

## Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Böbreklerin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

M. Aydın KETANİ<sup>1</sup>, Berfin KADIROĞLU<sup>2</sup>, Zelal KARAKOÇ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Diyarbakır

<sup>3</sup>Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Siirt

### ÖZET

Diyabetes Mellitus (şeker hastalığı) karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozuklukla karakterize, yüksek kan glukoz seviyeleriyle seyreden ve vücutta pek çok sistemi etkileyerek yaşam boyu devam eden bir hastalıktır. Diyabetin komplikasyonlarına bağlı dokularda değişiklikler meydana gelmektedir. Histopatolojik düzeyde araştırma yapmak amacıyla sıçanlarda deneysel diyabet oluşturuldu. Denekler kontrol ve diyabet grubu olarak ikiye ayrıldı. Deneysel diyabet oluşturulurken sitrat tamponunda çözülmüş streptozotosin 50 mg/kg intraperitoneal olarak tek dozda enjekte edildi. Sıçanların kan şekerleri 48 saat sonra ölçüldü. Glukoz değeri 300 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Her gruptan yedi denek 7. 14. ve 21. günlerde böbrekleri çıkarıldıktan sonra sakrifiye edildi. Alınan örnekler mikroskopta incelenmek üzere tespit aşamalarından geçirilerek parafine gömüldü. Mikroskop altında kontrol grubu böbrek dokusu normal bulundu. Diyabet grubunda ise kapiller bazal membranda kalınlaşma, Bowman kapsülünde daralma görüldü. Tübüllerde ise epitel dökülmesi, vakuolizasyon ve atrofi tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Streptozotosin, Diyabetes Mellitus, Sıçan, Böbrek

### Histological Examination of Kidney in Experimental Diabetic Rats

#### ABSTRACT

Diabetes mellitus (diabetes) is a disorder of carbohydrate, fat and protein metabolism which is characterized by high blood glucose levels and can affect many systems in the body. It is a disease that continues throughout life. Some changes can occur in the tissues due to diabetic complications. Experimental diabetes was constituted to research the histopathological changes in rats. The subjects were divided into two groups as control and diabetes. A single dose of 50 mg/kg streptozotocin dissolved in citrate buffer was injected intraperitoneally to the rats to induce diabetes. Plasma glucose levels were measured after 48 hours. Rats with plasma glucose levels >300 mg/dl were accepted as diabetic. Seven rats were sacrificed in each group at days 7, 14, and 21. after the kidneys removed. The samples were fixed and were embedded in paraffin blocks for examining by microscope. The control group had a normal kidney tissue in the examination by microscope. Thickening in the capillary basement membrane, narrowing in Bowman's capsule and rubbing of the epithelial tubules, vacuolization and atrophy was determined in diabetic groups.

**Key Words:** Streptozotocin, Diabetes Mellitus, Rat, Kidney

## GİRİŞ

Diyabet karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki değişiklikleri içeren ve hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Dünyada 150 milyon diyabet hastası bulunduğu ve 20 yıl sonunda bu sayının 2 katına çıkacağı tahmin edilmektedir(1). Çeşitli deneysel ve klinik gözlemler hipergliseminin direkt ya da indirekt olarak serbest radikal oluşumunu arttırdığı ve oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir(2,3). Ayrıca kanda yüksek seviyelere ulaşan glukoz proteinlerle birleşerek, kimyasal olarak geri dönüşebilen glukozilasyon ürünlerine dönüşür. Glukozun damar duvarlarında veya interstisyel dokularda kollajenle ve diğer uzun ömürlü proteinlerle oluşturduğu glukozilasyon bileşikler bir seri kimyasal reaksiyon sonrasında geri dönüşümü olmayan glukozilasyon son ürünlerine dönüşür(4,5).

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların gelişmesinde en önemli etken olarak oksidatif stres gösterilmektedir(6,7). Normal şartlar altında serbest radikaller, süperoksit dismutaz(SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz gibi vücuttaki antioksidan enzimlerle ve besinlerle alınan E, C vitaminleri, karotenler ve flavonoidler gibi antioksidanlardan oluşan etkili bir sistemle nötralize edilir. Sağlıklı bireylerde antioksidanlar ve serbest radikaller arasında hassas bir denge vardır. Hiperglisemide glukoz ototoksikasyonu ve protein glukozilasyonu ile serbest radikallerin oluşum hızının artması bu dengeyi bozar ve bütün biyolojik moleküllerde (DNA, lipid, protein ve karbonhidrat gibi) oksidatif strese neden olur(8). Artan oksidatif stres ve protein glukozilasyonu diyabetik nefropatinde içinde

bulduğu anjiyopati, retinopati ve nöropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır(2,3).

Streptozotosin(STZ) Sterptomyces türü bakterilerden elde edilen ve pankreasdaki beta hücrelerini seçici bir biçimde ve dönüşümsüz olarak tahrip ederek insülinomanın tedavisinde ve deneysel olarak diyabet oluşturmakta kullanılan maddedir. STZ glukoz oksidasyonunu bozarak(9),insülin biyosentezini ve salınımını azaltır(10). Hipergliseminin şiddeti ve süresi ilacın dozuna ve laboratuvar hayvanının türüne bağlıdır (11).

Bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların böbreğinde oluşan histopatolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

## MATERYAL VE METOD

Dicle Üniversitesi Prof.Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DÜSAM) toplam 28 yetişkin erkek Wistar albino sıçanlar(250-300g) kullanıldı. Bu çalışmada diyabet grubu sıçanlara 0.1 M sitrik asit tamponu içerisinde, pH 4.5, 50 mg/kg dozunda streptozotosinin (STZ,Sigma Chemical Company,St Louis, MO) periton içine enjeksiyonuyla sağlandı. Sıçanların kan glukoz seviyesi >300 mg/dL olanlar diyabetik kabul edildi.

Deney süresince deney hayvanları pelet yemleri ve suları ad libitum olarak beslenmesi sağlandı. 22 ± 1°C sıcaklıkta 12s ışık/12s karanlık siklus sağlandı. Bu çalışma Helsinki Beyanı ve Hayvan Koruma Komitesi Yönetim'inin izniyle uyum sağlandı.

Deneysel protokolleri kapsayan bütün prosedürler Dicle Üniversitesi'nin Hayvan Etik Komitesi tarafından onaylandı(protocol No:2010/49). Hayvanlar öncelikli kontrol

(n=14) ve deney grubu(n=14) olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı. Doku örnekleri histolojik yönden aşağıdaki prosedürler esas alınarak incelendi.

#### **Histolojik Prosedür**

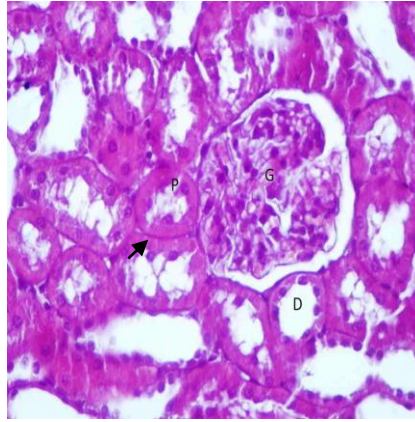
Her gruptan yedi hayvan periton içi ketamin HCl (35mg/kg) ve ksilazin (3mg/kg) anestezisi altında kalbinden kan alınmasıyla ötenazi yapıldı. Ötenazi işlemini takiben sağ bbbrekleri

#### **BULGULAR**

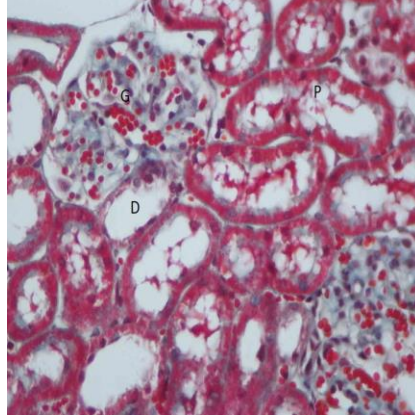
Diyabete bağlı bbbrekte gelişen histopatolojik değişimler glomerullerde hipertrofi, mezengiumda genişleme, glomeruler skleroz, glomeruler bazal membranda kalınlaşma, bbbreklerde büyüme ve porlar arasından geçirgenliğin artması olarak belirlendi. Hematoksilen eozin boyamada bowman aralığı daralmış olup, tbbüllerde epitel dökülmesi tespit edildi. Ayrıca vakuol

total olarak çıkarıldı. Bu işlem sırasıyla tespit, suyunu alma (dehidratasyon), şeffaflandırma, parafinizasyon, blok hazırlama, kesit hazırlama, boyama yapıldı. Preparatlar gruplara ayrıldı ve üç farklı boyama yapıldı. Bunlar trichrome, Hematoksilen-Eozin (H-E) ve PAS boyamalarıdır.

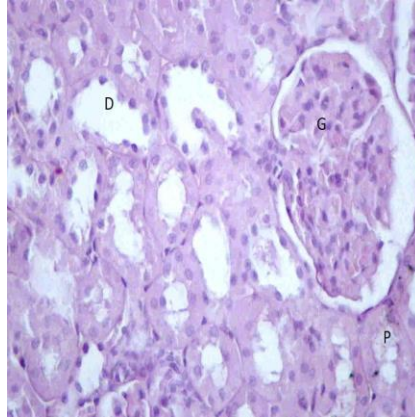
dejenarasyonun geliştiğini gözlemlendi. Asidofilik yapının kayıba uğradığı tespit edildi(Resim 4). Trichrome boyamada herhangi bir bağ doku artışı gözlemlenmedi(Resim 5). PAS boyamada fırçamsı kenar kaybı tespit edildi. Bazal laminalar hafif kalınlaşmış görünümde olup bulgular fokal olarak gözlemlendi(Resim 6). Diyabetin 14. günlere ait prepratlarında olguların ilerlemiş olduğu belirlendi.



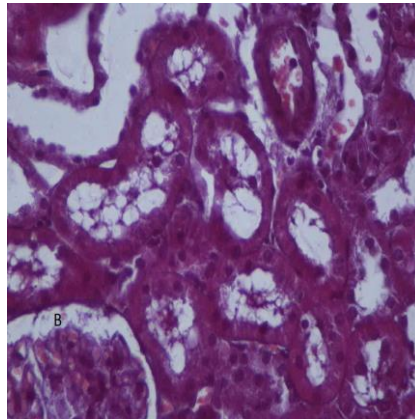
Resim 1: Kontrol grubuna ait bbbreğin histolojik kesiti. Boyama Hematoksilen eozin,orijinal Büyütme X400.Bazal lamina (ok başı), Bbbrek dokusunun Glomerül yapısı(G), Proksimal(P) ve Distal tbbüller(D) normal yapıdadır.



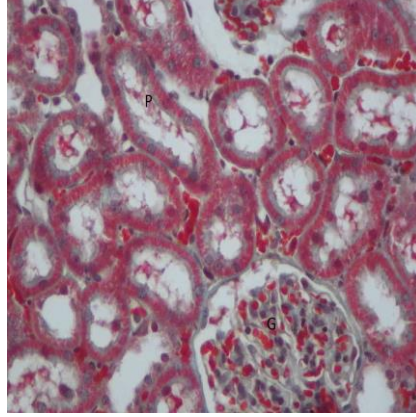
Resim 2: Kontrol grubuna ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama Trichrome, orijinal Büyütme X400. Böbrek dokusunun Glomerül yapısı(G), Proksimal(P) ve Distal tübüller(D) normal yapıda izlendi.



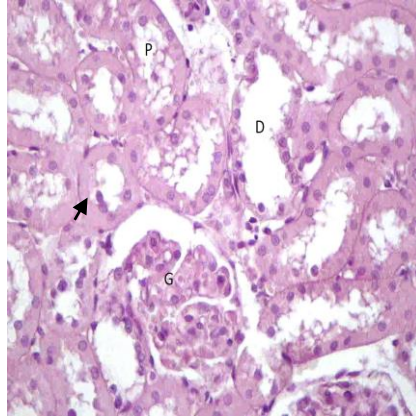
Resim 3: Kontrol grubuna ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama PAS,orijinal Büyütme X400.Böbrek dokusunun Glomerül yapısı(G), Proksimal(P) ve Distal tübüller(D) normal yapıdadır.



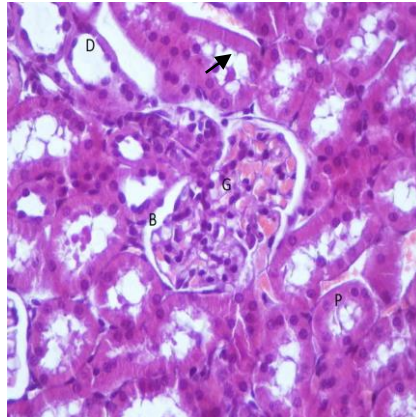
Resim 4: Diyabet 7. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama Hematoksilen eozin, orijinal Büyütme X400. Bowman aralığı (B), Vakuoler dejenerasyon (okucu).



Resim 5: Diyabet 7. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama trichrome,orijinal Büyütme X400. Glomerül yapısı(G), Proksimal tübül(P).

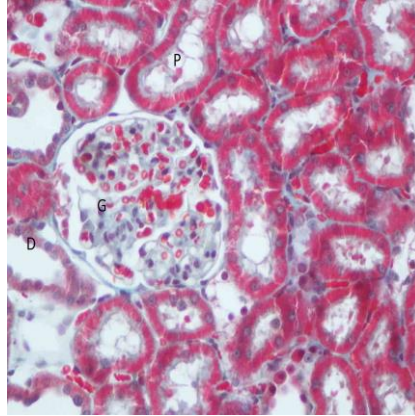


Resim 6: Diyabet 7. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama PAS,orijinal Büyütme X400.Glomerül yapısı(G), Proksimal(P) ve Distal tübüller(D). Bazal lamina (ok başı).

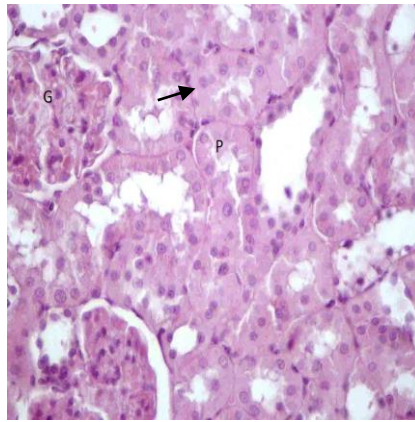


Resim 7: Diyabet 14. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama Hematoksilen eozin, orijinal Büyütme X400. Bowman aralığı (B), Vakuoler dejenarasyon (ok ucu), Proksimal tübül(P) ve Distal tübül(D), Glomerül (G).





Resim 8: Diyabet 14. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama trichrome,orijinal Büyütme X400. Glomerül yapısı(G), Proksimal(P) ve Distal tübül(D).



Resim 9: Diyabet 14. güne ait böbreğin histolojik kesiti. Boyama PAS,orijinal Büyütme X400.Glomerül yapısı(G), Proksimal tübül(P). Bazal lamina (ok başı).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlarda diyabetin başlamasından itibaren 1-2 yıl içinde diffüz glomerüloskleroz gelişmektedir. Diyabetik glomerüloskleroz batı dünyasında kronik böbrek yetmezliklerinin % 30'undan sorumludur(12). Diffüz glomerüloskleroz mezangial hücre proliferasyonu ile birlikte PAS (+) mezangial matriksde artışla karakterizedir. Beraberin de kapiller bazal membranında kalınlaşma da izlenir. Glomerüloskleroz ilerledikçe tübüler iskemisi ve interstisyel fibrozis de gelişir. Glukozürisi kontrol altına alınmayan hastalarda glukoz geri emilerek tübül epitelinde glikojen olarak depolanabilir(13).

Osterby ve ark.(14) insanlarda tip 1 diyabete bağlı olarak mezangial matriks hacminde belirgin bir artış gözlemişlerdir. Laboratuvar hayvanlarında deneysel olarak oluşturulan tip 1 diyabette de benzer bulgulara rastlanmıştır. Özcan ve ark.(15) alloxan ile sıçanlarda oluşturdukları tip 1 diyabet sonrasında glomerüler skleroz, intraglomerüler mezangial hücre artışı, tübüler atrofi, dilatasyon ve vakuoler dejenerasyon izlemişlerdir. İnce yapı incelemelerinde ise glomerüler bazal laminada fokal kalınlaşmalar gözlemişlerdir. Sanai ve ark.(16) streptozotosin ile tip 1 diyabet oluşturdukları sıçan böbreklerinde glomerül mezengiumunda ve interstisyel alanlarda artış, tübüler

vakuolizasyon izlemişlerdir. Brees ve ark.(17) streptozotosin verdikleri sıçanların glomerül bazal membranında laminin ve fibronektin artışı izlemişlerdir. Biz çalışmamızda streptozotosin ile diabetik yaptığımız sıçanların kapiller bazal membranda kalınlaşma, Bowman kapsülünde daralma, tübüllerde ise epitel dökülmesi, vakuolizasyon ve atrofi gözlemledik. Patolojik olgularda ve deneysel diyabetik nefropatide ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikimi ile oluşan glomerular ve tübüler bazal membran kalınlaşması çeşitli araştırmacılarca belirtilmektedir(18-22). Bizde çalışmamızda bu bulgulara benzer olarak proksimal tübüllerin bazal membranlarında kalınlaşma tespit ettik.

Sonuç olarak; sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan diyabete bağlı olarak böbrek dokusunda histopatolojik değişiklikler şekillenmiştir.

#### KAYNAKÇA

1. Koyuturk M, Tunali S, Bolkent S, Yanardag R. (2005). Effects of Vanadyl Sulfate on Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res* ;104:233-47.
2. Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bazek P, Durackova Z. (2002). Influence of  $\beta$ -resorcylicidene Aminoguanidine on Selected Metabolic Parameters and Antioxidant Status of Rats with Diabetes Mellitus. *Physiol Res* ;51:277-84.
3. Agardh CD, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. (2002). Effects of Inhibition of Glycation and Oxidative Stress on the Development of Diabetic Nephropathy in Rats. *J Diabetes Complications* ;16: 395-400.
4. Crawford JM, Cotran RS. (1999). The Pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. *Pathologic Basis of Disease*. USA: WB Saunders Company; p.913-20.
5. Unlucerci Y, Kocak H, Seferoglu G, Bekpınar S. (2001). The Effect of Aminoguanidine on Diabetes-Induced Inactivation of Kidney Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase in Rats. *Pharmacol Res* ;44:95- 8.
6. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. (2001). Melatonin Inhibits Lipid Peroxidation and Stimulates the Antioxidant Status of Diabetic Rats. *J Pineal Res* ;31:193-8.
7. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. (2002). Comparative Analysis of the Protective Effects of Melatonin and Vitamin E on Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. *J Pineal Res* ;32:225-30.
8. Damasceno DC, Volpato GT, de Mattos Paranhos Calderon I, Cunha Rudge MV. (2002). Oxidative Stress and Diabetes in Pregnant Rats. *Anim Reprod Sci* ; 72:235-44.
9. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. (1996). N-monomethyl-arginine and Nicotinamide Prevent Streptozotocine-Induced Double Strand DNA Break Formation in Pancreatic Islets. *Experientia* ; 52: 344-347.
10. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawadw J. (1990). Importance of the Concentration of ATP in Rat Pancreatic Beta Cells in the Mechanism of Streptozotocine-Induced Cytotoxicity. *J Endocrinol* ; 127: 161-165.
11. Szkudelski T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* ; 50: 536-546.
12. Porter KA. (1992). The Kidneys in Metabolic Disorders. In: *Systemic Pathology* , Vol 8, St. C. Symmers W (ed), Churchill Livingstone ;330-331.
13. Crawford JM, Cotran RS. (1990). The Pancreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. eds. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, WB Saunders Com p:913-23.

14. Osterby R, Bangstad HJ, Nyberg G, Rudberg S. (2001). On Glomerular Structural Alterations in Type-1 Diabetes. Companions of Early Diabetic Glomerulopathy. Virchows Archiv ;438(2):129-135.
15. Özcan O, Karaöz E, Kükner A. Dağdeviren A. (1992). Sıçanlarda Alloxanın Neden Olduğu Diabetes Mellitusda Böbrekde İnce Yapı Değişiklikleri. GATA Bülteni ; 34:747-758.
16. Sanai T, Sobka T, Johnson T, El-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, Oldroyd S, El Nahus AM. (2000). Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. Diabetologia ;43:91-100.
17. Brees DK, Hutchison FN, Cole GJ, Williams JC Jr. (1996). Differential effects of diabetes and glomerulonephritis on glomerular basal membrane. Proc Soc Exp Biol Med ; 212(1):69-77.
18. Cam M, Yavuz O, Güven A et al. (2003). Protective Effects of Chronic Melatonin Treatment against Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Pineal Res ; 35:212-220.
19. Lehman R, Schleicher ED. (2000). Molecular Mechanism of Diabetic Nephropathy. Clinica Chimica Acta ; 297: 135-144.
20. Oztürk F, Iraz M, Eşrefoğlu M, ve ark. (2005). Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi ; 12(1): 1-4.
21. Singh LP, Crook ED. (2000). Hexosamine Regulation of Glucose-Mediated Laminin Synthesis in Mesangial Cells Involves Proetin Kinases A and C. Am J Physiol Renal Physiol ; 279: 646-654.
22. Reeves BR, Andreoli TE. (2000). Transforming Growth Factor  $\beta$  Contributes to Progressive Diabetic Nephropathy.. PNAS ; 97(14): 7667-7669.

**Yazışma Adresi:**

Prof. Dr. M. Aydın KETANİ

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi

maketani@gmail.com