

ANJİOTENSİN II VE KALSİYUM KANAL İNHİBİSYONUNUN ESWL SONRASI GELİŞEN FİBROZİSİ ÖNLEMEDEKİ ROLÜ

THE PROTECTIVE EFFECT OF ANGIOTENSIN II AND CALCIUM CHANNEL BLOCKADE ON ESWL INDUCED RENAL TUBULOINTERSTITIAL FIBROSIS

KESGİN İ., VURUŞKAN H., OKTAY B., YAVAŞCAOĞLU İ., ŞİMŞEK Ü., ÖZYURT M.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, BURSA

ÖZET

ESWL tedavisinde uygulanan şok dalgasının şiddeti ve sayısına bağlı olarak tübüler, interstisyel, glomerüler değişiklikler meydana gelmekte ve bu değişikliklerin bir kısmı kronik dönemde tübulointerstisyel fibroze yol açmaktadır. Transforming growth faktör-Beta 1 (TGF- β 1) gelişen fibrozisi uyaran en önemli faktördür. Çalışmamızda, TGF- β 1 artışını yavaşlatarak, ESWL'ye bağlı böbrekte gelişebilecek tübulointerstisyel fibrozisi engellemeyi amaçladık.

3 gruba ayrılan 30 sıçanın hepsine aynı dozda ESWL uygulandı. ESWL öncesi ve sonrası 10 sıçan anjiotensin reseptör blokleri Losartan ile, 10 sıçan ise kalsiyum kanal blokleri Diltiazem ile tedavi edilirken, 10 sıçana hiçbir tedavi verilmedi. Sham grup olarak adlandırılan 5 sıçana sadece anestezi verildi. TGF- β 1 doku düzeyleri semi-kantitatif bir yöntemle immünohistokimyasal boyama ile değerlendirildi.

Sham-opere böbreklerle ESWL uygulanan gruplardaki böbrekler TGF- β 1'le boyanma düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Tedavi almayan grubun TGF- β 1'le boyanma düzeyleri de diltiazem ve losartan gruplarından yüksek bulundu ($p<0,05$). Diltiazem grubunun TGF- β 1'le boyanma düzeyleri diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$).

Bu bulgular değerlendirildiğinde ESWL'ye bağlı TGF- β 1 artışını, anjiotensin II ve kalsiyum kanal blokajı yaparak azaltmanın ve böylece gelişecek tübulointerstisyel fibrozisi önlemenin mümkün olabileceğini gösterdik. Bu histopatolojik bulgular özellikle, soliter böbrekli, bozulmuş renal fonksiyonlu, tedavisinde sıklıkla ESWL yöntemi tercih edilen üriner sistem taş hastalığı olgularında ve pediatrik yaş grubunda daha da önemlidir.

Anahtar Kelimeler: ESWL, tübulointerstisyel fibrozis, TGF- β 1

ABSTRACT

Due to the strength and duration of the shock waves, extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) may cause tubular, interstitial and glomerular alterations that result with tubulointerstitial fibrosis in the long-term follow-up. Transforming growth factor-Beta I (TGF- β 1) is a major stimulating factor of fibrogenesis. In our study, we tried to suppress TGF- β 1 during ESWL to prevent the kidney from tubulointerstitial fibrosis.

30 rats were divided into three groups and all groups underwent ESWL of same doses. 10 rats were treated by an anjiotensin II receptor blocker, Losartan and another 10 rats by a calcium channel blocker, Diltiazem and the last group received no medication before and during ESWL. 5 rats called sham group received anesthesia alone. The tissue levels of TGF- β 1 are investigated by immunohistochemical staining.

All rats underwent ESWL have significantly increased levels of TGF- β 1 as compared to sham group ($p<0,001$). Untreated rats have also significantly increased levels of TGF- β 1 when compared to treated rats ($p<0,05$). Rats given diltiazem have the least levels of TGF- β 1 ($p<0,05$).

Our data demonstrates that diltiazem and losartan may reduce ESWL-induced renal tubular damage by decreasing levels of TGF- β 1. Such medications may be useful especially in patients with diminished renal function or solitary kidney and pediatric group.

Key Words: ESWL, tubulointerstitial fibrosis, TGF- β 1

GİRİŞ

ESWL, vücut dışından gönderilen şok dalgalarının, üriner sistem taşlarının üzerine odaklanarak kırılmasını sağlayan, ilk kez Chaussy ve arkadaşları tarafından önerilmiş, günümüzde üriner sistem taşları olan hastalarda %85'in üzerinde başarı ile kullanılan bir yöntemdir¹. ESWL sonrası yüksek oranda böbrek yaralanması oluş-

maktadır. Bu yaralanma, perirenal ödem ve Gerota fasyasında kalınlaşma, fokal ve interstisyel hemoraji, subkapsüler hemoraji, tübüllerde dilatasyon ve ödem, kortikal nekroz, inflamasyon, pelvis renaliste hemoraji, periarteriyel adventisyel hemoraji, gevşek bağ dokusunda erken skarlaşma şeklinde olabilir.

Transforming growth faktör- β 1'in (TGF- β 1) fibrinogeneziste rol oynayan sitokinler arasında önemli bir yeri vardır^{2,3,4}. TGF- β 1 kollojen, fibronektin ve proteoglikan gibi matriks proteinlerinin sentezini aktive etmenin dışında, matriks proteinlerinin yıkımını engeller^{5,6,7}. TGF- β 1 fibroblastların dokuya gelişini ve proliferasyonunu uyarır. Ayrıca renal intersitisyumda hücreler arası matriks proteini birikiminde rol alır. TGF- β 1 özellikle glomeruloskleroz ve tübülointerstisyel fibroziste hücreler arası matriks komponentleri sentezini stimüle ederken, kollojenaz yapımını azaltarak renal skar dokusu meydana gelmesini sağlar⁸⁻¹². Anjiotensin II, hipoksi, yüksek glukoz seviyesi, otoantikorlar, immün kompleksler, *platelet derived growth faktör* (PDGF) ve *basic fibroblast growth faktör* (bFGF) *Transforming growth faktör*- β yapımını artırır⁷.

Bir vazoaktif madde olan anjiotensin II (ANG II) TGF- β 'nın böbrekteki salımını stimüle etmektedir. ANG II etkisiyle vasküler düz kas hücrelerinden TGF- β sekresyonu uyarılmaktadır. Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda, kronik siklosporin A toksisitesinde, hipertansiyonun bazı tiplerinde ve diyabetik nefropatide anjiotensin II üzerinden TGF- β 'nın hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Anjiotensin II Tip-1 reseptör blokörleri ANG II üzerinden yapılan TGF- β salımını engellerler. Bu ilaçlar genelde antihipertansif olarak kullanılmasının yanı sıra, lokal TGF- β salımını engelleyerek renoprotektif etki de gösterirler. Diltiazem, L-tipi voltaja bağımlı kalsiyum kanalı üzerinden mezanjial hücre proliferasyonu ve sitokin yapımını inhibe edip, glomerulosklerozisi engellemektedir^{10,13,14}.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneyde ağırlıkları ortalama 250-300 gram arasında değişen, 35 adet dişi *Sprague-Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. 35 sıçana *intrapeitoneal pentobarbital* anestezisi (5.0 mg/kg) altında, ESWL uygulaması sırasında böbreğin odaklanabilmesi için, sol böbrek üst polü çevresindeki perinefritik yağ dokusuna metal klips yerleştirildi.

Sham-opere olarak adlandırılan gruptaki 5 sıçan hariç, diğer 30 sıçana 3 gün arayla 250'şerden toplam 500 SW, 15 kV ESWL uygulandı. Bu

amaçla PCK Stonelith Versiyon:3 ve Lithovision J kollusu ile çalışıldı. ESWL öncesi sıçanlara *intramuscular ketalar* (25 mg/kg) uygulanarak anestezi sağlandı. 30 sıçan, 10'ar adetten oluşan 3 gruba ayrıldı. İlk 10 sıçana herhangi bir medikasyon yapılmadı. 10 adet sıçandan oluşan ikinci gruba ESWL uygulamasının ilk gününden itibaren, anjiotensin II reseptör antagonisti *Losartan*, içme suyu ile oral yoldan (20 mg/lt) verildi. 10 adet sıçandan oluşan üçüncü gruba ESWL uygulamasının ilk gününden itibaren kalsiyum kanal blokörü *Diltiazem*, intramusküler (10 mg/kg) uygulandı. Deney sırasında 4 sıçan anestezide bağlı komplikasyonlar yüzünden kaybedildi. Son ESWL seansından 1 hafta sonra yine pentobarbital anestezisi altında tüm sıçanlara sol nefrektomi uygulandı. Nefrektomi sonrası böbrekler % 10'luk formaldehit solusyonunda 24 saat bekletildi. Rutin takip işlemlerinden sonra elde edilen parafin bloklardan hazırlanan kesitler hemotoksilen-eozin ve *Transforming Growth Faktör*- β 1 primer antikorla boyandı. Dokular; fokal veya interstisyel hemoraji, subkapsüler hemoraji, tübüllerde dilatasyon ve ödem, kortikal nekroz, inflamasyon, pelvis renaliste hemoraji, periarteriyel adventisyel kanama ve gevşek bağ dokusunda erken skarlaşma ve kollojen birikimi açısından değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan dokular ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme semi-kantitatif bir yöntemle yapıldı. Dokuda TGF- β 1 düzeyi hiç izlenmediyse negatif (-) olarak değerlendirildi. Dokunun %25'den azında izlendi ise 1 pozitif (+), dokunun %25-50'sinde izlendi ise 2 pozitif (+ +), dokunun %50'sinden fazlasında izlendi ise 3 pozitif (+ + +) olarak değerlendirildi.

Verilerin analizi, Fisher'in kesin kıkare testi ile, bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

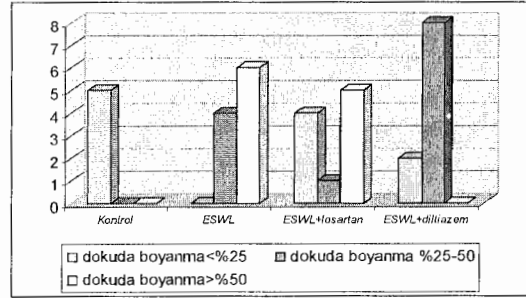
Nefrektomi için laparotomi yapıldığında, tüm metal klipslerin işaretlenmiş yerlerinde olduğu görüldü ve böbreklerin yaklaşık yarısında makroskopik olarak subkapsüler hematomla uyumlu olabilecek lezyonlar izlendi.

Bulgular değerlendirilirken böbrekler 4 gruba ayrıldı. Birinci grupta ESWL uygulanan tedavi verilmeyen böbrekler, ikinci grupta ESWL uy-

gulanımı ile birlikte losartan verilen böbrekler, üçüncü grupta ESWL uygulanımı ile birlikte diltiazem alan böbrekler, dördüncü grupta ise sham-opere böbrekler yer alıyordu. Her grupta TGF- β 1 ile dokunun boyanma düzeyleri tablo 1 ve şekil 1'de belirtilmiştir.

	Grup I Sham- opere	Grup II ESWL	Grup III ESWL+ Losartan	Grup IV ESWL+ Diltiazem
Sıçan 1	+	+++	+	++
Sıçan 2	+	++	+	+
Sıçan 3	+/-	+++	+++	++
Sıçan 4	+	++	+	++
Sıçan 5	+	+++	+++	++
Sıçan 6		++	+++	++
Sıçan 7		+++	+++	++
Sıçan 8		++	+++	+
Sıçan 9		+++	++	++
Sıçan 10		+++	+	++

Tablo 1. Gruplarda ESWL sonrası TGF- β 1 doku düzeyleri.



Şekil 1. Gruplarda ESWL sonrası TGF- β 1 doku düzeyleri.

Transforming growth faktör- β 1 düzeylerinin, ESWL uygulananlarda, ESWL işlemi sonrası diltiazem yada losartan tedavisi alan gruplara oranla belirgin olarak arttığı görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 1). Sham-opere böbreklerle, tüm ESWL uygulananlar karşılaştırıldığında, TGF- β 1 düzeyleri ESWL uygulananlarda anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($p < 0.001$).

ESWL'yi takiben diltiazem verilen grupta TGF- β 1 düzeylerinin diğer gruplara oranla daha düşük olduğu görüldü. ESWL'yi takiben diltiazem verilen grupla ESWL grubu ($p < 0.05$), ESWL'yi takiben diltiazem verilen grupla ESWL'yi takiben losartan verilen grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$). Diltiazem grubunda ESWL sonrası TGF- β 1 artışının en az olduğu görüldü. ESWL'yi takiben losartan verilen grubun doku TGF- β 1 düzeyleri, sadece ESWL uygulanan böbreklere oranla daha düşük bulundu ($p < 0.05$). ESWL

sonrası diltiazem tedavisi alan grubun TGF- β 1 düzeyleri incelendiğinde (+ + +) boyanma hiç izlenmedi.

TARTIŞMA

ESWL'ye bağlı böbrek yaralanmasını pek çok araştırmacı hayvan deneyleriyle incelemiştir. Bu çalışmaların ilki yine Chaussy tarafından yapılmış ve ESWL tedavisine bağlı renal ve perirenal patolojik değişiklikler rapor edilmiştir¹⁶.

Hill ve ark.'larının yaptığı deneysel çalışmada, ESWL uygulanan köpek böbreklerinde histopatolojik değişiklikler araştırılmıştır. ESWL sonrası akut dönemde (ilk 12 saatte) deneklerin %30'unda fokal hemoraji, %10'unda intersitisyel hemoraji, %15'inde vasküler yapılar da konjesyon ve %10'unda glomerüler konjesyon saptanmıştır. Geç dönemde (7 gün sonra) deneklerin %81'inde gevşek bağ dokusunda erken skarlaşma ve kollojen artışı tespit etmiştir¹⁷.

Morris ve ark.'ları kullandıkları enerji kaynaklarına göre lithotriptörlerin böbrekte oluşturdıkları histopatolojik değişiklikleri, sham opere grup ve birbirleriyle karşılaştırmışlardır. Yapılan deneysel çalışmada tedavi gruplarında ilk 7 gün içinde histopatolojik olarak, subkapsüler hematoma, parankimal hemoraji, intratübüler hemoraji, noktasal kortikal ve medullar nekroz odakları saptanmıştır. Kronik dönemde (7-28 gün) subkapsüler ve parankimal fibrozis gözlenmiştir. Bu akut ve kronik bulgular sham opere grupla karşılaştırdıklarında önemli istatistiksel farklılık olduğu saptanmıştır¹⁸.

Weber'in yaptığı deneysel çalışmada ESWL'nin böbrek vasküler sisteminde yaptığı yaralanma incelenmiştir. Çalışma sonucunda; %75 oranında intersitisyel hemoraji, %35 oranında subkapsüler hematoma, %25 oranında renal pelvik ekstrasvazasyon, %15 oranında peteşiyal hemoraji saptanmıştır¹⁹.

Abrahams tarafından yapılan başka bir deneysel çalışmada, ESWL'ye bağlı olarak böbrekler ve diğer organlarda oluşan histopatolojik değişiklikler araştırılmıştır. Bu çalışmada 7 ile 22 gün arasında bütün böbreklerde (%100) kortikal intersitisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, %75 oranında fibroblastik proliferasyon ve %58 oranında hemoraji ve hemosiderin içeren makrofajlar gösterilmiştir²⁰.

Çalışmamız ESWL'ye bağlı mikroskobik patolojik değişiklikler açısından incelendiğinde, fokal veya interstisyel hemoraji (%33), subkap-süler hemoraji (%36), tübüllerde dilatasyon ve ödem (%43), kortikal nekroz (%27), inflamasyon (%60) ve pelvis renaliste hemoraji (%13) görülmüştür. Bu bulgular literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. Bu bulgulara ilaveten ESWL'ye bağlı olarak meydana gelen vasküler yaralanma sonucunda etkilenen vasküler yapının distalindeki böbrek parankiminde iskemi medya-na geldiğini düşünmekteyiz.

Losartanın fibrozisi önleyici etkisi Burd-mann ve ark. tarafından deneysel olarak siklosporin-A verilen sıçanlarda interstisyel fibrozis oluşturularak araştırılmıştır. 28 günlük losartan tedavisi sonrası interstisyel fibrozis skoru 0,5 iken tedavi almayan grupta bu skor 1,3 olarak bulunmuştur²¹.

Chansel ve ark.'ları yaptıkları deneysel çalışmada böbrek mezangial hücreleri üzerine anjiotensin II ve losartanın etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda anjiotensin II'nin mezangial hücrelerdeki AT1 reseptörlerine bağlanarak biyolojik etkilerini gösterdiklerini ve mezangial hücrelerde hücre içi kalsiyum seviyesini, protein ve prostaglandin sentezini arttırdıklarını ortaya koymuşlardır. Ortaya çıkan bir başka sonuç ise, anjiotensin II'nin bu etkilerinin losartan tarafından önlenmesidir⁽²²⁾.

Çalışmamızda AT1 reseptör blokörü losartan verilen grupta, tedavi verilmeyen grup TGF- β 1 yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında losartan grubunun TGF- β 1 düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular ve literatür bilgileri ışığında losartanın anjiotensin II üzerinden gerçekleşen TGF- β 1'in aşırı salımını azalttığını söyleyebiliriz.

Yaman ve ark.'larının yaptığı deneysel çalışmada, tavşanlara 18kV şiddetinde 1000-2000 seans şok dalgası verilmiş ve bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin etkinliği ESWL grubuyla karşılaştırılmıştır. Bulgular ESWL seansından 24 saat ve 3 ay sonra MRI ve histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. İlk 24 saat içinde ESWL grubunda MRI görüntülemesi sonucu; özellikle kortikomedullar bileşkede hemoraji, parankim içinde hemoraji alanları saptanmıştır. Verapamil grubunun ilk 24 saat içindeki MRI

bulguları ise normale yakinken, ilk 24 saatte yapılan histopatolojik değerlendirmede, ESWL grubunda tübüllerde dilatasyon ve hidropik dejenerasyon, interstisyel boşlukta yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu ve eritrosit kümeleri izlenmiştir. Verapamil grubunda aynı değişiklikler oldukça düşük oranda gözlenmiştir.

3 ay sonra yapılan MRI ve histopatolojik değerlendirmede ise verapamil grubunda persiste eden histopatolojik bulgu saptamazken, ESWL grubunda tübüller ve interstisyel patolojilerin azalan şiddette devam ettiğini göstermiştir²³.

Deneysel bulgularımızı değerlendirildiğinde, diltiazem verilen grupta TGF- β 1 düzeylerinin losartan tedavisi alan ve tedavi almayan grupların altında kaldığı ortaya çıkmıştır. Bu durumu losartan sadece anjiotensin II üzerinden gelişen fibrozisi önlerken, diltiazem anjiotensin II ve diğer sitokinlerin mezangial hücreler üzerinde yaptığı stimülasyonu L-tipi kalsiyum kanalları aracılığı ile önleyerek daha geniş spektrumda inhibisyon yapmasına yorumlayabiliriz.

Bu histopatolojik bulgular özellikle, soliter böbrekli, bozulmuş renal fonksiyonlu, tedavisinde sıklıkla ESWL yöntemi tercih edilen üriner sistem taş hastalığı olgularında ve pediatrik yaş grubunda daha da önemlidir.

Sonuç olarak, üriner taş hastalığı tedavisinde kullanılan ESWL'ye bağlı olarak gelişen tübülointerstisyel fibrozisin önlenmesinde anjiotensin II veya kalsiyum kanal blokajının faydalı bir farmakoterapi olabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- 1- **Jaeger P, Redha F, Ulschmid G and Hauri D:** Morphologic changes in canine kidney following extracorporeal shock wave treatment. Urol. Res. 16: 161, 1988
- 2- **Roberts AB:** Molecular and cell Biology of TGF- β . Miner. Electrolyte Metab. 24:2 111, 1998.
- 3- **Shankland SJ, Johnson RJ:** TGF- β in glomerular disease. Miner. Electrolyte Metab. 24: 2 168, 1998
- 4- **Frishberg Y, Kelly CJ:** TGF- β and regulation of interstitial nephritis. Miner. Electrolyte Metab. 24: 2, 181, 1998
- 5- **Roberts AB, McCune BK, Sporn MB:** TGF- β : Regulation of extracellular matrix. Kidney Int. 41: 557, 1992 .

- 6- **Roberts AB, Sporn MB:** TGF- β Adv. Cancer Res. 51: 107, 1988
- 7- **Peters H, Border WA and Noble NA:** Targeting TGF- β overexpression in renal disease: Maximizing the antifibrotic action of anjiotensin II blockade. Kidney Int. 54: 1570,1998
- 8- **Bornstein P, Sage H:** Regulation of collagen gen expression. Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 37: 67, 1989
- 9- **Dean DC, Newby RF, Bourgeois S:** Regulation of fibronectin biosynthesis by dexamethasone, TGF- β and cAMP in human cell lines. J.Cell Biol. 106: 2159, 1988
- 10- **Wolf G:** Link between anjiotensin II and TGF- β in kidney. Miner Electrolyte Metab. 24: 2-3 174, 1998
- 11- **Ketteler M, Noble NA, Border WA:** Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.3: 446, 1994
- 12- **Wayne A, Border MD:** Transforming growth factor-beta and pathogenesis of glomerular disease. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.3: 54, 1994
- 13- **Ling H, Vamvakas S, Scheafer L, Schnittler HJ, Scheafer RM, Heidland A:** Anjiotensin -II-induced cell hypertrophy: Potential role of impaired proteolytic activity in cultured LLC-PK1 cells. Nephrol. Dial. Transplant. 10: 1305, 1995
- 14- **Kontogiannis J and Burns KD:** Role of AT-1 anjiotensin II reseptors in renal ischemic injury. Am.J.Physiol. 274: 79, 1998
- 15- **Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE and Schambelan M:** Distribution of anjiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. Am.J.Physiol. 262: 236, 1992
- 16- **Chaussy C, Brendel H, Schmiedt E, Jocham D and Yiedl B:** Extracorporeal shock wave lithotripsy for treatment of urolithiasis. Urology. 23: 59, 1984
- 17- **Hill DE, McDougal WS, Stephens H, Fogo A and Koch MO:** Physiologic and pathologic alterations assaciated with ultrasoically generated shock waves. J.Urol.144: 1531, 1990
- 18- **Morris JS, Husmann DA, Wilson J et. al:** A comparison of renal damage induced by varying modes of shock wave generation. J.Urol. 145: 864, 1991
- 19- **Weber C, Moran ME, Braun EJ and Drach GW:** Injury of rat renal vessels following extracorporeal shock wave treatment. J.Urol. 147: 476, 1992
- 20- **Abrahams C, Stewart L and Ross L:** Pathologic changes in the kidneys and other organs of dogs undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy with a tubeless lithotripter. J.Urol. 140: 391, 1988
- 21- **Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA et al:** Prevention of experimental cycloporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. Am.J.Physiol. 269: 491, 1995
- 22- **Chansel D, Bizet T, Vandermeersch S, Pham P, Levy B et al:** Differential regulation of anjiotensin II and losartan binding sites in glomeruli and mesangial cells. Am.J.Physiol. 266:393,1994
- 23- **Yaman Ö, Sarıca K, Özer G, Soygür T, Kutsal O et al:** Protective effect of verapamil on renal tissue during shock wave application in rabbit model. J.Endourol. 10:329, 1996.