

ÜRİK ASİT VE KALSİYUM OKZALAT KRİSTALLERİNİN BÖBREK TÜBÜL EPİTEL HÜCRELERİNE APOPTOZİS ETKİLERİ*

Dr. Ömer Levent TUNCAY, Dr. Mantu GUPTA,
Dr. Arthur D. SMITH

Department of Urology, Long Island Jewish Medical Center, New Hyde Park, NY-USA

- ✓ Kalsiyum okzalate ve ürik asit kristalleri böbrek tübül epitel hücreleri tarafından endositoz yoluyla alınır. Çalışmada bu kristallerin böbrek tübül epitel hücrelerinde kristallerin tübül lümene ve interstisyuma salınmasına neden olabilecek programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) arttırıcı etkileri araştırıldı. Opossum proksimal tübül epitel hücreleri RPMI besiyerinde üretildikten ve 48 saat üremeleri durdurulduktan sonra 10 µgr/ml ürik asit ve 10 µgr/ml kalsiyum oksalat kristalleri ile 24 saat muamele edildi ve sonra 48 saat süre ile büyümeleri durduruldu. Ürik asit ve kalsiyum oksalat monohidrat kristallerinin böbrek tübül epitel hücrelerinde apoptozisi arttırdığı sonucuna varıldı. Apoptozisin artması böbrekte interstisyel kristal salınması ile skarlaşmayı, ayrıca tübül lümene kristallerin salınması ise yeni taş oluşmasını açıklamaktadır.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, böbrek tübül hücresi, üriner taşlar, kalsiyum okzalate, ürik asit,

- ✓ **Renal Tubular Cells Undergo Apoptosis When Exposed to Uric Acid and Calcium Oxalate Crystals**

Calcium oxalate monohydrate crystals (COMC) and uric acid crystals (UAC) are endocytosed by renal tubular epithelial cells (RTEC). We studied whether these crystals could also induce programmed cell death (apoptosis) which may cause release of endocytosed crystals either into the tubular lumen or into the interstitium. RTEC from the opossum proximal tubule (OK cells) were grown in RPMI media until subconfluent, growth arrested for 48 hours, and incubated with 10 µgr/ml COMC and 10 µgr/ml UAC for 24 hours. We concluded that COMC and UAC induce apoptosis of RTEC. This may be of pathogenetic importance not only for interstitial scarring (release into interstitium) but also for crystal growth and stone formation (release into tubular lumen).

Key words: Apoptosis, renal tubular cell, urinary calculi, calcium oxalate, uric acid.

GİRİŞ

Büyüme, farklılaşma ve ölüm bir hücrenin yaşam döngüsünün temel unsurlarıdır. Hücre ölümü, patolojik (nekroz) ya da fizyolojik (apoptoz) süreçler sonunda gerçekleşir. Birçok canlı türü apoptozis yolu ile yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak homeostazın sürdürülmesini sağlar. Apoptozis programlanmış hücre ölümüdür⁽¹⁾. Apoptozis hücresel birçok gen ve gen ürününün aktivasyonu ve karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Hücre ölümü şekli olarak apoptozis

uzun yıllardan beri bilinmektedir, ancak koagülasyon nekrozundan farklı, özgün ve önemli bir hücre ölüm şekli olarak değerlendirilmesi son yıllarda olmuştur. Apoptozis birçok fizyolojik olaylarda özellikle sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre azaltılmasında rol oynar. Canlılarda en çok yenilenen hücre gruplarından birisi de böbrek tübül epitel hücreleridir. Çalışmada böbrek tübül epitel hücrelerini çeşitli konsantrasyonlarda kalsiyum okzalate ve ürik asit kristalleri ile etkileştirerek apoptozisin gelişmesini izledik.

*: AUA Ninety-first annual meeting, Orlando-1996'da sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada *opossum* proksimal tübül epitel hücrelerinden hazırlanan hücre kültürleri kullanıldı. Böbrek tübül epitel hücreleri toplam 24 adet ayrı RPMI besiyerlerinde

ve İAK ile muamele edilen hücrelerde apoptozis sayısının kontrollere göre fazla olduğu görüldü. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Sonuçlar Tablo I'de gösterilmektedir.

Tablo I. Gruplarda Apoptozis Gösteren Hücre Sayıları ($\times 10^4$ Hücre/ml, Ortalama \pm Standart Hata).

10 $\mu\text{g/ml}$ KOMK	Kontrol	10 $\mu\text{g/ml}$ ÜAK	Kontrol
23.1 \pm 4.7	9.5 \pm 1.7	40.2 \pm 2.4	8.6 \pm 0.5

üretildikten sonra 48 saat süre ile büyüme-leri durduruldu. Daha sonra kontrol (n=6) grupları da oluşturarak 10 mikrogram/mililitre (10 $\mu\text{gr/ml}$) kalsiyum okzalat monohidrat (KOMK) (n=6) ve (10 $\mu\text{r/ml}$) ürik asit kristalleri (ÜAK) (n=6) ile muamele edildi. Yirmi-dört saat süre ile kristallerle muamele edilen tübül epitel hücreleri daha sonra kontrol grupları ile beraber hücre ölümü ve apoptozis varlığının araştırılması için boyanarak sayıldı. Hücre kültürü hücre ölümünün görüntülenmesi için Tripan mavisi ile boyandı ve ışık mikroskopu altında sayım yapıldı. Tripan mavisi hücre membranından girerek hücreleri boyayan ve apoptozis dışında diğer sebeplerle ölen hücreleri boyayan bir boyadır. Akridin Orange fragmanete olmuş hücre çekirdeklerini boyayan ve apoptozis için belirleyici olan bir boyadır. Apoptozis için hücreler Akridin Orange ile boyanarak faz kontrast mikroskopta sarı filtre altında incelenerek apoptotik hücreler sayıldı. Çalışma üç kez tekrarlanarak bu konuda deneyimli patoloğlardan yardım istendi. Sonuçlar ortalama \pm SE şeklinde hesaplanarak student-t testi ile analiz edildi.

BULGULAR

Tripan mavisi ile boyama sonuçları kontrol olarak yapıldığından sonuçları değerlendirmeye dahil edilmedi. Sadece apoptozis sayımları kontrolleri ile karşılaştırıldı. KOMK

TARTIŞMA

Böbrekler canlılarda regulasyon fonksiyonlarını yaparken dolaşımında bulunan kalsiyum, oksalat, fosfor gibi maddeleri kalsiyumun erimeyen tuzları haline getirerek vücut dışına atarlar. Aynı zamanda metabolik son ürünlerden birisi olan ürik asit de ileri derecede erimeyen bir bileşik halinde idrarla atılmak zorundadır. Böbrekler bu fonksiyonları yaparken artmış idrar atımı ile bu maddelerin idrarda kristal oluşturmalarını engellerler. Ancak bazı kişilerde metabolik son ürünlerdeki artış, farklı diyet alışkanlıkları bu maddelerin idrarda kristal oluşturmalarına sebep olur. Normal kişilerde ise bazı durumlarda azalmış hidrasyon supersaturasyon sonucu kristal agregasyonuna sebep olabilir. Klinik hasta takibi sırasında genellikle önemsenmeyen idrar tetkikinde görülen kristal atımı yaptığımız in-vitro araştırma sonuçlarına göre aslında ciddi böbrek hasarlarına neden olabilecek bir klinik tablo oluşturabilmektedir.

Taş oluşumunu açıklayan iki görüş mevcuttur. Taş oluşumu ile ortaya atılmış iki hipotezden birisinde taşın böbrek tübüllerinin içinde olduğu savunulmaktadır. Diğer hipotez ise taşların tübül epitel hücrelerinin içinde oluşup tübül lümenine salındığını belirtmektedir. Birinci teoriye göre taş

oluşmasının ilk aşamasında kristal agregasyonu oluşmakta, daha sonra kristaller böbrek tübül epitel hücrelerinin epitelyal yüzeylerine yapışmaktadırlar. Lieske ve arkadaşları kalsiyum okzalat monohidrat kristallerinin tübül epitel hücrelerinin apikal yüzlerine yapışmaları sonucu taş oluşumunun başladığını belirtmişlerdir⁽²⁾. Yine aynı çalışmada kalsiyum okzalat monohidrat moleküllerinin tübül lümenine yapışmalarında idrardaki makromoleküler maddelerin etkisinin olduğu belirtilmiştir. Reise ve arkadaşları ise kalsiyum okzalat monohidrat kristallerinin hücre membranındaki bazı proteinlerin etkisi ile tübül lümenindeki çok özel reseptörlere bağlandığını belirtmişlerdir⁽³⁾.

Taş oluşmasını açıklayan diğer görüşte ise böbrek tübül epitel hücresi içinde oluşan kristallerin tübül lümenine salınması ile taş oluşumunun tetiklendiği belirtilmektedir. Boeve ve arkadaşları etilen glikol ve amonyum klorit verilmiş farelerde okzalat kristallerinin hücre içinde oluştuğunu göstermişlerdir⁽⁴⁾. Çalışmaları sonucu kristal ve taş oluşumunun tübül epitel hücrelerinin içinde gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca in-vitro hücre kültürlerinde yaptığımız çalışmalarda kalsiyum okzalat ve ürik asit kristallerinin böbrek tübül epitel hücreleri içine endositoz yoluyla alındığını görmüştük. Bu bilgiler ışığında kristallerin tübül epitel hücrelerinin içinden çıkarak lümenine salındığını bilerek bu çalışmayı yaptık. Çalışmamızın sonuçları tübül hücresi içinde oluşan kristallerin taş oluşumuna sebep olmasa da apoptozisi indüklediğini gösterdi. Programlanmış hücre ölümünde meydana gelen artma kristallerin lümen içine ve intertisyel alana salınmasına sebep olacaktır. Lümen içine salınacak kristaller yeni taş oluşmasına neden olacak, intertisyel alana atılan kristaller ise fibroze

sebepe olacaktır. Böylece çoğu zaman önemsenmeyen taş öncesi uyarı olarak anladığımız kristalürinin aslında toplayıcı sistemde obstrüksiyon oluşturmadan da böbrek parenkimi için zararlı etkileri olabileceği sonucu çıkarılabilir. Bu durumda, tekrarlayan kristalürili hastaların taş oluşumu olmadan mutlaka tedavi edilmeleri gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızın in-vivo planlanan devamında ise obstrüksiyon varlığında ve yokluğunda meydana getirilen kristalüri sonucu apoptozis oranlarının karşılaştırılması yapılacaktır. Böylelikle sadece obstrüksiyonun böbreklere zararlı olmadığı aynı zamanda kristal atımının da zararlı olabileceği sonucu doğrulanmaya çalışılacaktır.

Geliş tarihi: 03.06.1996

Yayına kabul tarihi: 16.06.1997

Yrd.Doç.Dr. Ömer Levent Tuncay
Pamukkale Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı
P.K. 66,
20100 Denizli

KAYNAKLAR

1. Kennedy WA, Stenberg A, Lackgren G, et al. Renal tubular apoptosis after partial ureteral obstruction. *J Urol* 1994; 152: 658-64.
2. Lieske JC, Swift H, Martin T, et al. Renal epithelial cells rapidly bind and internalize calcium oxalate monohydrate crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6987-6991.
3. Reise R, Mandel N, Wiessner J, et al. Cell polarity and calcium oxalate crystal adherence to cultured collecting duct cells. *Am J Physiol* 1992; 262: F177-F184.
4. Boevé ER, Ketelaars GAM, Vermeij M, et al. An ultrastructural study of experimentally induced microliths in rat proximal and distal tubules. *J Urol* 1993; 149: 893-899.