

# Diyabetin Böbreklerde Neden Olduğu Histolojik Değişiklikler Üzerine Aminoguanidinin İyileştirici Etkileri

## IMPROVING EFFECTS OF AMINO GUANIDINE ON THE HISTOLOGIC ALTERATIONS IN RAT KIDNEYS IN DIABETES

Dr. Nigar VARDI,<sup>a</sup> Dr. Mustafa IRAZ,<sup>b</sup> Mehmet GÜL,<sup>a</sup>  
Dr. Feral ÖZTÜRK,<sup>a</sup> Dr. Muharrem UÇAR,<sup>c</sup> Dr. Ali OTLU<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Histoloji Embriyoloji AD, <sup>b</sup>Farmakoloji AD, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, MALATYA  
<sup>c</sup>Erzurum Devlet Hastanesi, ERZURUM

### Özet

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

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada kullanılan Sprague-Dawley cinsi; 15 adet erişkin dişi sıçan: kontrol, diyabet (D) ve aminoguanidin ile tedavi edilen diyabet (DAG) gruplarına ayrıldı. Deneysel diyabet D ve DAG gruplarında tek doz STZ (45 mg/kg)'nin intraperitoneal uygulanması ile oluşturuldu. Diyabet oluşturulduktan sonra, DAG grubuna 8 hafta süreyle içme suyu içinde (1 gr/L) aminoguanidin verildi. Deneyin sonunda sıçanların kan-glikoz seviyeleri ölçüldü. Örnekler rutin doku takibinden sonra, parafine gömüldü. Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların ardından, kesitler ışık mikroskopta incelendi.

**Bulgular:** Diyabet grubundaki sıçanların, kontrol ve DAG grubuna göre kan-glikoz düzeyleri önemli derecede yükselirken, vücut ağırlıkları belirgin şekilde azaldı. Diyabete bağlı olarak gelişen temel histolojik değişiklikler glomerül ve tübül bazal membranları ile epitel hücrelerinde (glikojen birikimi, şişme ve vakuolizasyon) gözlemlendi. Uygulanan aminoguanidin tedavisiyle, bu bulguların önemli ölçüde azaldığı tespit edildi.

**Sonuç:** Kronik aminoguanidin uygulaması STZ ile sıçanlarda oluşturulan diyabetin neden olduğu böbrek hasarını azalttı. Bu yüzden aminoguanidinin diyabetik böbrek hasarının gelişimini önleyeceğini veya bulguları hafifleteceğini düşünmekteyiz. Yine de aminoguanidinin tedavi edicisini anlamak için daha ileri çalışmalar ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel Diabetes mellitus, aminoguanidin, böbrek, histoloji

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26:599-606

### Abstract

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

**Material and Methods:** Fifteen Sprague-Dawley adult female rats were divided into three groups: control, diabetic (D) and diabetic treatment with aminoguanidine (DAG) groups. Experimental diabetes was induced by a single intraperitoneal dose of STZ (45 mg/kg). In the DAG group, AG was added in the drinking water (1 gr/L) after administration of STZ. This was maintained until the end of the study (for 8 weeks). At the end of the experiment, blood glucose levels were determined and after the routine tissue follow-up process, kidneys were embedded in paraffin. Histochemical and immunohistochemical stains were applied and the specimens were examined with light microscope.

**Results:** After 8 weeks, the rats in diabetes group had significantly lower body weight and significantly higher blood glucose levels than the rats of control and DAG groups. The main histological changes resulting from diabetes were detected in glomerular and tübüler basal membrane and epithelial cells (glycogen accumulation, swelling and vacuolization). We observed the improving effects of aminoguanidine treatment on rat kidney.

**Conclusion:** In conclusion, chronic administration of aminoguanidine reduced renal injury in STZ- induced diabetic rats. Therefore, we believe that aminoguanidine may be used to prevent development of diabetic renal damage. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms of the improving effect of aminoguanidine on diabetic complications.

**Key Words:** Diabetes mellitus, experimental, pimagedine, kidney, histology

Geliş Tarihi/Received: 12.04.2006 Kabul Tarihi/Accepted: 11.07.2006

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Nigar VARDI  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji Embriyoloji AD, 44089, MALATYA  
nvardi@inonu.edu.tr

Copyright © 2006 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26

**D**iyabet, insülin yokluğu veya etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan hiperglisemiye bağlı olarak gelişmektedir.<sup>1</sup> Çeşitli deneysel ve klinik gözlemler hipergliseminin direkt ya da indirekt olarak serbest radikal oluşumunu

arttırdığı ve oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.<sup>2,3</sup> Ayrıca kanda yüksek seviyelere ulaşan glikoz proteinlerle birleşerek, kimyasal olarak geri dönüşebilen glikozilasyon ürünlerine dönüşür. Glikozun damar duvarlarında veya interstisyel dokularda kollajenle ve diğer uzun ömürlü proteinlerle oluşturduğu glikozilasyon bileşikler bir seri kimyasal reaksiyon sonrasında geri dönüşümü olmayan glikozilasyon son ürünlerine dönüşür.<sup>1,4</sup>

Artan oksidatif stres ve protein glikozilasyonu diyabetik nefropatinde içinde bulunduğu anjiyopati, retinopati ve nöropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır.<sup>2,3</sup>

Bir phenyl hidrazine bileşiği olan aminoguanidin (AG) inducible nitrik oksit sentezi (iNOS)'ni selektif olarak inhibe ederek NO üretimini azaltır. Ayrıca non-enzimatik glikozilasyon bölgelerine bağlanan diamin oksidazı inhibe eder ve reaktif karbonil parçalarını yakalayarak daha ileri glikozilasyon ürünlerinin oluşumunu önler.<sup>3,5</sup> Bunlara ek olarak yapılan bazı çalışmalarda AG'nin peroksinitrit gibi radikalleri süpürücü etkisi ile de antioksidan özellikleri olduğu bildirilmiştir.<sup>6</sup>

Bu çalışmada, STZ ile deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda böbrek dokusunda ortaya çıkan histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine AG'nin etkisinin histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi için planlanmıştır.

### Gereç ve Yöntemler

Çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilen Sprague Dawley cinsi, 15 adet erişkin dişi sıçan kullanıldı. Denekler rastgele her biri 5 sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı; kontrol, diyabet oluşturulup tedavi edilmeyenler (D) ve diyabet oluşturulup, AG ile tedavi edilenler (DAG). Tüm sıçanların deney öncesi kan şekerleri ölçüldü. Diyabet oluşturulacak D ve DAG grup sıçanlara 45 mg/kg tek doz STZ (Sigma, USA) pH: 4.5 olan sitrat tamponu içinde, intraperitoneal (i.p) yoldan uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik enjeksiyon edildi. D ve DAG gruba uygulanan STZ en-

jeksiyonundan 72 saat sonra alınan kanda (Elite Glukometre Bayer) el glukometresiyle kan şekerleri ölçüldü. Kan şekerleri 270 mg/dL ve üzerinde olanlar çalışmaya dahil edildiler. AG, sıçanlara çeşme suyu içerisinde (1 gr/L) verildi.<sup>7</sup> Sekiz haftalık deney süresinde; tüm hayvanlar standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler. Deney sonunda üretan (1.2-1.4 gr/kg) anestezisi altında sıçanların böbrekleri alınarak %10 nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonrasında parafine gömülen dokulardan alınan 5 µm'lik kesitlere; hematoksilen eozin (HE), periyodik asit Schiff + hematoksilen (PAS-H), toluidin mavisi ve anti-fibronektin boyama yöntemleri uygulanarak, ışık mikroskopunda incelendiler.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmelerde Windows uyumlu SPSS 13.0 paket programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Gruplararası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grup içindeki değişim testi ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile yapıldı.

## Bulgular

### Vücut Ağırlıkları ve Kan-Glikoz Değerleri

Sıçanların deneyin başlangıç ve sonundaki vücut ağırlıkları ile kan glikoz değerleri aritmetik ortalama ± standart hata olarak Tablo 1'de verildi.

İki aylık deney süresi sonunda; D grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarında azalma gözlenirken (-13.6), DAG (+13.8) ve kontrol grubundaki (+21.8) sıçanlar ağırlık kazandılar.

D grubunda STZ enjeksiyonundan deneyin sonuna kadar hiperglisemi izlendi. Diğer yandan DAG grubunda; D grubuna göre kan-glikoz değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma (p< 0.01) gözlemlendi.

### Histolojik Değerlendirme

Kontrol grubu:

Kontrol grubunun pankreaslarında Langerhans adacıkları oval ya da yuvarlak sınırları ile normal görünümündeydi (Resim 1).

**Tablo 1.** Sıçanların deneyin başlangıç ve sonundaki vücut ağırlıkları ile kan glikoz değerleri.

	Kontrol (n= 5)	D (n= 5)	DAG (n= 5)
Başlangıç vücut ağırlığı	183.40 ± 13.6	167.8 ± 15.38	157.40 ± 5.15
Final vücut ağırlığı (gr)	205.50 ± 14.37	154.20 ± 17.70	171.20 ± 51.0
Başlangıç kan-glikoz değeri (mg/dL)	125.8 ± 8.97	444.80 ± 39.50	386.60 ± 23.07
Final kan-glikoz değeri (mg/dL)	125.2 ± 8.67	493.2 ± 28.27 <sup>a</sup>	252.80 ± 50 <sup>b</sup>

STZ enjeksiyonunu takiben 3. gün başlangıç olarak alındı.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p< 0.01),

b: Diyabet grubuna göre anlamlı olarak farklı (p< 0.05).

Böbrek kesitlerinde; glomerüller, bowman mesafesi, proksimal ve distal tübüller normal histolojik yapısında gözlemlendi (Resim 2, 3 ve 4).

Anti-fibronektin immün boyama yöntemi ile proksimal ve distal tübüller ve glomerüllerin bazal membranlarında hafif pozitif bir boyanma izlendi (Resim 5).

#### Diyabet grubu:

Langerhans adacıklarının çapları küçülmüştü. Adacığın merkezinde yer alan hücrelerin bazıları şişmiş ve nükleusları irileşmişti (Resim 6).

Diyabet grubunda kortekste şeffaf görümlü tübüllerin yanında özellikle bazal yerleşim gösteren irili-ufaklı vakuollerle dolu tübüller dikkat çekiciydi (Resim 7, 8). Glomerül yapıları genişlemiş ve Bowman mesafesi daralmıştı (Resim 7).

Bazı glomerüllerin kapillerinin bazal membranları kalınlaşmış olarak izlendi. Tübül bazal membranlarının görünüşleri kontrollere benzerdi. Bazı tübüllerin lümeni pembe-kırmızı renkte boyanmış glikojenle doluydu ve fırça kenar yapıları yer yer bozulmuştu (Resim 9).

Toluidin mavisi boyama yöntemi ile bazı tübüllerin epitel hücrelerinin sitoplazmasında koyu mavi renkte boyanan ve farklı irilikte tanecikler dikkat çekti (Resim 10).

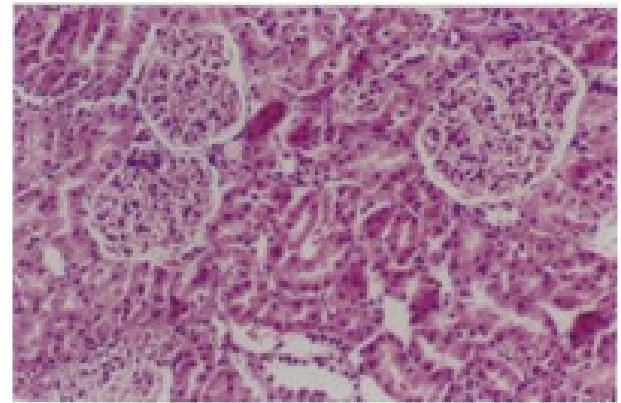
Anti-fibronektin immün boyama metodu ile tübül bazal membranındaki boyanma şiddetli pozitif olarak değerlendirildi (Resim 11).

#### DAG grubu:

Langerhans adacıklarının konturları düzensizdi ancak D grubuna göre hücre yapıları daha iyi korunmuştu (Resim 12).



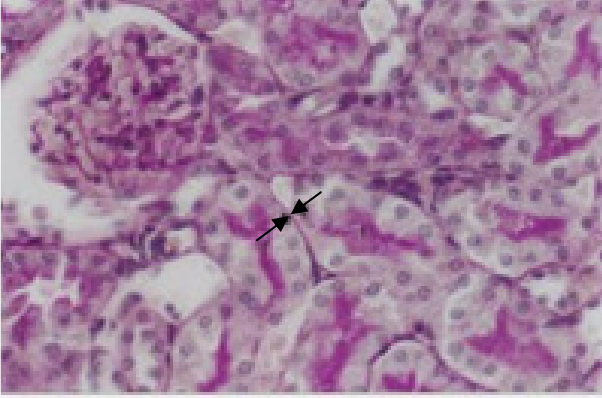
Resim 1. Kontrol grubunda, Langerhans adacığı. HE X 132.



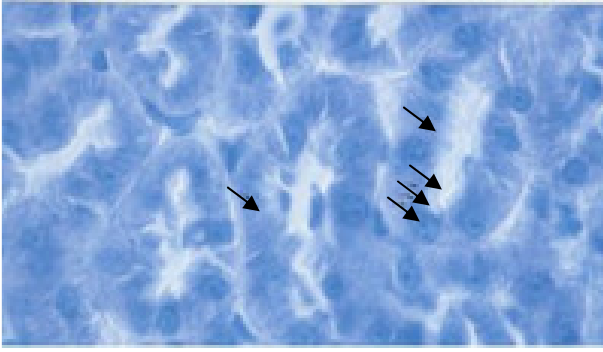
Resim 2. Kontrol grubunda, normal böbrek histolojisi. HE X 66.

HE boyama yöntemi ile böbrek kesitlerinde şeffaf tübül yapıları, D grubuna göre çok seyrekli. Glomerüllerin etrafındaki Bowman mesafesi belirgin olarak izlendi (Resim 13).

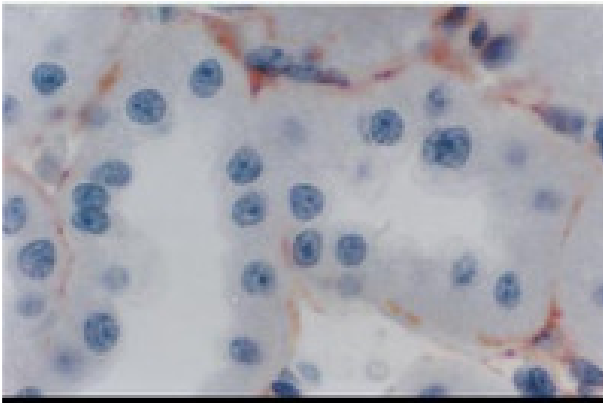
PAS-H boyama yönteminde, glomerül kapillerlerinin bazal membranlarında belirgin bir kalınlaşma izlenmedi. Tübüllerin sitoplazmalarında



**Resim 3.** Kontrol grubunda, bazal membran (oklar) ve fırça kenarın (f) görünümü. PAS-H X 132.



**Resim 4.** Kontrol grubunda, seyrek ve az yoğun izlenen granül benzeri yapılar (ok). Toluidin mavisi X 330.



**Resim 5.** Kontrol grubunda, anti-fibronektin immün boyaması ile tübül bazal membranı. X 330.

glikojen küçük granüller şeklindeydi ve proksimal tübüllerin çoğunda fırça kenar sağlam olarak izlendi (Resim 14).

Toluidin mavisi boyama yöntemi ile sitoplazmada mavi renkte boyanan tanecikler D grubuna göre çok seyrek dağılımlıydı (Resim 15).

Anti-fibronektin immün boyama yöntemi ile tübül bazal membranları orta derecede pozitif olarak boyandılar (Resim 16).

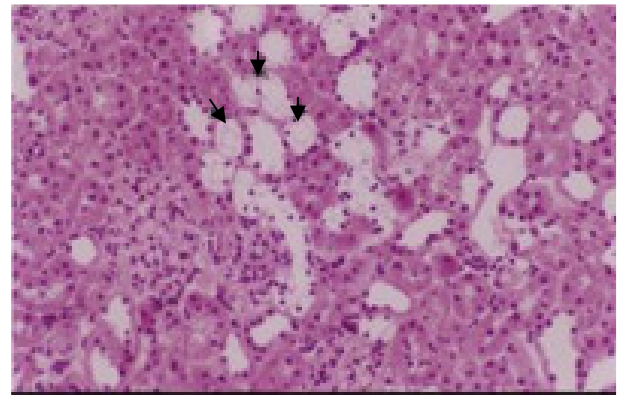
### Tartışma

Diyabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde artmış oksidatif stresin ve ilerlemiş glikozilasyon son ürünlerinin önemli olduğu bilinmektedir.<sup>2</sup>

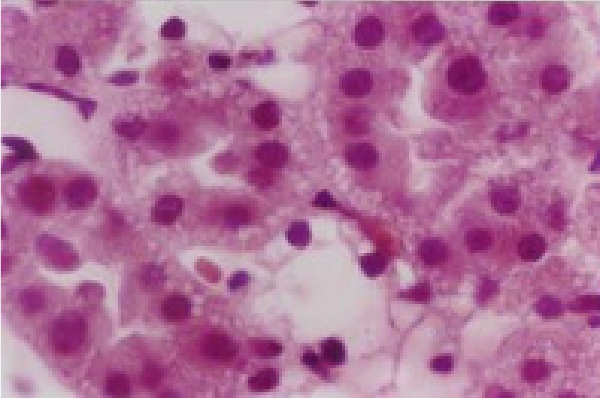
Çeşitli ajanlar ile hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan diyabet modellerinde ve insanda diyabete bağlı gelişen böbrek hasarı morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel parametrelerle gösterilmiştir.<sup>3,8</sup>



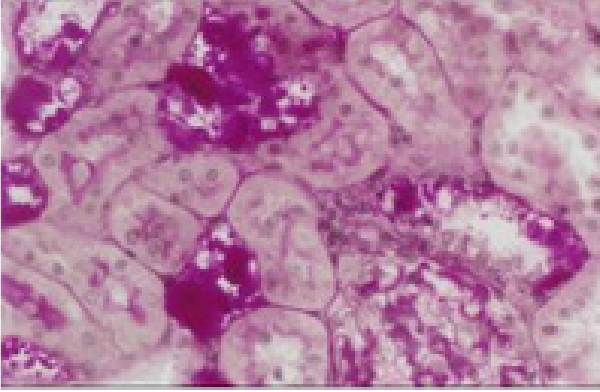
**Resim 6.** D grubunda, Langerhans adacığı. HE X 132.



**Resim 7.** D grubunda, tübül epitellerinde izlenen hidropik değişiklikler (oklar) ve glomerüllerin etrafında fark edilemeyen bowman mesafesi. HE X 66.



**Resim 8.** D grubunda, tübüllerin bazalinde izlenen vakuolizasyon. HE X 330.



**Resim 9.** D grubunda izlenen glikojenle dolu tübül epitelleri. PAS-H X 132.

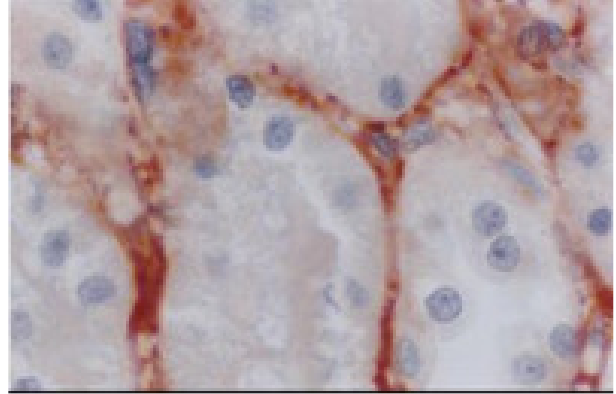


**Resim 10.** D grubunda, çok sayıda ve yoğun olarak izlenen granül benzeri yapılar. Toluidin mavisi X 330.

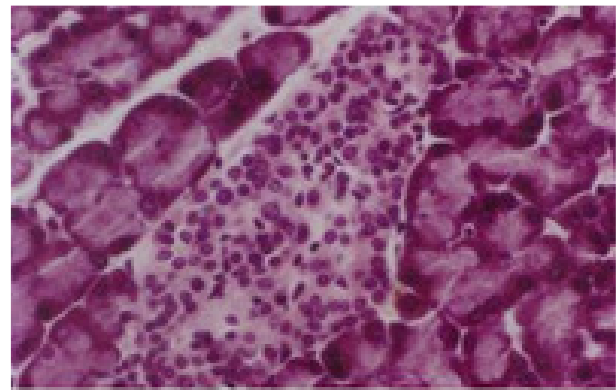
Deneysel diyabet modellerinde genellikle pankreatik  $\beta$  hücrelerine toksik etkisi olan ajanların verilmesi ile oluşturulmaktadır. Bu amaçla en sık

kullanılan kimyasallar alloxan ve STZ'dir. Biz bu çalışmada streptomyces achromogenes tarafından üretilen bir antibiyotik olan STZ'yi kullandık.<sup>9</sup> Çalışmada STZ enjeksiyonunun 3. gününden deneyin sonuna kadar, D grubunda hiperglisemi izlendi. AG ile tedavi edilen grupta ise, kan-glikoz değerleri D grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. Bu sonuçlar, diyabetik sıçanlara uygulanan 8 haftalık AG tedavisinin plazma glikoz seviyeleri üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildiren Liptowa ile uyumludur.<sup>3</sup>

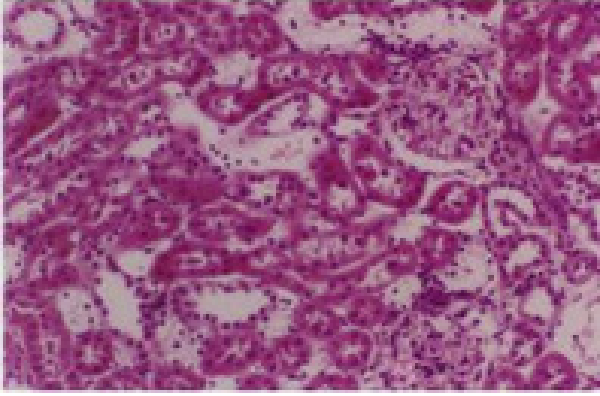
STZ'nin diyabetojenik etkisini,  $\beta$  hücrelerinde hem NO<sup>-</sup> hem de reaktif oksijen radikallerinin (OH<sup>-</sup>, ROO<sup>-</sup>) üretimine neden olarak gösterdiği bildirilmektedir.<sup>10</sup> Nitekim NOS inhibitörlerinin ve antioksidanların STZ'nin neden olduğu hiperglisemiye düşürdüğü görülmektedir.<sup>8,11,12</sup> AG'nin



**Resim 11.** D grubunda anti-fibronektin immün boyaması ile tübül bazal membranı. X 330.



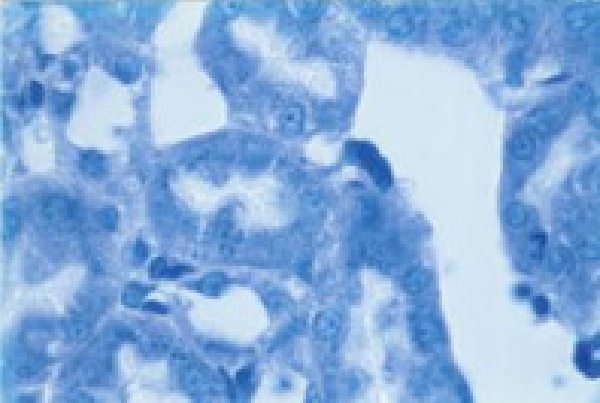
**Resim 12.** DAG grubunda, Langerhans adacığı. HE X 132.



**Resim 13.** DAG grubunda, glomerül ve tübüllerin yapısı. HE X 66.



**Resim 14.** DAG grubunda, küçük granüller şeklinde izlenen glikojen partikülleri. PAS- H X 132.



**Resim 15.** DAG grubunda, D grubuna göre az sayıda izlenen granül benzeri yapılar. Toluidin mavisi X 330.

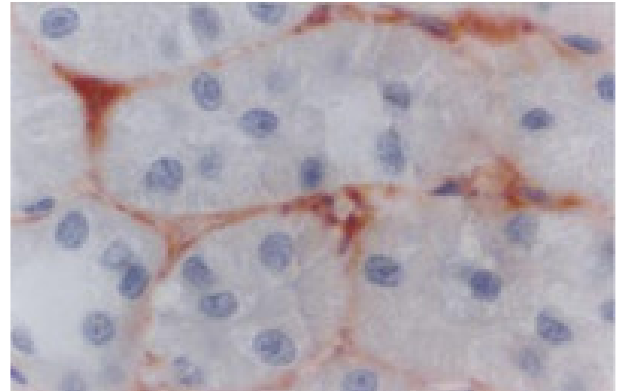
hiperglisemi üzerindeki iyileştirici etkisi muhtemelen hem NOS inhibitörü hem de antioksidan özellikleri sayesinde Langerhans adacıklarındaki  $\beta$

hücre hasarını nispeten geri döndürmesi ile ilgili olabilir.

Bizde çalışmamızda, AG verilen grupta Langerhans adacıklarının konturlarını ve hücre yapılarını D grubuna göre daha düzenli olarak gözlemledik.

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların böbreklerinde gözlenen ilk bulgu, yer yer hasarlanmış tübüllerin izlenmesidir. Bizde tübüllerdeki hasarı, hidropik değişiklikler (hücre şişmesi ve intrasitoplazmik vakuolizasyon) ve glikojen birikimi şeklinde izledik. Bu bulgular literatür bilgilerine uygunluk göstermektedir.<sup>8,13</sup>

Çalışmamızda toluidin mavisi ile boyanmış kesitlerde yapılan incelemelerde, tübül hücrelerinde intrasitoplazmik olarak yer alan farklı irilikte tanecikler dikkat çekiciydi. Yakan ve ark. da diyabetik sıçanların yarı-ince kesitlerinde gözledikleri bu iri globüler ve heterojen yoğunluktaki yapıların lizozomlar olabileceğini düşünmüşler ve uzamış hiperglisemide fazla miktardaki glikojenin eliminasyonuna yönelik sayılarının artmış olabileceğini rapor etmişlerdir.<sup>14</sup> Diğer yandan plazmada glikoz seviyesinin yükselmesi, protein ve peptidlerin glikozilasyonuna yol açarak, ilerlemiş glikozilasyon son ürünlerine dönüşür. Gugliucci, glomerüller tarafından fitre edilen AGE peptidlerinin, proksimal kıvrıntılı tübüllerde endolizozomal sistem tarafından metabolize edildiğini bildirmiştir.<sup>15</sup> Bu şekilde AGE peptidleri ile yüklenen tübül lizozomların yoğun-



**Resim 16.** DAG grubunda, anti-fibronektin immün boyaması ile tübül bazal membranı. X 330.

lukları artmış olabilir. Ayrıca; Osicka diyabette sülfataz, Teschner'de katepsin ve metalloproteinaz gibi renal lizozomal enzim aktivitelerinin önemli derecede azaldığını rapor etmiştir.<sup>7,16</sup> Diyabette hem AGE peptidlerinin proksimal tübüllerden endositozu, hem de lizozomal aktivitenin düşmesi alınan materyallerin lizozomlar içinde birikip, yoğunluklarının artmasına neden olmuş olabilir. AG verilen grupta ise lizozomların D grubuna göre sayılarının ve yoğunluklarının azalmış olduğu gözlemlendi. AG'nin AGE ürünlerine proteinlerin kross bağlanmasını önleyen etkin bir ajan olduğu bilinmektedir.<sup>15</sup> Nitekim Nilsson, diyabetik sıçanlarda AGE'nin kontrollere göre 5 kat yükseldiğini, AG ile tedavi edilen sıçanlarda ise 1.3 kata kadar düştüğünü rapor etmiştir.<sup>17</sup>

AG'nin AGE peptidlerini oluşmasını inhibe etmesi antioksidan özelliği ile de ilgili olabilir. Çünkü, AG hem reaktif oxo-gruplarını bloke ederek hem de dikarboksilleri süpürerek glikooksidasyon sürecini inhibe edebilir.<sup>3</sup> Nitekim çalışmalar, reaktif oksijen radikallerinin intrasellüler AGE oluşumunu arttırdığını ve antioksidanların ise inhibe ettiğini bildirmiştir.<sup>18</sup>

Çalışmamızda, antifibronektin ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, tübül bazal membranlarının STZ uygulanan grupta kontrol ve DAG grubuna göre daha kuvvetli pozitif boyandığı izlendi. Ancak glomerül bazal membranlarında D ve DAG grupları ile kontroller arasında önemli bir değişiklik gözlemlenmedi.

Ayo yüksek glikoz içeren medyumlarda kültüre edilmiş hücrelerin Tip 4, kollajen, laminin ve fibronektin sentezinin kontrollere göre %50-60 arttığını göstermiştir.<sup>19</sup> Ayrıca hiperglisemide artan AGE gibi modifiye proteinlerin fare ve insanda fibronektin ve Tip 4 kollajen stimülasyonunu aktive ettiği bildirilmiştir.<sup>20</sup>

Diyabetin neden olduğu böbrek hasarında oksidatif stress ve AGE ürünleri ile ekspresyonu artan "Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$  )" ve "Hepatosit Growth Factor (HGF)" gibi yüksek moleküler ağırlıklı büyüme faktörlerinin etkisinden bahsedilmektedir.<sup>20-23</sup> Glomerüler ultrafiltrasyona uğrayarak, tübüler sıvıya geçen bu faktörler prok-

simal tübüler hücreleri değişikliğe uğratarak Tip 4 kollajen, laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini aktive ederler.<sup>22,23</sup> Nitekim insanlarda ve diyabetik hayvan modellerinde, glomerül ve tübülointerstisiyel alanda TGF- $\beta$  mRNA seviyesi önemli derecede artmış olarak bulunmuştur.<sup>23</sup>

Çalışmamızda, AG verilmesinin, fibronektin yoğunluğunu D grubuna göre azalttığını izledik. A. Flyvbjerg diyabette AGE inhibitörlerinin uygulanmasının, Ha ve ark.da kronik antioksidan tedavisinin TGF- $\beta$  mRNA ve fibronektin ekspresyonunu önlediğini bildirmiştir.<sup>22,24</sup> Ayrıca Soulis-Liporata, STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerde, AG tedavisi ile üriner albumin atılımının ve glomerüler mezengiyal genişlemenin azaldığını bildirmiştir.<sup>25</sup> AG bu şekilde de, glomerüler filtrasyonu kontrol altına alarak, büyüme faktörlerinin tübüler sıvıya geçmesini azaltmış olabilir.

Sonuç olarak, kronik AG uygulamasının sıçanlarda STZ ile oluşturulan diyabetin neden olduğu böbrek hasarını hafiflettiği izlendi. AG'nin diyabetin tedavisinde kullanılmasının hem antioksidan hem de AGE inhibitörü olarak faydalı etkileri olabilir. Ancak yine de AG'nin tedavi edici mekanizmasını anlamak için daha ileri çalışmalar ihtiyaç bulunmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Crawford JM, Cotran RS. The pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. Pathologic Basis of Disease. USA: WB Saunders Company; 1999. p.913-20.
2. Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bazek P, Durackova Z. Influence of  $\beta$ -resorcylicidene aminoguanidine on selected metabolic parameters and antioxidant status of rats with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002;51:277-84.
3. 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;16:395-400.
4. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2000;297:135-44.
5. Unlucerci Y, Kocak H, Seferoglu G, Bekpınar S. The effect of aminoguanidine on diabetes-induced inactivation of kidney Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase in rats. *Pharmacol Res* 2001;44:95-8.
6. Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, Ihm J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats. *Metabolism* 1999;48:1141-5.



7. Osicka TM, Kiriazis Z, Pratt LM, Jerums G, Comper WD. Ramipril and aminoguanidine restore renal lysosomal processing in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 2001;44:230-6.
8. Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Uçar M, Gül, M Eşrefoğlu M ve Otlı A. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005;12:145-52.
9. 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;38:127-30.
10. Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Sci* 1995;56:1789-98.
11. Tanaka Y, Shimizu H, Sato N, Mori M, Shimomura Y. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology* 1995;50:69-73.
12. Haluzik M, Nedvidkova J, Skrha J. The influence of NO synthase inhibitor and free oxygen radicals scavenger, methylene blue on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Physiol Res* 1998;47:337-41.
13. 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;35:212-20.
14. Yakan B, Eşrefoğlu M. Deneysel diabetes mellitusta böbreklerin ince yapısı ve selenyumunun düzeltici etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1995;15:255-9.
15. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 2000;100:621-34.
16. Teschner M, Schaefer RM, Svarnas A, Heidland U, Heidland A. Decreased proteinase activity in isolated glomeruli of streptozotocin diabetic rats. *Am J Nephrol* 1989;9:464-9.
17. Nilsson BO. Biological effects of aminoguanidine: An update. *Inflamm Res* 1999;48:509-15.
18. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Browlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998;47:1114-20.
19. Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Gloss WF 2<sup>nd</sup>, Kreisberg JJ. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990;136:1339-48.
20. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:822-32.
21. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:241-5.
22. Flyvbjerg A. Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2000;43:1205-23.
23. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor  $\beta$  contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7667-9.
24. Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: The role of oxidative stress and protein kinase. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:147-51.
25. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991;40:1328-34.