



Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler⁺

Feral Öztürk*, Mustafa Iraz**, Mukaddes Eşrefoğlu*, Meltem Kuruş*, Mehmet Gül*, Ali Otlu*

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Embriyoloji-Histoloji AD, Malatya.

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji AD, Malatya.

Amaç: Bu çalışma, deneysel tip 1 diyabetin ve fizyopatolojisi taklit edilen tip 2 diyabetin sıçan böbreklerinde oluşturabileceği hasarın histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak incelenmesi ve birbirleriyle karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan Sprague Dawley cinsi, 15 adet erişkin erkek sıçan; kontrol, streptozotocin (STZ) ve fruktoz gruplarına ayrıldı. STZ grubuna tek doz STZ (45mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Fruktoz grubuna 8 hafta boyunca %10 D-fruktoz içeren içme suyu verildi. 8 haftanın sonunda öldürülen sıçanların sol böbrekleri alınarak rutin tespit ve doku takibi sonrasında histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Bulgular: STZ ve fruktoz gruplarında korteksde histolojik değişiklikler izlendi. Her iki grupta da glomerül kapiller bazal membranında kalınlaşma, mezengial matrisde artış bazı glomerüllerin Bowman kapsülü pariyetal yaprağında kalınlaşma ve nadiren tubül bazal membranında kalınlaşma izlendi. Fruktoz grubunda ayrıca arteriol duvarında kalınlaşma izlendi.

Sonuç: Her iki tip deneysel diyabette sıçan böbreklerinde benzer bulgular olduğu ve bu bulguların muhtemelen hipergliseminin oluşturduğu direkt ve/veya indirekt etkilere bağlı olarak geliştiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Deneysel diyabet, Sıçan, Böbrek, Işık mikroskopi

The Histologic Alterations of Experimental Diabetes on the Rat Kidneys

Objective: This study was designed to detect and evaluate the histochemical and immunohistochemical alterations in rat kidney histology following streptozotocin (STZ)-induced and fructose-induced experimental diabetes.

Material and Methods: Fifteen male Sprague-Dawley adult rats were divided into three groups as control, STZ and fructose groups. STZ group rats received a single dose of STZ (45mg/kg) intraperitoneally. Fructose group rats were fed by tap water containing 10 % D-fructose for 8 weeks. At the end of eight weeks rats were killed, left kidneys were removed. Following routine tissue process, kidneys were embedded in paraffin. Histochemical and immunohistochemical stains were applied and the specimens examined by light microscope.

Results: In both STZ and fructose groups histological changes were observed in the cortex. Increase of Basal membrane thickness in glomerule capillary, mesangial matrix, thickness in parietal layer of Bowman's capsule and rare tubular basal membrane thickness were detected in both groups. In fructose group arteriol walls also showed increased thickness.

Conclusion: We concluded that both STZ and fructose induced experimental diabetes led to similar findings in rat kidneys and these findings probably occur as direct and/or indirect results of hyperglycemia.

Key Words: Experimental Diabetes, Rat, Kidney, Light Microscopy.

⁺Bu çalışma VI. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresinde (12-15 Eylül 2002, İstanbul) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Diyabet karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozuklukla seyreden kronik bir hastalıktır. İnsülin hormonunda veya etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan hiperglisemiye bağlı olarak gelişmektedir. Diyabet, tip 1 (insüline bağımlı) ve tip 2 (insüline bağımlı olmayan) diyabet olarak iki farklı grup oluşturmaktadır. Tip 1 diyabet, insülin salgılayan pankreatik β hücre kütlelerinde azalmaya bağlı oluşur. Ciddi ve mutlak insülin yetmezliği bulunur. Tip 2 diyabette ise glukoz yüklemesine karşın göreceli insülin yetmezliği ve buna eklenen periferik dokularda insüline yanıt yetersizliği vardır.¹

Her iki tip diyabette hastaların kanında yüksek seviyelere ulaşan glukoz proteinlerle birleşerek kimyasal olarak geri dönüşebilen glukozilasyon ürünlerine dönüşür. Glukozun kan damarlarının duvarlarında veya interstisyel dokularda

kollajenle ve diğer uzun ömürlü proteinlerle oluşturduğu glukozilasyon, bir seri kimyasal reaksiyon sonrasında geri dönüşümü olmayan glukozilasyon son ürünlerine dönüşür. Hiperglisemi sürdükçe bu birikim artar. Glukozilasyon son ürünleri diyabette oluşan mikroanjiopati, retinopati, nefropati, nöropati gibi ciddi komplikasyonların oluşmasında önemli rol oynamaktadır.¹

Böbrekler diyabette önemli hedef organlardır. Diyabete bağlı oluşan ölümlerde böbrek yetmezliği, miyokard infarktüsünden sonra ikinci sırada gelmektedir. Diyabet böbreklerde, glomerüller lezyonlar, renal damarlarda ateroskleroz ve piyelonefrit oluşturmaktadır.¹⁻³

Deney hayvanlarına çeşitli kimyasal ilaçlar (streptozotosin, alloxan) verilerek, deneysel tip 1 diyabet oluşturulmaktadır. Bu ilaçlar pankreatik beta hücrelerinde kalıcı hasar oluşturmaktadır.^{3,4} Tip 2 diyabetin ise fizyopatolojisi taklid edilebilmektedir. Yüksek fruktoz içeren diyetler sıçanlarda, glukoz toleransını ve insülinin karaciğer ile periferik dokulardaki fonksiyonunu bozmaktadır. Böylece tip 2 diyabette izlenen insülin direnci gelişmektedir.⁵

Diyabetle ilgili yapılan deneysel çalışmalar çoğunlukla tip 1 diyabet üzerine yoğunlaşmıştır. Oysa klinikte tip 1 ve tip 2 diyabetin oluşum mekanizmaları, kan glukoz ve insülin değerleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle böbreklerde meydana getirebilecekleri histolojik değişikliklerin de farklı olması olasıdır.

Bu çalışma, deneysel tip 1 diyabetin ve fizyopatolojisi taklit edilen tip 2 diyabetin sıçan böbreklerinde oluşturabileceği hasarın histokimyasal ve immunhistokimyasal olarak incelenmesi ve birbirleriyle karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilen Sprague Dawley cinsi, 15 adet genç erişkin erkek (başlangıç ağırlıkları, 150-240 g) sıçan kullanıldı. Denekler rastgele üç gruba ayrılarak aşağıdaki işlemler uygulandı;

Kontrol grubu (n=5): 8 hafta boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslendiler.

Streptozotosin-STZ grubu (n=5): Tek doz STZ (45mg/kg) serum fizyolojik içinde çözülerek intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulamadan 12 saat önce aç bırakılan denekler uygulamadan 4 saat sonra standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslenmeye başladılar. Uygulamadan 3 gün sonra 6 saatlik açlık

sonrası kuyruk ucundan alınan kapiller kanda el glukometresi ile kan glukoz değerleri ölçülerek, 270 mg/dl üzerinde olanlar çalışmaya dahil edildiler.

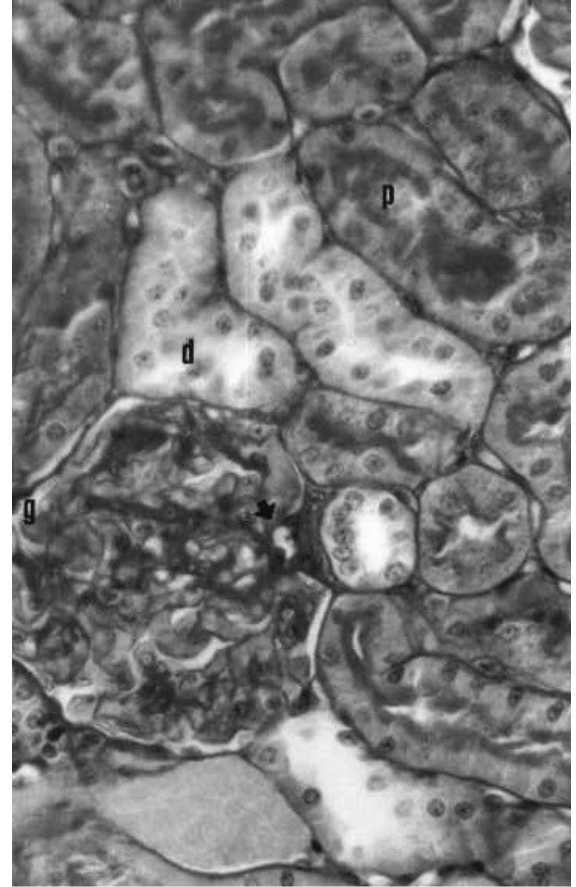
Fruktoz grubu (n=5): 8 hafta boyunca standart sıçan yemi ve içme sularına %10 D-fruktoz katılarak beslendiler. 8. haftanın sonunda kan şekeri 150mg/dl üzerinde olanlar çalışmaya dahil edildiler.

Deney süresi sonunda dekapitasyonla öldürülen sıçanların sol böbrekleri Bouin solusyonunda tespit edilerek, rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitler hematoxilen-eozin, periyodik asid Schiff - hematoxilen (PAS-H) , anti laminin boyamaları ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendiler.

BULGULAR

Kontrol grubunda böbrekler normal histolojik görünümde izlendiler (Resim 1).

Şekil 1: Kontrol grubu sıçanda normal histoloji. Glomerül (g), proksimal tubül (p), distal tubül (d), arteriol (ok).. PAS-H, X132.

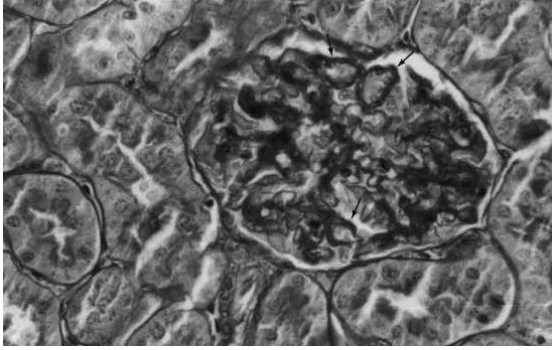


STZ ve fruktoz gruplarında kortekste histolojik değişiklikler izlendi. Her iki grupta da glomerül

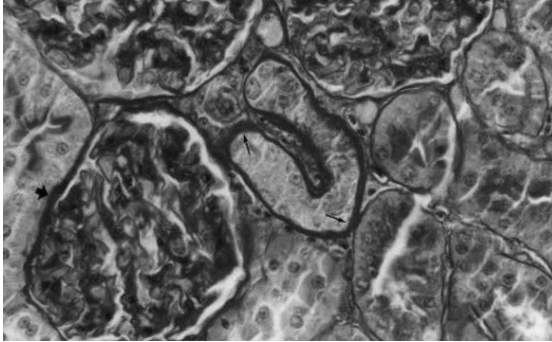
Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler#

kapiller bazal membranında kalınlaşma, mezengial matriksde artış görüldü. Bazı glomerüllerin Bowman kapsülü pariyetal yaprağında kalınlaşma ve nadiren tubül bazal membranında kalınlaşma izlendi (Resim 2,3). Fruktoz grubunda bu bulgulara ek olarak arteriollerde kalınlaşma izlendi (Resim 4).

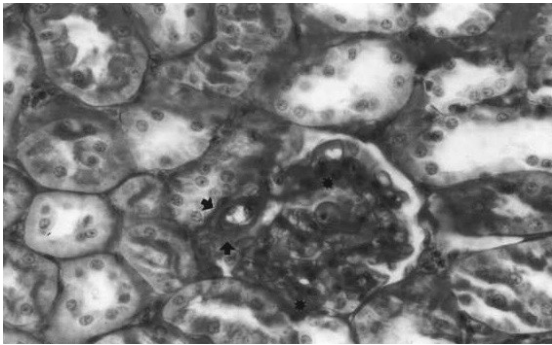
Şekil 2: STZ grubu sıçanda glomerül kapiller bazal membranda kalınlaşma (ok). PAS-H, X132.



Şekil 3: STZ grubu sıçanda Bowman kapsülü pariyetal yaprağında (kalın ok), ve tubül bazal membranında kalınlaşma (ince ok). PAS-H, X132.



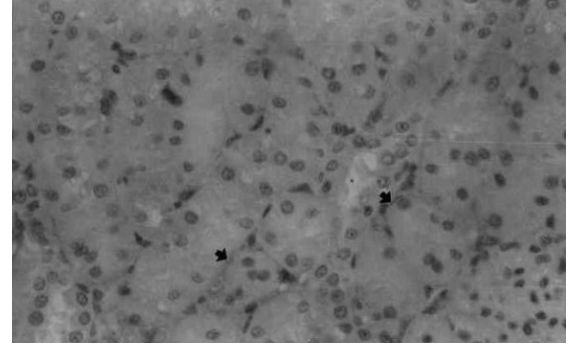
Şekil 4: Fruktoz grubu sıçanda arteriollerde kalınlaşma (ok) ve mezengial matriksde artış (yıldız). PAS-H (132).



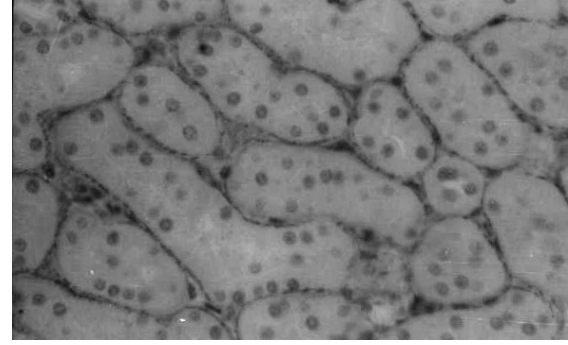
Kontrol grubunda anti-laminin immün boyaması ile tubül bazal membranında ve tubüller arasındaki interstisyel bağ dokuda hafif bir pozitif boyanma izlendi (Resim 5). STZ ve fruktoz gruplarında ise anti-laminin immün boyaması ile tubül bazal

membranında ve tubüller arasındaki interstisyel dokuda kuvvetli pozitif boyanma gözlemlendi. Özellikle STZ grubunda pozitif boyanma daha belirgindi (Resim 6,7).

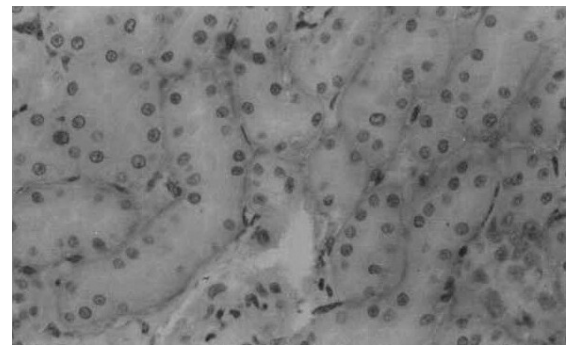
Şekil 5: Kontrol grubu sıçanda anti-laminin immün boyaması ile tubül bazal membranı (ok). X132.



Şekil 6: STZ grubu sıçanda anti-laminin immün boyaması ile tubül bazal membranı belirgin pozitif boyanma gösteriyor. X132.



Şekil 7: Fruktoz grubu sıçanda anti-laminin immün boyaması ile tubül bazal membranı zayıf pozitiflik gösteriyor. X132.



TARTIŞMA

İnsanlarda diyabetin başlamasından itibaren 1-2 yıl içinde diffüz glomerüloskleroz gelişmektedir. Diyabetik glomerüloskleroz batı dünyasında kronik böbrek yetmezliklerinin % 30'undan sorumludur.⁶

Diffüz glomerüloskleroz mezengial hücre proliferasyonu ile birlikte PAS (+) mezangial matriksde artışla karakterizedir. Beraberinde kapiller bazal membranında kalınlaşma da izlenir. Glomerüloskleroz ilerledikçe tubüler iskemi ve interstisyel fibrozis de gelişir. Glukozürisi kontrol altına alınamayan hastalarda glukoz geri emilerek tubül epitelinde glikojen olarak depolanabilir.¹ Osterby ve ark.⁷ insanlarda tip 1 diyabete bağlı olarak mezengial matriks hacminde belirgin bir artış gözlemişlerdir. Laboratuvar hayvanlarında deneysel olarak oluşturulan tip 1 diyabette de benzer bulgulara rastlanmıştır. Özcan ve ark.⁸ alloksan ile sıçanlarda oluşturdukları tip 1 diyabet sonrasında glomerüler skleroz, intraglomerüler mezangial hücre artışı, tubüler atrofi, dilatasyon ve vakuoler dejenerasyon izlemişlerdir. İnce yapı incelemelerinde ise glomerüler bazal laminada fokal kalınlaşmalar gözlemişlerdir. Sanai ve ark.³ streptazotosin ile tip 1 diyabet oluşturdukları sıçan böbreklerinde glomerül mezengiumunda ve intersitisyel alanlarda artış, tubüler vakuolizasyon izlemişlerdir. Biz çalışmamızda streptozotosin ile diabetik yaptığımız sıçanların böbreklerinde PAS (+) mezengial matriksde artış, kapiller bazal membranda kalınlaşma, Bowman kapsülü pariyetal yaprağında kalınlaşma izledik. Tubüllerde ise dilatasyon, vakuolizasyon ve atrofi izlenmedi. Nadiren tubül bazal membranlarında kalınlaşma izlendi.

Çalışmamızda anti-laminin ile yapılan immunohistokimyasal boyamada tubül bazal membranlarının streptazotosin uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha kuvvetli pozitif boyandığı izlendi. Ancak glomerül bazal membranında önemli bir değişiklik izlenmedi. Brees ve ark.⁹ streptazotosin verdikleri sıçanların glomerül bazal membranında laminin ve fibronektin artışı izlemişlerdir.

Tip 2 diyabetin fizyopatolojisini taklit ettiğimiz grupta ise böbreklerde tip 1 diyabetik grupla benzer bulgular elde edilmiştir. Bu grupta arteriol duvarındaki kalınlaşma daha belirgin olarak izlenirken anti-laminin ile tubül duvarındaki pozitif boyanma tip 1 diyabetik gruba göre daha az izlendi. Essawy ve ark.¹⁰ White ve ark.¹¹ çalışmalarında tip 1 ve tip 2 diyabeti olan hastaların böbreklerinde benzer nefropatik değişiklikler izlemişlerdir.

Çalışmamızda sıçan böbreklerinde izlediğimiz değişiklikler hipergliseminin böbrek üzerinde gösterdiği direkt veya indirekt etkilerin (protein glukozilasyonu) sonucu olarak gelişmektedir.³ Bulut ve ark.⁴ tavşanlarda, Sanai ve ark.³ sıçanlarda insülin verilmesiyle böbrek hasarının azaldığını gözlemişlerdir. Bu bulgular oluşan böbrek hasarının hiperglisemiye bağlı olarak geliştiği ihtimalini

kuvvetlendirmektedir. STZ' nin böbreklerde direkt olarak toksik etki gösterebileceği de düşünülmüştür. Sanai ve ark.³ STZ verildiği halde diyabet gelişmeyen sıçanlarda böbrek hasarının da gelişmediğini gözlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da fruktoz grubu sıçanlara STZ verilmediği halde, STZ grubu ile benzer böbrek bulguları elde edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, deneysel tip 1 ve tip 2 diyabetin sıçan böbreklerinde özellikle bazal membranlarda kalınlaşmaya neden olduğunu gözledik. Etkilenen bazal membranlar içinde glomerül kapiller epitel, Bowman kapsülü pariyetal yaprağı ve tubüllerin bazal membranı bulunmaktaydı. Fruktoz grubunda arteriollerde de kalınlaşma izlendi. Her iki tip deneysel diyabette benzer bulgular olduğu ve bu bulguların muhtemelen hipergliseminin oluşturduğu direkt ve/veya indirekt etkilere bağlı olarak geliştiği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- 1) Crawford JM, Cotran RS, The Pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. eds. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, WB Saunders Com. 1999;913-23.
- 2) Berg UB, Torbjörnsson TB, Jaremko G, Thalmé B. Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. Diabetologia 1998;41:1047-56.
- 3) Sanai T, Sobka T, Johnson T, El-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, Oldroyd S, El Nahas AM. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. Diabetologia 2000;43:91-100.
- 4) Bulut HE, Onarhoğlu B, Kaloğlu C, Özdemir O, Ayan S. Effects of experimental diabetes and insulin treatment on rabbit renal morphology: a quantitative and qualitative study. Turk J Med Sci 2001;209-216.
- 5) Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 2000;279:R1334-40.
- 6) Porter KA. The Kidneys in Metabolic Disorders. In: Systemic Pathology, vol 8, St. C. Symmers W (ed), Churchill Livingstone, 1992;330-331.
- 7) Osterby R, Bangstad HJ, Nyberg G, Rudberg S. On glomerular structural alterations in type-1 diabetes. Companions of early diabetic glomerulopathy. Virchows Archiv 2001;438(2):129-135.
- 8) Özcan O, Karaöz E, Kükner A, Dağdeviren A. Sıçanlarda alloksanın neden olduğu diyabet mellitusda böbrekte ince yapı değişiklikleri. GATA Bülteni 1992; 34:747-758.
- 9) Brees DK, Hutchison FN, Cole GJ, Williams JC Jr. Differential effects of diabetes and glomerulonephritis on glomerular basal membrane. Proc Soc Exp Biol Med 1996; 212(1):69-77.
- 10) Essawy M, Söylemezoğlu O, Muchaneta-Kubara EC, Brown CB, El Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1997;12:43-50.
- 11) White KE, Bilous RW. Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural functional relationship that are similar to type 1 disease. J Am Soc Nephrol 2000;11:1667-73.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Feral Öztürk
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Embriyoloji-Histoloji AD,
44280 Malatya.
E-posta : fozturk@inonu.edu.tr
Tel : 422 341 0660-1305
Faks : 422 341 0036