

Yeni Doğan Streptozotosin Diyabetik Nefropatide İsradipin'in TGF-β1 ve Tip IV Kollajen Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Matem TUNÇDEMİR¹, Fatma KAYA DAĞISTANLI¹, Melek ÖZTÜRK¹

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Bu çalışmada; kalsiyum kanal blokleri olan isradipin'in Tip II diyabetine uygunluk gösteren yeni doğan sıçan streptozotosin (YD-STZ) diyabet modelinde renal fonksiyonlar ve glomerulun yapısal değişimleri üzerine etkilerini incelendi. Yeni doğan wistar türü albino sıçanlardan 4 grup oluşturuldu. 1. ve 2.gruba; doğumu izleyen 2.günde STZ (100 mg/kg, i.p, tek doz) uygulandı. 1.grup;YD-STZ diyabetik kontrol grubu olarak ayrıldı. 2.gruba; 12.haftadan itibaren İsradipin (5 mg/kg/gün, 6 hafta, i.p.) uygulandı. 3.grup; diyabetik olmayan sağlıklı sıçanlara 12. haftadan itibaren isradipin (5 mg/kg/gün, 6 hafta) uygulandı. 4.grup; sağlıklı kontrol grubu olarak ayrıldı. Çalışma süresince tüm gruplardaki hayvanların kan glukoz düzeyi ölçümleri, vucut ağırlık ölçümleri ve mikro-albüminüri düzey ölçümleri yapıldı. Böbrek doku kesitlerine Periodik Asit Schiff boyaması ve TGF-β1, tip IV kollajen antikorlu ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. İsradipin uygulanan diyabetik grubun kan glukoz düzeylerinde belirgin düşme saptandı. Diyabetik gruba kıyasla tedavili diyabetiklerde mikro-albüminüri düzeylerinde anlamlı azalma saptandı. Böbrek ağırlıkları; diyabetik grupta, sağlıklı kontrol gruba kıyasla artış gösterirken, tedavili diyabetik grupta azalma saptandı. Tedavisiz diyabetik grubun diğer gruplardan daha büyük boyutta glomeruller içerdikleri saptandı. Diyabetiklerde glomerul ve tubullerde bazal membran kalınlaşması, belirgin mezangiyal matriksi ve hücre artışı gözlemlendi. YD-STZ diyabetiklerde glomerul membran kalınlaşması, TGF-β1 ve tip IV kollajen immünreaktivitesinde artış gözlemlendi. İsradipin uygulanan diyabetik gruptaki TGF-β1 ve tip IV kollajen immünreaktivitesi sağlıklı kontrol grubuna benzerdi. İsradipin'in kullanılan doz ve sürede, bu diyabet modelinde renal doku hasarını önlemede yetersiz olduğu, ancak kan glukoz ve mikro-albüminüri düzeylerinin azaltarak diyabetik nefropatinin ilerlemesini yavaşlattığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Yeni doğan-STZ diyabeti, böbrek, tip IV kollajen, TGF-β1, isradipin, streptozotosin

Cerrahpaşa Tıp Derg 2007; 38: 152 - 158

The effects of isradipine on TGF-β1 and type IV collagen expression in neonatal streptozotocin diabetic nephropathy **Abstract**

The effects of isradipine on TGF-β1 and type IV collagen expression in neonatal STZ diabetic nephropathy In this study, the effects of isradipine as a calcium channel blocker, on glomerulus structural alterations and renal functions were examined in the neonatal streptozotocin diabetes (n-STZ) model. We used 4 groups of newborn Wistar rats. On the 2nd day of birth after STZ (100 mg/kg) injection to the 1st and 2nd group, isradipine (5 mg/kg, i.p) was administered to the 2nd group for 6 weeks from 12 weeks on. The 3rd group was isradipine treated (5 mg/kg, i.p., from 6 weeks to 12 weeks) control group and the 4th group was healthy control. During the period of the experiment, blood glucose levels, body weight and microalbuminuria level of the rats were measured. Kidneys were weighted. Tissue sections were immunostained using monoclonal type IV collagen and TGF-β1 antibodies. The blood glucose levels were markedly decreased in the isradipine treated controls. Microalbuminuria levels were decreased in treated diabetics compared to diabetic group. Kidney weights were increased in n-STZ diabetics when compared to non-diabetics. Glomeruli dimensions of n-STZ diabetics were increased in comparison to nondiabetic control group. In the isradipine treated diabetic group the larger glomeruli were observed according to the nondiabetic group. Basal membrane thickening in glomerulus and significant increase in mesangial matrix and mesangial cells and an increased type IV collagen and TGF-β1 expression in n-STZ diabetics were observed. In the isradipine treated groups type IV collagen and TGF-β1 immunoreactivity in glomerulus were seen to be similar to nondiabetic controls. Our results show that isradipine could be effective in delaying the progression of nephropathy by decreasing microalbuminuria and blood glucose levels but it didnot completely improved renal morphology.

KeyWords: Neonatal-STZ diabetes, kidney, type IV collagen, TGF-β1, isradipine, streptozotocin

Cerrahpasa J Med 2007; 38: 152 - 158

Alındığı Tarih: 20 Kasım 2007

Yazışma Adresi (Address): Dr. Matem TUNÇDEMİR,
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı
34098 Cerrahpaşa - İstanbul
E-posta: tmatem@istanbul.edu.tr

Diyabetes mellitus (DM) böbrekte ciddi morfolojik ve fizyopatolojik değişikliklere neden olan bir hastalıktır [1, 2]. Renal hipertrofi ve hiperfiltrasyon DM'un uzun dönemli komplikasyonlarından biri olan diyabetik nefro-

pati için karakteristik olan erken değişimlerdendir [3]. Nefropatinin ilerleyen dönemlerinde albumin atılım oranında artış, mezangiyal proliferasyon, glomerül mezangiyumunda hücrelerarası matris elemanlarının birikmesi, glomerül ve tubül bazal membranlarının kalınlaşması ile glomeruloskleroz gelişir [4]. Belirgin nefropati klinik olarak proteinüri, hipertansiyon ve ilerleyici renal yetmezlik ile karakterizedir [5]. Glomerül hemodinamiğindeki ciddi değişimlerin sonucu ortaya çıkan mikroalbuminüri ise diyabetli hastalarda renal hasarların erken belirtecidir [6]. Diyabette hücreler arası matris elemanlarının birikiminin patogeneze yönelik araştırmalarda, TGF-β1'in hücreler arası matris proteinlerinin sentezini uyararak diyabetik nefropati gelişimine katıldığı gösterilmiştir [7]. Böbrek dokusunda tip IV kollajen değişimleri ve diyabetik nefropatinin ilerlemesi arasında belirgin bir ilişki olduğu belirtilmektedir [8, 9]. Diyabetik renal tutulumun engellenmesi için ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inhibitörleri ve kalsiyum kanal blokerleri (KKB) gibi çeşitli antihipertansif ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11, 12]. Diyabetik renal hastalık çalışmalarında renin-angiotensin sistem (RAS) blokajının renoprotektif etkisinin sonucu olarak glomerulde ve tubulointerstyumda TGF-β1'in aşırı ekspresyonunun kontrol altına alındığı gösterilmiştir [13, 14, 15].

Diyabet ve komplikasyonlarının araştırılmasında çeşitli deneysel modeller kullanılmaktadır [16, 17]. Tip II diyabetine en yakın model olarak geliştirilen "yeni doğan STZ (YD-STZ) diyabet modeli" nde yeni doğan sıçanlara doğumu izleyen 1. ile 5. günler arasında, diyabetojenik ajan STZ tek doz olarak enjekte edilerek β hücrelerinin haraplanması hedeflenmektedir. Yeni doğan sıçanların β hücrelerinde 10 -20. günlerde hızlı bir regenerasyonun gerçekleştiği gözlenmiş, yetişkin dönemde neogenezin sınırlı olarak devam ettiği gösterilmiştir [18, 19].

Bu çalışmada kalsiyum kanal blokeri olan isradipin'in YD-STZ diyabet modelinde, böbrek dokusu üzerine koruyucu etkilerinin olup olmadığını, TGF-β1 ve kollajen ekspresyonlarını immünohistokimyasal olarak karşılaştırmalı incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, yeni doğan sıçanlardan oluşan 4 deney grubu oluşturuldu. Doğumu izleyen 2.günde 1.ve 2.gruba streptozotosin (STZ, Sigma, St. Louis, MO) 100 mg/kg, serum fizyolojik ile sulandırma, intraperitoneal (i.p) yolla tek doz uygulandı. 1.grup yeni doğan STZ diyabetik grup olarak ayrıldı (n=7). 2.gruba 12.haftadan itibaren serum fizyolojik ile sulandırılan 5 mg/kg dozunda İsradipin (Dynacirc, Sandoz, İsviçre) 6 hafta süre ile her gün i.p olarak uygulandı (n=9). 3.gruptaki diyabetik olmayan sağlıklı sıçanlara 12. haftadan itibaren 6 hafta hergün 5 mg/kg dozunda İsradipin i.p. olarak uygulandı (n=9). 4.grup diyabetik olmayan sağlıklı kontrol grubu olarak ayrıldı.

12.haftadan itibaren yalnızca serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) i.p. uygulandı (n=7). Laktasyonun sona ermesinden sonra aynı gruba ait yavru hayvanlar 6.haftada cinsiyetleri tayin edilerek dişi ve erkek sıçanlar ayrı kafeslere alındılar. Hayvanlar içinde % 21 protein bulunan sıçan yemleriyle serbest olarak beslendiler. Her gün taze içme suyu verildi. 18. haftanın sonunda eter anestezisi altında sakrifiye edilen hayvanlardan alınan böbreklerin ağırlıkları ölçüldükten sonra, Bouin fiksatifinde tespit edilip, parafine gömüldü. Kan glukoz, Vücut ağırlığı: Deney süresince tüm grupların haftalık kan glukoz değerleri ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Deney hayvanları bir gece öncesinden aç bırakıldılar ve ertesi sabah kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinden kan glukoz düzeyi ölçümleri glikostiksler kullanılarak glukometre ile yapıldı (Glukostix, Bayer, Ames Glucometer II Model 5550).

Mikro-albüminüri: 6.,12. ve 18. haftalarda tüm gruplardaki hayvanlardan her biri bir gece öncesinden metabolizma kafeslerine alındı ve 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Toplanan bu idrardan mikral test ile (Micral-Test II, Böhringer-Mannheim, İstanbul) mikro-albüminüri düzeyleri ölçüldü. Mikro-albüminüri düzey ölçümünün değerlendirilmesi, kit uygulama klavuzuna uygun olarak, idrar içindeki stripin renk reaksiyonuna göre strip üzerinde bulunan aralıklardan 4 değer (50,<50, 20,<20 mg/l) belirlenerek yapıldı. Mikral test kiti içerisinde belirtilen <20-0 aralığı normal değer olarak kabul edildi.

Işık mikroskopi: Böbrek dokuları Bouin solüsyonunda tespit edilip rutin ışık mikroskopi takip yöntemleri kullanılarak parafine gömüldü. 3-5 µ kalınlığında alınan parafin kesitler Periodik Asit Schiff (PAS) boyası ile boyandı. İmmünohistokimya: PLL (poly-L-Lysine) kaplanmış lamlara alınan böbrek doku kesitlerine streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi [20] ile monoklonal tip IV kollajen antikoru (Collagen type IV (Ab-2) monoclonal, ALBIOCHEM, 1/50 sulandırma) ve poliklonal TGF β1 antikoru (ImmunoCruz TM Staining System, sc-146K:TGF-β1(V)K-Santa Cruz Biotechnology, predilüe) kullanılarak Zymed-Histostain SP Kiti (95-9943) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Böbrek ağırlığı: Deney bitiminde eter anestezisi altındaki hayvanların sağ böbrekleri çıkarıldı, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra ağırlık ölçümleri yapıldı.

Glomerul boyutu: PAS boyası yapılan böbrek kesitlerinde glomerül boyut ölçümü oküler mikrometresi (Beck Kassel, CBS, px8) ile X 40 objektif büyütmesi kullanılarak rastgele alanlardan seçilen 30 adet düzgün şekilli glomerül üzerinde çap ölçülerek yapıldı.

İstatistik: Çalışma süresince tüm gruplardaki hayvanların kan glukoz ve vücut ağırlık ölçümlerinin, çalışma bitiminde tüm gruplardaki hayvanlardan alınan böbreklerin ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirmesinde tek yönlü ANOVA ve çoklu grup kıyaslama testi kullanıldı. Mikro-albüminüri düzey ölçümünün istatistiksel değerlendirmesinde Bonferroni düzeltmesi kullanıldı [21].

BULGULAR

Kan Glukoz

6. haftada ölçülen başlangıç kan glukoz düzeyleri incelendiğinde YD-STZ diyabetik grupların (1. ve 2. grup) kan glukoz düzeyleri, STZ uygulanmamış sağlıklı hayvanlardan oluşan gruplardan (3. ve 4. grup) anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0.001$). 11.haftada diyabetik tüm gruplarda (1. ve 2. grup) 6.haftaya göre kan glukoz düzeylerinde belirgin bir düşüş gözlenirken, 12.hafta bu gruplara ait kan glukoz düzeylerinin diğer gruplara kıyasla artış gösterdiği saptandı ($p<0.001$). 18. haftadaki kan glukoz düzeyleri açısından YD-STZ diyabetik grup diğer gruplardan belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetik grubun kan glukoz düzeylerinin tedavisiz diyabetik gruba kıyasla daha düşük, kontrol gruba yakın olduğu saptandı (Tablo 1).

Vücut Ağırlıkları

Vücut ağırlık ölçümleri bakımından değerlendirilen tüm gruplarda, 18.haftaya kadar belirgin bir artış saptandı. YD-STZ diyabetik gruba ait sıçanların vücut ağırlıkları sağlıklı kontrol grubuna yakın bir artış gösterirken, isradipin uygulanan gruplarda (2. ve 3.gruplar) kilo artışı sağlıklı kontrol ve diyabetik kontrol gruplara göre daha az olarak saptandı (Tablo 2).

Mikro-albüminüri

Mikro-albüminüri ölçüm ve değerlendirmesinde; 6., 12., ve 18.haftalar için 3 kıyaslama kombinasyonu yapıldı. YD-STZ diyabetik grupta tüm ölçümlerde mikro-albüminüri düzeyi (50, <50) açısından bir değişim olmazken, isradipin uygulanan YD-STZ diyabetik grupta 2.periottan (50, <50) 3.periota (20, <20) geçişte mikro-albüminüri düzeylerinde anlamlı bir düşme saptandı ($p<0.001$). Diğer gruplar arasında mikro-albüminüri düzeylerinin değişimi açısından fark bulunmadı (Tablo 2).

Böbrek Ağırlıkları

YD-STZ diyabetik grubuna ait böbrek ağırlıkları tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 2).

Glomerül Boyutu

YD-STZ diyabetik grubun diğer tüm gruplardan daha büyük boyutta glomerüller içerdikleri saptandı ($p<0.001$) (Tablo 2).

Morfolojik Bulgular

Kontrol grubuna (Şekil 1A) kıyasla YD-STZ-diyabetik gruba ait böbrek kesitlerindeki en önemli bulgu glomerül bazal membran (GBM) kalınlaşması idi. Ayrıca glomerüller mezangiyal matrikstek ve hücrelerdeki artış, glomerüllerde segmental veya global bozulmalar ile çok sayıda hipertrofik glomerüller saptandı (Şekil 1B). İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetiklerde, diyabetik grupta yer yer glomerül ve

Tablo 1. Çalışma süresince tüm gruplara ait kan glukoz (mg/dL) değerlerinin istatistiksel analizi.

Grup	Kan Glukoz 6. hafta	Kan Glukoz 11. hafta	Kan Glukoz 12. hafta	Kan Glukoz 18. hafta
1 YD-STZ diyabetik (n=7)	214.71 ± 32.74 ^a	123.42 ± 38.50 ^c	210.14 ± 21.79 ^d	233.14 ± 34.06 ^f
2 YD-STZ diyabetik+isradipin (n=9)	224.44 ± 48.18 ^b	70.55 ± 10.39	190.33 ± 21.91 ^e	145.66 ± 41.39
3 İsradipin (n=9)	88.44 ± 11.75	90.11 ± 18.42	91.22 ± 24.03	82.88 ± 20.37
4 Sağlıklı Kontrol (n=7)	91 ± 6.16	86.85 ± 8.80	85.14 ± 6.61	71.14 ± 13.44

a, b : $p<0.001$ sağlıklı kontrol ve isradipin kontrol gruba kıyasla,

c, f ; $p<0.001$ diğer tüm gruplara kıyasla, d,e: $p<0.001$ sağlıklı kontrol ve isradipin uygulanan kontrol gruba kıyasla

Tablo 2. Çalışma sonunda (18.hafta) tüm gruplara ait vücut ağırlık (g), böbrek ağırlığı (mg), mikro-albüminüri (mg/L) ve glomerül çap(μ) değerlerinin istatistiksel analizi.

Grup	Vücut Ağırlığı	Böbrek Ağırlığı	Mikro-albüminüri	Glomerül Çap
1 YD-STZ diyabetik (n=7)	203.71 ± 10.7	901.43 ± 136.3 ^b	≤ 50 ^c	103.7 ± 8.8 ^d
2 YD-STZ diyabetik+isradipin (n=9)	183.22 ± 27.2	724.44 ± 201.13	≤ 20 ^e	100.2 ± 8.0
3 İsradipin (n=9)	174.11 ± 24.68	730.00 ± 66.33	< 20	82.0 ± 4.3
4 Sağlıklı Kontrol (n=7)	222.43 ± 18.1a	704.28 ± 134.6	< 20	85.0 ± 3.4

a; $p<0.001$; isradipin uygulanan YD-STZ diyabetik ve isradipin kontrol gruba kıyasla,

b, c, d; $p<0.001$; diğer tüm gruplara kıyasla,

e; $p<0.001$ YD-STZ diyabetik gruba kıyasla

tübül dejenerasyonlarına rastlanmasına rağmen sağlıklı kontrol grubuna benzer görüntüler de saptandı (Şekil 1C). İsradipin uygulanan diyabetik olmayan sıçan grubuna ait böbrek kesitlerinde ise glomerül yapısının düzgün olduğu gözlemlendi.

İmmünohistokimya

Tip IV kollajen: YD-STZ diyabetik sıçanlarda glomerul membranı ve mezangiyal matrikste Tip IV kollajen immünreaktivitesinde belirgin bir artış gözlenirken (Şekil 2 B), isradipin uygulanan YD-STZ diyabetik sıçanlarda glomerüllerde Tip IV kollajen immünreaktivitesinin YD-STZ-diyabetik gruba kıyasla daha zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 2C). İsradipin uygulanan diyabetik olmayan sıçan grubuna ait glomerüllerde Tip IV kollajen immünreaktivitesi sağlıklı kontrol grubuna yakın görüntüler içermekteydi.

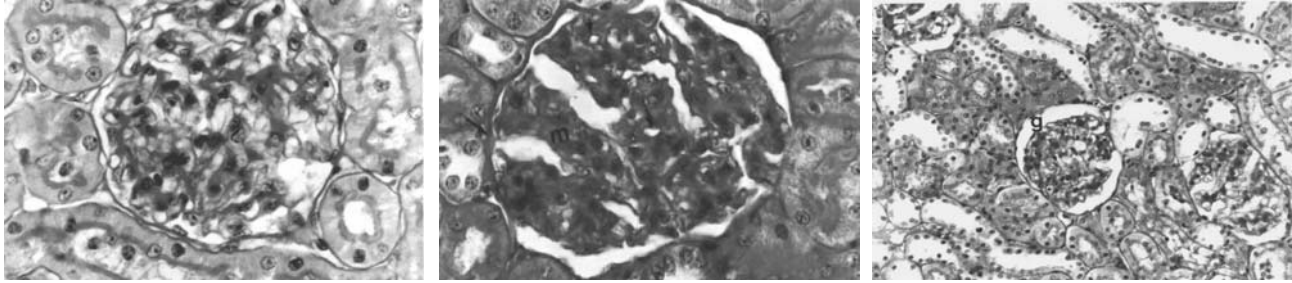
TGF-β1: Sağlıklı kontrol gruba ait böbrek dokularında TGF-β1 immünreaksiyonu glomerül içinde ve mezangiyal matrikste ayrıca tubül çevrelerinde, zayıf olarak gözlenirken (Şekil 3A), YD-STZ diyabetik gruba ait böbrek kesitlerinde glomerüllerde, tubül çevresinde ve interstisyel alanlarda şiddetli TGF-β1 immünreaksiyonu gözlemlendi (Şekil 3B). İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetik sıçanlarda glomerüllerde TGF-β1 immünreaktivitesi YD-STZ-diyabetik gruba göre daha zayıf gözlemlendi (Şekil 3C).

TARTIŞMA

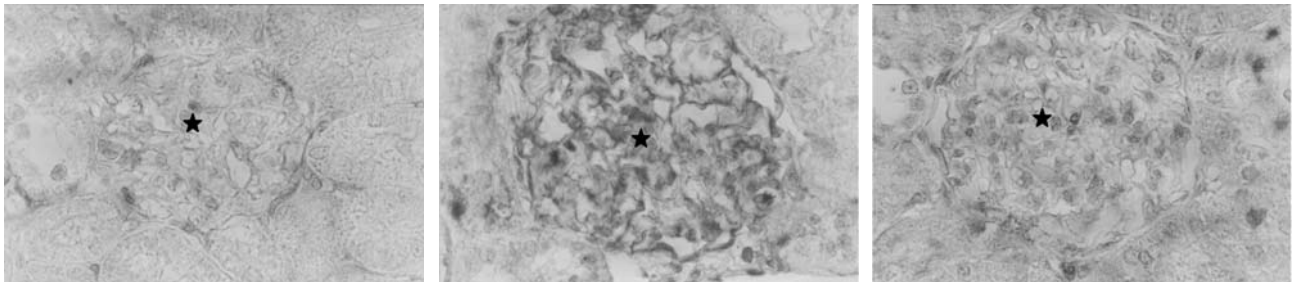
Diyabetin ciddi bir komplikasyonu olması nedeniyle diyabetik nefropatinin erken tanısı oldukça önemlidir.

Çalışmalarda; diyabetin erken dönemlerinde mezangiyal matriks birikimi ile ortaya çıkan matriks genişlemesi, diyabetin süresine ve şiddetine göre derecelendirilmiştir [22, 23]. STZ diyabetik hayvanlarda diyabetin erken döneminde hücreler arası matriks komponentlerinin (tip IV kollajen, fibronektin, laminin) sentezindeki artışta, hiper-gliseminin esas rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [7, 8, 14].

Tüm YD-STZ diyabetik gruplarda yüksek seviyelerde ölçülen kan glukoz düzeylerinde 11. haftada belirgin bir düşüş gözlenirken, 12. haftadan itibaren bu gruplara ait kan glukoz düzeylerinin tekrar artış gösterdiği saptandı. Bu çalışmada kullanılan YD-STZ diyabet modelinde, diyabetik gruplarda tespit edilen kan glukoz düzey verilerinin karakteristik olarak Tip II diyabet modeline uygun olduğu gözlemlendi [18, 19]. Tedavisiz YD-STZ-diyabetik grupta GBM kalınlaşması ile birlikte mezangiyal hücre artışı ve matriks birikimine bağlı olarak glomerül boyutlarında saptanan belirgin artış, diyabetik nefropatinin erken bulgusu olarak kabul edilen mikroalbüminüri tespiti ile de desteklenmiş oldu. Diyabetik nefropatinin başka bir önemli bulgusu da

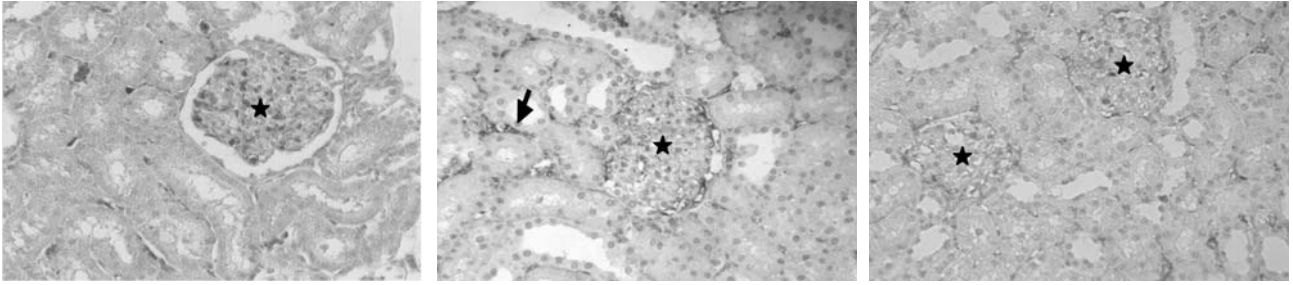


Şekil 1. Sağlıklı kontrol grubuna ait glomerül (g) (A). YD-STZ diyabetik gruba ait glomerül bazal membran, Bowman kapsülü bazal membran kalınlaşması (↑), mezangial matriks artışı (m) ve segmental glomerül görünümü (B). İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetik grupta kontrole yakın görünümdeki glomerüller (g) (C). (Boya: PAS+Hl) (A,B: X 100, C X 20).



Şekil 2. Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile monoklonal tip IV kollajen antikoru kullanılarak yapılan immün boyama ile, sağlıklı kontrol grubuna ait glomerüllerde (*) tip IV kolajen immünreaksiyonu zayıf olarak (A), YD-STZ diyabetik grup tip IV kollajen immünreaktivitesi özellikle glomerüllerde (*) belirgin olarak (B), İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetik sıçan grubunda glomerüllerde kontrole benzer (*) tip IV kollajen immünreaksiyonu (C) görülmektedir.

(Zıt Boya: Hematoksilin) (A, B, C: X 100)



Şekil 3. Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile poliklonal TGF- β 1 antikorunu kullanılarak yapılan immün boyama ile, sağlıklı kontrol grubunda ait glomerüllerde (*) ve tubullerde TGF- β 1 immünreaksiyonu zayıf olarak (A), YD-STZ diyabetik grup TGF- β 1 immünreaktivitesi özellikle glomerüllerde (*) ve interstisyel alanlarda belirgin olarak (B), İsradipin uygulanan YD-STZ diyabetik sıçan grubunda glomerüllerde kontrole benzer (*) TGF- β 1 immünreaksiyonu (C) görülmekte. (Zıt Boya: Hematoksilen) (A, B, C: X 20)

böbrek ağırlığında ve böbrek boyutunda meydana gelen artıştır. YD-STZ diyabetik gruba ait sıçanların böbrek ağırlıklarının sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin olarak arttığı, YD-STZ diyabetik gruba ait glomerüllerin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha büyük boyutta olduğu gözlemlendi. Bu bulgular diğer diyabet modellerinin bulguları ile uyumlu idi [2, 3, 4].

ACE inhibitörleri ve kalsiyum kanal blokerleri antihipertansif tedavi amacı ile klinik ve deneysel diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Farklı sınıflara ait antihipertansif ilaçların genel etkileri nefropatinin ilerlemesini ve idrar albümin atılımının önlenmesi üzerinedir [10, 11, 12, 24]. Deneysel diyabet çalışmalarında; kalsiyum kanal blokerlerinin doğrudan etkisinin, GBM'ı üzerine olduğu [10, 11], renal hasarın ilerlemesini geciktirdiği [5, 25] ancak tamamen önlemediği ayrıca proteinüriyi azaltıcı etkilerinin olduğu [26] yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Çeşitli kalsiyum kanal blokerleri, farklı tipte kalsiyum kanallarında (T tipi, L tipi) etkilidir ve genellikle glomerül içi basıncı azaltmaya yönelik etkilere sahiptirler. Diyabetik hastalarda nefropati gelişiminde kan basıncı ve albüminüri arasında ilişki kurulmuş, sadece kan basıncının düşürülmesi ile de renal fonksiyonun korunduğu bildirilmiştir [27, 28]. Dihidropiridin (nifedipin) ve dihidropiridin olmayan (isradipin, diltiazem, verapamil) kalsiyum kanal blokerleri arteriyel kan basıncını azaltıcı etkiye sahiptir. İsradipin'in albüminüriyi azaltıcı etkilerinin olduğu yapılan klinik çalışmalar ile belirlenmiş [29, 30], ancak nefropatide isradipin kullanımı ile morfolojik düzeydeki etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma YD-STZ diyabetinde yapılan ilk çalışma niteliğindedir.

Diyabetik nefropatinin erken morfolojik kanıtının mezangiyumda matriks komponentlerindeki artış olduğu bilinmektedir. Mezangiyal değişimlerin sonucu olarak fokal glomerüloskleroz ortaya çıkar. Çalışmalarda çeşitli antihipertansif ilaçların renal hastalığın ilerlemesinde morfolojik değişimler üzerine etkileri diyabetik hayvanlarda karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir ve farklı sonuçlar elde edilmiştir [25, 31, 32]. Anderson ve ark. [10], bir dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokeri olan nifedipin'in diyabetik

sıçanlarda glomerül hasarını önlemede yetersiz olduğunu ancak kan glukoz ve proteinüri düzeylerinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Gaber ve ark [31]; diltiazem benzeri (TA-3090) dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokeri ile fokal glomerülosklerozun ilerlemesinin, ACE inhibitörlerine oranla daha az düzeylerde azaldığını saptamışlardır. Mezangiyal matriks komponentlerindeki birikmenin her iki tedavi şeklinde de azaldığı gösterilmiştir. Uyguladığımız YD-STZ diyabet modelinde daha önce deneysel diyabetik nefropatide kullanılmamış uzun süre etkili dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokeri olan isradipin kullanarak böbrek ağırlıklarında YD-STZ diyabetik gruba kıyasla belirgin bir azalma saptandı ve bu grubun glomerül boyut ölçümlerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. Tedavili diyabetik grubun böbrek kesitlerinin morfolojik incelenmesinde, GBM'da ve kapiller bazal membranda kalınlaşmaların devam ettiği, mezangiyal matriks ve mezangiyal hücre artışına bağlı olarak hipertrofik görümlü glomerüllerin varlığı ile diffüz ve segmental glomerüloskleroz görülmesi isradipin'in böbrek morfolojisinde tam bir düzeltici etkisinin olmadığı gözlemlendi. Buna karşılık isradipin kullanımı sonucu mikroalbüminüri düzeylerinde diyabetiklere oranla anlamlı bir azalma bulunması diğer çalışmalar ile uyumluluk gösterdi [29, 32].

Diyabetik nefropatinin patogenezinde hiperglisemi, glikozillenmiş proteinler, hücre içi poliol, vazoaaktif hormonlar, sistemik ve glomerüler hipertansiyon, proteinüri, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi birçok aracı faktör karışmaktadır [7, 33, 34]. Diyabetik nefropatide plazma glukoz konsantrasyon artışı ile TGF- β 1 arasında ilişki olduğu belirtilmektedir [34]. Glukoz artışının neden olduğu enzimatik olmayan glikolizasyon, reseptörlerin veya hücresel düzenleyici proteinlerin yapısını değiştirerek TGF- β sentez veya biyoaktivitesini etkilemektedir. Kültür ortamında yüksek glukoz konsantrasyonlarının, mezangiyal hücreler ve proksimal tubül hücrelerinde TGF- β 1 mRNA ekspresyonunu artırdığı, tip IV kollajen transkripsiyonuna ve heparan sülfat proteoglikanın mezangiyal üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir [35, 36]. STZ diyabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda hipergliseminin başlangıcından sonra en erken

24 saat sonra glomerular TGF- β 1 mRNA'sında artış olduğu bildirilmektedir. Diyabetik sıçanlarda hızlı renal hipertrofi gözlenen safhada böbrekte TGF- β 1 ekspresyonundaki artış çalışmalarla kanıtlanmıştır [9, 13]. Böbrekte TGF- β 1 ekspresyonundaki artış diyabetik nefropati gelişimindeki renal değişimlerden sorumludur [36]. Sıçanlarda ilerleyici mezangiyoproliferatif glomerulonefritte ACE inhibitörü (cilazapril) ve angiotensin-1(AT-1) antagonisti (candesartan) kullanımının renal dokuyu hasara karşı koruduğu ve TGF- β 1 mRNA'sında ve protein düzeylerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur [15]. ACE inhibitörleri ve AT-1 antagonistlerinin renoprotektif etkilerini AT-1 reseptörleri aracılığıyla TGF- β ve matriks proteinlerin üretimini düzenleyerek yaptığı belirtilmektedir [7, 37]. Çalışmamızda YD-STZ diyabetik grubun glomerül ve interstisyel alanlarında artmış olarak gözlenen TGF- β 1 ekspresyonunun, bir kalsiyum kanal blokeri olan isradipin uygulaması ile belirgin olarak azaldığı saptandı. Bu bulgu ile kalsiyum kanal blokerlerinin de TGF- β 1 ekspresyonunu düzenleyici mekanizmalar üzerine etkileri olduğu gösterildi.

TGF- β , tip IV kollajen ve fibronektin üretiminin uyarımı sayesinde ekstrasellüler matriks birikimini artırır, bu artışta interstisyel fibrozis ve glomeruloskleroz ile sonuçlanır [8]. Tubulointerstisyel fibrozis hemen hemen tüm ilerleyici renal hastalıklarda tipik bir bulgudur. Diyabetik sıçanlarda histolojik anormalliklerin en belirgin olanı tubular dilatasyondur. Tubul epitel hücreleri ve çevredeki interstisyel hücrelerde tespit edilen tip IV kollajen ve TGF- β 1'in artmış ekspresyonu tubular dilatasyon ile ilişkilendirilmiştir [7]. Çalışmalarda tubulointerstisyel TGF- β 1 ve kollajenin aşırı ekspresyonu deneysel diyabetin oluşturulmasından sonraki ilk 4 hafta ile sınırlandırılmaktadır. Ihm ve ark. [38] STZ ile diyabetin oluşturulmasından sonraki 7. ve 28.günlerde sıçanların proksimal tubuluslarında tip IV kollajen ekspresyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Erensoy ve ark. [9]; tedavisiz diyabetiklerin böbrek dokularında gözlenen GBM kalınlaşması ve mezangiyal matriks genişlemesinin tip IV kollajen ve laminin ekspresyonundaki artış ile ilişkili olduğunu immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Gilbert ve ark. [7] diyabetik sıçanların böbrek dokusu peritubular bazal membranlarında tip IV kollajen immünreaktivitesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda YD-STZ diyabetik sıçanların böbrek dokusunda glomerül membranı ve mezangiyal matrikste tip IV kollajen ekspresyonunda belirgin bir artış gözlerken, isradipin uygulaması ile diyabetik sıçanların glomerüllerindeki tip IV kollajen ekspresyonu belirgin azalmıştır.

Isradipin'in kullanılan doz ve sürede, YD-STZ diyabet modelinde renal doku hasarını önlemede yetersiz olmasına rağmen, kan glukoz ve proteinüri düzeylerini azaltarak diyabetik nefropatinin ilerlemesini yavaşlattığı, bu renoprotektif etkisinin TGF- β 1 ve tip IV kollajen'in glomerular ekspresyonunun baskılanması yolu ile olduğu sonucuna varıldı.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan deney gruplarından elde edilen verilerin istatistik analizlerindeki yardımlarından dolayı Dr. Ömer UYSAL'a teşekkür ederiz. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Etkinliklere Katılımı Destekleme Programı (BEKADEP) tarafından B-788/2310200 nolu proje olarak desteklemiştir.

KAYNAKLAR

1. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin dependent patients. *N Eng J Med* 1984; 311:89-93.
2. Cortes P, Dumler F, Goldman J, et al. Relationship between renal function and metabolic alterations in early streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1987; 36: 80-87.
3. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, et al. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int* 1991;39:1176-1183.
4. Fujihara CK, Padilha RM, Zatz R. Glomerular abnormalities in Long-term experimental diabetes. *Diabetes* 1992; 41; 286-293.
5. Bakris GL, Smith A. Effects of sodium intake on albumin excretion in patients with diabetic nephropathy treated with long-acting calcium antagonists. *Ann Intern Med* 1996;125: 201-204.
6. Gambaro G, Cavazzana AO, Luzi P, et al. Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 1992; 42: 285-291.
7. Gilbert RE, Cox A, Wu LL, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes* 1998;47:414-22.
8. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, et al. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta1. *Kidney Int* 1992;41:1213-1221.
9. Erensoy N, Yilmazer S, Ozturk M, et al. Effects of ACE inhibition on the expression of type IV collagen and laminin in renal glomeruli in experimental diabetes. *Acta Histochem* 2004;106:279-87.
10. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats. *Kidney Int* 1989;36:526-536.
11. Bakris GL, Williams B. Angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium antagonists alone or combined: does the progression of diabetic renal disease differ?. *J Hypertension* 1995;13: 95-101.
12. Brown RA, Lee MM, Sundareson AM, et al. Influence of calcium channel blockers treatment on the mechanical properties of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetol* 1996; 33: 7-14.
13. Kalender B, Ozturk M, Tuncdemir M, et al. Renopro-

- tective effects of valsartan and enalapril in STZ-induced diabetes in rats. *Acta Histochem* 2002;104:123-130.
14. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1994;46:430-442.
 15. Nakamura T, Obata J, Kimura H, et al. Blocking angiotensin II ameliorates proteinuria and glomerular lesions in progressive mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55:877-889.
 16. Altuğ T, Gürel A, İkitimur E, ve ark. Sıçanlarda neonatal dönemde farklı dozlarda streptozotosin uygulanmasının böbrek kisti ve tümörü oluşturma etkileri. *Endokrinolojide Yönelişler* 1996; 6: 136-139.
 17. Kaya-Dagistanli F, Susleyici-Duman B, Öztürk M. Protective effects of a calcium channel blocker on apoptosis in thymus of neonatal STZ-diabetic rats. *Acta Histochem* 2005;107:207-214.
 18. Portha B, Blondel O, Serades P, et al. The rat models of non insülin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete&Metab* 1989;15:61-75.
 19. Vicent D, Villanueva PML, Volverde I, et al. Impaired in vivo insulin secretion in response to non-glucidic secretagogues in adult rats after neonatal streptozotocin. *Acta Diabetol* 1994;31: 133-137.
 20. Öztürk M. Işık Mikroskopide İmmünoişaretleme Yöntemleri. Uygulamalı Ultrastruktürel İmmunohistokimya Kurs Kitapçığı. Yazarlar:Yılmaz S, Öztürk M. 6-8 Mayıs 1998, İstanbul.
 21. Sounders BD, Trappe RG. *Basic & Clinical Biostatistics*. 2. ed. Appleton & Lange, London.1994.
 22. Anderson S, Rennke HG, Garcia DL, et al. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rats. *Kidney Int*1992; 41:891-897.
 23. Hirose K, Qsterby R, Nozawa M, et al. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int* 1982; 21: 689-695.
 24. Mogensen CE. Angiotensin converting enzyme inhibitors and diabetic nephropathy. *BMJ* 1992; 304:327-328.
 25. Barthelmebs M, Varilly B, Grima M, et al. Effects of dopamine prodrugs and feroldopam on glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18: 243-253.
 26. Bakris GL. Microalbuminuria: Prognostic implications. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:219-223.
 27. Jerums G, Allen TJ, Tsalamandris C, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and calcium channel blockade in incipient diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1992; 41: 904-911.
 28. Morelli E, loon N, Meyen T, et al. Effects of converting-enzyme inhibition on barrier function in diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1990; 39:76-82.
 29. Cavatorta A, Coghi P, Borghetti A. Isradipine in chronic renal failure: Antihypertensive effect and renal production. *Curr Ther Res Clin Exp* 1994; 55: 1538-1550.
 30. Wittenberg C, Rosenfeld J B. Long-term antihypertensive and renal effects of isradipine in hypertensive patients with normal and reduced renal function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;19 (Suppl 3) : 393-395.
 31. Gaber L, Walton C, Brown S, et al. Effects of different antihypertensive treatments on morphological progression of diabetic nephropathy in uninephrectomized dogs. *Kidney Int* 1994; 46: 161-169.
 32. Tikkanen I, Johnston CI. Comparison of renal-angiotensin to calcium channel blockade in renal disease. *Kidney Int* 1997;52(suppl.63):19-22.
 33. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *PNAS* 2000; 97: 7667-7669.
 34. Branton M.H., Kopp J.B . TGF-B and fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1:1349-1365.
 35. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S,et al. Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992; 41:107-114.
 36. Hill C, Flyvbjerg A, Gronbeak H, et al. The renal expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology* 2000; 141: 1196-1208.
 37. Flyvbjerg A, Hill C, Logan A. Pathophysiological Role of Growth Factors in Diabetic Kidney Disease: Focus on Innovative Therapy. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10:267-272.
 38. Ihm CG, Lee GS, Nast CC, et al. Early increased renal procollagen alpha 1(IV) mRNA levels in streptozotocin induced diabetes. *Kidney Int* 1992;41:768-777.