

DIABETİK SIÇANLARDA BÖBREK POLİAMİN VE HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİNE AMİNOGUANİDİNİN ETKİSİ

Yeşim ÜNLÜÇERÇİ, Selda BEKPINAR*

ÖZET

Poliaminler (putresin, spermidin, spermin), hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan polikasyonlardır. Poliaminlerin diabetik renal hipertrofinin ortaya çıkmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Diabetin başlangıcından 2 ila 3 yıl sonra veya streptozotosin (STZ) ile diabetik yapılan sıçan modellerinde ilk birkaç haftada, böbrek mezangial matriksinde genişleme, bazal membranda kalınlaşma saptanmıştır. Büyüme faktörleri, glomerüler bazal membran kalınlaşmasından büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır. İleri glikasyon ürünlerinin (AGE) oluşumunu inhibe eden Aminoguanidin (AG)'in diabete bağlı büyüme faktörlerindeki artışı önlediği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile deneysel diabet oluşturulan Wistar albino erkek sıçanlarda AG'in diabetik nefropati bulguları üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla diabetik sıçanların bir grubuna 1g/L dozda AG oral yolla 10 hafta süreyle verildi. Böbrek doku poliamin düzeyleri HPLC yöntemi ile, hidroksiprolin düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Doku hidroksiprolin içeriği, kollajen indeksi olarak kullanıldı. Kontrol grubu sıçanlardaki putresin (16.0 ± 3.7 nmol/g doku), spermidin (183.9 ± 51.0) ve spermin (290.0 ± 91.7) ortalama değerleri diğer iki diabetik grupta anlamlı bir farklılık göstermedi. Ancak böbrek hidroksiprolin düzeyleri, diabetik grupta anlamlı ölçüde arttı (kontrol: 1.95 ± 0.61 μ mol/g doku, DM: 3.43 ± 1.05). AG uygulaması, diabete bağlı böbrek hidroksiprolin artışını engelledi (2.58 ± 0.66).

Anahtar Kelimeler: Poliamin, hidroksiprolin, diabet, böbrek

SUMMARY

Effect of aminoguanidine on renal polyamines and hydroxyproline levels in diabetic rats. Basement membrane (BM) thickening and expansion of mesangial matrix can be demonstrated in human kidney within the first two to three years after the onset of diabetes and within the first few weeks of diabetes in the streptozotocin (STZ) rat model. Certain growth factors are responsible for the BM thickening. Aminoguanidine (AG), an inhibitor of advanced glycation end products (AGEs) accumulation on tissue proteins, was demonstrated to prevent diabetes-induced increase of some growth factors. The polyamines, putrescine, spermidine and spermine are polycations that play an important role in cell growth and differentiation polyamines are suggested to be involved in diabetic renal hypertrophy. In this study, experimental diabetes was produced by treating male Wistar albino rats with a single injection of STZ (50 mg/kg, i.v.) Diabetic rats are divided into two groups. One group (DM+AG) was given tap water containing aminoguanidine (1g/L), whereas the other group was kept as diabetic control (DM). After 10 weeks of treatment, animals were sacrificed by cardiac venipuncture. Serum glucose levels were determined enzymatically. Polyamine levels in kidney homogenate were measured by HPLC and hydroxyproline levels which are known as an index for tissue collagen were measured by spectrophotometrically in glomerular basement membrane (GBM) preparations. Polyamine levels in kidney did not change in both diabetes and diabetes+AG groups. But hydroxyproline levels in kidney increased significantly in diabetes AG treatment ameliorated diabetes-induced changes in GBM hydroxyproline content. Some studies suggest that the enhancement in polyamines is not a crucial determinant for kidney hypertrophy. Our results confirm these previous reports. Our experiments also demonstrate that renal hydroxyproline levels increase in diabetic rats and AG treatment prevents this increment.

Key Words: Polyamine, hydroxyproline, kidney, diabetes

GİRİŞ

Diabetin başlangıcından 2 ila 3 yıl sonra veya streptozotosin (STZ) ile diabetik yapılan

sıçan modellerinde ilk birkaç haftada, böbrek mezangial matriksinde genişleme, bazal membranda kalınlaşma saptanır⁽³⁾. Glome-

rüler bazal membranda (GBM), tip IV kollajen, laminin, heparan sülfat proteoglikan (HSPG), fibronektin, siyaloglikoproteinler ve henüz karakterize edilmemiş diğer proteinler bulunur. Büyüme faktörleri (TGF- β , FGF, PDGF), yukarıda anılan bazal membran bileşenlerinin sentez ve yıkımını etkileyerek, GBM'in kompozisyonunu değiştirir. Diabetik böbrekte HSPG hariç diğer bazal membran bileşenlerinde artış saptanmıştır.

Diabetik böbrek glomerülünde matriks bileşenlerinin aşırı birikmesine, kısmen de olsa ileri glikasyon ürünleri (AGE)'nin neden olduğu ileri sürülmüştür. AGE'ler, diabette, glikoz ile doku proteinlerinin, nonenzimatik modifikasyonu ile gelişen bir seri reaksiyon sonucu oluşur ve kollajen, lens kristalini gibi uzun ömürlü doku proteinleri üzerinde birikirler. Makrofaj, endotel hücresi ve monositler üzerindeki spesifik reseptörlere AGE proteinlerin bağlanması, hem bunların çözünürlükte AGE peptidlere yıkılmasına yol açarken, hem de TGF- β , FGF, PDGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin uyarılmasına yol açabilmektedir (6). Bazal membran ve matriks bileşenlerindeki kalitatif ve kantitatif değişimlerden büyüme faktörleri sorumlu tutulmuştur (4). Nükleofilik bir bileşik olan aminoguanidin (AG)'in diabetik deney hayvanlarına uygulanması, doku proteinleri üzerinde AGE birikimini engelleyerek TGF- β gibi büyüme faktörlerindeki diabete bağlı artışı önlediği ifade edilmiştir (14).

Genelde poliaminler olarak anılan, putresin, spermidin ve spermin hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan polikasyonlardır. Poliaminlerin diabetik renal hipertrofinin patogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (10). Poliamin sentezinde düzenleyici enzim olan ornitin dekarboksilaz (ODC) aktivitesinin ve dolayısıyla poliamin sentezinin, çeşitli hormon ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri ile uyarıldığı ifade edilmiştir (5).

Diabetik sıçanlarda, büyüme faktörlerine cevap olarak gelişen kollajen sentezindeki değişimde, poliaminlerin rolünü araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada ayrıca, diabetik sıçanlarda büyüme faktörlerindeki artışı baskıladığı ileri sürülen AG uygulamasının, poliamin düzeyleri üzerine etkisi de araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

250 gram ağırlığında 25 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. 7 tanesi kontrol (I. Grup) olarak ayrıldıktan sonra geri kalanına 50 mg/kg dozda STZ penis veninden enjekte edildi. Enjeksiyondan 72 saat sonra kan glikozu %350 mg'm üzerinde olanlar diabetik kabul edildi ve II. ve III. gruba ayrıldı.

II. grup (Diabet grubu, DM) (n:9): normal içme suyu verildi.

III. grup (DM+AG grubu) (n:9) 1g/L konsantrasyonda AG içeren içme suyu verildi. Bu uygulamalar 10 hafta sürdü. Deney gruplarındaki hayvanlardan üç tanesi bu süreyi tamamlayamadı. Sürenin sonunda eter anestezi altında göğüs kafesi açılarak hayvanlar sakrifiye edildi. İntrakardiyak alınan kan glikoz tayinleri için kullanıldı. Eksize edilen böbrek dokusu %0.9 NaCl ile yıkandıktan sonra süzgeç kağıdı ile kurutuldu ve biyokimyasal analizler için -80 0C de saklandı. Poliaminler, %10'luk böbrek homojenatında HPLC yöntemi ile incelendi (8). HPLC sistemi, 2 pompa içeren Waters 600 controller olup Waters 474 floresans detektör (ex: 252 nm, em: 500 nm) ve C18 reverse-phase (ODS spheri-5) 250x4.6 mm.lik kolon kullanıldı. Poliaminler dansilklorür ile dansillendikten sonra kolona enjekte edildi ve putresin, spermidin ve spermin sırasıyla 6.5 dk., 11.7 dk., ve 13.8.inci dk.larda elüe edildi. Böbrek glomerüler bazal membranı, Monnier ve arkadaşlarının yöntemine göre elde edildi (9). Elde edilen GBM 72 saat 370C de kollajenaz ile inkübe edildikten sonra sindi-

rim sıvısında hidrokspirolin düzeyleri ölçüldü (7).

Sonuçlar, Kruskal Wallis istatistiksel analiz yöntemi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Sonuçlar Tablo 1 ve 2'de görülmektedir. Diabet grubu ve diabet+aminoguanidin grubundan elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- 1) Diabet, vücut ağırlığında %40 oranında düşüşe yol açtı. AG uygulaması, diabete bağlı ağırlık azalmasını düzeltmedi.
- 2) Diabet, böbrek ağırlığını değiştirmedir. Ancak, hem diabetik hem de AG uygulanmış diabetik sıçanlarda, vücut ağırlığına göre böbrek ağırlığında rölatif bir artış saptandı.
- 3) Diabet ile serum glikozunda görülen %350 oranındaki artış AG uygulaması ile normale döndürülemedi.
- 4) Diabet, böbrek poliamin düzeylerini etkilemedi. Diabetik sıçanlara AG uygulaması, kontrol grubu ile kıyaslandığında poliamin düzeylerinde %40-50 oranında azalmaya neden oldu. Ancak değerler arasındaki sapma

nedeni ile bu azalma istatistiksel anlamlılık sınırında değildi.

5) Glomerüler bazal membranın kollajen içeriğinin bir ölçüsü olarak incelenen hidrokspirolin düzeyleri, diabetik sıçanlarda %75 oranında arttı. AG uygulaması, diabete bağlı hidrokspirolin düzeylerindeki artışı önledi.

TARTIŞMA

Parsiyel nefrektomi sonrasında gelişen böbrek hipertrofinde ODC aktivitesinin ve poliamin konsantrasyonunun rol oynadığı ileri sürülmüştür (2). Pederson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, poliamin sentezini düzenleyen ODC aktivitesinin diabet oluşturmundan sonraki 24 saatte maksimum değere ulaştığı (6 kat), daha sonra kademeli olarak azaldığı, insülin uygulamasının ODC aktivitesindeki diabete bağlı artışı kısmen engellediği ifade edilmiştir (11). Aynı çalışmada, ODC aktivitesindeki artışa paralel olarak böbrek ağırlığında da bir artış belirlenmiştir. Çalışmamızda her iki diabetik grupta da böbrek ağırlıkları kontrol grubundan farklı bulunmamış, ancak böbrek ağırlığının vücut ağırlığındaki yüzdesi, deney gruplarında artmıştır (Tablo 1). Diğer deneysel diabet modellerinde de rölatif böbrek ağırlığının arttığı

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanların vücut, böbrek ağırlıkları ve serum glikoz konsantrasyonu (ortalama±SD)

	Kontrol (n=7)	DM (n=8)	DM+AG (n=7)	K.Wallis değeri; p=
Vücut ağırlığı (g)	336.48.3	203.7±29.7	221.7±26.6	17.88; K-DM, K-(DM+AG) 0.0001
Böbrek ağırlığı (g)	2.08±0.22	2.05±0.31	2.57±0.47	5.65; 0.095
Böbrek.10 ³ / vücut ağırlığı	6.50±0.65	10.11±0.80	11.67±2.04	18.15; K-DM, K-(DM+AG) 0.0001
Serum glikoz (mg/dL)	123.7±9.3	564.3±20.1	477.8±44.9	21.18; K-DM, K-(DM+AG) DM-(DM+AG) 0.0000

Tablo 2. Böbrek dokusu poliamin ve hidroksiprolin düzeyleri (ortalama±SD)

	Kontrol	DM	DM+AG	K.Wallis değeri;	p=
Putresin (nmol/g doku)	16,00±3.70 (n:6)	15.32±6.49 (n=3)	7.64±3.37 (n=3)	3.12;	0.2098
Spermidin (nmol/g doku)	183.97±51.02 (n=6)	171.90±51.49	109.25±40.86 (n=7)	3.83;	0.1471
Spermin (nmol/g doku)	290.00±91.70 (n=6)	228.40±45.60 (n=6)	157.67±91.38 (n=7)	2.79;	0.2476
Hidroksiprolin µmol/g doku	1.95±0.61 (n=5)	3.43±1.05 (n=8)	2.58±0.66 (n=7)	7.67; K-DM	0.0216

bulunmuş ve renal hipertrofinin akut dönemde ODC aktivitesinin ve poliaminlerin artışı ile paralellik gösterdiği ancak ilk haftadan sonra hipertrofiye poliaminlerin rolünün olmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (12,13). Bu çalışmadaki böbrek dokusu poliamin düzeylerine ait bulgularımız hipertrofiye farklı medyatörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Glomerüler bazal membran komponentlerinin yapısal ve kantitatif değişiminin diabetik nefropatiye yol açan faktörlerin başında geldiği bilinmektedir. Diabetik böbrekte bazal membranın bütün bileşenlerinde heparan sülfat dışında artış olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (1). Diabetik grupta, GBM hidroksiprolin düzeylerinde artış bulmamız, diabete bağlı kolajen sentezindeki artışın bir göstergesi olarak kabul edilebilir. AG uygulamasının hidroksiprolin artışını önlemesi, glikasyona bağlı doku proteini modifikasyonlarının GBM kalınlaşmasında etkili olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Abboud HE: Growth factors and diabetic nephropathy: An overview. *Kidney Int* 52:S3 (1997).
2. Austin HA, Goldm H, Gaydos D, Preuss HG: Polyamine metabolism in compensatory renal growth. *Kidney Int* 23:581 (1983).
3. DeFronzo RA: Diabetic nephropathy: Etiologic and therapeutic considerations. *Diabetes Rev* 3:150 (1995).
4. Doi T, Vlassara H, Kirsstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ: Receptor-specific increase in extracellular

matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2873 (1992).

5. Feldman EJ, Aures D, Grossman MJ: Epidermal growth factor stimulates ornithine decarboxylase activity in the digestive tract of mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 159:400 (1978).
6. Flyubjerg A, Nielsen B, Skjaerbaek C, Frystyk JAN, Gronbaek H, Orskov H: Roles of growth factors in diabetic kidney disease, in *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus* (2nd ed), edited by Mogensen CE, Norwell; Kluwer Academic Publishers (1994).
7. Ho KC, and Pang CP: Automated analysis of urinary hydroxyproline. *Clin Chem Acta* 185:191 (1989).
8. Marce M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF: Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: applications to plant and animal tissues. *J Chromatog B* 666:329 (1995).
9. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauehot P, Kohn RR: Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen linked fluorescence. *N Engl J Med* 314:403 (1986).
10. Pederson SB, Flyubjerg A, Gronbaek H, Richelsen B: Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hypertrophy in experimental diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 86:67 (1992).
11. Pederson SB, Flyubjerg A, Richelsen B: Inhibition of renal ornithine decarboxylase activity prevents kidney hypertrophy in experimental diabetes. *Am J Physiol* 264:C453 (1993).
12. Pederson SB, Bjorn SF, Richelsen B, Flyubjerg A: Inhibition of renal ornithine decarboxylase activity fails to reduce kidney size and urinary albumin excretion in diabetic rats with manifest kidney hypertrophy. *Mol Cell Endocrinol* 107:123 (1995).
13. Tovar A, Sanchez Capelo A, Cremades A and Penafiel R: An evaluation of the role of polyamines in different models of kidney hypertrophy in mice. *Kidney Int* 48:731 (1995).
14. Yang CW, Vlassara H, Peten EP, Hc CJ, Striker GE, Striker LJ: Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9436 (1994).