

STREPTOZOTOSİN İLE DİABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA SİLAZAPRİLİN BÖBREKLER ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Mustafa AKGÜZEL*, Dr. Ahmet KAYA*, Dr. Vedat AKPINAR*, Dr. Lema TAVLI**, Dr. Ali KOŞAR*

* S.Ü.T.F. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, ** S.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Diabetik hastalarda nefropati en sık ölüm nedenleri arasındadır. Nefropatiyi önlemek için iyi bir metabolik kontrolün yanında değişik antihipertansif ajanlar da deneme aşamasında kullanılmaktadır. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratlarda yaptığımız bu çalışmada diabet yapıldıktan 4 ve 8 hafta sonra böbreklerde oluşan değişiklikler incelenmiş ve sonuçlar 8 hafta süreyle silazapril verilen diabetik ratlardaki böbrek değişiklikleri ile karşılaştırılmıştır. Silazapril verilen diabetik ratlarda böbreklerin büyüklük olarak erken hiperfonksiyon ve hipertrofi dönemine yaklaştığı, glomerüler bazal membran kalınlaşması, tubuler nekroz, tubuler yağlı dejenerasyon, piyelonefrit ve interstisyel fibrozisin azaldığı histopatolojik olarak saptanmıştır ($p<0.001$).

Anahtar Kelimeler: Streptozotosin, diabetik rat, nefropati silazapril.

SUMMARY

Cilazapril Arrested Glomerular Injury in Streptozotocin Induced Diabetic Rats

Diabetic nephropathy is one of the major cause of early mortality among the diabetic patients. In order to reduce the mortality, the prevention of nephropathy and the meticulous control of diabetes are necessary. Various trials are being carried out with antihypertensive drugs to control diabetic nephropathy. Although, physiologic or protective role of these drugs is not to be verified in this study. For this, renal changes in streptozotocin induced diabetic rats were investigated morphologically at 4 weeks and 8 weeks intervals and the results were compared histologically with those of cilazapril treated streptozotocin induced diabetic rats. Cilazapril arrested the nephropathy at early hyperfunction and hypertrophy stage in streptozotocin induced diabetic rats. The ratio of the left kidney weight to body weight of cilazapril treatment received diabetic rats was either similar to 4 weeks old diabetic rats or higher than that of 8 weeks old diabetic rats which was the further support of nephropathic arrest by the cilazapril treatment. Histologic studies also revealed that glomerular basement membrane thickness, fatty degenerative of epithel cells of tubuli, tubular necrosis, pyelonephritis, and interstitial fibrosis were conspicuously regressed by cilazapril treatment ($p<0.001$).

Key Words: Streptozotocin, diabetic rat, nephropathy, cilazapril.

GİRİŞ

Diabetes mellitusta kronik dejeneratif komplikasyonlara bağlı ölümlerin en sık nedeni nefropatidir (1). Diabetik nefropatinin başlaması ve son dönem

böbrek yetmezliği ile sonlanması yıllarca devam eden bir süreçtir (1,2). Bu süreç içerisinde erken dönemde dejeneratif komplikasyonları önleyici ve/veya durdurucu önlemlerin geliştirilebilmesi önemlidir. Özellikle erken

Haberleşme Adresi: Doç. Dr. Ahmet KAYA, S.Ü.T.F. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, KONYA

hiperfonksiyon ve hipertirofi döneminde böbreklerdeki değişimler geri dönüşümlü olabileceği için bu dönemin tanınması ve tedavisi de oldukça önemlidir (3,4). Antihipertansif ajanlarla diabetik nefropatisi olan hipertansif hastalarda böbreklerde fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri inceleyen klinik ve deneysel pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda değişik antihipertansif tedavilerin erken dönemde diabetik nefropatisi olan hastalarda böbrek fonksiyonlarında olumlu etkiler yaptığı, oluşan hasarı önlediği bildirilmiştir (5,6,7).

Bu çalışmada streptozotosin (STZ) ile diabet yapılan ratlarda 4 ve 8 hafta sonra böbreklerde oluşan patolojik değişiklikler ve bir angiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü olan silazaprilin bu değişiklikler üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada başlangıç ağırlıkları 351-422 gm (378.3±13.20) arasında değişen 10 adet erişkin erkek Wistar albino cinsi sağlıklı nondiabetik rat ile, eter anestezi altında intraperitoneal enjeksiyonla 65 mg/kg dozunda STZ verilerek diabet oluşturulan, başlangıç ağırlıkları 213-510 gm (361.2±12.99) olan 34 adet benzer özelliklere sahip rat kullanıldı. Başlangıçta her bir ratın ağırlığı belirlendi ve kuyruk veninden alınan kanda glukometer (Ames) ile kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Bütün ratlar aynı şartlarda, %24 ham protein, %7 ham selüloz, %8 ham kül, %1 NaCl, %1-2.8 kalsiyum ve %0.9 fosfor içeren standart rat diyeti ile beslendi.

Kontrol grubu olan 1. gruba (n:10) 8 hafta boyunca yalnızca standart diyet verildi. Diyabetik yapılan II. grup (n:8) 4 hafta, III. grup (n:14) ise 8 hafta süreyle standart diyetle beslendi. IV. gruba (n:12) STZ uygulanmasından 10 gün sonra içme suyuna 15 mg/L yoğunluğunda silazapril ilave edildi ve 8 hafta verildi. II. grup 4. hafta, diğer grupların ise 8. hafta sonunda

eter anestezi altında önce vücut ağırlıkları (VA) tartıldı ve paramedian insizyonla aorta ve böbreklere ulaşıldı. Her birinin glikoz düzeyleri ölçülüp, işlem sonunda sol böbrek eksize edilerek sol böbrek ağırlığı (SBA) saptandı ve SBA/VA oranı hesaplandı.

Böbrekler enine kesit yapılarak %10'luk formalin içerisine alındı. Korteks ve medullayı içerisine alan ve bir lamda 3 kesit olacak şekilde hazırlanan preparatlar hematoksilin eosin ve PAS boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda 200 büyütmede bakılarak değerlendirildi. Her bir preparatta 100 adet glomerul sayıldı; glomerül bazal membran kalınlaşması (GBMK), mezengiumda hiyalinizasyon (MH), glomerüler atrofi (GA), piyelonefrit (P), tubuluslarda nekroz (IN), interstisiyel fibrozis (İF) ve tubuluslarda yağlı dejenerans (TYD) ile kapiller bazal membran kalınlaşması (KBMK) olup olmadığına ve oranına bakıldı.

Histopatolojik parametrelerin tümü % değer olarak alınıp sonuçlar istatistiksel olarak khi-kare testi yapılarak değerlendirildi.

Ratların kan şeker sonuçları, SBA/VA oranları aynı grup içerisinde paired t, farklı gruplar arasında unpaired t testi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmada incelenen toplam 44 adet rata ait başlangıç ve çalışma sonunda belirlenen VA ve kan glikoz düzeyleri, SBA, SBA/VA oranları tablo I'de verilmiştir.

Nondiabetik kontrol grubu ratların başlangıç ve 8. hafta sonunda kan glikoz düzeyleri ve VA'larında anlamlı bir farklılık bulunamadı (p>0.05). Diabet oluşturulan gruplarda ise çalışma sonunda başlangıç değerlerine göre kan glikoz düzeylerinde yükselme (p<0.001), VA'larında ise azalma (p<0.001) gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Normal ve silazapril verilen diabetik grupta sistemik parametreler

Gruplar	n	İlk Ağırlık (gm)	Son Ağırlık (gm)	İlk kan şekeri (mg/dl)	Son kan Şekeri (mg/dl)	Sol Böbrek Ağırlığı	Sol böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı
Normal	10	378.3±3.21	366.4±7.7	126.8±5.9	116.9±5.4	1.30±0.009	0.0035±0.0001
4 haftalık diabetik	8	258.9±15.7	171.0±9.7	121.0±6.9	315.1±23	0.97±0.02	0.0058±0.0004
8 haftalık diabetik	14	373.1±100	269.9±13	131.6±4.1	330.8±19	1.33±0.053	0.0045±0.0001
Silazapril verilen diabetik	12	415.9±18.0	331.8±22	124.7±6.0	325.8±15	1.77±0.064	0.065±0.0002

Diabetik gruplarda saptanan SBA/VA oranı, kontrol grubunda belirlenen SBA/VA oranına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Ayrıca 4 haftalık diabetik ratların SBA/VA oranı 8 haftalık diabetik ratlarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$). 4 hatalık diabetik ratlarla ölçülen SBA/VA oranı ile silazapril grubunda ölçülen SBA/VA oranı arasında anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0.05$). Silazapril grubunda SBA/VA oranı 8 haftalık diabetik ratlardaki orandan yüksek bulundu ($p<0.001$).

Histopatolojik inceleme sonuçları tablo 2'de verilmiştir. 4 ve 8 haftalık diabetik ratlarda KBMK, MH, P, TN, TYD ve GA oranları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0.05$). GBMK 4 haftalık ratlarda %13.8 haftalık diabetik ratlarda ise %31 oranında bulunmuş olup, diabet süresi uzadıkça GBMK görülme sıklığı artmaktadır ($p<0.001$). İF 4 haftalık diabetik rat grubunda % 71.8 haftalık ratlarda ise % 87 olarak saptanmıştır ($p<0.001$).

Silazapril verilen diabetik rat grubunda elde edilen bulgularla 4 ve 8 haftalık diabetik ratlardan elde edilen bulgular karşılaştırıldığında; KBMK, MH, GA görülme oranları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). GBMK görülme oranı silazapril verilen gruba göre 8 haftalık ratlarda anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) bulundu; 4 haftalık ratlarda ise farklılık bulunamadı ($p>0.05$). Piyelonefrit, TN, TYD, İF görülme oranları ise silazapril verilen grupta 4 ve 8 haftalık diabetik

gruba göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.001$), (Tablo -2). Resim 1'de 8 haftalık diabetik rat böbreğinde GBMK ve MH; Resim 2'de ise silazapril verilen ratların böbreğinde korunmuş glomerül yapısı görülmektedir.

TARTIŞMA

İlk kez 1936 yılında Kimmelstiel - Wilson tarafından tanımlanan nefropati diabetik hastalarda morbidite ve mortaliteden önemli ölçüde sorumludur (1). Tüm diabetiklerin %8'inde , tip I diabetiklerin ise %59'unda böbrek yetmezliğine bağlı ölüm görülmektedir (1,8). Ülkemizde yapılan bir çalışmada diabetik hastalarda nefropatiden ölüm oranı %10.6 olarak bildirilmiştir (9). Japonya'da ise diabetik hastaların % 11.9'unda ölüm nedeni nefropatiye bağlıdır (10).

Diabetin erken döneminde böbrekler genellikle büyümüştür. Erken hiperfonksiyon ve hipertrofi dönemi olarak bilinen bu devrede glomerüller hipertrofi ve tubuler genişleme vardır; bazal membran ve mezengium normaldir. Bu dönemde sistemik kan basıncı normal; intraglomerüler basınç, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) filtrasyon fraksiyonu (FF) ve böbrek plazma akımı (RPF) artmıştır (1). GBMK ve mezengial matriks artışı diabet başlangıcından ortalama 2 yıl sonra karşımıza çıkar ve diabetik nefropati 15-20 yıl sonra üremik dönemle sonlanır (11).

Bugüne kadar STZ ile diabet oluşturulan ratlarda böbrek değişikliklerini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda GBMK, mezengial matriks artışı; hiyalinizasyon ve proliferasyon, piyelonefrit, tubuler nekroz gibi bulgular bildirilmiştir (12). Çalışmamızda elde edilen veriler bu bulgularla uyumludur.

Diabetik ratlarla yapılan çalışmalarda erken diabetik nefropatide başlangıç döneminde saptanan glomerüler yapıda düzensizlik ve glomerüler genişleme gibi morfolojik değişikliklerin erken insülin tedavisi ile düzelebileceği gösterilmiştir (13). Ayrıca deneysel ve klinik çalışmalarda antihipertansif ajanlarla tedavinin diabetiklerde böbrek fonksiyonları ve morfolojisi üzerine etkisini ortaya koyan değişik çalışmalar yapılmıştır. STZ ile diabet oluşturulan ratlarda ACE inhibitörlerinin böbrekler üzerine koruyucu etkisinin rezerpin, hidralazin ve hidroklorotiazid gibi klasik üçlü tedaviden daha

Tablo 2. Histopatolojik bulguların görülme sıklığı (%)

No	Bulgular	4 Haf. DM.	8 Haf. DM.	Silazapril
1	KBMK	% 66	% 64	% 63
2	GBMK	%13	% 31	% 10
3	MH	%92	% 95	% 99
4	P	%87	% 93	% 50
5	TN	%75	% 71	% 33
6	TYD	% 87	% 78	% 33
7	GA	% 81	% 84	% 85
8	İF	% 87	% 71	% 6

KBMK: Kapiller bazal membran kalınlaşması, **GBMK:** Glomerüller bazal membran kalınlaşması, **MH:** Mezengial hiyalinizasyon, **P:** Piyelonefrit, **TN:** Tubuluslarda nekroz, **TYD:** Tubuluslarda yağlı dejenerasyon, **GA:** Glomerüller atrofi, **İF:** İnterstisyel fibrozis.



Resim 1. Sekiz haftalık diabetik rat böbreğinde glomerüller bazal membran kalınlaşması ve mezangial hiyalinizasyon. H.E x200.



Resim 2. DM/silazapril grubu ratların böbreğinde korunmuş glomerül yapısı. H.E. x 200.

fazla olduğu gösterilmiştir. Anderson ve arkadaşları diabetik ratlarda glomerüloskleroz ve hiyalinizasyonun kaptopril verilerek önenebileceğini bildirmişlerdir (14). Daha önce yapılan bir çalışmada da Meyer ve arkadaşları enalaprilin glomerüler hasarı önlediğini göstermişlerdir (15). Deneysel diabette yapılan çalışmalarda glomerüler lezyonların oluşması ve ilerlemesinde hemodinamik faktörlerin metabolik faktörlerden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Diabetik fare modelleri ile yapılan deneysel çalışmalarda ACE inhibitörlerinin intraglomerüler basıncı azaltarak glomerüloskleroz gelişimini önlediğini bildirilmiştir (16).

Çalışmamızda 4 haftalık diabetik rat grubunda SBA/VA oranı normal ve 8 haftalık diabetik rat grubundaki orana göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). 8 hafta süre ile silazapril alan diabetik grupta ölçülen SBA/VA oranı ile 4 haftalık diabetik grupta ölçülen SBA/VA oranları arasında farklılık bulunamadı ($p > 0.05$). Bu sonuçlar 4 haftalık diabetik rat grubu böbreklerin diabetik nefropatinin erken hiperfonksiyon ve hipertrofi dönemine uygun olarak büyüdüğünü göstermektedir. Ancak bu dönemde nefromegali; intraglomerüler basınç artışı ve hi-

perfiltrasyon beklenirken (1,2) çalışmamızda bununla uygun olmayarak GBMK ve MH gibi diabete özgü patolojik bulgular saptadık. Bunun nedeni belki de 4 haftalık sürenin erken diabetik nefropati için biraz geç bir zaman olmasıdır.

Çalışmamızda MH, GA ve KBMK görülme oranlarında tedavi ile belirgin bir azalma olmadı. Ama GBMK, P, TN, TYD, İF oranları silazapril verilen grupta 4 ve 8 haftalık diabetik ratlara göre anlamlı olarak düşük bulundu. Çalışma sonunda silazapril ile histolojik olarak böbreklerin korunduğu saptanmış olup, elde edilen sonuçlar diğer ACE inhibitörleri ile yapılan çalışmalarla uyumludur (14,15,17).

ACE inhibitörlerinin diabetiklerde böbrekler üzerine koruyucu etkisinin reserpin, hidralazin ve hidroklorotiazide göre üstünlüğü gösterilmiştir. Üçlü tedavide glomerüler lezyonlar devam ederken ACE inhibitörleri glomerüler hasarı önlemektedir. Bu fark, ACE inhibitörlerinin glomerüler kapiller basıncı düzeltici etkisinin sistemik kan basıncı kontrolünden bağımsız olarak ortaya çıktığı şeklinde değerlendirilmiştir (14, 16).

KAYNAKLAR

1. Hostetter TH. Diabetic nephropathy. In: Brenner BM, Rector FC., eds. The Kidney. Philadelphia: WB Saunders, 1991; 1694-1727.
2. Mogensen CE. Diabetes and kidney function. A comparison between type I and type II diabetes. *Medicographia* 1984; 6: 28-32.
3. Mogensen CE, Qsterby R, Gundersen HJG. Early functional and morphologic vascular renal consequences of the diabetic state. *Diabeteologia* 1979; 17: 71-6.
4. Parving HH, Andersen AR, Smith UM, Sevensen PA. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in the kidney function diabetic nephropathy. *Lancet* 1983; 5: 1175-78.
5. Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Rich SS, Mauer M. Studies of kidney muscle biopsy specimens from identical twins discordant for type I diabetes mellitus. *New Engl J Med* 1985; 16: 1282-87.
6. Swainson CD, Walker RJ, Bainley RR. Effect of cilazapril on renal function and hormones in hypertensive patients with renal disease. *Am J Med* 1989; 87: 835-875.
7. Anderson S, Renneke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986; 77: 1993-2000.
8. Compy C, Shapiro F. End stage diabetic nephropathy: Dialysis and treatment. In: Brodoff BN, Bleicher SJ, eds. Diabetes mellitus and obesity. Baltimore : WW, 1982: 671-78.
9. Önen K. Diabetik Nefropati patogenezi ve tedavisine ilişkin bilgilere kısaca bakış. *Diabet Yıllığı* 1987; 5: 69-83.
10. Freidman EA. Renal consequences of diabetes. In: Brodoff BN, Bleicher SJ, eds. Diabetes mellitus and obesity. Baltimore: WW, 1982: 664-70.
11. Unger RH, Foster DW. Diabetes mellitus. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams textbook of endocrinology. Philadelphia; WB Saunders, 1992: 1255.
12. Holck P, Rasch R. Structure and segmental localization of glycogen in the diabetic rat kidney. *Diabetes* 1993; 42: 891-900.
13. Moriya T, Ohna J, Kanamon A, Matobz K, Yfma Y. Ultrastructural study of glomerular basement membrane in diabetic rats by quick-freezing, deep-etching and replica method. EASD, 29th annual meeting İstanbul 1993; A222: 855 abstract.
14. Tucker BJ, Blantz RC, Rasch R. Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in early and established STZ- diabetic rats. EASD, 28th annual meeting Prague 1992; A 11: 33 abstract.
15. Meyer TW, Anderson S, Renneke HG, Brenner BM. Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney Int* 1987; 31: 752-59.
16. Bangstad HJ, Qsterby R, Dahl, Jorgensen K, Hartmaan A, Berg KS, Lanssen KF. Glomerular basement membrane thickening and expansion are retarded by improved blood glucose control. EASD, 29th annual meeting İstanbul: 1993; A62: 234 abstract.
17. Berden JHM, Elving LD, Wetzelz JFM, van Lier HJJ, deNobel E. Captopril and atenolol have similar effects on renal function in patients with diabetic nephropathy. EASD, 29th annual meeting İstanbul: 1993; A62: 237 abstract.