

HİPEROKSALÜRİNİN MESANE EPİTELİ ÜZERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HASAR VE BU HASARIN LOSARTAN TARAFINDAN GERİ DÖNDÜRÜLMESİ *

Burçin TUNÇ, Oktay DEMİRKESEN, İlhan UYANER, Ebru GÜREL, Ayşegül KAPUCU, Tahir TURAN

Background and Design.- Hyperoxaluria is a recognized cause of tubulointerstitial lesions in the kidney and it may contribute to chronic renal failure. Although the mechanism could not be well understood, in previous studies it was demonstrated that angiotensin II type I receptor blocker losartan was effective against the progression of tubulointerstitial lesions caused by hyperoxaluria. As far as we know, up to date the effects of hyperoxaluria on bladder were not studied although hyperoxaluric urine is stored in the bladder. In this study we tried to evaluate the damage of hyperoxaluria on bladder and epithelium, and action of losartan on these lesions: Two-month-old male Sprague-Dawley rats were randomized into four groups according to drinking water, 1-control animals given tap water only (n: 10 rats), 2-animals made hyperoxaluric by adding 1% ethylene glycol to the drinking water (n: 10 rats), 3-animals that were fed with 1% ethylene glycol plus 20 mgr/l angiotensin II type I receptor blocker losartan (n:10 rats), 4-animals fed with only losartan (n: 10 rats). In metabolic cages at the beginning and after four weeks, urine of the rats was collected for twenty-four hours and creatinine clearance, urinary albumin excretion, urinary pH and urinary oxalate levels were determined. Results were compared with the beginning levels and within the groups. Kruskal Wallis, ANOVA and Wilcoxon Rank probability tests were used as statistical methods and p<0.05 were considered as significant.

Results.- There was no difference in urine oxalate excretion in ethylene glycol and ethylene glycol and losartan group. Renal functions significantly worsened in ethylene glycol group when compared with ethylene glycol and losartan group. Urine pH and nitrate levels were similar among the groups. Histological examination of the bladders revealed that in the second group, there were increased intracytoplasmic vacuolisation in the epithelium, epitheliums' heights were also increased and in the connecting tissue there were increased bleeding points. Although some bleeding points in the connective tissue were seen in the third group, these were recovered by organization and there was increased mitosis at the connective tissue. Bladder's height was decreased compared to group 1 and intracytoplasmic vacuolization was not seen in this group. Bladder specimens had similar properties in control group and losartan group.

Conclusion.- In this study we showed that hyperoxaluria causes epithelial damage in the bladder as in the tubulointerstitium. Losartan reverses this damage by increasing mitosis and prevents bladder epithelium. At this moment we do not know the relation between our histochemical and hystologic result and clinical symptoms. Further investigations are needed on this subject.

Tunç B, Demirkese O, Uyaner İ, Gürel E, Kapucu A, Turan T. Effects of hyperoxaluria on bladder epithelium and preventive role of losartan for these lesions. Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 69-73.

Etilen glikol, hiperoksaluri oluşturan öncü bir maddedir. Hiperoksaluri, böbrek dokusunda tubulointerstisyel hasarın en bilinen nedenlerinden birisi olup, tubuler epitel hücre nekrozu, tubuler laminada kalsiyum oksalat kristal birikimi, mononükleer hücre infiltrasyonu, interstisyel hücre proliferasyonu, bunların sonucu olarak da ekstrasellüler matrikste artış ve fibrozis oluşturarak kronik renal yetmezliğe de sebep olmaktadır.^{1,2} Hiperoksaluri sonucu renal tubuluslarda ve interstisyumda hasar oluştuğu bilinmesine

karşın, hasar oluşmasında rol oynayan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Oksalatın yüksek konsantrasyonlarda toksin gibi davranarak serbest radikaller oluşturduğu ve bu şekilde hücre sel hasara sebebiyet verdiği düşünülmektedir.^{1,3} Günümüzde oksidatif stresin, fibrotik mekanizmaları tetiklediği bilinmektedir. Renin-anjiotensin sisteminin, öncü fibrotik mekanizmaların özellikle anjiotensin II tip I reseptörü uyarılması ile renal interstisyel fibrozis gelişmesinde kritik bir rol oynadığı

***Anahtar Kelimeler:** Hiperoksaluri, losartan; **Key Words:** Hyperoxaluria, Losartan; **Alındığı Tarih:** 1 Nisan 2005; Dr. Burçin Tunç, Doç. Dr. Oktay Demirkese: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul; Bio. İlhan Uyaner, Bio. Ebru Gürel, Bio. Ayşegül Kapucu: İ.Ü.Fen Fakültesi Zooloji Bilim Dalı, İstanbul; Doç. Dr. Tahir Turan: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Denizli; **Yazışma Adresi (Address):** Dr. Burçin Tunç, Adres: Merkez Mah. Huzur Sok. No: 2/7 Şişli, İstanbul.

gösterilmiştir.⁴ Anjiotensin II'nin mononükleer hücreler aktivitesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.⁵ Anjiotensin II tip I reseptör blokerlerinin antioksidan savunma mekanizmalarını uyardığı da hayvan deneyleri ile ispatlanmıştır.⁶ Bu bilgilerden yola çıkan birçok araştırmacı, anjiotensin II tip I reseptör blokerlerinin (losartan), renal tubuler dokuda hiperoksalurinin meydana getirdiği fibrotik hasarı geri döndürdüğü ve bu sayede de böbrek fonksiyonlarını koruduğunu göstermiştir.^{1,7,8} Fakat bildiğimiz kadarı ile hiperoksalurinin mesane dokusu üzerine etkisi bugüne kadar çalışılmamıştır.

Bizde bu çalışmada hiperoksalurik idrarlar temas eden mesane dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine losartanın etkisini inceledik.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Başlangıç ağırlığı minimum 250 gr olan 2 aylık 40 adet erkek Sprague-Dawley sıçanı içme sularına eklenen maddelere göre 4 gruba ayrıldı. Grup 1, kontrol grubunu oluşturmak için normal içme suyu ile beslenen sıçanlar (10 adet); Grup 2, hiperoksalurik hale getirmek için içme sularına %1 oranında Etilen Glikol (EG) eklenen sıçanlar (10 adet); Grup 3, hiperoksaluri durumunda anjiotensin II tip 1 blokerinin etkinliğini değerlendirmek için, içme sularına %1 EG ile 20 mg/lit anjiotensin II tip 1 blokeri losartan eklenen sıçanlar (10 adet); ve Grup 4, içme sularına sadece 20 mg/lit losartan eklenen sıçanlar olarak oluşturuldu. Hayvanlar aynı sıçan yemi ile 4 hafta süre ile beslendi. Deneye başlamadan önce ve deneyin sonunda hayvanların 24 saatlik idrarları toplanarak, idrar kreatinin, idrar oksalat düzeyi, mikroalbuminüri ve idrar pH'sı bakıldı. Bu değerler, başlangıç değerleri ve gruplar arasında karşılaştırıldı. İstatistiksel metot olarak, Kruskal Wallis, ANOVA ve Wilcoxon Rank testleri kullanıldı.

Metabolik kafeslerde idrarları toplandıktan sonra bütün hayvanlar eter anestezisi ile sakriye edildi. Mesaneleri çıkarıldı. Mesane dokusu, ışık mikroskobu çalışmaları için %10'luk

formaline, histokimyasal çalışmalar için %4'lük paraformaldehite alınarak fikse edildiler.

Işık mikroskobu incelemeleri için, mesane dokusu %10'luk formalin fiksatifinde tespit edildikten 24 saat sonra, %70 alkole alındı ve alkol birkaç defa değiştirilerek fiksatifin dokulardan çıkması sağlandı. Daha sonra, yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırılan parçalar, parafine (58°C'lik) gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitlere, hematoksilin-eozin (H+E) boyama yöntemi ve bağ dokusunun daha iyi gösterilebilmesi içinde Mason Trikrom uygulandı.

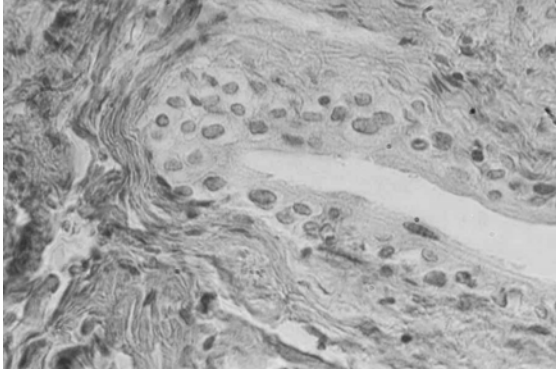
BULGULAR

Deneye başlamadan önce toplanılan 24 saatlik idrarların değerlendirilmesinde, idrar kreatininin gruplar arasında birbirine benzer düzeyde olduğu saptandı (p=0,516). Deneyin sonunda, idrar kreatinin düzeyinin, sadece EG ile beslenen grupta (ortalama: 4.09 mgr/dl) diğer gruplara oranla anlamlı olarak daha düşük olduğu (p=0,005), EG ve losartan birlikte verilen grupta ise idrar kreatinin düzeyinin (ortalama: 12.05 mgr/dl) kontrol grubu ve sadece losartan verilen gruptaki sıçanlar ile benzer seviyede olduğu görüldü. EG grubundaki sıçanlar (Grup 2) ile EG ve losartan grubundaki sıçanların (Grup 3) idrar oksalat düzeyi arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık olmadığı (p=0,802) görüldü. Mikroalbuminüri ve idrar pH'sı karşılaştırıldığında ise gruplar arasında ve grupların deney öncesi ve sonrası değerlerinde bir değişiklik saptanmadı.

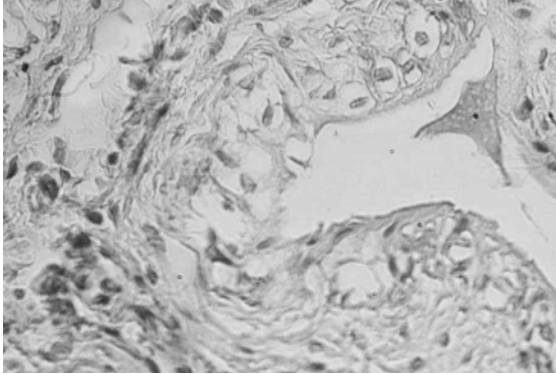
Çıkarılan mesane dokularının hematoksilin-eozin (H+E) ve Mason trikrom boyanması ile histolojik incelenmesinde; kontrol grubunda (Grup 1), mesane duvarında her hangi bir patolojiye rastlanılmadı. Ürotelyumun, doğal düzgülün bir sıra ile dizildiği, lamina proprianın doğal formunu koruduğu görüldü (Resim 1).

Etilen glikol ile beslenen sıçanlarda (Grup 2) ise; epitel hücrelerinde intrasitoplazmik vakuolizasyon ve epitel kalınlığında artış görülürken, bağ dokusunda yer yer kanama odaklarının varlığı dikkat çekici olarak bulundu (Resim 2).

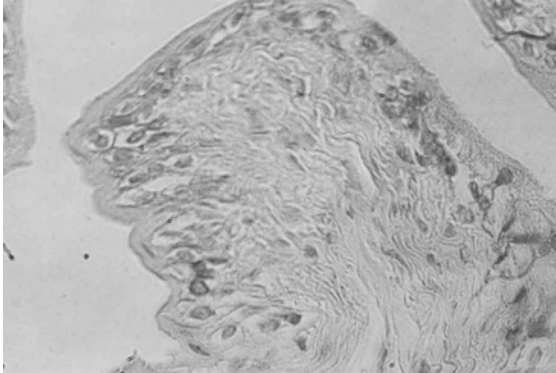
Resim 1. Kontrol Grubu (Grup 1) mesanesi, ürotelyum düzgün bir sıra ile dizilmiş olup, lamina propria doğal formunu korumakta (H+E x200).



Resim 2. Etilen Glikol Grubu (Grup 2), epitel hücrelerinde intrasitoplazmik vakuolizastonda ve epitel kalınlığında artış dikkat çekiyor (H+E x200).



Resim 3. Etilen Glikol ve losartan grubu (Grup 3), epitel kalınlığı kontrol grubuna göre daha fazla olmasına karşın sadece etilen glikol grubuna göre incelmış (H+E x200).

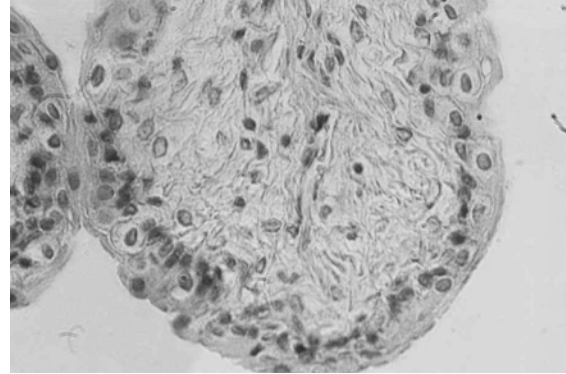


Losartan ve etilen glikol ile beslenen hayvanların (Grup 3) mesane epitel kalınlığının, kontrol grubundan daha fazla olmasına rağmen sadece etilen glikol ile beslenen gruba (Grup 2) nazaran daha incelmış olduğu görüldü. Bağ dokusunda yer yer kanama odaklarına rastlanmasına rağmen bunların organizasyon gösterdiği

saptandı. Ürotelyumda intrasitoplazmik vakuolizasyon ile birlikte mitotik aktivitede artış görüldü. Bu bulgular bize losartanın mitozu teşvik ettiğini düşündürdü. Bu grupta bağ dokusunun, sadece etilen glikol alan hayvanların mesanelerinin bağ dokusuna göre daha düzgün sıralandığı tespit edildi. Sonuç olarak etilen glikol ile birlikte losartan alan grubun mesanelerinin sadece etilen glikol alanlara nazaran daha iyi korunduğu, oluşan hasarların ise tamir edildiği gösterildi (Resim 3).

Sadece Losartan ile beslenen grubun (Grup 4) mesanesinin kontrol grubu ile aynı özelliklere sahip olduğu görüldü (Resim 4).

Resim 4. Losartan grubu (grup 4), kontrol grubuyla benzer özellikler göstermekte (H+E x200).



TARTIŞMA

Etilen Glikol canlı metabolizması için toksik bir madde olmakla kalmayıp, oksalat üretimi için de öncü bir maddedir. Birçok araştırmacı tarafından deneysel hiperoksaluri oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu değişim, deneysel olarak kalsiyum oksalat taşları oluşması için de kullanırken, birçok araştırmacı da hiperoksalurinin böbrek dokusunda tubulointerstisyel hasarın bilinen en önemli nedenlerinden biri olması nedeniyle, bu maddeyi deneysel böbrek parankim hasarı oluşturmak için kullanmaktadır.

Hiperoksalurinin taş oluşturması mekanizması ile tubulointerstisyel hasar oluşturma mekanizmaları birbirinden farklıdır.⁹ Etilen glikol verilmesi ile oluşan hiperoksalurik durumlarda, toksik maddelerin sistemik dolaşım ile böbreğe gelerek, serbest radikaller oluşturduğu ve daha

sonra lökositlerin infiltrasyonu, ve antioksidan enzim aktivitelerini azaltarak böbrekte hasar oluşturduğu⁹ veya yüksek konsantrasyonda oksalatın kendisinin bu mekanizmaları tetiklediği⁸ iddia edilmesine rağmen hasarın oluşma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yine de proteinüri ve enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunun asıl hasarı oluşturan sebepler olduğu gösterilmiştir.^{10,11} Bizim çalışmamızda da sadece etilen glikol ile beslenen grupta, renal fonksiyonlar belirgin olarak azalırken (idrar kreatinin seviyesi), proteinüride anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Oysaki etilen glikol ile birlikte losartan alan grupta bu değerlerin kontrol grubundakilerle uyum içinde olduğu görülmüştür. Hiperoksaluri ile meydana gelen hasarlar; tubular epitelyal hücre nekrozu, tubular lamina kalsiyum oksalat kristalleri birikmesi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve interstisyel hücrelerde proliferasyon, ekstraselluler matriks artışı ve bunların sonucunda da fibrozis ile karakterizedir.

Hiperoksalurinin böbrek parankiminde oluşturduğu hasarlar oldukça detaylı olarak birçok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen, hiperoksalurik idrar ile sürekli olarak temas halinde olan mesane üzerine aşırı oksalat atılımının etkileri bugüne kadar hiç araştırılmamıştır. Oksalatın kendisinin serbest oksijen radikalleri oluşmasına sebep olduğu¹¹ ve oksidatif stresin birçok dokuda fibrotik olayları başlattığı bilinmektedir.¹² Öyle ise oksalatın kendisinin uzun süre temas halinde kaldığı mesane epiteli üzerinde hasar oluşturmasını beklemek doğaldır. Bu deneyde etilen glikol ile beslenen grupta intrastoplazmik vakuolizasyonun ve epitel kalınlığının arttığı görüldü. Bağ dokusunun da düzenli yapısının bozulduğu tespit edilirken, yer yer kanama odaklarına rastlanıldı. Hiperoksalürik idrarın, birçok araştırmacı tarafından tariflenen böbrekte yapmış olduğu hasarlara benzer bir hasarı mesanede de yapmış olduğunu gözlemlendi.

Hiperoksalurinin böbrek dokusunda medyana getirdiği hasarlarda renin-anjiyotensin sistemi, tubulointerstisyel fibrozis ve tubulointerstisyel hasar gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır.⁸ Anjiyotensin II tip I reseptörlerinin

uyarılması pro-fibrotik mekanizmaları tetiklemektedir. Ayrıca, anjiyotensin II, mononükleer hücrelerin fonksiyonlarını göstermesinde önemli bir rol oynamaktadır. Anjiyotensin-converting enzim (ACE) inhibitörlerinin ve anjiyotensin II tip I reseptör blokerlerinin, iltihabi hücrelerin yayılmasını engelleyerek ve proteinüriyi düzelterek, interstisyel hasarı engellediği birçok çalışmacı tarafından gösterilmiştir.^{4,8,13,14} Anjiyotensin II tip I reseptör blokerlerinin, hiperoksaluri olmaksızın kronik böbrek yetmezliği olan olgularda kreatinin klirensini düzelttiği, proteinüriyi azalttığı ve böbrek fonksiyon kaybını minime indirdiği de bildirilmiştir.^{14,15} Mesanede anjiyotensin reseptörlerinin varlığı bilinmemektedir. Buna rağmen, böbrekteki etkisine benzer olarak, mesanede de, 3. gruptaki sıçanlar ile 2. gruptaki sıçanların idrar oksalat düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, 3. gruptaki sıçanların mesanelerinde, hiperoksalurinin daha önce tarif edilen hasarlarının büyük oranda geri döndüğü gösterildi. Böbrek üzerine yapılan çalışmalarda anjiyotensin II reseptörlerinin profibrotik oldukları ve bu reseptörlerin uyarılması ile fibrotik prosesin başladığı gösterilmiştir. Bu reseptörlerin blokajı ile fibrozisin geri döndürüldüğü iddia edilmiştir.⁹ Oysaki bu çalışmada losartan ve etilen glikol alan sıçanların mesanelerinde hasar oluştuktan sonra losartanın mitotik aktiviteyi arttırarak hasarı ortadan kaldırdığını düşündürecek bulgular elde ettik.

SONUÇ

Hiperoksalurinin böbrek, beyin, kalp ve karaciğer için toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Mesane üzerine etkisi ise bilinmemektedir. Bu çalışmamızda, hiperoksalurinin histolojik olarak böbrektekine benzer bir şekilde mesane epitelinde de hasar oluşturduğu gösterildi. Anjiyotensin II tip I reseptörler blokerlerinin ise yine böbrektekine benzer olarak mesanede de hiperoksaluriye bağlı hasar gelişmesini engellediği ve gelişen hasarı mitotik aktiviteyi arttırarak geri döndürdüğü görüldü.

Her ne kadar çalışmamızdaki bulgularımız ile klinik semptomlar arasında doğrudan bir ilişki kurmak şu anda mümkün olmasa da, hi-

peroksalurinin mesane hasarı oluşturmada ki etkisini ve klinik rolünü gösterecek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Anjiotensin II tip I reseptör blokerlerinin hiperoksalurinin böbrek parankiminde oluşturduğu hasarı geri döndürdüğü gösterilmiştir. Hiperoksalurinin mesane üzerine etkisi ise bugüne kadar çalışılmamıştır. Hiperoksalurinin mesane epiteli üzerine meydana getirdiği hasar ve losartanın bu olaylara etkisini inceledik.

40 adet erkek sıçan, içme sularına eklenen maddelere göre 4 gruba ayrıldı. Normal su ile beslenen kontrol grubu (Grup 1), içme sularına %1 oranında etilen glikol (EG) eklenerek hiperoksaluri oluşturulan Grup 2, içme sularına %1 EG ile anjiotensin II tip 1 blokeri olan losartan eklenen Grup 3 ve içme suyuna sadece 20 mg/lt losartan eklenen sıçanlardan oluşan Grup 4. Deneye başlamadan önce ve dört haftanın sonunda hayvanların 24 saatlik idrarları toplanılarak, idrar kreatinin, idrar oksalat düzeyi, mikroalbuminüri ve idrar pH'sı bakıldı. Bu değerler, başlangıç değerleri ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Çıkarılan mesane dokuları histolojik olarak incelendi.

İkinci Grup ile 3. gruptaki sıçanların idrar oksalat düzeylerinde bir farklılık görülmemesine rağmen ikinci grubun böbrek fonksiyonlarının anlamlı olarak daha çok bozulduğu görüldü. Histolojik incelenmelerde 2. gruptaki sıçanların mesane epitellerinde intrasitoplazmik vakuolizasyonda artış, bağ dokusunda kanama odakları ve epitel kalınlığında artış görülürken, 3. gruptaki sıçanlarda bütün bu değişikliklerin organize olarak tamir edildiği görüldü.

Hiperoksaluri mesane epitelinde de hasara yol açmaktadır. Losartan bu hasarı mitozu artırarak tamir etmektedir. Ancak, hiperoksaluri ile mesane epitelinde meydana gelen hasarın ne derece önemli olduğu bilinmemesine karşın, histokimyasal ve histolojik bulgularımız ile mesane hastalıkları arasında ilişki kuracak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Toblli JE, Ferder L, Stella I, et al. Protective role of enalapril for chronic tubulointerstitial lesions of hyperoxaluria. *J Urol.* Jul; 2001; 166: 275-80.
2. Okada H, Strutz F, Danoff TM. Possible pathogenesis of renal fibrosis. *Kidney Int, suppl,* 1996; 54: S37.
3. Scheid C, Koul H, Hill WA. Oxalate toxicity in LLC-PK1 cells: Role of free radicals. *Kidney Int,* 1996; 49: 413.
4. Toblli JE, Ferder L, Stella I, et al. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade by losartan on tubulointerstitial lesions caused by hyperoxaluria. *J Urol.* Oct. 2002; 168: 1550-5.
5. Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin actions in kidney: Renewed insight into old hormone. *Kidney Int.,* 1991; 40: 583.
6. De Cavanaugh EM, Fraga CG, Ferder L. Enapril and captopril enhance antioxidant defences in mouse tissue. *Am Physiol,* 1997; 272: R514.
7. Eliahou H, Avinoach I, Shammurov M. Renoprotective effect of angiotensin II receptor antagonists in experimental chronic renal failure. *Am J Nephrol.* Jan-Feb. 2001; 21: 78-83.
8. Toblli JE, Ferder L, Stella I, et al. Protective role of enalapril for chronic tubulointerstitial lesions of hyperoxaluria. *J Urol.* Jul; 166(1): 275-80, 2001.
9. Huang HS, Ma MC, Chen J, Chen CF. Changes in the oxidant-antioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol.* Jun. 2002; 167: 2584-93.
10. Eddy AA. Expression of the genes that promote renal interstitial fibrosis in rats with proteinuria. *Kidney Int, suppl.,* 1996; 54: S49.
11. Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int,* 1997; 51: 2.
12. Eddy AA. Molecular insight into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol,* 1996; 7: 2495.
13. Poli G, Parola M. Oksidative stress and fibrogenesis. *Fr. Radic Biol Med,* 1997; 22: 287.
14. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, et al. Expression of cox-2, angiotensin II and the AT1 receptor in remnant kidneys. Strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal antiinflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol.* Dec 2003; 16.
15. Eliahou H, Avinoach I, Shammurov M, et al. Renoprotective effect of angiotensin II receptor antagonists in experimental chronic renal failure. *Am J Nephrol.* Jan-Feb. 2001; 21: 78-83.