

Erdosteinin Diyabetik Ratlarda Böbrek Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi

The Protective Effect of Erdosteine on Renal Injury in Diabetic Rats

ÖZ

AMAÇ: Diyabetik nefropati patogenezinde oksidatif stres rol oynamaktadır. Birçok çalışmada antioksidan kullanımının diyabetik komplikasyonları azaltabileceği rapor edilmiştir. Bu çalışmada ratlarda diyabete bağlı gelişen böbrek hasarı üzerine erdosteinin koruyucu etkilerini gözlemlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Otuz adet rat rastgele 5 deneysel gruba ayrıldı (Grup 1: kontrol, Grup 2: erdosteine verilen grup, Grup 3; alloxan verilen grup, Grup 4: alloxan+erdosteine verilen grup ve Grup 5: İnsülin+alloxan verilen grup, (her grupta n=6). Ratlar %0,9'luk sodyum klorürde çözülmüş alloxanın intraperitoneal enjeksiyonuyla diyabetik hale getirildi. Dört hafta boyunca erdosteine (10 mg/kg/gün) oral yolla ve insülin günde 2 kez 3 g/kg dozunda intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Sonrasında fareler kesildi. Işık mikroskopisi ile böbrekte histopatolojik değerlendirme yapıldı.

BULGULAR: Diyabet geliştirilen ratlarda belirgin diyabetik nefropatiye ait değişiklikler görülürken, erdosteine tedavisi alan grup, almayan grupla karşılaştırıldığında histopatolojik değişiklikler anlamlı olarak daha az oranda görüldü (p<0.05). İnsülin alan ratlarda histolojik değişiklikler tedavisiz diyabetik gruba göre anlamlı olarak daha az gözlemlendi (p<0.05). Erdosteine grubunda görülen histopatolojik değişiklikler insülin tedavisi alan ratlara benzerdi (p>0.05).

SONUÇ: Bu çalışmada, diyabette böbrekte oluşan hasar üzerine erdosteine koruyucu etkisi olabileceğini gözlemledik.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Diyabetik nefropati, Erdosteine, Böbrek yetmezliği, Alloxan

ABSTRACT

OBJECTIVES: Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. It has been reported in many studies that antioxidant therapy may decrease complications related to diabetes mellitus. We aimed to evaluate the protective effects of erdosteine on diabetic renal injury in diabetic rats.

MATERIAL and METHODS: Thirty rats were randomly divided into 5 experimental groups (Group 1: control, group 2: erdosteine, group 3: alloxan, group 4: alloxan+erdosteine, and group 5: alloxan+insulin, n=6 each). Rats were made diabetic using alloxan injection intraperitoneally. Erdosteine (10 mg/kg/day) orally and insulin two times a day (3 g/kg) intraperitoneally were administered for four weeks. All rats were then sacrificed and kidney histopathological examinations were performed by light microscopy.

RESULTS: The diabetic rats had diabetic nephropathic changes in the kidney on histological examination but the rats treated with erdosteine showed significantly less histopathological changes, similar to the control group compared with the diabetic rats not treated with erdosteine (p<0.05). The histopathological changes in insulin-treated rats were significantly less than the diabetic rats (p<0.05). The rats treated with erdosteine had histopathological changes similar to insulin-treated rats (p>0.05).

CONCLUSION: Based on the present data, we conclude that erdosteine may show protective effects on renal injury due to diabetes mellitus.

KEY WORDS: Diabetic nephropathy, Erdosteine, Renal failure, Alloxan

Faruk TURGUT¹
Ayşe ÇARLIOĞLU²
Rabia ALKAN³
Derya AKDENİZ³
Hacer HALTAŞ⁴
Özlem ŞAHİN BALÇIK⁵
Ebru UZ¹
Ömer Faruk KARATAŞ⁶

- 1 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye
- 2 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye
- 3 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
- 4 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
- 5 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye
- 6 Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi : 07.06.2010

Kabul Tarihi : 25.08.2010

Yazışma Adresi:

Faruk TURGUT

Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Nefroloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Gsm : 0 505 642 17 12

E-posta : turgutfaruk@yahoo.com

GİRİŞ

Diyabet oksidatif hasarla ilişkili sistemik bir hastalıktır. Oksidatif hasar diyabetik nefropati gibi komplikasyonların oluşumunu hızlandırmada rol oynamaktadır (1). Serbest radikal temizleyicilerin oksidatif kaynaklı hasarı önlemede rol alabileceği düşünülmektedir.

Erdosteine (N-karboksimetiltioasetil-homosisteine tiolaktone) kronik pulmoner hastalıkların tedavisi için geliştirilen mukolitik bir ajandır. Bu ajan ancak karaciğer metabolizması ile serbestleştirilebilen iki adet bağı sulfhidril grubu içerir. Erdosteinein temizleyici ve antioksidan mekanizmasında bu iki sulfhidril grubu rol oynar (2, 3). Deneysel ve klinik çalışmalar erdosteinein antioksidan olarak serbest radikal temizleyici fonksiyonlarını göstermiştir (4-6). Bu çalışmada ratlarda diyabetle gelişen hasar üzerine erdosteinein koruyucu etkilerini gözlemlemek amaçlanmıştır.

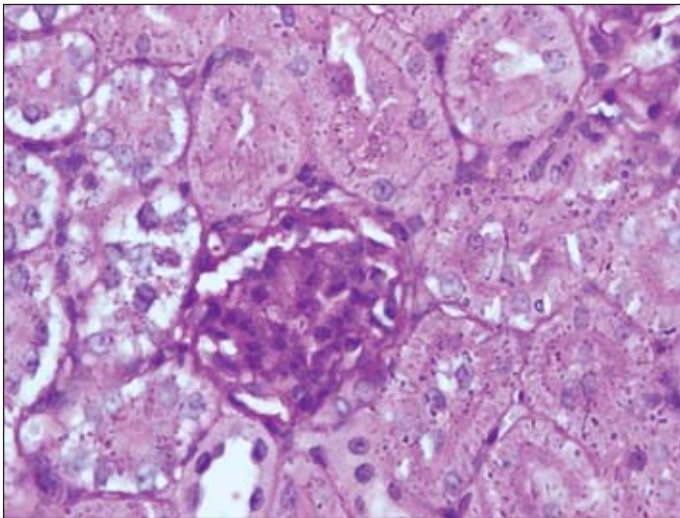
GEREÇ ve YÖNTEMLER

Hayvanlar

Bu çalışmada 30 adet dişi, 180-220 gr arası ağırlıkta Wistar tipi albino rat kullanıldı. Ratlar lokal etik komitesi tarafından kabul edilen Hayvan Laboratuvarı Bakım ve Kullanım şartlarına uygun olarak özel bir odada 12'şer saatlik ışık-karanlık siklusu altında saklandı. Hayvanlar yeme, su içme ve libido açısından özgür bırakıldı.

İlaçlar

Erdosteinein (İlsan, Türkiye) daha önceki bir çalışmada yapılmış olduğu gibi (7, 8) distile suda çözülmesi sağlandı ve 10 mg/kg gün dozunda oral olarak verildi. Erdosteine taze olarak hazırlandı ve 4 hafta boyunca diyabetik ratlara tedavi amacıyla günlük olarak verildi.



Şekil 1: Alloksan verilen grupta diffüz skleroze görünümde glomerul (PAS x 1000).

Diyabetin İndüklenmesi

Diyabet yeni hazırlanmış alloksanın (Alloxan monohydrate, Iktlabs, USA) intraperitoneal (i.p.) tek enjeksiyonuyla indüklendi (120 mg/kg,%0,9 luk tuzda çözünmüş olarak). Bu indükleme, alloksan uygulamasından 3 gün sonra glikoz indikatör stik yoluyla glikozürinin test edilmesiyle doğrulandı (9).

Referans İlaç (İnsülin)

Çinko insülin, insülin ile tedavi edilen diyabetik ratlara kesilecekleri zamana kadar, 4 hafta boyunca i.p. enjeksiyonla günde 2 kez 3 g/kg dozunda uygulandı (10).

Deneysel Plan

Ratlar 5 grup olarak ayrıldı ve her grup 6 rattan oluşacak şekilde düzenlendi.

Grup 1: Sadece su alan normal kontrol grubu

Grup 2: Dört hafta oral yolla 10 mg/kg erdosteine alan normal ratlar

Grup 3: Tek enjeksiyon ile i.p. yolla alloksan alan ratlar

Grup 4: Oral yolla 4 hafta erdosteinele tedavi edilen diyabetik ratlar (10 mg/kg gün)

Grup 5: İnsülin alan diyabetik ratlar (3 g/kg i.p. yolla 4 hafta boyunca)

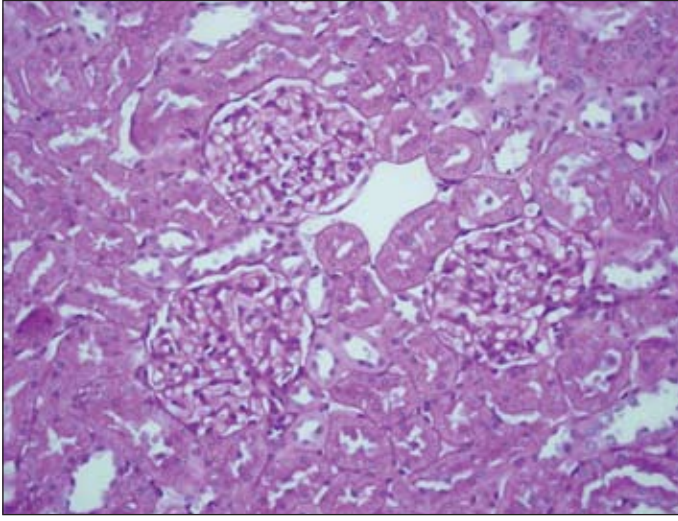
Dört hafta sonunda tüm ratların uretranla anestezi sağlanarak böbrekleri çıkarıldı ve longitudinal olarak ikiye ayrıldı. Bir parçası histopatolojik değerlendirme için %10 formalinle fikse edildi. Diğer parça analiz edilene kadar -70°C'de saklandı.

Histopatolojik Değerlendirme

Ratlara ait böbrek örnekleri dereceli etanol serilerinde dehidrate edildi ve parafin mum içine gömüldü. Mum temizlendikten sonra 4 mikrometrelik kesitlere ayrıldı ve 3-4 mm kalınlığında kesitler boyanarak tekrar mumdan arındırıldı ve dehidrate edildi. Daha sonra bu kesitler hemotoksilen-eosinle boyandı. Histolojik hasar; glomerüloskleroz varlığı, Bowman aralığında daralma, kapiller bazal membran kalınlaşması, mezangial matriks artışı, retiküler fibril artışı, tübüler epitelde hidropik değişiklikler ve vakuolizasyon, tübüler epitelde glikojen birikimi ve renal proksimal tübüllerde epitel fırça kenarda destrüksiyon olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS for Windows 9.0 istatistik paket programı kullanıldı. Histopatolojik değişiklikler bir patolog tarafından semikantitatif olarak H: Hafif değişiklik, O: Orta düzeyde değişiklik, C: Ciddi düzeyde değişiklik gösteren rat sayıları olarak her grupta değerlendirildi. En az anlamlı farkla gruplar arası farkları histopatolojik ve morfolojik farkların belirlenmesinde varyans analizi (ANOVA) ve Post-Hoc Bonferroni testi kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda



Şekil 2: Alloksan + erdosteine verilen grupta minimal bowman mesafesinde daralma (PAS x 400).

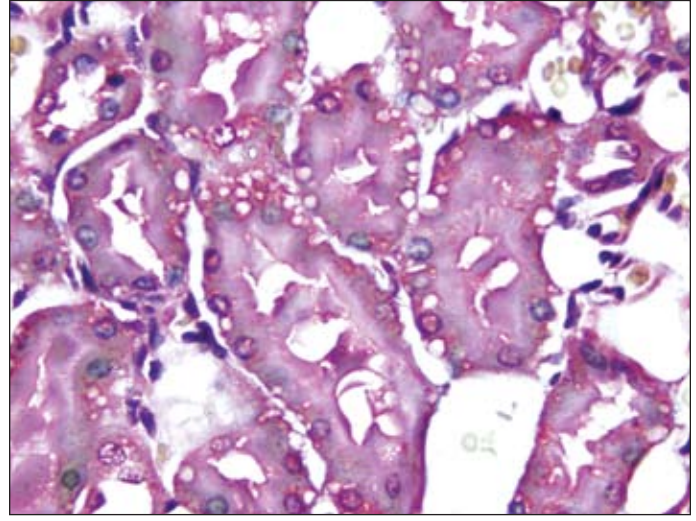
Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar \pm standart sapma olarak sunuldu ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Gruplardaki histopatolojik değişikliklerin derecelendirilmesi Tablo 1’de verilmiştir. Diyabet geliştirilen ratlarda, böbrekte glomerüloskleroz, Bowman aralığında daralma, mezangial matriks genişlemesi ve renal proksimal tübüllerde epitel fırça kenarda destrüksiyon oluşmuştu (Şekil 1). Kontrol grubunda minimal glomerüloskleroz, Bowman aralığında daralma ve retiküler fibrillerde artış izlendi. Alloksanla indüklenen ratlara ait kesitlerde de erdosteine tedavisi sonrası Bowman aralığında daralma ($p < 0,001$); kapiller bazal membran kalınlaşmasında azalma ($p < 0,001$); mezangial matriks genişlemesi, retiküler fibril artışı ve tübüler epitelde hidropik değişiklikler ($p < 0,001$); tübüler epitelyum vakuolizasyonu ve renal proksimal tübül epitelinde fırça kenar destrüksiyonunda ($p < 0,05$) anlamlı gerileme gözlemlendi (Şekil 2,3).

İnsülin tedavisi altında takip edilen ratlarda kapiller bazal membran kalınlaşması ($p < 0,001$), proksimal tübüllerde epitel fırça kenarda destrüksiyon ($p < 0,001$), tübüler epitelde hidropik değişiklikler ($p < 0,05$) ve tübüler epitelde vakuolizasyon ($p < 0,05$) tedavisiz diyabetik gruba göre anlamlı olarak daha az gözlemlendi (Şekil 4). Erdosteine tedavisi altında glomerüloskleroz, kapiller bazal membran kalınlaşması, retiküler fibril artışı, tübüler epitelde hidropik değişiklikler ve tübüler epitelyum vakuolizasyonunda insülin tedavisi altında olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0,05$) yalnızca Bowman aralığı daralması yönünden anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

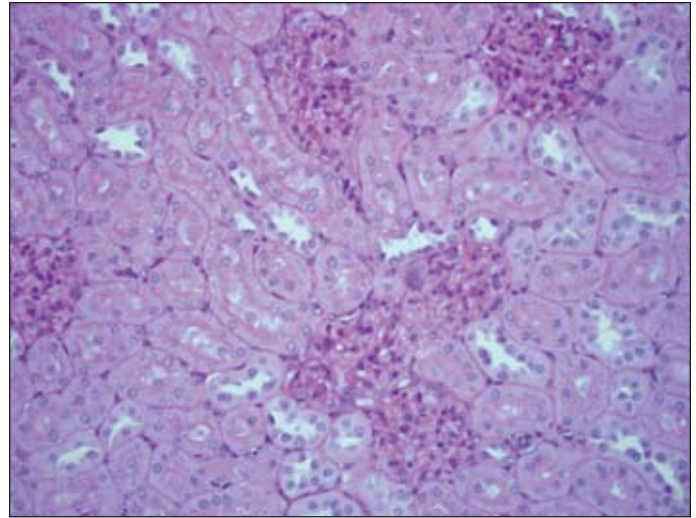


Şekil 3: Alloksan + erdosteine verilen grupta proksimal tübül epitelinde sitoplazmasında vakuolizasyon, fırçamsı kenarda minimal bozulma (Masson Trichrom x 1000).

TARTIŞMA

Çalışmamızda alloxan vererek oksidatif komplikasyonları indüklenen diyabetik ratlarda histolojik ve morfolojik değişikliklerin arttığını; erdosteine ve insülin verilen ratlarda ise bu değişikliklerin azaldığını gözlemledik.

Diyabetik nefropati glomerüler bazal membran kalınlaşması, mezangial matriks artışı, glomerüler skleroza kadar ilerleyebilen glomerüler hipertrofi, tübülinterstisyel fibrozis, glomerüler alanda geniş proteinöz depozitler, glomerüler alanda hyalin depozitler ve tübülde hyalin kastlar, arterioller hyalinozis ve tübüler dilatasyon gibi yapısal değişikliklere eşlik eder (11). Diyabetik hastada tübüler epitelde glikojen depozitleri olması tübüler lezyon gelişiminin erken habercisidir (12).



Şekil 4: Alloksan-insülin verilen grupta Bowman mesafesinde daralma (PAS x 400)

Tablo I. Renal histopatolojik değişikliklerin derecelendirmesine göre ratların dağılımı.

	K			E			A			A+I			A+E		
	H	O	C	H	O	C	H	O	C	H	O	C	H	O	C
Glomeruloskleroz	5	-	-	5	-	-	-	2	4	-	2	4	3	1	1
Bowman alanında daralma	5	-	-	5	-	-	-	4	2	3	2	1	5	-	-
Kapiller bazal membran kalınlaşması	-	-	-	-	-	-	1	2	3	5	-	-	4	-	-
Mezangial matriks artışı	-	-	-	-	-	-	-	1	5	1	5	-	1	3	1
Retiküler fibrillerde artış	5	-	-	5	-	-	-	1	5	1	2	3	3	1	1
Tubuler epitelde hidropik dejenerasyon	-	-	-	-	-	-	1	-	5	2	4	-	4	1	-
Tubuler epitelde vakuolizasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	6	2	4	1	2	2	1
Tubuler epitelde H glikojen birikimi	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	2	-	1	1	1
Renal proximal tubulde epitelyal fırça kenar destruksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	1	5	5	-	-	3	1	1

K: Kontrol grubu, **E:** Erdosteine alan grup, **A:** Alloksan alan grup **A+I:** Alloksan+insülin alan grup **A+E:** Alloksan+erdosteine alan grup,
H: Hafif patolojik değişiklikler gözlenen rat sayısı, **O:** Orta düzeyde patolojik değişiklikler gözlenen rat sayısı,
C: Ciddi düzeyde patolojik değişiklikler gözlenen rat sayısı.

Diyabetik böbrekte mezangial matriks artışı, ekstrasellüler matriks elemanlarının birikmesi ve anormal mezangial hücre proliferasyonu erken değişiklikler olarak bildirilmiştir (13).

Erdosteine, nitrik oksit ve ksantin oksidaz aktivitesini önleyerek serbest radikal oluşumunu azaltır (7, 8). Erdosteine ilaçlara bağlı toksik renal yetmezlikte başarıyla kullanılmaktadır. Renal doksorubisin ve sisplatin toksisitesinde etkinliği gösterilmiştir (14, 15). İskemi reperfüzyon sonrası ratlarda böbreğin korunmasında erdosteinein koruyucu etkisi gösterilmiştir (16, 17). Bütün bu veriler, erdosteinein ratlarda çeşitli oksidatif stres durumlarında koruyucu etkisini vurgulamaktadır.

Alloksanın diyabetojenik etkisi reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimine yol açması ve bu radikallerin pankreas B hücrelerinde yaptığı sitotoksiteden kaynaklanmaktadır. Bu hasar sonucu insülin sentez ve salınımı azalmakta bu durum da diyabetin komplikasyonlarının böbrek dahil diğer dokularda artışına neden olmaktadır (18, 19). Bizim çalışmamızda da histopatolojik bulgular önceki çalışmalarla benzerdi. Alloksan alan grupta glomeruloskleroz varlığı, bowman aralığında daralma, kapiller bazal membran kalınlaşması, mezangial matriks genişlemesi gibi morfolojik değişiklikler gözlemledik. Çalışmamızda, literatürde ilk kez erdosteine ve insülin tedavisi alan grupta yukarıda sayılan histolojik değişikliklerden farklı

ve daha hafif olarak minimal glomeruloskleroz ve Bowman aralığında daralma olduğunu gösterdik. Bütün bu sonuçlarla biz, çalışmamızda renal hasarın azaltılmasında erdosteinein etkili olduğunu düşünüyoruz.

Alloksanla indüklenen diyabetiklerde azalmış antioksidan enzim düzeyleri ve artmış lipid peroksidasyonu çalışmalarda gösterilmiştir (20, 21). Çalışmalarda lipid peroksidasyonunu indükleyen ajanlara maruz kalan hayvanlarda oksidatif strese karşı erdosteinein koruyucu etkisi de gösterilmiştir (22). Çalışmamızda görülen erdosteinein renal yetmezlikten koruyucu etkisi aynı zamanda renal tübülde lipid peroksidasyonunu azaltıcı yönü nedeniyle olabilir. Erdosteine içerdiği iki bağlı sülfhidril grubu aracılığıyla diyabet kaynaklı oksidan hasarı önleyebilir.

Çalışmamızda ışık mikroskopisi ile değerlendirerek doğal seyrinde giden ve indüklenmiş diyabette oluşan böbrek hasarında erdosteinein koruyucu bir ajan olduğunu gözlemledik. Erdosteine diyabet komplikasyonu olarak oluşan böbrek hasarını önlemede ve hasarı geri döndürmede umut verici bir ilaç olabilir. Ancak deneysel diyabette erdosteinein gerçek etki mekanizmasını ortaya çıkaracak antioksidan ve molekül düzeyinde daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Kakkar R, Kalra J, Mantha S, Prasad K: Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995; 151(2):113-119
2. Dechant K, Noble S: Erdosteine. *Drugs* 1996; 52(6):875-881
3. Braga P, Dal Sasso M, Zuccotti T: Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts. *Arzneimittelforschung* 2000; 50(8):739-746
4. Biagi G, Fregnan G, Gazzani G, Vandoni G: Erdosteine protection from cigarette smoke-induced loss of alpha 1-antitrypsin activity in rat lungs. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989; 27(5): 235-237
5. Inglesi M, Nicola M, Fregnan G, Bradamante S, Pagani G: Synthesis and free radical scavenging properties of the enantiomers of erdosteine. *Farmaco* 1994; 40(11):703-708
6. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O: Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res* 2003; 47(2):149-156
7. Fadillioglu E, Yilmaz H, Erdogan H, Sogut S: The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: Protective effect of erdosteine. *Toxicology* 2003; 191(2-3):153-158
8. Fadillioglu E, Erdoğan H, Söğüt S, Kuku I: Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol* 2003 200; 23(1):71-74
9. Traisman H, Greenwood R: A comparative clinical evaluation of a new proprietary method for urine testing in juvenile diabetics. *Clin Pediatr (Phila)* 1973; 12(6):357-359
10. Bora P, Srivastava L, Bhatt SD: Metabolic and histopathological effects of streptozotocin induced diabetes in rats: effect of propranolol and insulin. *Indian J Exp Biol* 1985; 23(1):23-26
11. Gruden G, Perin P, Camussi G: Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Curr Diabetes Rev* 2005; 1(1):27-40
12. Vardı N IM, Oztürk F, Ucar M, Gül M, Esrefoğlu M, Otlu A: Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. *İnönü Üniv Tıp Fak Dergisi* 2005; 12:145-152
13. Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, Lagarde M, El Bawab S: Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels. *FEBS Lett* 2005; 579(5):1249-1254
14. Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK: Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 48(4):377-382
15. Ozyurt H, Yildirim Z, Kotuk M, Yilmaz HR, Yağmurca M, Iraz M, Söğüt S, Gergerlioglu S: Cisplatin-induced acute renal failure is ameliorated by erdosteine in a dose-dependent manner. *J Appl Toxicol* 2004; 24(4):269-275
16. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK: Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res* 2006; 34(1):41-46
17. Gurel A, Armutcu F, Cihan A, Numanoglu K, Unalacak M: Erdosteine improves oxidative damage in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Eur Surg Res* 2004; 36(4):206-209
18. Sakurai K, Katoh M, Someno K, Fujimoto Y: Apoptosis and mitochondrial damage in INS-1 cells treated with alloxan. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(8):876-882
19. Sabu M, Smitha K, Kuttan R: Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(1-2):109-116
20. Roy S, Sehgal R, Padhy B, Kumar VL: Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(3):470-473
21. Sepici-Dincel A, Açıkgoz S, Cevik C, Sengelen M, Yeşilada E: Effects of in vivo antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(3):498-503
22. Tunc T, Uysal B, Atabek C, Kesik V, Caliskan B, Oztas E, Ersoz N, Oter S, Guven A: Erdosteine and ebselen as useful agents in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2009; 155(2): 210-216