

POLİKİSTİK BÖBREK HASTALIĞINDA APOPTOZ

Tevfik ECDER*

ÖZET

Apoptoz artışı, çeşitli polikistik böbrek hastalığı modellerinde bildirilmiştir. Buna karşılık, apoptozun kist patogenezinde ve böbrek yetersizliği gelişimindeki rolü bilinmemektedir. Han:Sprague-Dawley (SPRD) sıçan modeli, insandaki otozomal dominant polikistik böbrek hastalığına fenotipik benzerlikler gösterir. Bu nedenle, bu hastalığın patogenezinin araştırılması için iyi bir modeldir.

Han:SPRD sıçanları, hastalığın erken döneminde (1. gün ve 2. hafta) çalışmaya alındı. Homozigot (Cy/Cy) olan sıçanlarda 2. haftada yaygın kist oluşumu ile birlikte böbrek yetersizliği gelişimi gözlemlendi. Böbrek dokularındaki apoptotik hücreler, TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end-labeling) yöntemi ile araştırıldı. İki haftalık heterozigot (Cy/+) ve Cy/Cy sıçanların böbrek dokularında, normal (+/+) sıçanlara göre TUNEL (+) hücrelerde anlamlı derecede artma saptandı. TUNEL (+) hücrelerin hem kistik, hem de kistik olmayan tubuluslarda görüldüğü dikkati çekti.

Sonuç olarak, polikistik böbrek hastalığındaki apoptoz artışının böbrek yetersizliğinin gelişiminde rolü olabilir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, polikistik böbrek hastalığı

SUMMARY

Apoptosis in polycystic kidney disease. Increased apoptosis is reported in different models of polycystic kidney disease. However, the role of apoptosis in cystogenesis and in the development of renal failure is not known. The Han:Sprague-Dawley (SPRD) rat model phenotypically resembles human autosomal dominant polycystic kidney disease. Therefore, it presents a model to investigate the pathogenesis of this disease.

Han:SPRD rats were studied during the early stages (1 day old and 2 weeks old) of their disease. Homozygous (Cy/Cy) rats had massive cystic development and renal failure at 2 weeks of age. Apoptotic cells were detected in kidney tissues by the TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end-labeling) assay. TUNEL (+) cells were significantly increased in 2-week-old heterozygous (Cy/+) and Cy/Cy rat kidneys compared to normal (+/+) littermate controls. TUNEL (+) cells were observed both in cystic and non-cystic tubules.

In conclusion, increased apoptosis may play a role in the development of renal failure in polycystic kidney disease.

Key words: Apoptosis, polycystic kidney disease

GİRİŞ

Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı (ODPBH) en sık karşılaşılan kalıtsal böbrek hastalığıdır. Görülme sıklığı 1:400 ile 1:1000 arasında değişir ve son dönem böbrek yetersizliği olgularının % 5-10'undan sorumludur ⁽¹⁾. Tubulus epitel hücrelerinde hiperplazi, tubulus hücrelerinden aşırı sekresyon ve ekstraselüler matriks bozukluklarının kist gelişiminde rolünün olduğu bilin-

mektedir ⁽²⁾. Son yıllarda, gerek insanlardaki polikistik böbrek hastalığında ⁽³⁾, gerekse de deneysel polikistik böbrek hastalığı modellerinde apoptoz artışının olduğu dikkati çekmiştir ⁽³⁻⁷⁾. Apoptoz, çoğu kez önceden programlanmış olan, bir çeşit hücre ölümüdür. Fetal hayattaki organogeneizde ve organizmanın istenmeyen hücrelerden arındırılmasında rol oynadığından dolayı fizyolojik bir mekanizma olarak kabul edilebilir. Buna

Mecmuaya geldiği tarih: 25.05.2001

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul
Bu çalışma, Colorado Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılmıştır.

karşılık, gereksiz ve aşırı apoptoz, belirli hastalıkların patogenezinde rol oynayabilir (8).

Han:Sprague-Dawley (SPRD) sıçanları, fenotipik özellikleri açısından insandaki ODPBH'na büyük benzerlikler gösterir. Bu nedenle, bu hastalığın patogenezinin araştırılmasında iyi bir model olarak kabul edilmektedir (9,10). Bu çalışmada, Han:SPRD sıçanlarının polikistik böbreklerinde apoptozun varlığı araştırıldı.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, normal (+/+), erkek heterozigot (Cy/+) ve homozigot (Cy/Cy) Han:SPRD sıçanlarında gerçekleştirildi. Bu sıçanlar, Kansas Üniversitesi Tıp Merkezi'ndeki sıçan kolonisinden alınarak Colorado Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırma Merkezi'nde üretildi. Çalışma boyunca sıçanların su alımı serbest bırakıldı ve standart sıçan besini verildi.

Han:SPRD sıçanlarında polikistik böbrek hastalığının seyri daha önce tarif edilmiştir (8,9). Erkek olan Cy/+ sıçanlarda doğumdan sonra yavaş bir şekilde kist gelişimi ile birlikte ilk 1 yıl içinde böbrek yetersizliğinden ölüm görülür. Dişi olan Cy/+ sıçanlarda ise daha az kist gelişimi saptanır ve böbrek yetersizliği gelişmez. Homozigot olan sıçanlarda ise kist gelişimi intrauterin hayatta başlar ve doğumdan sonraki ilk 3-4 hafta içinde masif kist gelişimi ve böbrek yetersizliği ile ölüm görülür.

Deneylerde 1 günlük ve 2 haftalık Han:SPRD sıçanları kullanıldı. Bu amaçla her genotipten 5'er adet sıçan çalışmaya alındı. Sıçanlar tartıldıktan sonra, intraperitoneal pentobarbital sodium (50 mg/kg) enjeksiyonu ile genel anesteziye alındı. Laparotomi ile böbreklerinin çıkarılıp tartılmasını takiben intrakardiyak kan örneği alındıktan sonra sakrifiye edildi. Histolojik tetkik için in-

celenecek olan böbrekler, %4'lük paraformaldehit içinde 120 dakika fikse edildikten sonra %70'lik etanol içine kondu.

Serum üre azotu ve kreatinin konsantrasyonları, Beckman otoanalizörü (Beckman Instruments, Fullerton, CA) kullanılarak ölçüldü.

İn situ DNA fragmantasyonunun incelenmesi için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated nick-end labeling) metodundan yararlanıldı (Trevigen, Gaithersburg, MD). Parafinize böbrek dokularında uygulanan bu histokimyasal yöntem daha önce tarif edilmiştir (11). Her deneyde, nükleaz enziminin uygulandığı pozitif kontrol ve TdT enziminin uygulanmadığı negatif kontrol da yapılarak metodun doğruluğu onaylandı.

Kistik ve kistik olmayan tubuluslardaki TUNEL (+) hücrelerin miktar tayini, korteks bölgesindeki rastlantısal 10 alanın sayılması ile yapıldı. Çapı 50 µm'nin altında olan tubulusların kistik olmadığı kabul edildi. TUNEL (+) hücreler toplam tubulus hücrelerinin yüzdesi olarak hesaplandı. TUNEL (+) hücreler, hem kistik hem de kistik olmayan tubuluslarda ayrı ayrı hesaplandı.

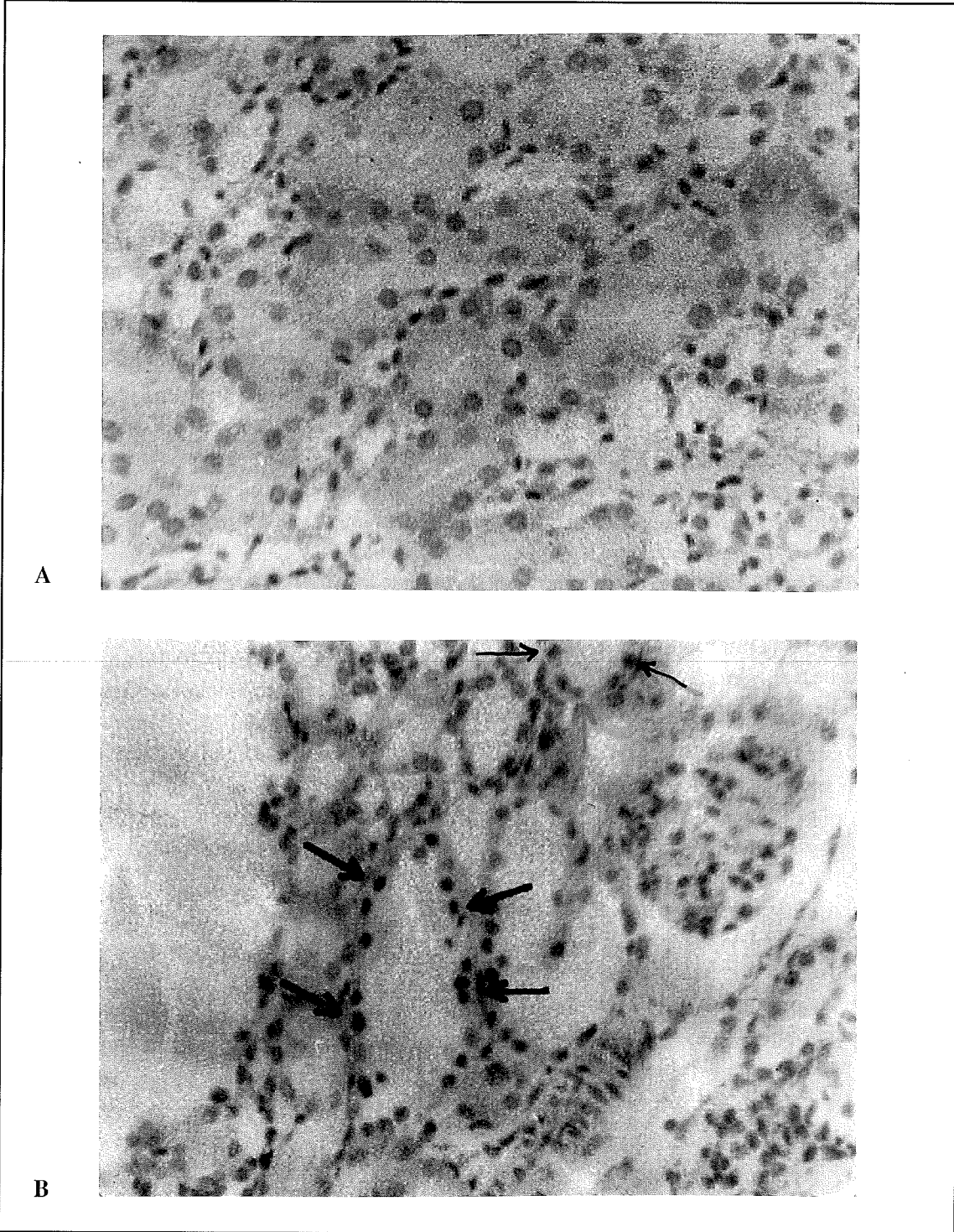
İstatistiksel değerlendirmede, eşlenmemiş iki grup analizi eşlenmemiş t testi ile ve multipl grupların analizi ANOVA testi ile yapıldı. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama + standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Han:SPRD sıçanlarının böbrek büyüklükleri ve böbrek fonksiyonları

Bir günlük sıçanlar: Normal sıçanların iki böbrek ağırlığı/toplam vücut ağırlığı oranı (İBA/TVA) (%) 1.06 ± 0.06 iken, Cy/+ sıçanlarda bu oran 1.22 ± 0.07 ve Cy/Cy sıçanlarda ise 2.31 ± 0.10 ($P < 0.001$, +/+ ve

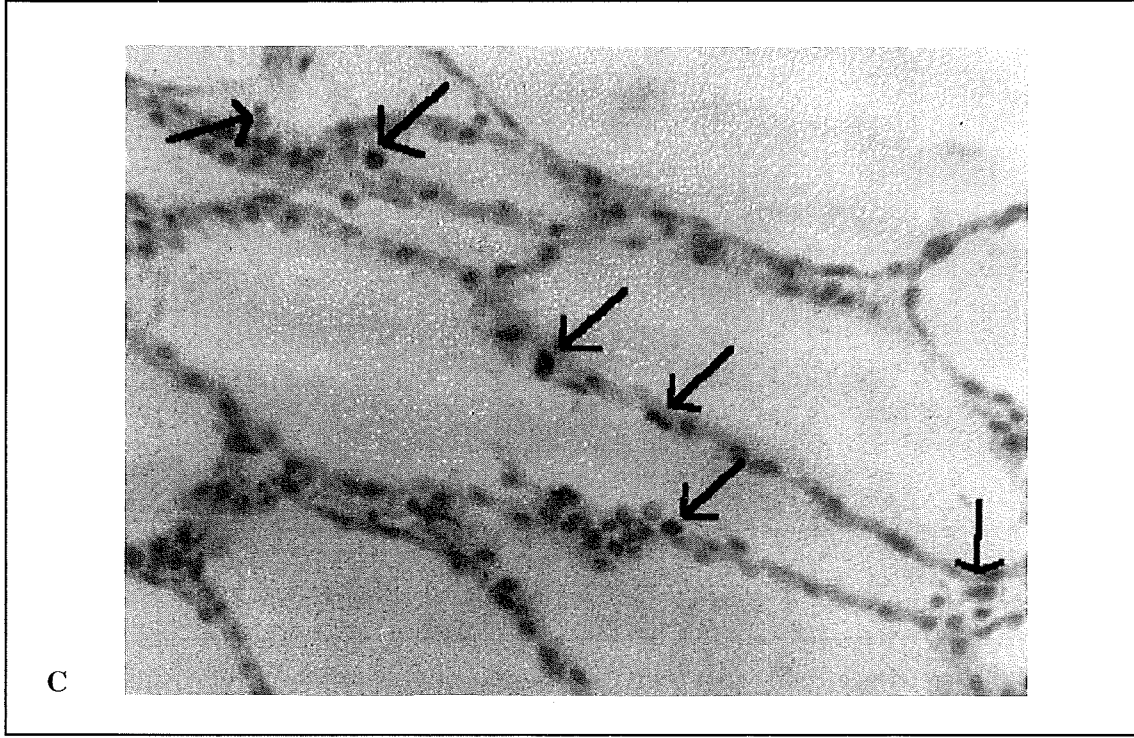
Şekil 1. İki haftalık normal (1A), heterozigot (1B) ve homozigot



Cy/+e göre) olarak bulundu. Normal sıçanların serum üre azotu konsantrasyonu 28.3 ± 1.7 mg/dl, Cy/+ sıçanların 24.0 ± 1.4 mg/dl ve Cy/Cy sıçanların ise 35.5 ± 7.5 olarak bulundu ve bu farklılıklar istatistiksel olarak

anlamli değildi. Ayrıca, serum kreatinin konsantrasyonlarında da anlamli bir değışiklik bulunamadı (+/+ : 0.40 ± 0.00 mg/dl, Cy/+ : 0.35 ± 0.03 mg/dl, Cy/Cy : 0.35 ± 0.05 mg/dl).

Şekil 1. (1C) sıçanların böbrek dokularının TUNEL metodu ile boyanması (X400)



İki haftalık sıçanlar: Normal sıçanlarda İBA/TVA 1.06 ± 0.03 , Cy/+ sıçanlarda 1.30 ± 0.03 ve Cy/Cy sıçanlarda ise 9.98 ± 0.37 ($P < 0.001$, +/+ ve Cy/+'e göre) olarak bulundu. Normal sıçanların serum üre azotu 19.6 ± 1.8 mg/dl, Cy/+ sıçanların 17.4 ± 1.5 mg/dl ve Cy/Cy sıçanların ise 41.9 ± 3.8 mg/dl olarak bulundu ($P < 0.001$, +/+ ve Cy/+'e göre). Normal sıçanların serum kreatinin konsantrasyonu 0.30 ± 0.02 mg/dl, Cy/+ sıçanların 0.24 ± 0.02 mg/dl, Cy/Cy sıçanların ise 0.34 ± 0.02 mg/dl ($P < 0.01$, +/+ ve Cy/+'e göre) olarak bulundu

TUNEL yöntemi

İki haftalık +/+, Cy/+ ve Cy/Cy sıçan böbrek dokularının TUNEL yöntemi ile histokimyasal incelenmesi Şekil 1'de görülmektedir. Normal dokularda hiç TUNEL (+) hücre görülmezken (Şekil 1A), Cy/+ sıçanların böbrek dokularında hem kistik, hem de kistik olmayan tubuluslarda TUNEL (+) hücreler saptandı (Şekil 1B). Bu TUNEL (+) hücrelerin %75'i kistik, %25'i ise kistik olmayan tubuluslarda idi. İki haftalık Cy/Cy sıçanların

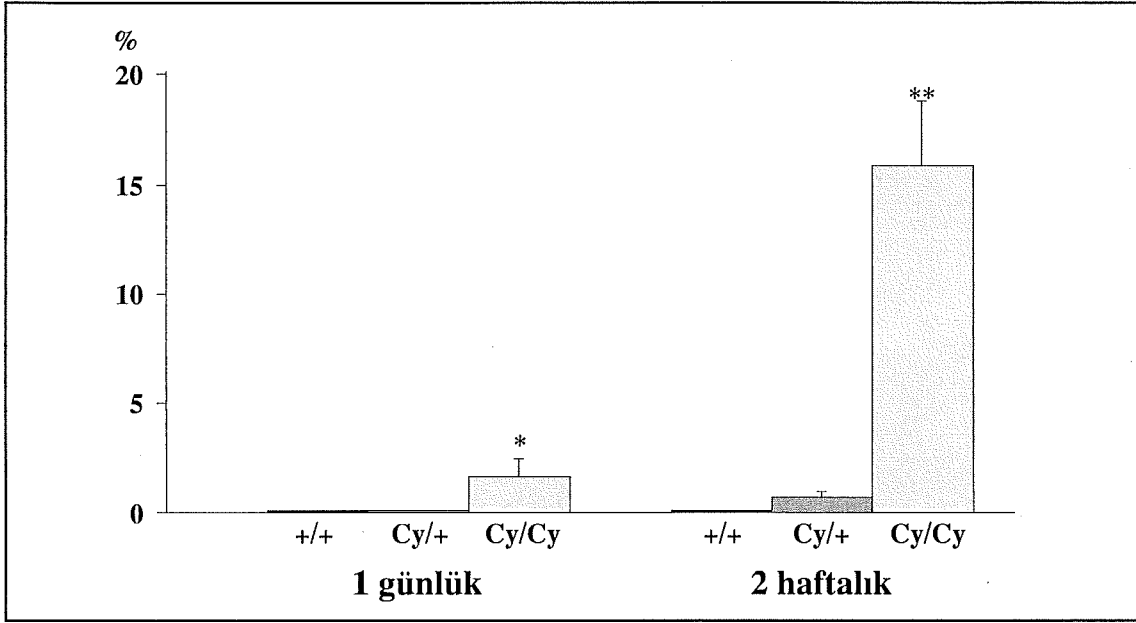
böbrek dokularındaki yaygın kistik tubuluslardaki TUNEL (+) hücreler Şekil 1C'de görülmektedir.

TUNEL (+) hücrelerin miktar tayini Şekil 2'de gösterilmiştir. Bir günlük ve 2 haftalık Cy/Cy sıçanların böbreklerinde aynı yaştaki Cy/+ ve +/+ sıçanlara göre TUNEL (+) hücrelerde belirgin artış saptandı. TUNEL (+) olan hücrelerin kondanse ve piknotik nukleusları hematoksilin ve eosin boyası ile doğrulandı.

TARTIŞMA

Böbrek hastalıklarının patogeneğinde apoptozun rolü, son yıllarda araştırılan önemli bir konudur ⁽¹⁾. Apoptoz artışı, insandaki ODPBH'da ve çeşitli hayvan polikistik böbrek hastalığı modellerinde gösterilmiştir ⁽³⁻⁷⁾. Bu bulgunun varlığına rağmen, apoptozun kistogeneze ve böbrek yetersizliği gelişiminde rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Tip 1 kollajen matriksin bulunduğu bir ortamda üretilen MDCK (Madin-Darby ca-

Şekil 2. Bir günlük ve 2 haftalık Han:SPRD sıçanlarının böbrek dokularında TUNEL (+) hücrelerin toplam tubulus hücrelerine oranı (%). (*P<0.05, +/+ ve Cy/+'e göre; **P<0.001, +/+ ve Cy/+'e göre)



nine kidney) hücrelerinde apoptoz ile birlikte kist oluşumunun gözlenmesi ve antiapoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonunun artırılması ile kist oluşumunun inhibe edilebilmesi apoptozun kist gelişiminde rolünün olabileceğini düşündürmektedir (12).

Woo (3), insandaki ODPBH'da hem kistik tubuluslarda, hem de kistik olmayan tubuluslarda apoptoz artışının görüldüğüne dikkati çekmiştir. Bu çalışmada, ODPBH modeli olan Han:SPRD sıçanlarında apoptozun varlığı araştırıldı. Değişik polikistik böbrek hastalığı modellerinde apoptoz artışı daha önceden bildirilmekle birlikte (3-7), bu sıçan modelinde apoptoz daha önceden araştırılmamış bir konudur.

Polikistik böbrek hastalığında böbrek yetersizliği gelişiminin nedeni bilinmemektedir. Kistlerin normal böbrek parenkimine bası yaparak fibrozise yol açtığı düşünülmekte ise de, bu hastalıkta nefronların sadece %1-2'sinden kistik gelişimin olması, böbrek yetersizliği gelişiminde başka mekanizmaların da olabileceğini akla getirmektedir. Bu çalışmada, Cy/+ sıçanlarda erken dönemde başlayan kistik gelişimlere apoptotik hücrelerin

eşlik ettiği görüldü. Ayrıca kistik olmayan tubuluslarda da apoptotik hücrelerin görülmesi, Woo (3)'nun da dikkat çektiği şekilde, polikistik böbrek hastalığındaki nefron kaybından sorumlu olabilir. Homozigot olan sıçanlarda da yaygın kistik değişikliklere, yaygın apoptoz artışının eşlik ettiği saptandı.

Sonuç olarak, Han:SPRD sıçanlarının polikistik böbreklerinde erken dönemde apoptoz artışı söz konusudur. Apoptoz artışının hem kistik, hem de kistik olmayan tubuluslarda görülmesi, apoptozun böbrek yetersizliği gelişiminde önemli rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 329:332 (1993).
2. Murcia NS, Sweeney WE, Jr, Avner ED: New insights into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. Kidney Int 55:1187 (1999).
3. Woo D: Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. N Engl J Med 333:18 (1995).
4. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. Cell 75:229 (1993).
5. Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mucher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner

- R, Fassler R: Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11:1938 (1997).
6. Trudel M, Barisoni L, Lanoix J, D'Agati V: Polycystic kidney disease in SBM transgenic mice: role of c-myc in disease induction and progression. *Am J Pathol* 152:219 (1998).
 7. Winyard PJ, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA, Woolf AS: Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int* 49:135 (1996).
 8. Savill J: Apoptosis and the kidney [editorial]. *J Am Soc Nephrol* 5:12 (1994).
 9. Cowley BD, Jr., Gudapaty S, Kraybill AL, Barash BD, Harding MA, Calvet JP, Gattone VH2: Autosomal-dominant polycystic kidney disease in the rat. *Kidney Int* 43:522 (1993).
 10. Schafer K, Gretz N, Bader M, Oberbaumer I, Eckardt KU, Kriz W, Bachmann S: Characterization of the Han:SPRD rat model for hereditary polycystic kidney disease. *Kidney Int* 46:134 (1994).
 11. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493 (1992).
 12. Lin HH, Yang TP, Jiang ST, Yang HY, Tang MJ: Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced Madin-Darby canine kidney simple epithelial cyst formation. *Kidney Int* 55:168 (1999).