

# Deneysel Diyabetik Nefropatide İrbesartan'ın Apoptoz Üzerine Koruyucu Etkileri

Matem Tunçdemir<sup>1</sup>, Melek Öztürk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

## Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, Angiotensin II tip 1 reseptör blokleri olan irbesartan'ın Streptozotocin (STZ)-diyabetik sıçanlarda apoptoz ve apoptozu düzenleyen antiapoptotik (Bcl-2) proteinini üzerine etkileri araştırıldı.

**Yöntem:** Çalışmada 24 adet erkek Wistar tipi albino sıçandan oluşan 3 grup kullanıldı. 1.grup; sağlıklı kontrol, 2.grup; tedavisiz STZ-diyabetik (60 mg/kg, tek doz, i.p), 3.grup; irbesartan (15 mg/kg/gün, intragastrik, 4 hafta) uygulanan STZ-diyabetik sıçan grubu olarak düzenlendi. Deney süresince tüm gruplardaki sıçanların kan glukoz ve mikroalbuminüri düzeyleri ölçüldü. Deney sonunda alınan böbrek dokuları nötral formalde tespit edilip parafine gömüldü. Böbrek doku kesitlerine apoptoz tespiti amacıyla TUNEL metodu uygulandı. Bcl-2 antikoru kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı.

**Bulgular:** İrbesartan uygulanan diyabetik grupta mikroalbuminüri düzeyleri tedavisiz diyabetik gruba kıyasla anlamlı olarak azaldı ( $p<0,001$ ). Tedavisiz STZ-diyabetik grupta tubüllerde yaygın apoptotik hücreler tespit edilirken ( $p<0,01$ ), Bcl-2 immun reaktivitesinde azalma gözlemlendi. İrbesartan uygulanan diyabetik grupta, diyabetik grup ile kıyaslandığında apoptotik hücrelerin sayısında azalma görülürken, antiapoptotik Bcl-2 immun reaktivitesinin kontrol gruba yakın olduğu gözlemlendi.

**Sonuç:** STZ-diyabeti ile oluşturulan nefropatide, AT1 reseptör blokleri irbesartan uygulamasının renoprotektif etkiye neden olduğu, Ang II aracılı apoptoz artışını engelleyebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Streptozotocin diyabeti, böbrek, apoptoz, Bcl-2, irbesartan

Cerrahpaşa Tıp Derg 2009; 40: 15-22

## *Protective effects of irbesartan on apoptosis in experimental diabetic nephropathy*

### Abstract

**Objectives:** The aim of this study is to investigate effects of irbesartan as an Ang II type 1 blocker on apoptosis and anti-apoptotic protein Bcl-2 in the streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat.

**Methods:** 24 male Wistar albino rats were used for three groups. The first group was the non-diabetic control group. Second group was the untreated STZ-induced diabetic group, (60 mg/kg, single dose, i.p). The third group was irbesartan treated (15 mg/kg/day, intragastric, for 4 week) STZ-diabetic rats. During the period of the experiment, blood glucose and microalbuminuria levels of the rats were measured. At the end of the study renal tissue samples were fixed in neutral formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were examined for apoptosis by TUNEL method and for anti-apoptotic protein Bcl-2 by immunohistochemical staining.

**Results:** The microalbuminuria levels of the irbesartan treated diabetic group were found reduced when compared with the untreated diabetic group ( $p<0,001$ ). Widespread apoptosis was seen in the tubules of untreated diabetic group ( $p<0,01$ ) and a decrease in the immunoreactivity of Bcl-2 were observed in glomeruli of the diabetic group. In the irbesartan treated diabetic group, antiapoptotic Bcl-2 immunoreactivity was similar to the results obtained from the control group and a decrease the number of apoptotic cells were observed.

**Conclusion:** The results suggested that irbesartan treatment has renoprotective effects in STZ-diabetic nephropathy. AT1 receptor blockade inhibites Ang II mediated apoptosis in the STZ-diabetic nephropathy.

**Key words:** Streptozotocin diabetes, kidney, apoptosis, Bcl-2, irbesartan.

Cerrahpaşa J Med 2009; 40: 15-22

**Alındığı Tarih:** 08 Ocak 2009

**Yazışma Adresi (Address):** Dr. Matem Tunçdemir

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

34098 - Cerrahpaşa - İstanbul

**e-posta:** tmatem@istanbul.edu.tr

**D**iyabetik nefropati, polikistik böbrek hastalığı, akut ve kronik böbrek yetmezliği ve glomerulonefritis gibi klinik ve deneysel böbrek hastalıklarında, iskemi, eksojen toksinler veya endojen mediatörlerin neden olduğu böbrek doku hasarı sonucu glomerüllerde veya

tubüllerde görülen hücre ölümünde apoptozun önemli rol oynadığı bildirilmiştir [1,2,3]. Diabetes mellitus, tubular atrofi ve interstisyel fibroz ile ilişkili kronik glomerulopatiye neden olmakta, akut nefrotoksik hasar neticesinde renal hücre kaybı ile sonuçlanmaktadır [4].

Böbrek hemodinamiğinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan Renin-Angiotensin Sistemi (RAS)'in bir üyesi olan Angiotensin II'nin (A II) apoptoz ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesine katıldığı bildirilmiştir. Hücresel proliferasyonun büyük oranda Angiotensin tip-1 reseptörleri (AT-1R) aracılığı ile olduğu, proliferasyon inhibisyonunun veya apoptozun ise AT-2R'leri aracılığı ile olduğu ileri sürülmektedir [5]. AII'nin diyabette ilerleyici nefron kaybına aracılık ettiği ve apoptotik hücre ölümünü uyardığı belirtilmektedir [6]. Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ) ve AII antagonistleri diyabetik nefropati, kronik böbrek hasarı ve hipertansiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ACEİ, AII üretimini engellerken, angiotensin reseptör antagonistleri ise AT reseptörlerini bloke eder. Diyabetik nefropatinin önlenmesinde gerek ACEİ'nin gerekse AT-1R blokerlerinin tek başlarına veya birlikte kullanımları ile RAS üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir [7,8]. Diyabetik nefropatide yararlı etkileri olduğu bilinen ACEİ ve AT-1R blokerlerinin, böbrek dokusunda görülen apoptozu önleyici etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, böbrek hemodinamiğinin kontrolünü sağladıkları veya A II'nin apoptoz üzerine olan etkilerini engelledikleri gösterilmiştir [1].

Bcl-2 (B-hücre lenfoma/lösemi-2) ailesinin yaşamsal (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-b) ve apoptotik (Bax, Bad, Bid, Bim, Bak, Hrk, APR/Noxa, Puma) üyeleri bir çok sistemde apoptozun mitokondri yolunun ana düzenleyicileridir. Yaşamsal Bcl-2 proteinleri mitokondri dış membranına bağlanırlar ve mitokondriden sitokrom-c'nin serbestleşmesini önleyerek apoptozu engellerler ve hücre yaşamını uzattılar [9]. Bax, Bcl-2'nin proapoptotik antagonisti olup apoptoz sürecinde sitoplazmadan mitokondriye geçerek mitokondri membranında kanallar açılmasına ve sitoplazmaya sitokrom-c'nin serbestleşmesini sağlar. Bcl-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri etkileşim halindedirler ve hücre yaşamı üzerindeki etkileri bir denge üzerine kuruludur.

Hücrelerin kaderini Bcl-2/Bax oranı belirler. Bcl-2 homodimerlerinin artışı hücre yaşamını sürdürmesine, Bax homodimer artışının hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir [10]. Diyabetik nefropatide yüksek glukozun proksimal tubul epitel hücrelerinde DNA fragmentasyonuna neden olduğu ve yüksek glukozun antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-x ekspresyonlarının azalmasına, buna karşı proapoptotik Bax ekspresyonunun artışına neden olduğu gösterilmiştir [11].

Çalışmamızda bir AT-1R blokleri olan irbesartan'ın streptozotocin (STZ)-diyabetik sıçanların böbrek dokusunda apoptoz ve apoptozu düzenleyen antiapoptotik Bcl-2 proteini üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada 24 adet erkek Wistar tipi albino sıçandan oluşan 3 grup kullanıldı. 1. grup: sağlıklı kontrol (n:8); 2. grup: tedavisiz STZ-diyabetik (60 mg/kg, tek doz, i.p) (n:8); 3. grup: irbesartan (15 mg/kg/gün, intragastrik, 4 hafta) (n:8) uygulanan STZ-diyabetik sıçan grubu olarak düzenlendi. Tüm gruplardaki hayvanlar içinde %21 protein bulunan sıçan yemleriyle serbest olarak beslendi. Her gün taze içme suyu verildi. Kafesler muntazam olarak temizlendi. Tüm gruplara ait hayvanların böbrekleri deney bitiminde (31. gün) eter anestezisi altında gerekli işlemler için çıkarıldı (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu onay tarihi: 20 Eylül 2006)

*Kan glukoz:* 1, 15 ve 30. günlerde tüm gruplardaki hayvanların kan glukoz düzeyi ölçümleri kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinden glukometre ile glikotiksler (Accu-Check Active cihazı, Accu-Check Active Glucose test stripi, ROCHE, Germany) kullanılarak yapıldı.

*Mikroalbuminüri ve Günlük idrar miktarı:* 1,15 ve 30. günlerde gruplardaki hayvanların metabolizma kafeslerinde toplanan 24 saatlik idrar örneklerinin miktarları ölçüldü ve bu idrardan mikral test (Micral test idrar stripi, ROCHE, Germany) yardımı ile mikroalbuminüri düzeyleri tespit edildi.

*Vücut ağırlığı, Böbrek ağırlığı ölçümleri:* Vücut ağırlık ölçümleri 1, 15 ve 30. günlerde tartılarak saptandı.

Çalışma sonunda eter anestezisi altında çıkarılan sol böbrekler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra tartıldı.

### Morfolojik Yöntemler

**Işık mikroskopi:** %10'luk nötral formolde tespit edilen parafine gömülen böbrek dokularından 5mm kalınlığında alınan doku kesitleri ışık mikroskopi ve immunohistokimya yöntemi için jelatin kaplı lamlara alındı. Periodik Asit Schiff (PAS) boyaması yapıldı.

**Glomerül çap ölçümü:** PAS boyası yapılan böbrek doku kesitlerinde glomerül boyut ölçümü oküler mikrometresi (Beck Kassel, CBS, px8) ile x 40 büyütmede rastgele alanlardan seçilen 30 adet düzgün şekilli glomerül üzerinde çap ölçülerek yapıldı.

**İmmünohistokimya:** Böbrek doku kesitlerine streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile fare monoklonal Bcl-2 (1:100 sulandırma) (C-2, Santa Cruz: 7382) antikoru kullanılarak Novostain Universal Detection Kit NCL-RTU-D (Novo Castra Lab.) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı [12].

**Bcl-2 immun boyamanın değerlendirilmesi:** Her böbrek doku kesitinde LEICA marka ışık mikroskobunda X40 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda immun boyamanın değerlendirilmesi ile yapıldı. (-; boyanma yok, +; zayıf, ++; orta derecede, +++; şiddetli boyanma)

**TUNEL Metodu (In Situ DNA Uç İşaretleme Yöntemi):** Böbrek doku kesitlerine apoptoz tespiti amacıyla TUNEL metodu (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Peroxidase Kit (S7101-KIT, Millipore), kit içerisinde önerilen işlem sırasına göre uygulandı. Parafini giderilen ve suya indirilen doku kesitleri, proteinlerin sindirilmesi amacıyla proteinaz K (20µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi. Distile su ile çalkalanan kesitler endojen peroksidazın baskılanması için % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk oda ısısında muamele edildi. PBS ile yıkandı. İyice kurulan kesitlerin üzerine 75µl 1xDengeleyici tampon konulup plastik lameller ile kapatıldı ve 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Plastik lameller kaldırılıp etrafı kurulan her lam üzerine 55µl Tdt enzimi konulup plastik lamel ile kapatıldı. Nemli ortamda 37°C etüvde 1 saat inkübe edilen kesitler Durdurma/Yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkandı. PBS ile yıkan-

dıktan sonra kesitler 65µl "Anti-Digoksinin-Peroksidaz" ile oda ısısında 30 dk muamele edildi. PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine 75µl DAB (diaminobenzidine) substrat solusyonu damlatıldı. 3-6 dk arasında pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tespit edildi. Renk reaksiyonunun oluşmasından hemen ardından kesitler distile su ile yıkandı. Nukleusların boyanması için kesitlere metil yeşili boyaması uygulandı.

**Boyama Özgüllüğünün Kontrolü:** Pozitif kontrol olarak, 5 mg/kg dozunda Deksametazon uygulanmış erişkin sıçana ait timus dokusu kullanıldı. Negatif kontrol olarak kullanılan kesitin üzerine Tdt enziminin uygulandığı aşamada Tdt enzimi yerine distile su damlatıldı.

**Apoptotik indeks:** Apoptotik indeksin tespiti, LEICA marka ışık mikroskobunda x40 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda glomerüllerde, tubüllerde ve interstisyel alanlarda TUNEL metodu ile pozitif olarak işaretlenen apoptotik nukleuslar sayılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı; Apoptotik İndeks (APOI)=Apoptotik nukleus sayısı/Toplam hücre sayısı x 100 [13].

**İstatistiksel yöntemler:** Tüm gruplardaki hayvanların kan glukoz, vücut ağırlık, mikroalbuminüri, idrar hacmi ölçümlerinin, böbrek ağırlıklarının ve glomerül boyutlarının ayrıca apoptotik indeksin istatistiksel olarak değerlendirmesinde gruplar arası kıyaslamalar için Kruskal-Wallis testi, her grup için ölçüm periyotları arası, grup içi eşli kıyaslamalarda Friedman testi kullanıldı. Çoklu kıyaslama (post-hoc) testi olarak, hem gruplar arasında, hem de grup içinde Dunn-testi uygulandı. Anlamlılık seviyesi p<0.05 olarak seçildi [14].

### Bulgular

**Kan glukoz düzeyi (mg/dl):** STZ uygulaması yapılan 2 grubun diyabetik oldukları, 48 saat sonra ölçülen kan glukoz düzeyi ölçümlerinde sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış (p<0.01) bulunması ile saptandı. STZ-diyabetik ve irbesartan uygulanan diyabetik grupların 1., 15. ve 30. günlerde ki kan glukoz düzeyleri kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 1).

**Mikroalbuminüri düzeyleri (mg/l):** Çalışma başlangıcında idrar mikroalbuminüri değerleri arasında istatis-

**Tablo 1.** Tüm gruplara ait kan glukoz (mg/dl), mikroalbuminüri (Ma) (mg/l), günlük idrar miktarı (ml/gün), vücut ağırlık (g), Böbrek Ağırlığı/Vücut Ağırlığı (mg) (BA/VA) ve glomerül çap ( $\mu$ ) değerlerinin Kontrol, STZ-diyabetik ve STZ+İrbesartan gruplarında karşılaştırılması.

Grup (n=8)	Kan Glukoz 30. gün	Ma 30. gün	Günlük idrar miktarı	Vücut ağırlığı	BA/VA ( $\times 10^{-3}$ )	Glomerül çap
Kontrol	93.37 $\pm$ 2.77	1.00 $\pm$ 0.00	16.00 $\pm$ 1.07	228.50 $\pm$ 19.0	33.74 $\pm$ 0.34	105.02 $\pm$ 4.74
STZ-diyabetik	426.75 $\pm$ 73.14 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	47.38 $\pm$ 3.11 <sup>d</sup>	182.50 $\pm$ 25.55 <sup>f</sup>	5.29 $\pm$ 0.66 <sup>g</sup>	122.44 $\pm$ 3.92
STZ+İrbesartan	473.13 $\pm$ 89.13 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	22.13 $\pm$ 3.60 <sup>e</sup>	164.25 $\pm$ 28.79 <sup>f</sup>	5.01 $\pm$ 0.78 <sup>g</sup>	100.80 $\pm$ 5.61 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> $p$ <0.01, <sup>b</sup> $p$ <0.01, <sup>d</sup> $p$ <0.001, <sup>f</sup> $p$ <0.05, <sup>g</sup> $p$ <0.01 Kontrol gruba kıyasla, <sup>c</sup> $p$ <0.001, <sup>e</sup> $p$ <0.05, <sup>h</sup> $p$ <0.001 STZ-diyabetik gruba kıyasla

tiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p$ >0.05). 15.günde sağlıklı kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir artış saptandı ( $p$ <0.01). Çalışma sonunda ölçülen mikroalbuminüri değerlerinin STZ-diyabetik gruba kıyasla İrbesartan uygulanan diyabetik grupta anlamlı olarak azalmış olduğu saptandı ( $p$ <0.001) (Tablo 1).

**Günlük idrar miktarı (ml/gün):** 15.günde yapılan ölçümlerde sağlıklı kontrol grubuna kıyasla STZ-diyabetik ve irbesartan tedavili diyabetik grupların idrar miktarlarında anlamlı bir artış saptandı ( $p$ <0.001). 30.günde; STZ-diyabetik gruba kıyasla irbesartan tedavili diyabetik grup da anlamlı azalma saptandı ( $p$ <0.05) (Tablo 1).

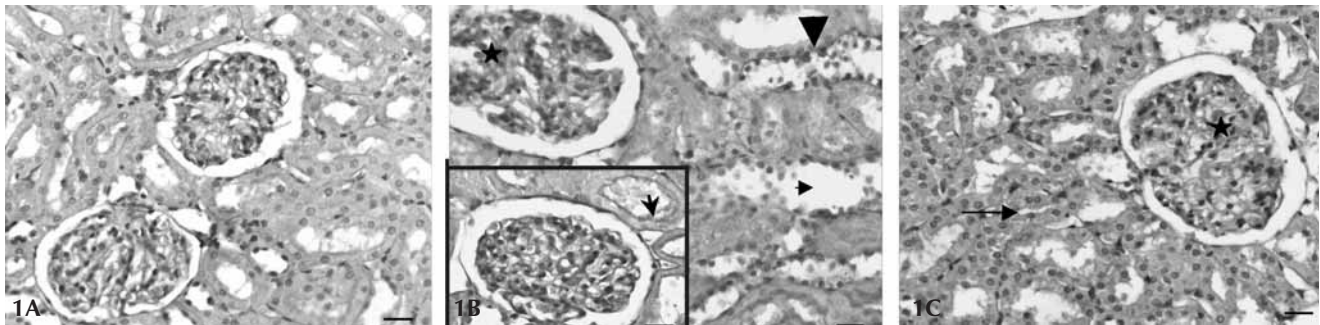
**Vücut ağırlık değerleri (g):** Deney sonundaki vücut ağırlıkları ölçümünde, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla tüm diyabetik gruplar arasında belirgin azalma saptandı ( $p$ <0.05), ancak diyabetik ve irbesartan tedavili diyabetik gruplar arasında fark yoktu (Tablo 1).

**Böbrek ağırlığı/Vücut ağırlığı (%) değerleri:** Böbrek ağırlığının vücut ağırlığına oranı açısından sağlıklı kontrol grubuna kıyasla tüm STZ-diyabetik gruplarda anlamlı derecede bir artış saptandı ( $p$ <0.01) (Tablo 1).

**Glomerül Boyutu ( $\mu$ ):** STZ-diyabetik gruba ait glomerüllerin tüm gruplardan daha büyük boyutta oldukları, irbesartan uygulanan diyabetik grubunun glomerül çap ölçümlerinin STZ-diyabetik gruba kıyasla daha düşük olduğu saptandı ( $p$ <0.001) (Tablo 1).

### Morfolojik Bulgular

**Histokimya-PAS boyaması:** STZ-diyabetik grubun kesitlerinde, glomerül kapiller bazal membran kalınlaşması, glomerülde segmental bozulma ve hipertrofik görünüm saptandı. Dilate tubüller ayrıca tubül sitoplazmasında yer yer PAS (+) glikojen birikimleri görüldü (Şekil 1B). İrbesartan uygulanan diyabetik grupta; glomerül ve tubüllerde diyabete özgü belirtilerin azaldığı saptandı (Şekil 1C).



**Şekil 1.** Sağlıklı kontrol grubuna ait böbrek doku kesiti (1A). STZ-diyabetik gruba ait böbrek kesitlerinde, hipertrofik görümlü glomerül (\*), tubüllerde yer yer glikojen birikimleri (→) ve dilatasyon (▲) (1B). İrbesartan uygulanan diyabetik grupta, tedavisiz diyabetik gruba kıyasla normal görümlü tubüller (→) (1C). (Boya: PAS+HI) (Bar 20 $\mu$ m).

**Bcl-2:** Sağlıklı kontrol grubunda (Şekil 2 A, B) glomerül ve interstisyel alanlarda görülen Bcl-2 immun pozitif hücreler tedavisiz diyabetik grupta (Şekil 2 C, D) azalmış olarak görüldü. İrbesartan uygulanan diyabetik grupta ise Bcl-2 immun reaksiyonunun tedavisiz diyabetik gruba göre artmış olduğu tespit edildi (Şekil 2 E, F) (Tablo 2).

**Apoptoz tespiti (TUNEL):** Sağlıklı kontrol grupta kortekste distal tubüllerde ve medullada çok az sayıda TU-

NEL pozitif hücre gözlenirken glomerüllerde boyanma gözlenmedi (Şekil 3A). STZ-diyabetik grupta glomerüllerde çok az sayıda apoptotik hücre gözlenirken, kortekste hasarlı distal tubüllerde ve medulla bölgesinde çok sayıda apoptotik hücre gözlendi ve bu artış kontrol gruba kıyasla ileri derecede anlamlı tespit edildi ( $p<0.01$ ) (Şekil 3 C-D). İrbesartan uygulanan diyabetik grupta tubüllerdeki apoptotik hücrelerin sayısında tedavisiz diyabetik gruba göre gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 3 B) (Tablo 3).

**Tablo 2.** TUNEL boyaması yapılan böbrek doku kesitlerinde tubüllerde apoptotik indeks değerlerinin (APOİ) karşılaştırılması.

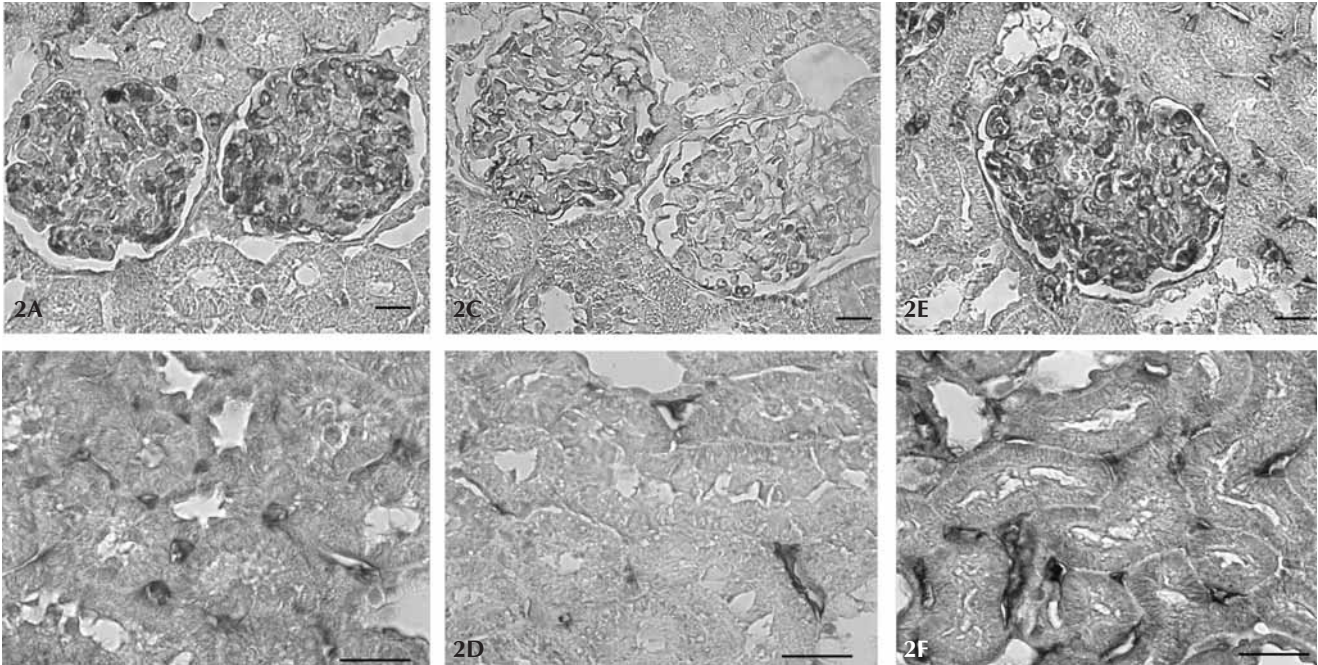
Grup (n=8)	APOİ
Kontrol	2.69±0.76
STZ-diyabetik	31.00±4.96 <sup>a</sup>
STZ+İrbesartan	11.97±1.88

<sup>a</sup> $p<0.01$  kontrol gruba kıyasla

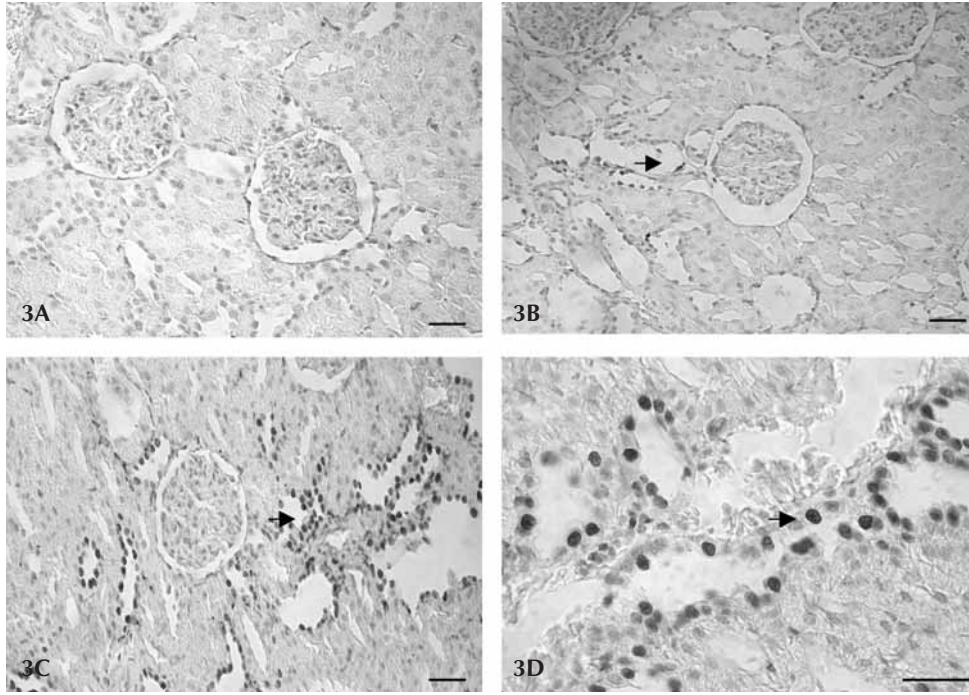
**Tablo 3.** Deney gruplarına ait Bcl-2 immun boyamasının reaksiyon şiddeti bakımından değerlendirilmesi.

Grup (n=8)	Glomerül	Tübül	İnterstisyel alan
Kontrol	++	+	++
STZ-diyabetik	+	-/+	-/+
STZ+İrbesartan	++/+++	++	+++

(-; boyanma yok, +; zayıf, ++; orta derecede, +++; şiddetli boyanma)



**Şekil 2.** Bcl-2 immun boyaması. Sağlıklı kontrol grubu (2A, 2B). STZ diyabetik grupta Bcl-2 immun reaktivitesi sağlıklı kontrol gruba kıyasla azalmış olarak (2C, 2D), İrbesartan uygulanan diyabetik grupta Bcl-2 immun reaksiyonu kontrol gruba benzer olarak görülmekte (2E, 2F). İmmun Boyama: Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi, Antikor: Monoklonal fare Bcl-2 antikor, Zıt Boya: Hematoksilin, (Bar 20µm)



**Şekil 3.** TUNEL yöntemi. Sağlıklı kontrol gruba ait böbrek doku kesiti (A). İrbesartan uygulanan diyabetik grubun böbrek tubüllerinde apoptotik hücre sayısının tedavisiz diyabetik gruba kıyasla azalmış olduğu görülmekte (→) (3B). STZ-diyabetik gruba ait böbrek kesitinde distal tubüllerde çok sayıda apoptotik hücre görülmekte (→) (3C, 3D).TUNEL yöntemi, Zıt Boya: Metil Yeşili. (Bar: 20 µm)

## Tartışma

Apoptoz, genetik olarak kontrol edilen, iyi organize olmuş dokularda hücre sayısını belirlemede çok önemli olan hücre ölümünün özel bir çeşididir. Akut ve kronik böbrek hastalıklarında apoptozun önemli bir hücre ölüm şekli olduğu gösterilmiştir. Diyabetik nefropati, siklosporin nefropatisi, üreterik obstruksiyonda görülen apoptoz artışı, tubüler patolojik değişimler ve tubüler atrofi ile ilişkilidir [9,15]. Hiperglisemide serbest radikal oluşumundaki artışın diyabet komplikasyonlarının gelişimine katıldığı, diyabetik böbrekte artmış oksidatif stresin apoptozu teşvik ettiği ve apoptozun diyabetik nefropati gelişimine katılabileceği ileri sürülmektedir [16].

Kumar ve ark.[17], diyabetik nefropatili insanlara ait böbrek biyopsi örneklerinde TUNEL metodu ile hem proksimal ve distal tubül epitel hücrelerinde, hemde interstisyel hücrelerde apoptoza rastlamışlar ancak glomerüller de apoptozu tespit edememişlerdir. STZ ile oluşturulan deneysel diyabette böbrekte hasarın ortaya

çıkmasında apoptotik hücre ölümünün önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda STZ diyabetik sıçanların böbrek dokusunda, distal tubüllerde ve Henle kulpunda TUNEL pozitif nukleuslar saptanırken, glomerüller de apoptoz gözlenmemiştir [16,17,18]. Bu çalışmada da sağlıklı kontrol grubunda tubüllerde ve medulla bölgesinde çok az sayıda apoptotik hücreler saptandı. STZ-diyabetik grupta distal tubüllerde ve medullada çok sayıda apoptotik hücre gözlenirken, glomerüllerde çok az sayıda apoptotik hücrelerin gözlenmesi hipergliseminin korteks ve medulladaki tubüllerde apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Bu bulgular diyabetik nefropatinin patogenezinde apoptotik hücre ölümünün belirgin bir rolü olduğunu desteklemektedir.

Glikojen birikimi, hücrelerde apoptoz oluşumuna ve diyabetik nefropatinin bir özelliği olan tubüler atrofi gelişimine katıldığı, bir çok anormal hücre sitoplazmasında glikojen partiküllerinin olduğu ve bu lezyonun insülin tedavisi ile önlenebileceği gösterilmiştir. STZ enjek-

siyonunun 24. saatinde diyabetik sıçan böbreğinde kortikal çıkan kol hücrelerinde glikojen birikimleri tespit edilmiştir. Bu hücrelerin ya apoptoz ya da nekroz yoluyla öldükleri gösterilmiştir. Diyabetiklerde yüksek kan glukozu nedeniyle apoptozu kontrol eden genlerin etkilendiği bildirilmiştir [9,15]. Hipergliseminin anti-apoptotik protein Bcl-2 gen ekspresyonunu azaltırken proapoptotik protein bax'ın mRNA düzeylerini geçici olarak artırdığı ve böbrekte tubüller apoptoz oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [19]. Bu çalışmada da tedavisiz diyabetik grubun glomerül ve hasarlı tubüllerinde Bcl-2 immun reaksiyonunda azalma tespit edildi. Bu değişimlerin tedavisiz diyabetik grubun kan glukoz düzeylerinde tespit edilen artışa ve tubül sitoplazmasında yer yer görülen glikojen birikimlerine paralel olarak tespit edilmesi, hipergliseminin apoptozu düzenleyen proteinlerin ekspresyonlarını değiştirerek böbrekte tubular apoptoz gelişimine neden olduğunu göstermektedir.

Klinik ve deneysel diyabette ve hipertansif nefrosklerozda A II'nin aktivite artışına bağlı olarak apoptotik hücre ölümünde artış olduğu gösterilmiştir [5]. A II'nin neden olduğu apoptozun genel olarak AT-2 reseptörleri aracılığıyla olduğu bunun yansısı AT-1R'leri ile de ilişkili olduğu belirtilmektedir [20]. Ding ve ark. [5], A II'nin glomerül epitel hücrelerinde apoptozu uyardığı, apoptozun Fas ve Fas L'in ekspresyon artışı ile ilişkili olduğunu, A II'nin proapoptotik bax ekspresyonunu artırdığını tespit etmişlerdir. STZ-diyabetik sıçanlara AT-1R ve AT-2R blokleri uygulaması ile böbrekte AII'nin neden olduğu apoptozun azalabileceği belirtilmektedir [5,17]. Kelly ve ark. [18], STZ-diyabetik sıçanlara bir ACE inhibitörü olan perindopril ve AT-1R blokleri olan valsartan uygulaması sonucunda diyabetik gruba kıyasla her iki grupta da apoptotik hücre sayısında azalma tespit etmişlerdir.

Apoptozun tubüllerde fazlaca gözlenmesinin tubulointerstisyel mikroçevrenin yıkımına yol açan hücreler arası matriks birikimi ve miyofibroblastların aktivasyonu sonucu olduğu, yaygın olarak apoptoz görülen tubüllerin fazlaca Bax ekspresyonu yaptıkları gösterilmiştir. Başlangıçta hasarlı tubüller hücrenin kendini koruma mekanizmasına bağlı olarak hem Bax hemde Bcl-2 ekspresse ederler. Hasarın şiddetine bağlı olarak korunma mekanizmasının tükenmesiyle Bcl-2 ekspresyonu yapan hücrenin hasarlayıcı faktörlere maruz kaldığı ve

Bax ekspresyonu yaparak apoptozu uğradığı bildirilmiştir [21].

Bu çalışma, STZ-diyabetik nefropati modelinde AT-1R blokleri irbesartan ile apoptoz arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. Bu çalışmada irbesartan uygulanan diyabetik grupta, tedavisiz diyabetik gruba kıyasla tubüllerde apoptotik hücre sayısında azalma buna karşın glomerül, tubül ve interstisyel alanlarda antiapoptotik protein Bcl-2 immun reaksiyonunda artış tespit edildi. Bu değişimler göz önüne alındığında, diyabetik nefropatide AT-1R blokleri ile RAS'i baskılamanın, A II artışı ile teşvik edilen apoptozun engellenmesi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Deneysel diyabetik nefropatide AT1 reseptör blokleri olan irbesartan'ın böbrek hemodinamiğinin düzenlenmesi üzerine renoprotektif etkilerinin olduğu, doku hasarını kontrol altına alarak apoptozu kontrol eden antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin dokuda artışına yol açarak A II aracılı apoptozu engelleyebileceği sonucuna varıldı.

## Teşekkür

Çalışmada kullanılan deney gruplarından elde edilen verilerin istatistik analizlerindeki yardımlarından dolayı Dr. Ömer UYSAL'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Antus B, Mucsi I, Rosivall L. Apoptosis induction and inhibition of cellular proliferation by angiotensin II: possible implication and perspectives. *Acta Physiologica Hungarica* 2000; 87: 5-24.
- 2- Valdés F, Pásaro E, Díaz I, et al. Segmental heterogeneity in Bcl-2, Bcl-xL and Bax expression in rat tubular epithelium after ischemia-reperfusion. *Nephrology (Carlton)* 2008; 13: 294-301.
3. El Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* 2003; 64: 1553-1563.
4. Wang VY, Tzanidis A, Divjak M, et al. Altered signalling and regulatory mechanisms of apoptosis in focal and segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1422-1433.

5. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001; 38: 1382-1387.
6. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 173-180.
7. Ruilope LM. Renoprotection and renin-angiotensin system blockade in diabetes mellitus. *Am J Hypertension* 1997; 10: 325-331.
8. Kalender B, Öztürk M, Tudemir M, et al. Renoprotective effects of valsartan and enalapril in STZ-induced diabetes in rats. *Acta Histochem* 2002; 104: 123-130.
9. Wong VY, Keller PM, Nuttall ME, et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Eur J Pharm* 2001; 433: 135-140.
10. Ortiz A, Justo P, Sanz A, et al. Targeting apoptosis in acute tubular injury. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1589-1594.
11. Makino H, Sugiyama H, Kashihara N. Apoptosis and extracellular matrix-cell interactions in kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: 67-75.
12. ztürk M. Editrler: S Yilmazer, M Öztürk. *Işık Mikroskopide İmmünoişaretleme Yöntemleri. Uygulamalı Ultrastrüktürel İmmunohistokimya Kurs Kitapçığı. İstanbul, 6-8 Mayıs 1998; 48-74.*
13. Tudemir M, Öztürk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Histol* 2008; 39: 605-616.
14. UNISTAT 5.0 (C.T.F. Biyoistatistik) ®
15. Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003; 83: 1069-1080.
16. Zhang G, Khanna P, Chan LL, et al. Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem Mol Med* 1997; 61: 58-62.
17. Kumar D, Zimpelmann J, Robertson S, Burns KD. Tubular and interstitial cell apoptosis in the streptozotocin-diabetic rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 96: 77-88.
18. Kelly DJ, Cox AJ, Tolcos M, et al. Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-angiotensin system in diabetic Ren-2 rats. *Kidney Int* 2002; 61: 31-39.
19. Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Investig Med* 1997; 45: 50-56.
20. Cao Z, Kelly DJ, Cox A, et al. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 2000; 58: 2437-2451.
21. Zhang G. Role of apoptosis and Bcl-2/Bax in the development of tubulointerstitial fibrosis during experimental obstructive nephropathy. *Exp Nephrol* 2001; 9: 71-80.