

DIABETİK RAT MODELİNDE KISA SÜRELİ DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL HEPARİN TEDAVİSİNİN RENAL ETKİLERİ

RENAL EFFECTS OF SHORT TERM LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN ADMINISTRATION IN DIABETIC RAT MODEL

Dr. Dilek Gogas, Dr. Yasemin Budak*, Dr. Önder Ersöz, Dr. Çetin Özener, Dr. Oğuzhan Deyneli, Dr. Kaya Emerk, Dr. Emel Akoğlu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi iç Hastalıkları Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı*, İSTANBUL

ÖZET

Glukozaminoglikan metabolizma bozukluğu diabetik nefropati patogeneğinde rol oynamaktadır. Mikroalbuminüriye neden olan glomerüler bazal membran anyonik yük kaybı, idrarda glukozaminoglikan kaybı ile ilişkilidir. Diabetik rotlarda uzun süreli glukozaminoglikan tedavisinin hem morfolojik renal değişiklikleri, hem de albuminüriyi önlediği bilinmektedir. Bu çalışma, kısa süreli nadroparin kalsiyum (düşük moleküler ağırlıklı heparin) tedavisinin renal fonksiyonlar, idrarda heparan sülfat ve albumin ekskresyonu üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Yirmi adet, oniki haftalık Wistar rat, streptozotosin ile diabetik hale getirilmiştir, on rattan oluşan birinci grup 200 U/kg/gün nadroparin kalsiyum tedavisi alırken, ikinci grupta kontrol olarak 0.1 cc serum fizyolojik verilmiştir. Hayvanların 24 saatlik kreatinin klirens, mikroalbuminüri ve heparan sülfat ekskresyonu ölçülmüştür. Nadroparin kalsiyum ve kontrol grupları arasında bazal mikroalbuminüri değerleri açısından fark yoktur (11 ± 13 mg/gün ve 12.3 ± 8 mg/gün, sırasıyla). Çalışma sonunda tedavi grubunda mikroalbuminüri kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (2.8 ± 3.8 mg/gün ve 28.5 ± 12 mg/gün sırasıyla, $p < 0.05$). Çalışma başlangıcında heparan sülfat ekskresyonu her iki grup arasında farklılık göstermemekteyken (104.7 ± 66.5 µg/gün ve 128 ± 69.5 µg/gün, sırasıyla), tedavi sonunda nadroparin kalsiyum grubunda belirgin olarak düşük bulunmuştur (195 ± 96 µg/gün ve 662 ± 300 µg/gün, sırasıyla, $p < 0.01$). Sonuçta kısa süreli nadroparin kalsiyum tedavisi idrarda heparan sülfat ve albumin ekskresyonunu belirgin olarak azaltmaktadır. Bu etki glomerül bazal membran anyonik yüklerinin korunması veya yerine konması ile ilişkili olabilir.

SUMMARY

Abnormal glycosaminoglycan metabolism is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Glomerular membrane anionic charge depletion leading to albuminuria is associated with loss of glycosaminoglycan in urine. It's well known that long term administration of different types of glycosaminoglycans prevents morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. This study was designed to evaluate the effect of short term administration of nadroparin calcium (a type of low molecular weight heparin) on proteinuria and to measure heparan sulphate loss in the urine in a streptozotocin diabetic rat model. Twenty, twelve weeks old wistar rats were made diabetic using streptozotocin. One group of ten rats received nadroparin calcium 200 U/kg/d, whilst the second group received 0.1 cc saline/d as control. 24 hour urine samples were collected at the beginning of the study and at the end of the 6th week for determination of creatinine clearance, heparan sulphate excretion and microalbuminuria. Basal levels of microalbuminuria did not differ between nadroparin calcium and control groups (11 ± 13 mg/d and 12.3 ± 8 mg/d respectively). At the end of the study microalbuminuria was significantly lower in the study group (2.8 ± 3.8 mg/d and 28.5 ± 12 mg/d respectively, $p < 0.05$). Basal heparan sulphate excretion did not differ between two groups (104.7 ± 66.5 µg/d and 128 ± 69.5 µg/d respectively). At the end of the study heparan sulphate excretion was significantly lower in the nadroparin calcium group (195 ± 96 mg/d and 662 ± 300 mg/d respectively, $p < 0.01$). In conclusion short term nadroparin calcium therapy may lead to reduction of microalbuminuria and heparan sulphate excretion by means of protection or replacement of the glomerular basement membrane anionic charge.

Anahtar Kelimeler: Diabetik nefropati, nadroparin kalsiyum, heparan sülfat ekskresyonu

Key Words: Diabetic nephropathy, nadroparin calcium, heparan sulphate excretion

GİRİŞ

Nefropati diabetik hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Tip 1 diabetik hastalarda % 30-35 oranında diabetik nefropati geliştiği bilinmektedir (1-2). Bu oran tip 2 diabetik hastalarda % 25'e ulaşabilmektedir (3).

Klinikte diabetik böbrek tutulumunun ilk göstergesi mikroalbuminüridir (4). Mikroalbuminürinin hemodinamik değişikliklere (5) ve/veya glomerüler bazal membrandaki biyokimyasal değişiklikler sonucu oluşan anormal yük geçirgenliğine (6-7) bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Glomerüler bazal membrandan anyonik alanların azalması ve yük seçiciliğinin bozulmasında glukozaminoglikan (GAG) metabolizmasındaki değişiklikler rol oynamaktadır. Anyonik yükün azalması heparan sülfat proteoglikanın sentez veya metabolizmasındaki bir bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (8-10). Glomerüler bazal membran yük kaybına eşlik etmek üzere heparan sülfat ve total GAG atılımı da artmaktadır (10).

Deneyel diabette uzun süreli GAG tedavilerinin (düşük molekül ağırlıklı heparin, dermatan sülfat) hem mikroalbuminüriyi, hem de böbrekteki morfolojik bozuklukları önlediği gösterilmiştir (11, 12). Bu çalışmanın amacı nadroparin kalsiyum (düşük molekül ağırlıklı heparin) tedavisinin deneyel diabette erken dönemdeki etkilerini incelemektir.

YÖNTEM

Çalışma 20 adet, 12 haftalık erkek Wistar rat ile gerçekleştirildi. Ratlar streptozotosin (Sigma Chemical Co) 65 mg/kg intraperitoneal uygulaması ile diabetik hale getirildi. Birinci grup rat 200 U/kg/gün Nadroparin kalsiyum tedavisi aldı, bu doz antitrombotik aktivite ED50 değerine eşdeğer dozdu. Kontrol grubunu oluşturmak üzere ikinci grup ratlarda 0.1 cc serum fizyolojik uygulandı.

Çalışma başlangıcında ve altı haftalık tedaviyi takiben ölçümler için 24 saatlik idrar ve kan örnekleri elde edildi.

24 saatlik idrar örnekleri, her rat için ayrı olarak, ratlar metabolik kafeslere alınarak, çalışma başlangıcında ve 6. hafta bitiminde son ilaç uygulamasından 24 saat sonra toplandı. İdrar örneklerinde kreatinin klirensi, mikroalbuminüri ve heparan sülfat ekskresyonu, kan örneklerinde glukoz ve kreatinin çalışıldı.

Ratlarda insülin tedavisi uygulanmadı. Beslenme % 20 protein içeren standart yem ile sağlandı. Çalış-

ma süresince kontrol grubundan 4, tedavi grubundan 5 rat enfeksiyon nedeniyle öldü. Ölen ratlardan hiçbirinde hemorajik bir bozukluğa rastlanılmadı.

Kreatinin ölçümleri kreatinaz, glukoz ölçümleri glukoz oksidaz yöntemleri ile yapıldı. Mikroalbuminüri spektrofotometrik yöntem ile Bayer mikroalbuminüri kiti kullanılarak Thecnicon RA 1000 spektrofotometresi ile ölçüldü.

İdrarda heparan sülfat ekskresyonu dimetilmtilen mavisı yönteminin Shumatsu spektrofotometresine adaptasyonu ile ölçüldü (13).

Çalışma sonunda ratlarda çıkartılan böbrek spesimlerinde morfometrik incelemeler yapıldı. Nicon objektif mikrometresi kullanılarak yapılan ışık mikroskopisinde random olarak seçilen 10 glomerüler bazal membran alanında ölçümler alındı. Patolojik spesimlenler 3 µg kalınlığında hazırlandı, hemotoksilen eozin ve pam boyalan ile boyandı.

Her iki grup arasında karşılaştırma Mann-Whitney U testi, korelasyon analizleri Pearson testi ile yapıldı (p<0.05) anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.

SONUÇLAR

Her iki grup arasında başlangıçtaki vücut ağırlıkları, glukoz, mikroalbuminüri, keratinin klirensi ve heparan sülfat ekskresyonları açısından farklılık bulunmamaktadır (**Tablo I**).

Tablo I. Parametrelerin ortalama ve SEM değerleri

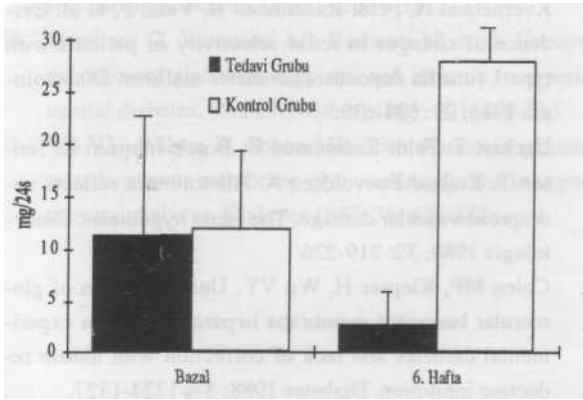
	Kontrol grubu		Tedavi grubu	
	basal	6. hafta	basal	6. hafta
Ağırlık gr	234±32	191±38	268±24	192±37
Glisemi mg/dl	67±18	520±219	75±26	737±141
Kreatinin klirens ml/tnin	0.24±0.01	0.17±0.05	0.21±0.05	0.16±0.03
Albuminüri mg/gün	12±8	28±12	11.4±13	2.8±3.8
Heparan sülfat H/gün	128±69	662±353	104±66	195±96

1 p<0.001, 2 p<0.001, 3 p<0.05, 4 p<0.01

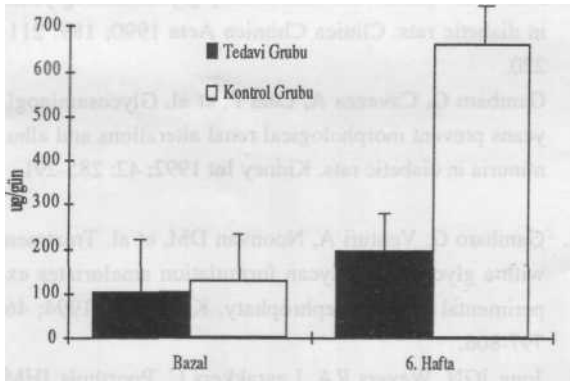
Çalışma başlangıcında tedavi ve kontrol grupları normoglisemik olup (sırasıyla 75 ± 26 mg/dl ve 67 ±

18 mg/dl) streptozotosin uygulanması sonucunda diabetik olan ratlar, insülin tedavisi verilmediği için belirgin olarak hiperglisemik hale gelmişlerdir (sırasıyla 737 ± 141 mg/dl ve 520 ± 219 mg/dl, $p < 0.001$).

Çalışma başlangıcında tedavi ve kontrol grupları arasında 24 saatlik idrarda albümin (sırasıyla 11.4 ± 13 mg/gün ve 12 ± 8 mg/gün) ve heparan sülfat (sırasıyla 104 ± 66 µg/gün ve 128 ± 69 µg/gün) ekskresyonları arasında farklılık yoktur. Nadroparin kalsiyum tedavisi ile albümin ekskresyonunun artışı anlamlı ölçüde önlenmiştir (sırasıyla 2.8 ± 3.8 mg/gün ve 28 ± 12 mg/gün, $p < 0.05$) (Şekil 1). Heparan sülfat ekskresyonu her iki grupta da artmakla birlikte tedavi grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (sırasıyla 195 ± 96 mg/gün ve 662 ± 353 µg/gün, $p < .01$) (Şekil 2).



Şekil 1. Mikroalbuminüri



Şekil 2. Heparan Sülfat

Her iki grup arasında kreatinin klirensi başlangıçta (sırasıyla 0.21 ± 0.05 ml/dak ve 0.24 ± 0.01 ml/dak) ve çalışma sonunda (sırasıyla 0.16 ± 0.03 ml/dak ve 0.17 ± 0.05 ml/dak) belirgin farklılık göstermemiştir.

Korelasyon analizleri sonucunda heparan sülfat ekskresyonu ve albüminüri arasında minimal korelasyon

gözlenmiştir ($r = 0.29$).

Patolojik spesimenlerin ışık mikroskopisi ile incelenmesi sonucunda tedavi ve kontrol grupları arasında glomerül bazal membran kalınlığı ölçümleri arasında belirgin farklılık bulunmamıştır (sırasıyla 4.98 ± 0.37 µm ve 4.85 ± 0.53 µm).

TARTIŞMA

Diabetik hastalarda mikroalbuminüri böbrek tutulumunun ilk klinik belirtisi olarak kullanılmaktadır (4). Oysa daha normoalbuminürik dönemde hemodinamik değişikliklerin başladığı, glomerül filtrasyon hızı ve efektif renal plazma akımının arttığı bilinmektedir (14-15). Yine bu dönemde idrarda glukozaminoglikanlar ve bunların metabolizmasında yer alan enzimlerin itrahlannın arttığı gösterilmiştir (16). Mikroalbuminüri döneminde ise idrarda protein ve GAG ekskresyonları arasında direkt korelasyon ortaya konmuştur (10, 17). İdrarda GAG ekskresyonunun artık diabetik nefropatinin bir erken göstergesi olduğu bilinmektedir (18).

Hayvan çalışmaları, deneysel diabetik nefropatide, idrar GAG ekskresyonunun erken dönemde hızla arttığı, mikroalbuminürinin ise uzun sürede tedrici bir artış gösterdiği ortaya konulmuştur (10, 19, 20).

İdrarda GAG ekskresyonunun artışı, glomerüler total GAG ve heparan sülfat sentezinde bir azalma ve glomerüler heparan sülfat sülfasyonunun bozulması ile birlikte olmaktadır (10). Yapılan çalışmalarda glomerüler GAG ve heparan sülfat metabolizma ve/veya sentez bozukluğunun glomerül bazal membranında anyonik yük kaybı ve yük seçiciliğinin bozulması ile ilgili olduğu gösterilmiştir (8, 9, 10, 21).

Glikozaminoglikan tedavisinin, glomerüler yüklerin mekanik restorasyonu yoluyla nefropatide koruyucu etkisi olabileceği ileri sürülmüştür (22). Glukozaminoglikanların deneysel çalışmalarda mezenseyal hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (23-25), glomerüler epitel sentezi üzerinde antimitojenik etki gösterdiği (26) ve glomerül bazal membranındaki heparan sülfat miktarını arttırdığı (27) bilinmektedir.

Gambaro ve arkadaşları, düşük moleküler ağırlıklı heparin ve dermatan sülfat ile yaptıkları uzun dönemli çalışmalarda, her iki tedavinin de diabetik ratlarda mikroalbuminüriyi azalttığını, glomerüler filtrasyon hızında ise belirgin değişiklik yapmadığını göstermişlerdir (11, 12). Morfolojik incelemelerde tedavinin glomerül bazal membranında anyonik yük dansitesinin korunmasında ve bazal membran kalınlığının artışı önlemede etkili olduğu ortaya konmuştur (11, 12).

Bizim çalışmamızda, düşük moleküler ağırlıklı heparin tedavisinin etkisinin erken dönemde başladığı gösterilmektedir. Diabetin 6. haftasında kontrol grubunda idrarda albümin ve heparan sülfat ekskresyonlarında belirgin artış gözlenmiştir. Nadroparin kalsiyum tedavisi alan grupta ise albümin ekskresyonu belirgin olarak azalmış, idrarda heparan sülfat ekskresyonu ise artma göstermekle birlikte, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük kalmıştır.

Mikroskopik incelemelerde her iki grup arasında morfolojik fark görülmemektedir. Bu da GAG tedavisinin morfolojik değişiklikler başlamadan önce de, erken dönemde etkili olduğunu göstermektedir.

Glomerüler filtrasyon hızı her iki grup arasında farklılık göstermemiştir. Bu sonuç Gambaro ve arkadaşlarının uzun süreli tedavi sonuçları ile de uyumludur (11, 12).

Ratlarda insülin veya herhangi bir diğer terapötik ajan uygulanmadığı ve her iki grubun da eşit ölçüde hiperglisemik seyrettiği dikkate alınırsa çalışma sonuçlarının direkt düşük moleküler ağırlıklı heparin tedavisi ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.

Her ne kadar GAG tedavisinin, glomerüler yüklerin mekanik restorasyonu yolu ile etkisi olabileceği düşünülmekte ise de (22), bu teori albüminürinin azalmasını açıklamakla birlikte, idrarda heparan sülfat ekskresyonunun azalmasını açıklayamamaktadır. GAG tedavisinin basit bir replasman etkisi yanında, daha kompleks etkileri de olduğu açıktır. Glukozaminoglikanlar, Gambaro ve arkadaşlarının da belirttiği gibi, büyük ihtimalle glomerüler bazal membrandaki hasarları da önleyerek ve/veya düzelterek etkili olmaktadır (11, 12).

Sonuç olarak çalışmamızda düşük moleküler ağırlıklı heparin tedavisinin etkisinin erken dönemde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Tedavi hem albüminüriyi önlemekte, hem de diabetik nefropatinin daha erken göstergelerinden biri olan idrarda GAG ekskresyonunun artışı engellemektedir. Bu çalışmaları takiben, düşük moleküler ağırlıklı heparin tedavisinin klinik uygulamada diabetik nefropatinin önlenmesi üzerine etkinliği araştırılarak alternatif bir tedavi olması olasılığı gündeme gelmektedir.

KAYNAKLAR

1. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in Type I (insulin dependent) diabetes: An epidemiologic study *Diabetologia* 1993; 25: 496-501.
2. Krolewsky AS, Warren JA, Chnstlieb AR, Busick ES, Kahn JR. The changing natural history of nephropathy in Type 1 diabetes. *Am J Med* 1985; 78: 785-794.
3. Ballarda DJ, Harping LL, et al. Epidemiology of persistent proteinuria in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 1988; 37: 405-412.
4. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1983; 31: 673-689.
5. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathy. *Am J Med* 1982; 72: 375-380.
6. Kverneland A, Feldt-Rasmussen B, Vidal P, et al. Evidence of changes in renal selectivity in patients with type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1986; 29: 634-639.
7. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The steno hypothesis. *Diabetologia* 1988; 32: 219-226.
8. Colen MP, Klepser H, Wu VY. Undersulfation of glomerular basement membrane heparan sulfate in experimental diabetes and lack of correction with aldose reductase inhibition. *Diabetes* 1988; 37: 1324-1327.
9. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Djurup R, Deckert M. Glomerular size and charge selectivity in insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1988; 33: 100-106.
10. Reddi AS. Glomerular and urinary glycosaminoglycans in diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* 1990; 189: 211-220.
11. Gambaro G, Cavazza A, Luzi P, et al. Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 1992; 42: 285-291.
12. Gambaro G, Venturi A, Noonvan DM, et al. Treatment with a glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1994; 46: 797-806.
13. Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis JHM. Dimethylmethylene blue based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidosis. *Clin Chem* 1989; 35: 1472-1477.
14. Vora JP, Dolben J, Dean JD, et al. Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41: 829-835.

15. Rudberg S, **Persson** B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy: An 8 years prospective study. *Kidney Int* 1992; 41: 822-835.
16. Baggio B, Briani G, Cicerello E, et al. Urinary glycosaminoglycans, sialic acid and lysosomal enzymes increase in nonalbuminuric diabetic patient. *Nephron* 1986; 43: 187-190.
17. Baggio B, Briani G, Cicerello E, Gambaro G; Borsatti A, et al. Urinary glycosaminoglycan excretion and microalbuminuria in diabetes. *JAMA* 1986; 255: 3250-3251.
18. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Mathiesen E, Baker L. Pathogenesis of incipient nephropathy: a hypothesis. *Diabetic Nephropathy* 1985; 2: 83-88.
19. Rasch R, Mogensen CE. Urinary excretion of albumin and total protein in normal and streptozotocin diabetic rats. *Acta Endocrinol* 1980; 95: 376-381.
20. Gambaro G, Venturini AP, Barbanti M, et al. Urinary excretion of glycoaminoglycans and albumin in experimental diabetes. *Contrib Nephrol* 1993; 101: 109-113.
21. Wu VY, Wilson B, Cohen MP. Disturbances in glomerular basement membrane glycosaminoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1987; 36: 679-683.
22. Olson JL. Role of heparin as a protective agent following reduction of renal mass. *Kidney Int* 1984; 25: 376-382.
23. Castellot JJ, Hoover RL, Harper PA, Karnowsky MJ. Heparin and glomerular epithelial cell-secreted heparin like species inhibit mesangial cell proliferation. *Am J Pathol* 1985; 120: 427-435.
24. Coffey AK, Karnowsky MJ. Heparin inhibits mesangial cell proliferation in Habuvenom-induced glomerular injury. *Am J Pathol* 1985; 120: 248-255.
25. Diamond JR, Karnowsky MJ. Non-anticoagulant protective effect of heparin in chronic aminonucleoside nephrosis. *Renal Physiol* 1986; 9: 366-374.
26. Adler S, Eng B. Reversal of inhibition of rat glomerular epithelial cell growth by growth factors. *Am J Pathol* 1990; 136: 557-563.
27. Foidart JB, Pirard YS, Winnard RJ, Mahieu PR. Tissue culture of normal rat glomeruli: Glycosaminoglycan biosynthesis of homogeneous epithelial and mesangial cell populations. *Renal Physiol* 1980; 3: 169-173.