

Siçan Böbrek Dokusunda Karbon Tetraklorürün Oluşturduğu Değişikliklere Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Etkisi

The Effect of Low Molecular Weight Heparin on Kidney Tissue of Rats Exposed to Carbon Tetrachloride

Tülin Fırat

Research Assistant M.D.
Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, Abant İzzet Baysal University
tulins2000@gmail.com

Aysel Kükner

Prof. M.D.
Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, Abant İzzet Baysal University
akukner@hotmail.com

Fatma Töre

Assoc. Prof. M.D.
Department of Physiology
Faculty of Medicine, Abant İzzet Baysal University

Bekir Uğur Ergür

Assoc. Prof. PhD
Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, 9 Eylül University
bekir.ergur@deu.edu.tr

Contract Grant sponsor: This study was supporter Abant İzzet Baysal Research Projects Unit, contact grant number: (2006.08.01.247)

This study was presented at XIXth International Electron Microscopy Congress, 26-29 August 2007, Eskişehir- Turkey.

Submitted : March 10, 2009
Revised : August 04, 2009
Accepted : October 19, 2009

Corresponding Author:

Araş.Gör. Tülin Fırat
Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, Abant İzzet Baysal University
Gölköy-BOLU / Turkey

Telephone: +90- 374 2534656
E- mail: tulins2000@gmail.com

Özet

Amaç Karaciğer ve böbreğe toksik etkili olan karbontetraklorür (CCL4) sanayide sıklıkla kullanılmaktadır. Heparin, antitrombotik özelliğinin yanında, yapılan çalışmalarda antifibrotik olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada düşük doz CCL4 (0.25 ml/kg) uygulanan siçanların böbrek dokularındaki değişiklikler ve düşük molekül ağırlıklı (DMA) heparinin buna etkisi inceyapı düzeyinde incelenmiştir.

Gereç and Yöntem: On sekiz adet erişkin erkek Sprague Dawley siçandan rastgele 4 grup oluşturuldu: 1.Kontrol grubu: Zeytinyağı (1ml) intraperitoneal gūnaşını uygulandı (n=4). 2.CCL4 grubu: 0,25ml/kg CCL4 1 ml zeytinyağı içinde, ip, gūnaşını uygulandı (n=5). 3.CCL4 + Heparin grubu: 0,25ml/kg CCL4 uygulanan siçanlara 180 IU/kg DMA heparin (Enoksaprin sodyum), her gün subkütan olarak son 3 hafta uygulandı (n=4). 4.DMA Heparin grubu: Üçüncü grupta uygulanan doz ve sürede Enoksaprin uygulandı (n=5). Siçanlar 4 haftalık deney süresi sonunda sakrifiye edilerek böbrekler tartıldı ve doku örnekleri alınarak gluteraldehit ile tespit edildi. İnce kesitler Zeiss EM ile incelenerek görüntüledi. Değerlendirmede Kruskal-Wallis istatistik testi kullanıldı.

Bulgular: CCL4'ün, böbrek dokularında proksimal tübül mikrovillus yapısında bozulmaya, bazal girintilerin ve lizozom sayılarının artışına, kapiller genişlemelerine neden olduğu tespit edilmiştir. CCL4'le birlikte DMA heparin uygulanan gruptaki siçanların böbrek yapıları normal morfolojiye yakın bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada düşük doz CCL4'ün böbrek glomerüllerinde ve proksimal tübül yapılarında minimal değişikliklere neden olduğu, enoksaprin uygulanan gruplardaki böbrek yapılarının ise kontrol grubuna benzediği tespit edilmiştir. Çalışmanın devamının yüksek doz CCL4'le yapılması planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: **Böbrek; Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin; Elektron Mikroskopi; Karbon Tetraklorür.**

Abstract

Purpose: Carbon tetrachloride (CCl4) is frequently used in the industry which has toxic effects on liver and kidney. Heparin is an antithrombotic drug, also an antifibrotic agent. In the present study, the effect of low molecular weight (LMW) heparin on kidney of low dose CCl4 exposed rats was examined by electron microscopy.

Material and Methods: Four groups were formed randomly from 18 adult male Sprague-Dawley rats: 1. Control: olive oil (1 ml) was given IP every other day (n=4). 2. CCl4: 0,25 ml/kg CCl4 was solved in olive oil and given IP every other day (n=5). 3.CCl4+LMW Heparin: CCl4 exposed rats were given subcutan 180 IU/kg LMW Heparin (n=4). (Enoxaparin sodium), everyday for last 3 weeks. 4. LMW Heparin: Enoxaparin in same dose and period as group 3 was administrated to rats (n=5). Rats were sacrificed after 4 weeks period, kidney tissues were taken and weighted. Tissue samples were fixed in glutaraldehyde for EM. Thin sections were examined with Zeiss EM. Kruskal-Wallis statistical test were used.

Results: CCl4 caused damage in proximal tubul microvillus structure,increased basal infoldings and number of lisosoms and capillary dilatation in rat kidney.In LMW heparin+CCl4 given group,the kidney tissue was found near normal morphology.

Conclusion: In this study,chronically exposing of lowdose CCl4 were caused minimal changes in proximal tubule and glomerulus structure. Enoxaparin given groups were same with control. The following study will be performed with highdose CCl4.

Key words: **Carbon tetrachloride; Heparin, Low-molecular-weight; Kidney; Microscopy, Electron.**

Giriş

Karbondioksit (CO₂), endüstriyel bir çözücü olarak özellikle kuru temizleme sanayi olmak üzere birçok alanda sıkça kullanılan, karaciğer üzerine toksik etkisi olan bir kimyasaldır (1, 2). Karbondioksit karaciğerde olduğu kadar böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve kan gibi diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. CO₂ böbreklerde akut ve kronik zedelenmeye yol açmaktadır (2, 3). Bu etkisinin serbest oksijen radikallerine bağlı olduğu gösterilmiştir. CO₂, lipid peroksidasyon ürünlerinin artışına ve bu ürünlere karşı koruyucu olan enzimlerin azalmasına neden olmaktadır. Bu etkiler CO₂'ün sitokrom P450 (CYP) enzimiyle daha toksik olan triklorometil ve triklorometil peroksit (CCl₃/CCl₃O₂) veya *N*-asetil-*p*-benzokinonelin (NAPQI) serbest radikallerine dönüşmesi sonucu meydana gelmektedir (4). Hepato/nefrotoksisitenin özellikle sitokrom P450 2E1 aktivitesiyle gerçekleştiği ileri sürülmektedir (5).

Heparin ve yarı ömrü daha uzun olan düşük molekül ağırlıklı heparin günümüzde antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinliği ile çeşitli hastalık gruplarında denetlenmektedir (6, 7). Özellikle glomeruloskleroz, hepatik ve pulmoner fibroziste başarılı sonuçlar alınmıştır (8, 9).

Bu çalışmada, sıçanlara düşük doz CO₂ uygulanarak böbrek dokusundaki oluşturduğu değişiklikler ve buna düşük molekül ağırlıklı heparinin olası etkisinin ince yapı düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntem

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram olan toplam 18 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı.

Rastgele seçilen hayvanlardan toplam 4 grup oluşturuldu: (i). Kontrol grubu: İntraperitoneal olarak zeytinyağı (1ml) gınaşırı uygulandı (n=4). (ii). CO₂ grubu: 0,25ml/kg CO₂ zeytinyağı içinde çözülerek, intraperitoneal, gınaşırı uygulandı (n=5). (iii). CO₂ + Heparin grubu: 0,25ml/kg CO₂ uygulanan sıçanlara 180 IU/kg düşük molekül ağırlıklı heparin (Enoxaparin sodium), her gün subkütan olarak son 3 hafta boyunca uygulandı (n=4). (iv) Heparin grubu: Sağlıklı sıçanlara sadece heparin uygulandı. 180 IU/kg Enoxaparin sodium günde tek doz, son 3 hafta boyunca subkütan verildi (n=5).

Sıçanlar dört haftalık deney süresi sonunda son enjeksiyondan 24 saat sonra sakrifiye edildi. Daha sonra böbrekleri alındı ve tartıldı. Doku örnekleri %2.5 glutaraldehit ile tespit edildi. İkinci fiksasyon için %2'lik osmiyum tetroksitte bekletildi. Dehidratasyon için dereceli alkollerden ve propilen oksitten geçirilen dokular Araldit Cy212 içinde gömülerek bloklar hazırlandı. Yarı ince kesitler Olympus BX51 foto mikroskop ile ince kesitler Zeiss EM ile incelenerek görüntüledi.

Tüm deneklerin 100 gr vücut ağırlığına düşen böbrek ağırlıkları hesaplandı. Gruplar arası böbrek ağırlıklarını karşılaştırmak için Kruskal-Wallis istatistik testi kullanıldı.

Bulgular

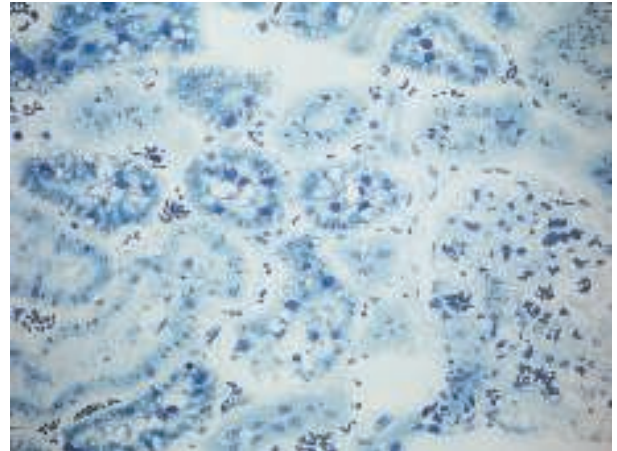
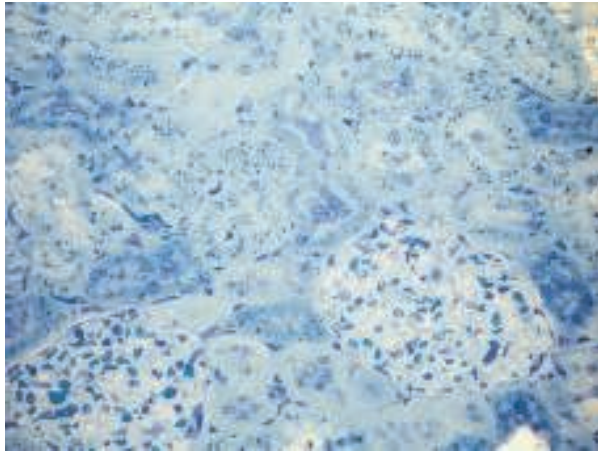
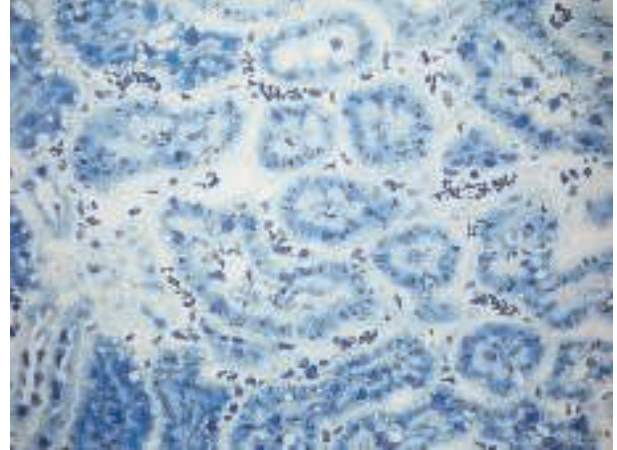
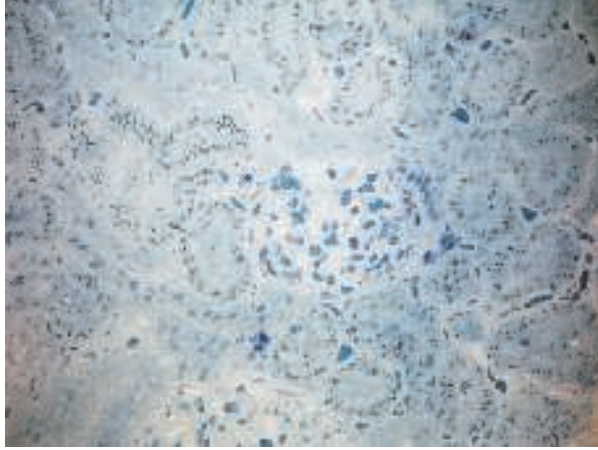
Grupların böbrek ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Z: 2,060; P=0,56; Tablo 1).

Tablo I: Sıçan böbrek ağırlıkları (Z: 2.060, P=0.56)

| Gruplar | Kontrol | CO ₂ | CO ₂ +Hep | Heparin |
|----------------|---------|-----------------|----------------------|---------|
| n | 4 | 5 | 4 | 5 |
| Minimum | 0,6300 | 0,6000 | 0,6200 | 0,6200 |
| Ortanca | 0,6550 | 0,7300 | 0,6750 | 0,6600 |
| Maksimum | 0,6800 | 0,8500 | 0,7300 | 0,7600 |
| Ortalama | 0,6550 | 0,7240 | 0,6750 | 0,6760 |
| Standart Sapma | 0,02082 | 0,09529 | 0,04655 | 0,05320 |
| Standart Hata | 0,01041 | 0,04261 | 0,02327 | 0,02379 |

Yarı ince kesitler incelendiğinde grupların hiçbirinde intertisyel hücre infiltrasyonu, fibrozis, vasküler konjesyon ve hemoraji izlenmedi. Kontrol grubunda glomerül ve tübül yapıları normal görünümdeydi. CCl₄ uygulanan grupta glomerül kapillerlerinde genişleme, peritübüler

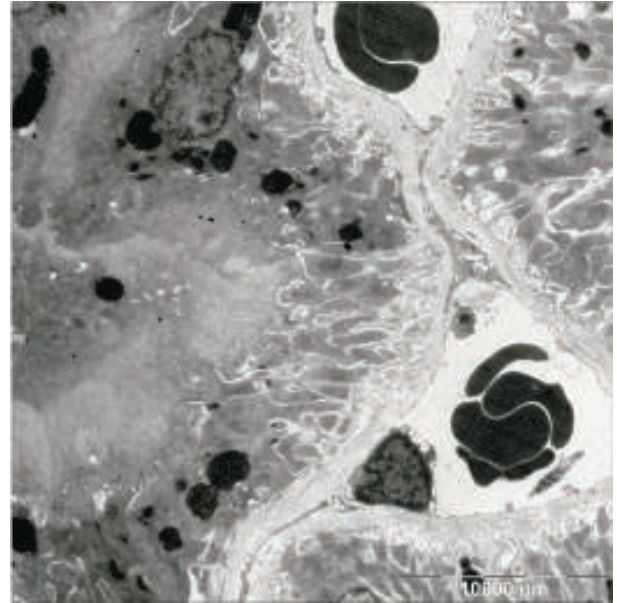
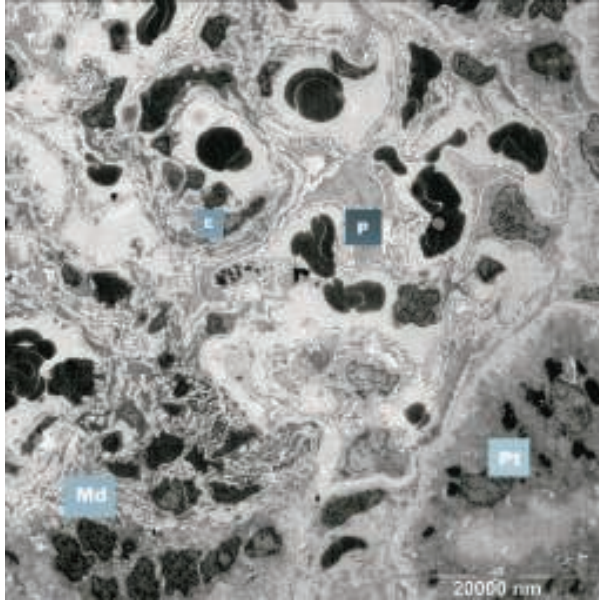
kapillerlerde dolgunluk, proksimal tübül bazal kısımlarında vakuolizasyon belirgin olarak ayırt edildi. CCl₄ + heparin uygulanan gruplarda böbrek yapısı kontrol grubuna benzemekteydi, tübüllerdeki vakuolizasyon azalmıştı (Resim 1).



Resim 1. Kontrol, CCl₄ uygulanan ve CCl₄ + Heparin uygulanan gruplardan alınan örnek mikroskobik materyali. Böbrek dokusunun kontrol grubuna ait ışık mikroskopik görünümü (**sol-üst**). CCl₄ uygulanan böbrek dokusunda genişlemiş glomerül kapillerleri, proksimal tübül bazalinde vakuolize görünüm dikkat çekmekte (**sağ-üst**). CCl₄ grubunda glomerüller ve peritübüler kapillerde dolgunluk, proksimal tübüllerde vakuol yapıları görülmekte (**sağ-alt**). CCl₄ + Heparin uygulanan grupta böbrek yapısının kontrole benzediği görülmektedir (**sol-alt**). (Toluidin mavisi X40).

Elektron mikroskopik olarak kontrol grubunda podoz sit hücrelerinin uzantıları, filtrasyon aralıkları, kapiller endotelleri, proksimal tübüllerin bazal çizgilenmeleri,

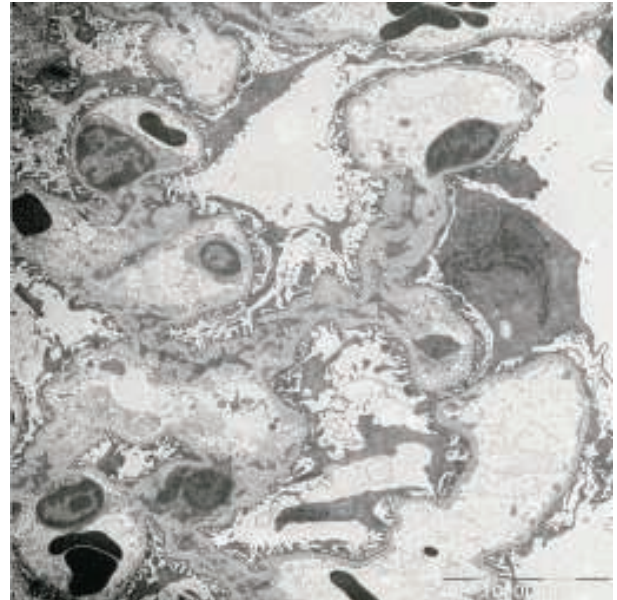
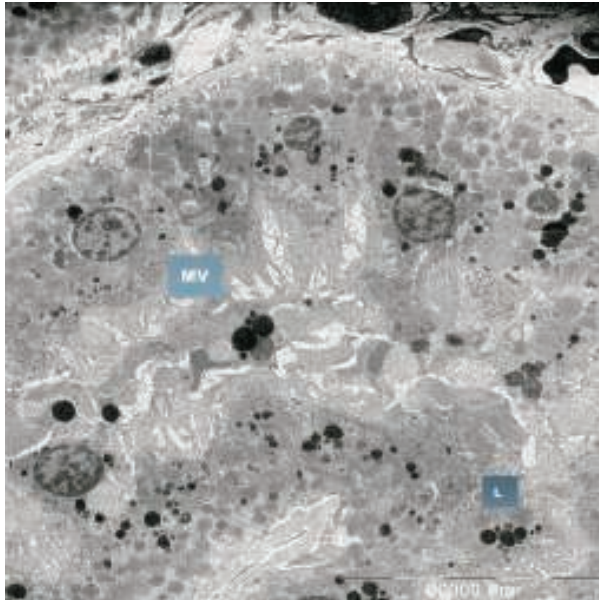
mitokondriyonlar, apikalde mikrovilluslar normal görünümdeydi (Resim 2).



Resim 2. Sol: Kontrol grubuna ait bir ratın böbrek glomerülünün ince yapısı. Proksimal tübül (Pt), Podosit (P), endotel (e), makula densa hücreleri (md). Bar =20000nm. **Sağ:** Kontrol grubunda proksimal tübülün normal yapıda olduğu görülüyor. Bar =10000nm.

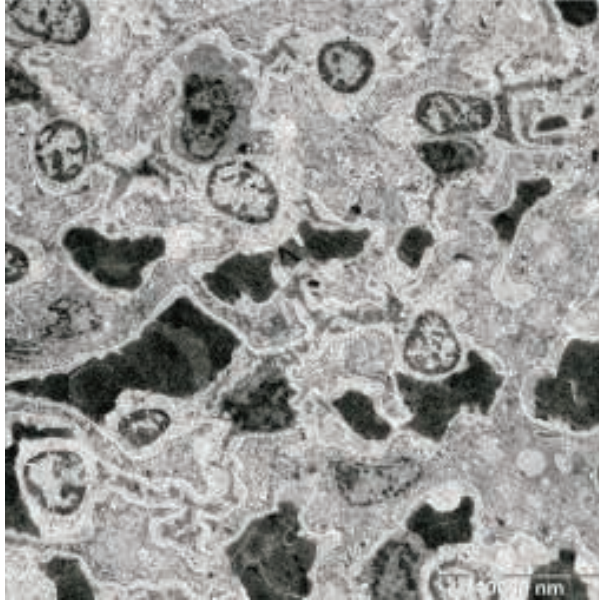
CCl₄ uygulanan grupta proksimal tübüllerde düzensiz mikrovilluslar, apikal sitoplazmada çok sayıda osmiyofilik granüller, glomerül yapısında genişlemiş kapiller yapıları

izlendi. Artmış mezengium gözlenmedi. Filtrasyon aralıkları düzgün olarak seçildi (Resim 3).



Resim 3. Sol: CCl₄ uygulanan gruba ait bir ratta proksimal tübülde düzensiz mikrovillus yapıları (Mv) ve lizozomlar (L) görülüyor. Bar =20000nm. **Sağ:** CCl₄ uygulanan grupta glomerülde genişlemiş kapillerler izleniyor. Bar =10000nm

CCl₄ + heparin uygulanan grupta glomerül kapillerleri dolgun, endotel hücrelerinde belirgin granüllü endoplazmik retikulum, perinükleer membranda genişleme izlendi (Resim 4).



Resim 4. CCl₄ + heparin uygulanan grupta glomerül yapısı görülüyor. Bar =10000nm.

Tartışma

Sanayi ve tarımda sık kullanılan CCl₄, hepatoksitesi ve nefrotoksitesi iyi bilinen bir kimyasaldır (10). Bu çalışmada düşük doz CCl₄'e maruz bırakılan sıçanların böbrek dokusundaki ince yapı düzeyindeki değişiklikler gösterilmiştir. 0,25 ml/kg dozda CCl₄, 4 hafta uygulandığında proksimal tübül mikrovillusları düzensiz, glomerül kapilleri genişlemiş gözlenirken intraglomerüler mezengium artışı izlenmemiştir. Buna karşın Doğukan ve arkadaşları 0,15 ml/kg dozda CCl₄'ü 7 hafta uygulamışlar ve ışık mikroskopisi değerlendirmesi sonucu interstisiyel fibrosis ve inflamasyon bulmuşlardır (11). Öztürk ve arkadaşlarının CCl₄ ile oluşturulan böbrek hasarında Betainin doku koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, CCl₄ 1 ml/kg, 11 gün uygulamışlar ve yoğun kortikal hasar, fokal glomeruloskleroz gözlemlemişlerdir (1). Böbrekteki doku hasarının farklı derecelerde gözlenmesi doğrudan CCl₄'ün uygulama dozuna bağlanabilir.

CCl₄'ün hepatotoksik etkileri çok yoğun olarak çalışılmaktadır. Bunun yanında böbrek çalışmaları da

yapılmaktadır. Bu organlarda oluşan bozuklukların fizyopatolojisinde oksidan hasar sorumlu tutulmaktadır. Kim ve arkadaşları 2007 yılında farelerde yaptıkları bir çalışmada CCl₄'ün renal toksitesinin cinsiyet farklılığına bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Erkek farelerin CCl₄ nefrotoksitesine dişilere göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Bunun, hepatic yetmezliğe bağlı testosteronun böbreğe daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşması ve renal CYP izoenzimlerini indüklemesi sonucu erkek farelerin böbreklerinin daha fazla oksidan hasara maruz kalmasıyla açığa çıktığı ileri sürülmüştür (5).

Bu çalışmada düşük molekül ağırlıklı heparinin düşük doz CCl₄'ün böbrek dokusunda oluşturduğu değişiklikleri elektron mikroskop düzeyinde azalttığını gösterilmiştir. Heparin uzun yıllardır antikoagulan olarak rutin klinik uygulamada kullanılmaktadır. Standart heparin molekülünün fraksiyonlarından elde edilen düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH) uzun etki süresi, kanama riskinin az olması, düşük dozlarda etkinliği nedeniyle anti-trombotik tedavide sıklıkla kullanılmaktadır (12, 13). DMAH, antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinliği nedeniyle çeşitli hastalık gruplarında tedavi edici olarak denenmektedir. Özellikle pulmoner fibrozisde ve glomerulosklerozda oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (8, 9). Adriamisinle oluşturulan böbrek hasarında düşük molekül ağırlıklı heparinin oksidatif stresi azaltma yoluyla olumlu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir (14). Sonuç olarak; bu çalışmada kronik olarak uygulanan düşük doz CCl₄ böbrek glomerüllerinde ve proksimal tübül yapılarında minimal değişikliklere neden olduğu, heparin uygulanan grupların böbrek yapıları ise kontrol grubuna benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın devamı niteliğinde, aynı yöntem ile yüksek doz CCl₄ uygulanarak yapılması planlanmıştır.

Kaynaklar

1. Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology* 2003; 62: 353-356.
2. Tirkey N, Pilkhwal S, Kuhad A, Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacol* 2005; 5: 2.
3. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Oner J, Kukner A, Sarsilmaz M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 85-92.
4. Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 273-280.
5. Kim YC, Yim HK, Jung YS, Park JH, Kim SY. Hepatic injury induces contrasting response in liver and kidney to chemicals that are metabolically activated: Role of male sex hormone. *Toxicol Appl Pharma* 2007; 223: 56-65.
6. Abdel-Salam OM, Baiuomya AR, Ameena A, Hassan NS. A study of unfractionated and low molecular weight heparins in a model of cholestatic liver injury in the rat. *Pharmacol Res* 2005; 51: 59-67.
7. Abe W, Ikejima K, Lang T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007; 46: 286-294.
8. Deepa PR, Varalakshmi P. The cytoprotective role of a low-molecular-weight heparin fragment studied in an experimental model of glomerulotoxicity. *Eur J Pharmacol* 2003; 478: 199-205.
9. Günther A, Lübke N, Ermert M, et al. Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1358-1365.
10. Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta* 1999; 289: 177-179.
11. Doğan A, Akpolat N, Çeliker H, İlhan N, Bahçecioglu HI, Günel AI. Protective effect of interferon on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. *J Nephrol* 2003; 16: 81-84.
12. Deepa PR, Varalakshmi P. Favourable modulation of the inflammatory changes in hypercholesterolemic atherogenesis by a low-molecular-weight heparin derivative. *Int J Cardiol* 2004; 106: 338-347.
13. Ogata S, Takeda M, Lee MJ, Itagaki S, Doi K. Histopathological sequence of hepatic and renal lesions in rats after cessation of the repeated administration of CCl₄. *Exp Toxicol Pathol* 1995; 47: 493-499.
14. Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact.* 2003; 146: 201-210.