantılı Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, nefron segmentlerinde histolojik olarak araştırılmıştır. Kontrol grubundakilerle kıyaslandığında Diyabetik ratların,

proksimal tübüllerde ve henle kulpunun kalın kolundaki Bax protein ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada diyabetik ratlardaki Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin proksimal tübüllerde azaldığını, henle kulpunun kalın kolunda ise de arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda diyabetik sıçanların proksimal tübüllerindeki Bcl-2 protein ekspresyonunun Bax protein ekspresyonuna oranı (Bcl-2/Bax) önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Aksine kontrol grubundakilerle kıyaslandığında diyabetik sıçanlardaki Bcl-2/Bax protein ekspresyonu oranının, henle kulpunun kalın kolunda belirgin şekilde yükseldiğini tespit etmişlerdir. Kikuch ve ark. (10)'nın yaptıkları bu çalışmanın sonunda, diyabetin erken dönemlerindeki yüksek glukoz değerlerinin proksimal tübüllerde apoptotik değişikliklere neden olabileceği; ancak bu durumun glomeruller ve distal tubularda apoptik süreci etkilemeyeceği ifade etmektedir. Bu çalışmada böbrek dokusundaki Bax ile Bcl-2 protein sentez düzeyleri western blot tekniği ile ölçülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında diyabetik ratların böbrek dokusunda, Bax protein düzeyinin arttığı, Bcl-2 protein düzeyinin azaldığı ve Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranının ise

arttığı tespit edilmiş ve yukardaki çalışmayla (10) benzediği görülmüştür. Son zamanlarda Yixiao ve ark. (40)'nın in vitro olarak yaptıkları çalışmalarında, P.A uygulamasının hipoksi/reoksijenasyon hasarı oluşturulmuş böbrek tubül epitel hücrelerinde Bax protein ekspresyonunu azalttığı, Bcl-2 protein ekspresyon düzeyini ise arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada benzer şekilde diyabet grubunda Bax ekspresyon düzeyinin arttığı buna karşın Perilil alkol ile tedavi grubunda Bax ekspresyon düzeyi azalırken Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin arttığı görüldü. Ayrıca Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranının ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, diyabetik ratların böbrek dokusunda artan MDA ve Bax protein düzeylerinin doku hasarı ile ilişki olduğu; perilil alkolün antioksidan ve antiapoptotik etkileri sonucu böbrek dokusundaki oksidatif hasarı ve apoptozisi azaltarak diyabetin olumsuz etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir. Fakat perilil alkolün antioksidan ve apoptotik özelliklerinin daha iyi anlaşılması ve terapötik dozunun belirlenmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Vlad I, Popa AR. Epidemiology of diabetes mellitus: A current review. Rom J Diabetes Nutr Metab Dis 2012; 19: 433-440.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. Cardiovasc Diabetol 2005; 4: 5.
- Altan N, Ongun CÖ, Hasanoğlu E, et al. Effects of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. Diabetes Research and Clinical Practice 1994; 22: 95-98.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. Diabetes 1999; 48: 1-9.
- Altan N, Ongun CÖ, Elmali E, et al. Effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione and glutathione peroxidase activity in alloxan induced diabetic rat hepatocytes. General Pharmacology 1994; 25: 875-887.
- Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, et al. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. Biochemical Pharmacology 1993; 45: 539-542.
- Kiliç N, Malhatun E, Elmali E, et al. An investigation into the effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat muscle tissue. General Pharmacology 1988; 30: 399-401.
- Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. J Invest Med 1997; 45: 50-56.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74: 609-619.
- Kikuchi Y, Nonoguchi H, Machida K, et al. Regulation of The Apoptosis-related Genes, Bax and Bcl2, in the Early Stage of Diabetes Mellitus. Nephrology 2002; 7: 294-302.
- Gomes-Carneiro MR, Felzenszwalb I, Paumgarten FJR. Mutagenicity testing of (±)- camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (+/-)-menthol and terpineol with the salmonella/microsome assay. Mutation Research 1998; 416: 129-136.
- Carnesecchi S, Schneider Y, Ceraline J, et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298: 197.
- Gould MN. Cancer Chemoprevention and therapy by monoterpenes. Environ Health Perspect 1997; 105: 977-979.
- Loza Tavera H. Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. advances in experimental Medicine and Biology 1999; 464: 49-62.
- Jahangir T, Sultana S. Perillyl alcohol protects against Fe-NTA-induced nephrotoxicity and early tumor promotional events in rat experimental model. eCAM 2007; 4: 439-445.
- Khan AQ, Nafees S, Sultana S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in wistar rats by inhibiting oxidative stress, NF-κB activation and proinflammatory cytokine production. Toxicology 2011; 279: 108-114.
- Zhou W, Fukumoto S, Yokogoshi H. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. Nutr Neurosci 2009; 12: 57-64.
- Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, et al. Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Chemother Pharmacol 1998; 42: 111-117.
- Gomez Contreras PC, Hernandez Flores G, Ortiz Lazareno PC, et al. In vitro induction of apoptosis in U937 cells by perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: Increased BCL-2 and BAX protein expression. Chemotherapy 2006; 52: 308-315.

20. Bardon S, Foussard V, Fournel S, et al. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett* 2002;181:187-194.
21. Reddy BS, Wang CX, SamahaH, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res* 1997; 57: 420-425.
22. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
23. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
24. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 1968; 25: 192-205.
25. Goth LA. Simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-151.
26. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
27. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76: 4350-4354.
30. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification and Analysis. In: Green MR, Sambrook J. (Editors). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York 2012: 1599-1625.
31. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 2017; 27: 4-25.
32. Karagöz Y. *SPSS 22 Uygulamalı Biyoistatistik*. 2nd Edition, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2015.
33. Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması. Erdoğan G. (Editör). *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2005; 342-248.
34. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *Journal of Surgical Research* 1983; 35: 433-460.
35. Motawi TK, Ahmed SA , Hamed M, et al. Melatonin and/or rowatinex attenuate streptozotocin-induced diabetic renal injury in rats. *The Journal of Biomedical Research* 2019; 33: 113-121.
36. Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* 2001; 15: 203-210.
37. Asayama K, Miyao A, Dobashi K, et al. Concentration of lipid peroxide in serum lipoproteins of insulin dependent diabetic children. *Acta Paediatr Jpn* 1991; 33: 369-374.
38. Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, et al. Early oxidative stress in the diabetic kidney: Effect of DL- α -lipoic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 34: 186-195.
39. Kataya HA, Hamza AA. Red cabbage (*Brassica oleracea*) ameliorates diabetic nephropathy in rats. *eCAM* 2008; 5: 281-287.
40. Yixiao X, Wantie W, Keke Jin, et al. Perillyl alcohol protects human renal tubular epithelial cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibition of ROS, endoplasmic reticulum stress and activation of PI3K/Akt/eNOS pathway: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 95: 662-666.
41. Preet A, Gubta BL, Yadava PK, et al. Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioksidan status in diabetic rat. *lenses J Biosci* 2005; 30: 221-230.
42. Haluzik M, Nedvidkova J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin induced diabetes mellitus: Experimental and clinical implications. *Physiol Res* 2000; 49: 37-42.
43. Jibin S, Bo S, Xiaoqing S, et al. Alteration of oxidative stress and inflammatory cytokines induces apoptosis in diabetic nephropathy. *Molecular Medicine Reports* 2017; 16: 7715-7723.
44. Gao D, Qingwang L, Gao Z, et al. Antidiabetic effects of corni fructus extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J* 2012; 53: 691-700.
45. Jahangir T, Sultana S. Perillyl alcohol protects against Fe-NTA-induced nephrotoxicity and early tumor promotional events in rat experimental model. *eCAM* 2007; 4: 439-445.
46. Yuan G, Dai S, Yin Z, et al. Sub-chronic lead and cadmium co-induce apoptosis protein expression in liver and kidney of rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7: 2905-2914.
47. Marques C, Mega C, Gonçalves A, et al. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators of inflammation* 2014;1-15.
48. Park HS, Lim JH, Kim MY, et al. Resveratrol increases AdipoR1 and AdipoR2 expression in type 2 diabetic nephropathy. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14: 1-13.
49. Lu WN, Zheng FP, Lai DW, et al. Xuezhikang reduced renal cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats through regulation of Bcl-2 family. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 2016; 22: 611-618.
50. Sun J, Xu Y, Deng H, et al. Involvement of osteopontin upregulation on mesangial cells growth and collagen synthesis induced by intermittent high glucose. *J Cell Biochem* 2010; 109: 1210-1221.
51. He YT, Xing SS, Gao L, et al. Ginkgo biloba attenuates oxidative DNA damage of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose. *Die Pharm* 2014; 69: 203-207.
52. Zhang Z, Li J, Yang L, et al. The cytotoxic role of intermittent high glucose on apoptosis and cell viability in pancreatic beta cells. *J Diabetes Res* 2014; 1-9.