

Diyabetik sıçan overlerindeki glikoz hasarı ve NF-kappa B yolunun etkisi

Glucose injury in diabetic rats' ovaries and effect of NF-kappa B way

Pala H G¹ Erbaş O² Oltulu F³ Pala E E⁴ Aktuğ H³ Yavaşoğlu A³¹Erata Kadın Hastalıkları ve Doğum - Perinatoloji Merkezi, İzmir, Türkiye²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye⁴Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, İzmir, Türkiye**Özet**

Amaç: Bu çalışmada, sıçan modellerinde glikoz toksisitesinin overdeki hasarlanma şiddeti ve bu hasarın NF-kappa B üzerinden etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Yedi adet sıçanda deneysel olarak diyabetes mellitus modeli oluşturuldu. Yedi adet kan glikoz seviyesi normal olan sıçan kontrol grubu olarak alındı. Sekiz hafta sonra over dokuları çıkarılıp histolojik olarak incelendi. Grupların özellikleri, tek yönlü ANOVA ve Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Diyabetik sıçanların over dokusunda, kontrol grubu normal sıçanlarla karşılaştırıldığında; foliküler dejenerasyon, stromal dejenerasyon, stromal fibrozis ve NF-kappa B immunoekspresyonunun anlamlı olarak arttığı tespit edildi (p=0,0001).

Sonuç: Çalışmamız glikoz toksisitesinin overde şiddetli olarak gerçekleştiğini ve bu hasarın NF-kappa B üzerinden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle NF-kappa B inhibitörleri diyabete bağlı gelişen doku hasarını önlenmesinde ümit verici olmaya devam etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Diyabetes mellitus, prematür over yetmezliği, ileri glikasyon ürünleri, ileri glikasyon ürün reseptörleri, NF-kappa B.

Summary

Aim: To investigate glucose toxicity for ovarian damage severity and the effect of these by NF-kappa B way in rat models.

Materials and Methods: An experimental diabetes mellitus model was created in seven rats. All seven rats, whose blood glucose levels were normal, were included in the control group. After eight weeks; bilateral oophorectomy was performed and the ovaries were researched histologically. The group characteristics were compared by one-way ANOVA and Mann Whitney U test. p values less than 0.05 were accepted as significant.

Results: There was a significant increase of follicular degeneration, stromal degeneration, stromal fibrosis and NF-kappa B immune-expression in diabetic rats' ovary when compared to the control group of normal rats (p=0,0001).

Conclusion: Our study shows that glucose toxicity occurred severely in the ovaries and this injury originated in the NF-kappa B way in diabetes mellitus. Therefore, NF-kappa B inhibitors continue to be promising in preventing diabetic related tissue injury.

Key Words: Diabetes mellitus, premature ovarian failure, advanced glycation end products, receptor of advanced glycation end products, NF-kappa B.

Yazışma Adresi: Halil Gürsoy PALA

Erata Kadın Hastalıkları ve Doğum - Perinatoloji Merkezi, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 14.12.2012 Kabul Tarihi: 28.12.2012

Giriş

Diyabetes mellitus, hiperglisemi ile karakterize, insülin aktivitesinin mutlak veya rölatif kaybı ile gidebilen ve son organlarda kendine özgü patolojiler yaratabilen bir hastalıktır. Hiperglisemi, doku hasarını 5 major mekanizma ile gerçekleştirir. Bunlar; poliol yolu üzerinden glikoz ve diğer şekerlerin artmış çözülmesi, ileri glikasyon ürünlerinin (AGE - *advanced glycation end products*) intrasellüler artışı, AGE ve onun aktive ligandları için artmış reseptör ekspresyonu, protein kinaz-C izoformlarının aktivasyonu ve heksozamin yolunun aşırı aktivasyonudur (1). Bu 5 mekanizma sadece mitokondrial aşırı yüklenme ve buna bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri ile açıklanmaktadır (2).

Hiperglisemiye bağlı oluşan ileri glikasyon ürünleri, hücre yüzeyindeki reseptörüne (RAGE - *receptor of advanced glycation end products*) bağlanarak etki etmektedir. RAGE; kromozom 6 üzerinde Major Histokompatibilite Kompleksi-III (MHC Class-III) bölgesinde kodlanmış immunglobulin ailesi üyesi bir reseptör kompleksidir (3,4). RAGE, nükleer faktör-kappa B (NF-kappa B) yolunu kullanarak gen ekspresyonunda yaptığı patolojik değişikliklerle organ hasarı oluşturabilmektedir(5). NF-kappa B yolunun aktivasyonu Anjiyotensin-2 artışına ve TGF-beta ve inflamatuvar sitokin (TNF, IL-1 gibi) salınımına sebep olmaktadır (6). TGF-beta dokularda fibrozisi tetikleyerek ekstrasellüler matrikste artışa neden olmaktadır (7). Diyabetik nefropati, nöropati ve kardiyovasküler değişikliklerde NF-kappa B bağlı hasarlanma literatürde iyi tanınmakla birlikte (8-10); diyabetin oluşturduğu over hasarı mekanizması net değildir.

Çalışmamızın amacı, sıçan modellerinde glikoz toksisitesinin overdeki hasarlanma şiddetini ve bu hasarın NF-kappa B üzerinden etkilerinin olup olmadığını göstermektir.

Gereç ve Yöntem

Deney hayvanları

Çalışmaya 14 adet 200-220 gr ağırlığında 12-16 haftalık dişi *Sprague Dawley* sıçan alındı. Tüm sıçanlar *ad-libitum* beslenme şartlarında, oda sıcaklığı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve neminde, 12 saatlik aydınlık / karanlık siklusu oluşturularak kafeslerde barındırıldı. Deneysel işlemler, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınan etik kurul onayı ile yürütüldü.

Deneysel işlemler

7 adet Sprague-Dawley dişi sıçana diyabetes mellitus oluşturmak için, 60 mg/kg dozunda STZ (Sigma-Aldrich), 0.1 mmol Na-sitrat tampon içinde (pH 4.5) çözülerek intraperitoneal yolla uygulandı. Diyabet gelişimini kontrol etmek için STZ uygulamasında 48 saat sonra kuyruktan

“stick” aracılıklı (Plusmed®) kan glikozu ölçüldü. 260 mg/dL (14.4 mmol/L) ve üzerinde kan glikozuna sahip olan sıçanlar diyabet olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi. 7 sıçan normal kontrol grubu olarak çalışmaya alındı ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Kontrol grubu sıçanlarda kuyruktan “stick” aracılıklı bakılan kan glikozları 120 mg/dL altında olarak tespit edildi. 8 hafta beklenen sıçanlar perfüze edilip over dokusu çıkarıldı ve histolojik olarak incelendi.

Histolojik İnceleme

Histolojik ve immunhistokimyasal incelemeler için, tüm sıçanlara ketamin (40 mg/kg, Alfamine®, Ege Vet, Alfasan International B.V. Holland) ve xylazine hydrochloric (4 mg/kg, Alfazyme®, Ege Vet, Alfasan International B.V., Holland) ile anestezisi intraperitoneal olarak uygulandı. Batın açılarak overler çıkarılıp %4 formol ile fikse edildi. Takip işlemlerinden sonra 5 µm'lik kesitler alındı, sonrasında hematoksilin & eosin (H&E) ve NF-kappa B (Bioss, Inc.; 1/100) ekspresyonu için immunohistokimyasal boyama yapıldı. Olympus BX51 mikroskobu ve mikroskoba implante Olympus C-5050 dijital kamera kullanılarak fotoğraflar çekildi. Değerlendirme ve skorlama 2 histolog tarafından, ardışık olmayan rastgele seçilmiş ortalama on iki histolojik kesitten yapıldı.

Foliküler dejenerasyon, stromal dejenerasyon ve stromal fibrozis parameterlerinin her biri için ayrı ayrı skorlama yapıldı. Her parametrenin şiddeti göz önüne alınarak 0'dan 3'e puan verilerek skorlama sistemi oluşturuldu. Overin tamamı değerlendirildiğinde söz edilen parametreler % 33 altında ise 1, %33 - %66 arasında ise 2, %66 üzerinde ise 3 puan verilerek hesaplama yapıldı.

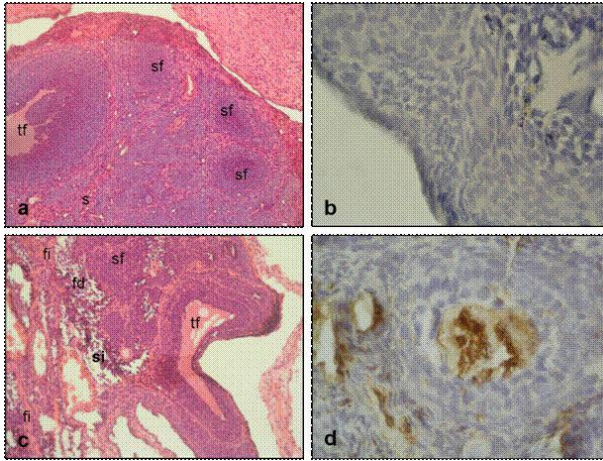
İmmunohistokimyasal değerlendirme X 100 büyütmede yapıldı ve pozitif reaksiyon veren hücreler yüzde (%) olarak hesaplandı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel açıdan verilerin değerlendirilmesinde *SPSS for Windows 15.0* istatistik paket programı kullanıldı. Grupların değişkenlerinin parametrik özelliklerinin karşılaştırmasında tek yönlü ANOVA, grupların parametrik olmayan özelliklerinin karşılaştırmasında ise *Mann Whitney U* testi uygulandı.

Bulgular

Diyabetik sıçanların over dokusunda, kontrol grubu normal sıçanlarla karşılaştırıldığında; foliküler dejenerasyon, stromal dejenerasyon, stromal fibrozis ve NF-kappa B immunoekspresyonunun anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p=0,0001$). Diyabetik sıçanlarda overin morfolojik yapısı bozulduğu ve stromal inflamasyon olduğu gözlemlendi. Resim-1'de kontrol grubu ve diyabetik sıçanların over dokuları ve NF-kappa B ekspresyonu gösterildi.

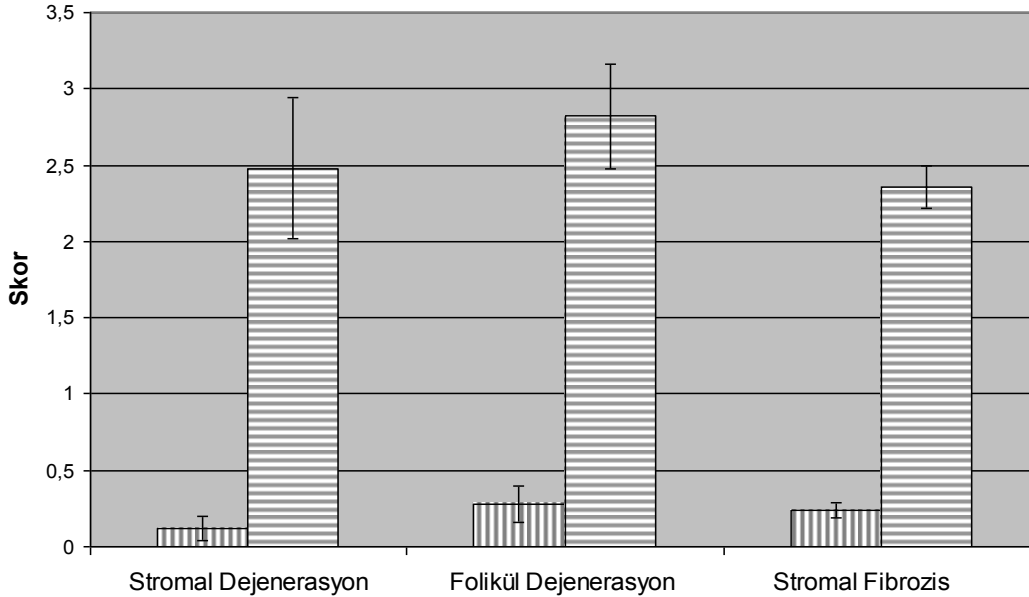


Şekil-1. Kontrol grubu ve diyabetik sıçanların over dokuları ve NF-kappa B ekspresyonlarının karşılaştırılması.

- a- Kontrol grubu normal over dokusu (H&E) (tf: tersiyer folikül, sf: sekonder folikül, s: stroma) X 20
b- Kontrol grubu normal over dokusu NF-kappa B ekspresyonu
c- Diyabetik sıçan over dokusu (H&E) (tf: tersiyer folikül, sf: sekonder folikül, fi: stromal fibrozis, fd: folikül dejenerasyonu, si: stromal inflamasyon)
d- Diyabetik sıçan over dokusu NF-kappa B ekspresyonu (oosit, stromal hücre ve perivasküler alanda)

Kontrol grubunda normal over dokusundaki stromal dejenerasyon skoru 0.12 ± 0.08 olarak tespit edilmişken; bu skor diyabetik sıçanlarda 2.48 ± 0.46 tespit edilip anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0001$). Folikül Dejenerasyon Skoru ise; kontrol grubunda 0.28 ± 0.12 olarak izlenirken, yine diyabetik sıçanlarda 2.82 ± 0.34 tespit edilip anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0001$). Stromal Fibrozis Skoru; kontrol grubunda 0.24 ± 0.05 iken, diyabetik sıçanlarda 2.36 ± 0.14 olarak gözlenip yine anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0001$). Son olarak NF-kappa B immunoekspresyonu yüzdesi (%) hesaplandı. Bu oran kontrol grubu normal over dokusunda 5.6 ± 2.14 iken, diyabetik sıçanlarda 43.21 ± 4.58 olarak tespit edildi. Bu artış da istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Bu bulgular Tablo-1 ve 2'de özetlendi.

Tablo-1. Kontrol grubu normal over dokusu ile diyabetik sıçanlardaki over dokusunun stromal dejenerasyon, folikül dejenerasyonu ve stromal fibrozis skorlarının karşılaştırılması.



	Stromal Dejenerasyon Skoru	Folikül Dejenerasyon Skoru	Stromal Fibrozis Skoru	NF-kappa B Immunoekspresyonu Yüzdesi (%)
Normal kontrol	0.12 ± 0.08	0.28 ± 0.12	0.24 ± 0.05	5.6 ± 2.14
Diyabetik sıçan	2.48 ± 0.46 *	2.82 ± 0.34 **	2.36 ± 0.14 ***	43.21 ± 4.58 ****

*Normal kontrol ve Diyabetik sıçan, Stromal Dejenerasyon, $p=0.0001$

**Normal kontrol ve Diyabetik sıçan, Folikül Dejenerasyon, $p=0.0001$

***Normal kontrol ve Diyabetik sıçan, Stromal Fibrozis, $p=0.0001$

****Normal kontrol ve Diyabetik sıçan, NF-kappa B Immunoekspresyonu, $p=0.0001$

Tartışma

Yaşam kalitesine olan olumsuz etkileriyle birlikte, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip diyabet hastalığı ve komplikasyonlarının patogenezi için yapılan çalışmalarda hayvan modelleri yaygın biçimde kullanılmaktadır. Deneysel hayvan modelleri; patolojiye genetik olarak uygun türlerin seçilebilmesine, istenilen sayıda örneklerle çalışılabilmesine ve değişkenlerin kontrol altında tutulmasına, fazla sayıda risk ve patolojinin bir arada çalışılabilmesine; tanısal, koruyucu veya tedavi edici yaklaşımların denenmesine olanak vermektedir. Bununla birlikte hayvanlarda oluşturulan diyabet modellerinin hiçbirisi insan diyabetine tam olarak eşdeğer tutulamayacağını unutmamak gerekir.

Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (11). Proteinler diyabette olduğu gibi yüksek glikoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glikoz bir enzimin aracılığına gereksinimi olmadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış bu proteinler, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (12). Glikoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazlarını, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünlerini oluşturur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ise AGE meydana gelir (13). AGE'ler, endotelin aracılığıyla vazokonstriksiyon nedeniyle endotel hasarına yol açabildiği gibi, daha kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Yine AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta NF-kappa B gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin, adhezyon molekülü, VCAM-1 gibi) ekspresyonlarının artışı da bulunmaktadır (14). Çalışmalar; AGE'lerin, reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra, artmış serbest radikallerinin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (15). Yapılan çalışmalarda AGE'nin, protein kinaz-C'yi aktive ettiği ve aktive olan protein kinaz-C'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogeneziinde rol aldığı öne sürülmektedir (16).

AGE'ler temelde diyabet komplikasyonlarında iki şekilde rol almaktadır. Bunlardan birincisi; özellikle ekstrasellüler matriksin yapısındaki proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak matriks yapısını ve fonksiyonlarını bozması, ikincisi ise; AGE'lerin bazı hücrelerde bulunan reseptörlerine (RAGE) bağlanması sonucunda çeşitli sinyal yollarını aktive ederek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve sitokinlerin sentezine ve salınımına yol açmasıyla pek çok metabolik değişikliklere neden olmasıdır (5). RAGE ekspresyonu, diyabet ile birlikte inflamasyonda da artar (17). AGE'nin RAGE'ye bağlanması ile hücre içi sinyal yollarını uyarması NF-kappa B'yi aktive eder. NF-kappa B'nin aktivasyonu ise inflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin ve çeşitli mediyatörlerin ekspresyonunu sağlar (18). NF-kappa B inhibitörleri diyabete bağlı gelişen organ hasarını önlenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (19).

Prematür over yetmezliği (POF); kromozom anomalileri, otoimmün ve endokrinolojik hastalıklar, enfeksiyon, radyasyon, kemoterapi neden ile hızlanmış atrezi ile gelişebilir. 30 yaş altındaki insidansı %0.1 olarak gösterilmiştir (20). Bu olguların %40'ında tiroid, paratiroid, sürrenal ve diyabet gibi endokrin hastalıklar görülebilmektedir. Bu olgularda otoimmün nedenler sıklıkla suçlanmaktayken, galaktozemi gibi karbonhidrat metabolizmasındaki değişiklikler de yetmezliğe yol açabilmektedir (21). Diyabetes Mellitus'un diğer spesifik organlardaki hasar mekanizması hakkında literatürde pek çok çalışma mevcut olup; over hasarı mekanizması hala net değildir. Çalışmamızda oluşturduğumuz modelde; hem folikül dejenerasyonu, hem stromal dejenerasyonun diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte yine diyabetik sıçanların overlerinde artmış NF-kappa B ekspresyonu olduğunu gözledik. Stromal fibrozis'in de diyabetik sıçanlarda daha yüksek olarak belirlenmesi ile, AGE'nin NF-kappa B üzerinden overdeki hasarda rol oynadığını göstermiş olduk.

Çalışmamız glikoz toksisitesinin overde şiddetli olarak gerçekleştiğini ve bu hasarın NF-kappa B üzerinden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle NF-kappa B inhibitörleri diyabete bağlı gelişen organ hasarını önlenmesinde ümit verici olmaya devam etmektedir. Bu kapsam over hasarının önlenmesi amacıyla özellikle prematür over yetmezliği gelişebilecek genç diyabetik hastalar için de genişletilebilir. Bu alanda daha büyük çapta klinik çalışmalara ve yeni ajan çalışmalarına ihtiyaç olduğu aşikardır.

Kaynaklar

1. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107(9):1058-70.
2. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: An unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-25.
3. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of Disease: Advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(5):285-93.
4. Herold K, Moser B, Chen Y, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: Inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol* 2007;82(2):204-12.
5. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114(6):597-605.
6. Yao D, Taguchi T, Matsumura T, et al. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *J Biol Chem* 2007;282(42):31038-45.
7. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101(1):160-9.
8. Queisser MA, Yao D, Geisler S, et al. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 2010;59(3):670-8.
9. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;106(4):571-8.
10. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007;117(5):1249-59.
11. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992;50(5):335-9.
12. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1988;14(1):1114-20.
13. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002;51(10):1360-2.
14. Eidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001;38 (4):100-6.
15. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;97(6):1422-8.
16. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001;18(12):945-59.
17. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54(7):405-19.
18. Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 2005;38(2):103-15.
19. Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR, Tunez I. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* 2005;38(5):539-44.
20. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986;67(4):604-6.
21. Sinha P, Kuruba N. Premature ovarian failure. *J Obstet Gynaecol* 2007;27(1):16-9.