

Sağlıklı ve Diabet Oluşturulmuş Farelerin Böbrek Dokusunda Katalaz Enziminin RT-PCR ile Gen ve İmmunohistokimyasal Olarak Protein Ekspresyonu ^{[1][2]}

Seyit Ali BİNGÖL *  Hakan KOCAMIŞ **

[1] Doktora tezinden özetlenmiştir

[2] KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2007-VF-13)

* Kafkas Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, TR-36100, Kars - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-36100, Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-1766

Özet

Bu çalışma; deneysel Diabetes Mellitus (DM) oluşturulan farelerin böbrek dokusundaki katalaz enzimi (CAT) gen ekspresyonu düzeyinin, bu enzimin dokudaki lokalizasyonunun ve diabetli hayvanların böbrek dokusunda oluşan histolojik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada kullanılan 36 adet Swiss albino fare, deneme (n=15), sham (n=15) ve kontrol (n=6) gruplarına ayrıldı. Deneme grubuna, 100 mg/kg dozda Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (İP) yolla uygulandı. Deneme grubunda kan glikoz düzeyi 200 mg/dl'nin üzerinde olan fareler diabetik kabul edilerek çalışmaya alındı. CAT mRNA ekspresyon düzeyi Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), bu enzimin böbrek dokusundaki lokalizasyonu ise immunohistokimyasal yöntemle belirlendi. CAT gen ekspresyonu ve enzimatik aktivitesinin deneme grubunda sham ve kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Deneme grubu dışındaki grupların böbrek korteksinde güçlü CAT immunohistokimyasal reaktivitesi tespit edildi. Diabetik böbreklerin tubulus proksimalislerinde glikojen düzeyinin azaldığı ve özellikle tubulus distalislerde hidropik dejenerasyon dikkati çekti. Bu çalışmanın sonuçları, şeker hastalığı ile antioksidanlar arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için yapılacak olan ileri düzeyde tekniklerin kullanıldığı çalışmalara ışık tutabilir.

Anahtar sözcükler: *Diabetes mellitus, Katalaz, RT-PCR, İmmunohistokimya, Böbrek*

The Gene Expression Profile by RT-PCR and Immunohistochemical Expression Pattern of Catalase in the Kidney Tissue of Both Healthy and Diabetic Mice

Summary

The aim of this study was to determine the gene expression pattern of catalase by RT-PCR technique, its tissue localization by immunohistochemistry method and the histological changes of DM kidney by routine histological techniques. In this study, 36 swiss albino mice were used and the animals were allocated into 3 groups as experimental (n=15), sham (n=15) and control (n=6) were used. STZ (100 mg/kg) was applied intraperitoneally (IP) to experimental group. Mice in which blood glucose level were above 200 mg/dl were included into DM group and considered as experimental group for the present study. Catalase gene expression level was determined by means of RT-PCR. Tissue localization of catalase enzyme was analysed by immunohistochemical method. Gene expression and enzyme activity of catalase from experimental group were found to be lower than those of the sham and control groups ($P<0.05$). Catalase staining was mainly observed in the renal cortex of all groups, whereas its reaction was relatively weaker in DM group than that of the other groups. Glycogen level was decreased in the proximal tubuls and hydropic degeneration was found especially in distal tubuls of the diabetic kidney. Result of the present study might make a contribution to future studies in the field of DM aiming to establish a better understanding of the relationship between antioxidants and DM.

Keywords: *Diabetes mellitus, Catalase, RT-PCR, Immunohistochemistry, Kidney*



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426807



seyitali@kafkas.edu.tr

GİRİŞ

Günümüzde dünyada 250 milyon, ülkemizde ise 5 milyon insanın diabet hastası olduğu tahmin edilmektedir. Gerek değişik etkenlerle kendiliğinden oluşan gerekse deneysel olarak oluşturulan DM hastalığında göz, böbrek, sinir ve arterlerde birçok bozukluk meydana gelmektedir ^{1,2}. Pek çok deneysel diabet oluşturma yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte bu çalışmada, karbonhidrat metabolizmasını etkileyerek glikojen sentezi ve glikoliziste azalmaya, glikoneogeneze ise artışa neden olan ve yan etkileri düşük diabetojenik bir kimyasal olan streptozotosin (STZ) ile deneysel diabet oluşturulması yöntemi tercih edilmiştir ^{3,4}.

Streptomyces achromogenes'ten izole edilen STZ ⁵⁻⁷, N-Asetil-β-D-glukozaminidaz enzimini inhibe ederek pankreas β-hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır ⁸. Pankreas β-hücrelerinin yıkımında lokal serbest radikallerin de rol aldığı ileri sürülmüştür ^{9,10}. Aerobik canlılarda, serbest radikallerin oluşumuyla birlikte antioksidan savunma da gelişmiştir ¹¹. Bu nedenle, organizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların ortadan kaldırılması arasında oksidatif denge bulunmaktadır. Oksidatif denge bozulduğunda ise doku hasarı meydana gelmektedir ¹². Antioksidan sistemin görevi, hücrelerde oluşan zararlı oksijen moleküllerini etkisiz hale getirmektir ^{13,14}. En yaygın olarak bilinen antioksidan enzimlerden olan katalaz (CAT) ilk defa Sumner ve Dounce ¹⁵ tarafından 1937 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir. Bu enzim, yaygın olarak ökaryotlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır ¹⁶. Değişik canlı familyalarından 74 türün CAT geni karşılaştırıldığında insan, sığır, fare ve ratlara ait CAT'ın hem baz dizilimi hem de amino asit dizilimi bakımından diğer 70 türe nazaran birbirine daha yakın olduğu bildirilmiştir ¹⁷. Dokulardaki CAT enzimi aktivitesi büyük değişiklikler göstermektedir. Karaciğer ve böbrek dokularında aktivitesi yüksek olan enzimin bağ dokusundaki aktivitesi oldukça düşüktür ¹⁸.

Literatürde deneysel diabette, böbrek dokusunda CAT enzimi ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte deneysel diabette böbrek dokusunda CAT enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca, aynı dokuda CAT geni ekspresyonu, CAT lokalizasyonu ve CAT enzimi aktivitesi ve histolojik değişikliklerin hepsini içeren bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda; STZ ile deneysel diabet oluşturulan farelerin böbrek dokusunda RT-PCR yöntemiyle CAT gen ekspresyonunun, immunohistokimyasal yöntemle CAT enzimi lokalizasyonunun, dokudaki histolojik değişikliklerin ve CAT enzim aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Deneysel uygulamalar, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirildi (Karar no: 04.04.2007/12).

Deney Hayvanları: Çalışmada kullanılan deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Ortalama 8-12 haftalık 36 adet yeni nesil dişi Swiss albino fare, adaptasyon amacıyla 1 hafta boyunca standart fare yemi ile beslendi ve su alımı serbest bırakıldı. Daha sonra deneme (n=15), sham (n=15) ve kontrol (n=6) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Deney hayvanları, standart fare kafeslerinde, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık, yaklaşık 22±2°C sıcaklık ve ortalama %50±5 nispi nem oranı olan standart bir ortamda tutuldu. Deneme grubuna, Nasitrat tamponunda çözödürülen STZ (Sigma, St Louis, MO, USA) 100 mg/kg dozunda İP yolla, sham grubuna Nasitrat tamponu İP olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmadı. Deneysel uygulamanın başlangıcıyla, 3, 7, 15, 21 ve 30. günlerinde sabah saatlerinde, 8 saatlik açlık sonrası fareler hareket edemeyecekleri ve darası alınmış bir kap içerisine konularak hassas dijital terazide canlı ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra gözün retroorbital sinüslerinden kan alındı. Dijital Accu-Chek-Go (Roche, Switzerland) el glukometresi ile farelerin kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Çalışmanın 3. gününde kan glikoz değerleri 200 mg/dl'den yüksek olan ¹⁹ fareler deneme grubuna dahil edildi.

Dokuların Alınması: Farelerden çalışmanın 3, 15 ve 30. günlerinde sabah saatlerinde, açlık sonrası kan glikoz değerleri ve canlı ağırlıkları ölçüldükten sonra eter anestezi altında servikal dislokasyon ile ötenazi edilerek böbrek dokusu alındı. Alınan böbrekler sol ve sağ olarak hassas terazide tartıldı. Böbrek ağırlığı, canlı ağırlık ile normalize edildikten [(böbrek ağırlığı/canlı ağırlık)*1000] ²⁰ sonra istatistiksel analizlerde kullanıldı. Sağ böbrekler, histolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere Bouin solüsyonunda tespit edildi. Sol böbrek dokuları ise genetik ve biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Gen ekspresyonu analizlerinde kullanılacak böbrek dokusu, TRI-Reagent (Sigma, St Louis, MO, USA) içine alınarak homojenize edildikten sonra +4°C'de tutuldu. Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan böbrek dokuları, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra analizin yapılacağı güne kadar -20°C'de muhafaza edildi.

RT-PCR: Total RNA, Chomczynski ve Sacchi ²¹ tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/phenol-kloform metodunun modifikasyonu sonucu oluşan TRI-Reagent (Sigma, St Louis, MO, USA) kullanılarak elde edildi. Bir mikrolitredeki RNA miktarı 260 nm dalga boyunda

spektrofotometreyle ölçüldü. RNA bütünlüğü ise %1'lik agaroz jelde gözlemlendi. Toplam mRNA'lar Oligo dT primerleri (Promega Co Madison WI, USA) kullanılarak izole edildi. Bu primerin çalıştığı en ideal sıcaklık 70°C'dir. Elde edilen mRNA'lardan cDNA sentezi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi: Önce, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV RT) enzimini ihtiva eden master karışım hazırlandı. Bu karışımın her 25 µl'sinde 8 µl MMLV enzim buffer, 8 µl dNTP (Promega Co Madison WI, USA), 1 µl rRNA sin (Promega Co Madison WI, USA), 1.6 µl MMLV-RT enzimi (Promega Co Madison WI, USA), 6.4 µl NF su bulunmaktadır. mRNA içeren ependorf tüplerin her birine laminar flow hood içerisinde 25 µl MMLV RT master karışımı eklendi ve karışım 37°C'de 1 saat, 95°C'de 5 dak. ve 4°C'de 5 dak. tutuldu. Kontrol için kullanılan β-aktin geni forward primer dizilimi, 5' TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT' 3 ve reverse primer dizilimi, 5'CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG' 3'tür ^{22,23}. CAT için forward primer dizilimi, 5' GCA GAT ACC TGT GAA CTG TC' 3 ve reverse primer dizilimi, 5'GTA GAA TGT CCG CAC CTG AG'3'tür ²⁴. Primerler ve taq karışımı (5 µl taq buffer, 1 µl dNTP, 1 µl forward primer, 1 µl revers primer, 1 µl taq enzimi (Promega Co. Madison WI, USA), 41 µl NF su) hazırlandıktan sonra 2 µl'lik cDNA içeren tüplere 50 µl taq karışımı eklendi ve DNA çoğaltma işlemi için son karışım 94°C'de 1 dak., 50°C'de 1 dak., 72°C'de 1.5 dak. sıcaklık ve verilen sürelerde 30 siklus tamamlanana kadar bekletildi ve 72°C'de 10 dak. tutulduktan sonra 4°C'de bırakıldı. Agaroz jel (%1.5'luk) hazırlanarak jel elektroforezde (1 saat 15 dak., 100 V) RT-PCR son ürünleri incelendi. Elde edilen jel ürünü kapalı UV ortamında fotoğrafları çekilerek değerlendirme ve istatistik için bilgisayara kaydedildi. Jeldeki bantların dansitometrik ölçümleri Kodak ID programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Histolojik İnceleme ve İmmunohistokimya: Doku örnekleri alındıktan sonra bekletilmeden Bouin solusyonunda tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafine bloklandı. Parafin bloklardan 6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksin Eosin (HE) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı ²⁵.

CAT'ın böbrek dokusundaki lokalizasyonunu incelemek için kesitler oda sıcaklığında 1 saat süreyle 1:3 000 oranında dilue edilmiş anti-CAT (Abcam, Cambridge MA, USA) ile inkübe edildi. Fosfat buffer salinde (PBS) yıkandıktan (3x5 dak.) sonra indirekt yöntemlerden biri olan Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği ²⁶ uygulandı. Zıt boyama için hematoksin kullanıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (BX-051 Olympus) incelenerek fotoğrafları çekildi. Hücrelerdeki CAT immuno-reaktivitesi, boyanma şiddetine göre, birbiriyle mukayese edilerek belirlendi (çok yoğun: +3, orta derecede yoğun: +2, az yoğun: +1 ve reaksiyon yok: 0). CAT immuno-reaktivitesinin spesifik olup olmadığını tespit etmek amacıyla, primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) PBS'de tutulan kesitlere diğer işlemler aynen uygulandı.

Katalaz Enzimi Aktivitesi: Böbrek dokusundaki CAT aktivitesi ölçümü, Aebi ²⁷ metodu ile yapıldı. Bu metodun ölçüm prensibi, doku homojenatında bulunan CAT enziminin dışarıdan eklenen H₂O₂'yi parçalaması ile 240 nm'de H₂O₂'nin absorbansının zamana bağlı olarak azalmasının belli aralıklarla ölçülmesi esasına dayanır. Ölçümler 15 sn'lik aralıklarla 90 sn boyunca yapıldı. İstatistik hesaplaması için absorbans azalmasının en fazla olduğu aralıktaki değerler kullanıldı.

İstatistiksel Analizler: İstatistik analizler için SPSS 12.0 programı kullanıldı ²⁸. Olası farklılıklar, student's t-test ve ANOVA testleri kullanılarak tespit edildi. İstatistik analizler sırasında güven aralığı 0.05 olarak belirlendi.

BULGULAR

Canlı Ağırlık Bulguları: Deneme grubu içinde günlere göre istatistiksel olarak canlı ağırlık bakımından karşılaştırma yapıldığında, her günün bir önceki örnekleme gününe göre olmasa da birkaç gün öncesine göre ağırlık kaybettiği tespit edildi (P<0.05), (Tablo 1). Sham ve kontrol gruplarında, grup içinde günlere göre canlı ağırlık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Böbrek Ağırlığı Bulguları: Deneme grubu böbrek ağırlığının, sham ve kontrol grupları böbrek ağırlıklarının

Tablo 1. Deneme grubu içinde günlere göre canlı ağırlık karşılaştırması

Table 1. The comparison of body weight changes in the experimental group through the study

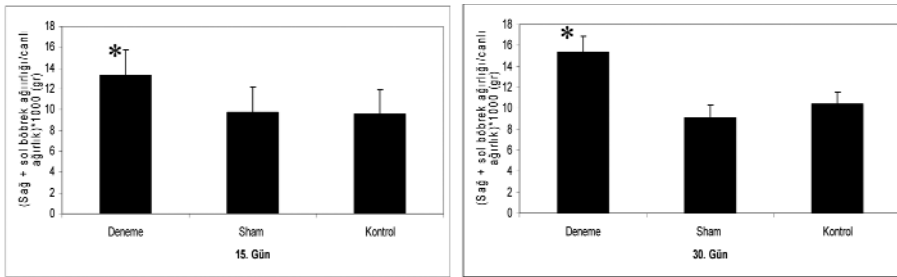
Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	SD	F	Anlamlı Fark
0. gün	15	41.02	4.536		7. gün, 15. gün, 21. gün, 30. gün
3. gün	15	38.63	4.644		15. gün, 21. gün, 30. gün
7. gün	10	33.85	3.733		0. gün
15. gün	10	30.10	3.648	15.350 *	0. gün, 3. gün
21. gün	5	28.98	3.643		0. gün, 3. gün
30. gün	5	29.18	3.583		0. gün, 3. gün

* P < 0.05. (SD= Standart sapma, F= F değeri)

dan istatistiksel olarak 15 ve 30. günlerde daha fazla olduğu gözlemlendi ($P<0.05$), (Şekil 1). Sham ve kontrol gruplarının istatistiksel olarak ortalama böbrek ağırlığı bakımından benzer düzeyde olduğu tespit edildi. Deneme grubu içinde günlere göre böbrek ağırlığı/canlı ağırlık oranında 15 ve 30. günlerde, 3. güne göre belirgin bir artış gösterdiği tespit edildi ($P<0.05$), (Şekil 2).

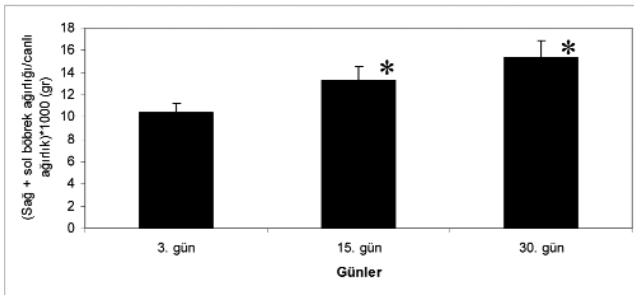
Histolojik Bulgular: Yapılan mikroskopik incelemeler sonucu kontrol ve sham grubundaki fare böbreklerinin normal histolojik yapıya sahip oldukları gözlemlendi. Bununla birlikte; denemenin 3. gününde, deneme grubun-

daki hayvanların proksimal tubuluslarının bazılarının apikal kısmında glikojen birikiminde azalma, glomeruluslarda lobulasyon ve Bowman boşluğunda dilatasyon dikkati çekti. Bowman kapsülünün paryetal yaprağı epitelinde hafif kalınlaşma ve dejenerasyon görüldü (Şekil 3A). Deneme grubunun 15. gününde Bowman boşlukluklarında dilatasyon gibi değişikliklere de rastlandığı gibi bazı glomerulusların Bowman kapsülünün paryetal yapraklarına yapışarak Bowman boşluğunun ortadan kalkmasına neden olduğu görüldü (Şekil 3B). Deneme grubunun 30. gününde alınan dokulardaki lezyonlar oldukça sınırlı olmakla birlikte bazı tubulus epitel



Şekil 1. Gruplar arasında 15. ve 30 gün için böbrek ağırlıklarının karşılaştırılması (* $P<0.05$)

Fig 1. The comparison of kidney weight changes between groups for 15th and 30th days (* $P<0.05$)

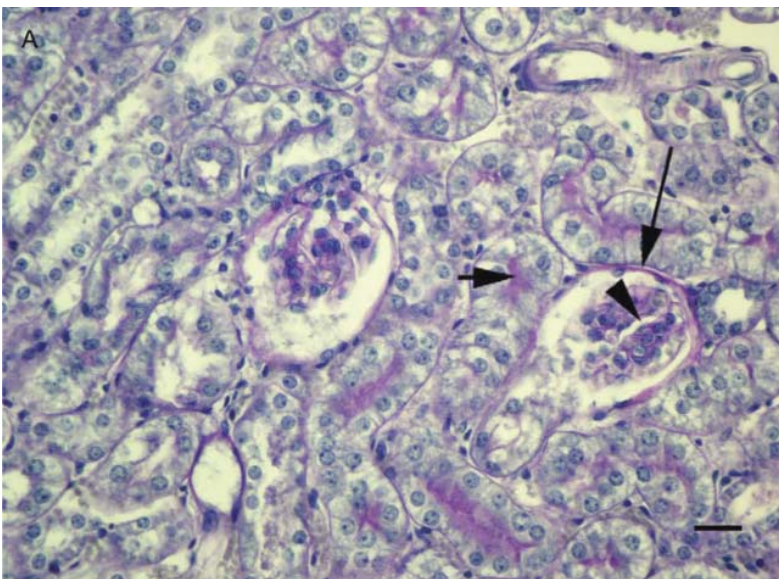


Şekil 2. Deneme grubunda böbrek ağırlığının günlere göre karşılaştırılması (* $P<0.05$)

Fig 2. The comparison of kidney weight according to days in the experimental group (* $P<0.05$)

hücrelerinde (proksimal, distal ve toplayıcı) çekirdek dış hatlarında düzensizleşme, fazla ve büyük boyuttaki çekirdekçikler gibi dejeneratif değişikliklerin deneme grubunun 15. gününe göre daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 4A). Ayrıca, glomerular yumakların Bowman kapsülüne yapışması sonucu Bowman boşluğunun obliterasyonu gözlemlendi (Şekil 4A, 4B). Yine, distal tubul epitel hücrelerinde belirgin, diğer böbrek tubul epitel hücrelerinin bazılarında hafif bir hidropik dejenerasyon gözlemlendi (Şekil 4B).

İmmunohistokimyasal Bulgular: Yapılan mikroskopik incelemede deneme, sham ve kontrol gruplarında spe-

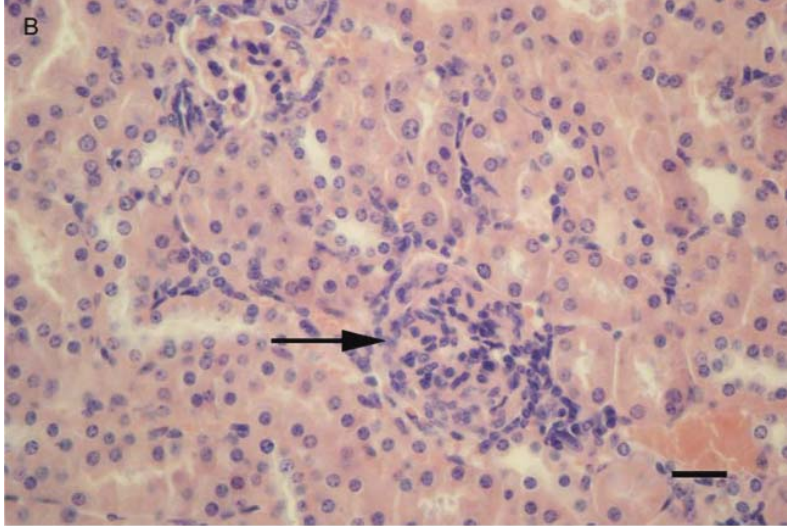


Şekil 3.A. Deneme grubundan bir hayvanın 3. günde böbrek kesiti. Böbrek iç korteksindeki bazı proksimal tubuluslarda glikojen birikmesi (kısa ok). Bowman kapsülünün paryetal yaprağının epitel hücrelerinde hafif kalınlaşma ve dejenerasyon (uzun ok). Glomerular yumakta lobulasyon (ok başı). PAS (Bar=100 µm)

Fig 3.A. A renal section of an experimental animal at 3rd day. Glycogen accumulation in the some proximal tubules of inner cortex (short arrow) is seen. Thickening and degeneration in the parietal layer of Bowman's capsule (long arrow). Lobulation of the glomerular tuft (arrowhead). PAS (Bar=100 µm)

sifik CAT immunohistokimyasal reaksiyonu görüldü. Deneme grubu dışındaki grupların böbrek korteksinde güçlü CAT immunohistokimyasal reaktivitesi tespit edildi. Tüm grupların böbrek medullasında ise CAT immuno-

reaktivitesinin oldukça zayıf (+1) olduğu tespit edildi (*Şekil 5A*). Tüm grupların kortekste CAT immunoreaktivitesinde, bölgelere göre farklılıklar gözlemlendi. Her üç grupta da, korteksin iç kısmındaki immunoreaktivitenin

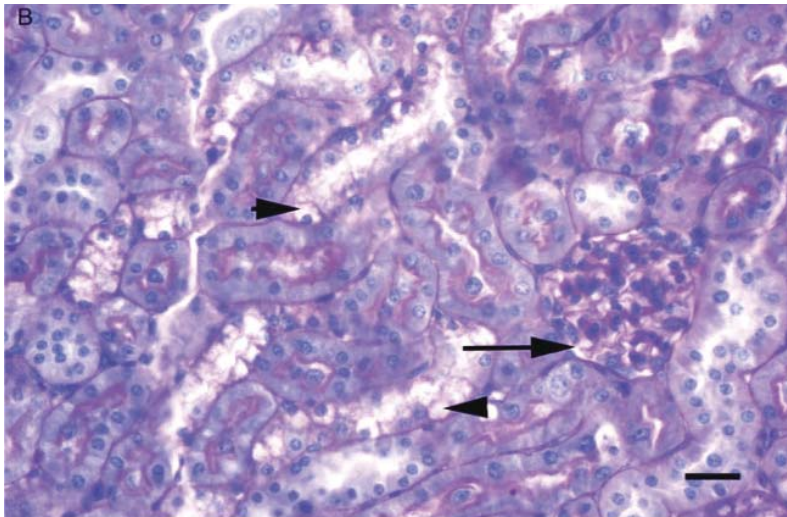
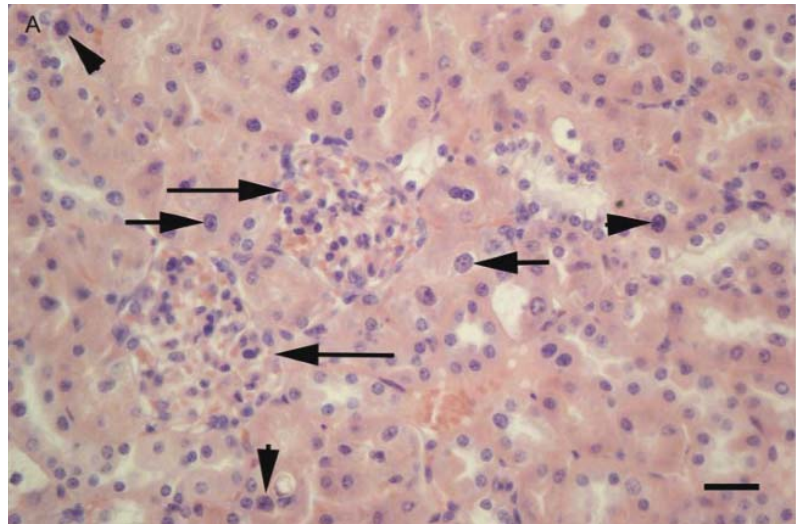


Şekil 3.B. Deneme grubundan bir hayvanın 15. günde böbrek kesiti. Glomerular yumağın birkaç noktada kalınlaşan Bowman kapsülüne yapıştığı ve Bowman boşluğunun ortadan kalktığı görülmektedir (ok). HE (Bar=50 µm)

Fig 3.B. A renal section of an experimental animal at 15th day. The glomerular tuft that stuck to the Bowman's capsule slightly thickened in several points, led to the disappearance of Bowman's space (Arrow). HE (Bar=50 µm)

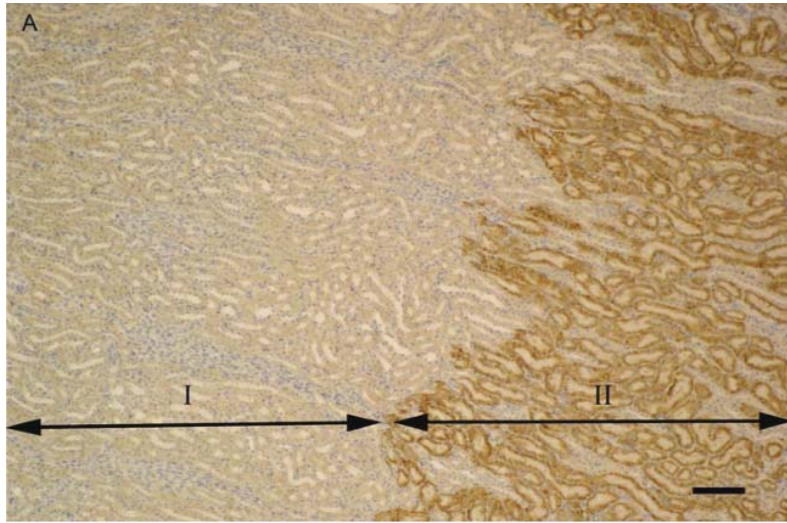
Şekil 4.A. Deneme grubundan bir hayvanın 30. günde böbrek kesiti. Glomerular yumakların Bowman kapsülüne yapışması sonucu ortaya çıkan Bowman boşluğu obliterasyonu (oklar). Çok sayıda ve iri çekirdekçikler (kısa oklar). Çekirdek sınırlarında düzensizleşme (ok başları). HE (Bar=50 µm)

Fig 4.A. A renal section of an experimental animal at 30th day. Obliteration of Bowman's space was observed as a result of the glomerular tufts sticking to Bowman's capsule (arrows). Numerous and large diameter nucleoluses (short arrow). Irregularity of the outer frame of nuclei (arrowheads). Experimental day 30th HE (Bar=50 µm)



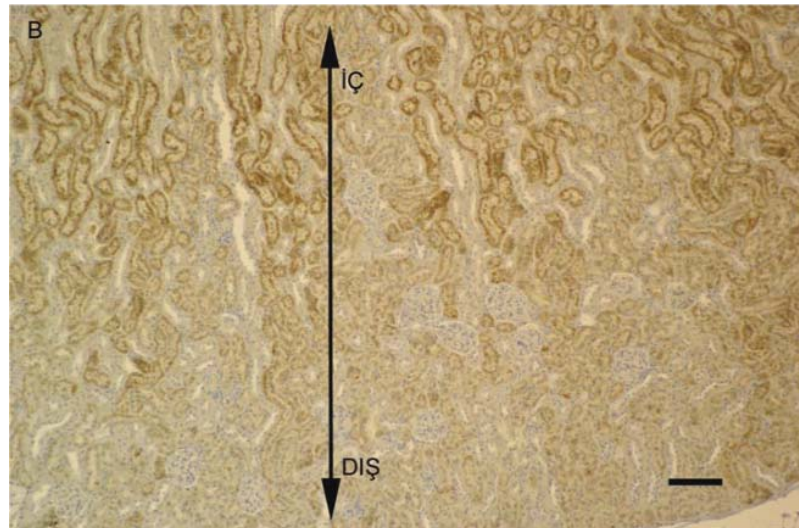
Şekil 4.B. Deneme grubundan bir hayvanın 30. günde böbrek kesiti. Glomerulus, Bowman boşluğunu (ok) tamamen doldurmuş durumda. Distal tubulus epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (ok başları). PAS (Bar=50 µm)

Fig 4.B. A renal section of an experimental animal at 30th day. Glomerulus filling Bowman's space completely (arrow). Hydropic degeneration in epithelial cells of distal tubules (arrowheads). PAS (Bar=50 µm)



Şekil 5.A. Sham grubundan bir hayvanın 30. günde böbrek kesiti. Medulla (I) ve kortekste (II) CAT immunoreaktivitesi. Kortekste CAT immuno-reaktivitesi oldukça belirgin olmasına rağmen medullada oldukça zayıftır. CAT immunoreaktivitesi (Bar=200 µm)

Fig 5.A. A renal section of a sham animal at 30th day. CAT immunoreactivity in the medulla (I) and cortex (II). Although strong catalase immuno-reactivity is clearly seen in the cortex, the reactivity weak in the medulla. CAT immunoreactivity. (Bar=200 µm)



Şekil 5.B. Deneme grubundan bir hayvanın 30. günde böbrek kesiti. Korteksin iç ve dış kısmındaki CAT immunoreaktivitesi arasında belirgin fark görülmektedir. CAT immunoreaktivitesi (Bar=200 µm)

Fig 5.B. A renal section of an experimental animal at 30th day. The difference in catalase immuno-reactivity between the inner and the outer cortex is seen. CAT immunoreactivity (Bar=200 µm)

dış kısmına nazaran daha yoğun olduğu tespit edildi (Şekil 5B). Sham, kontrol ve deneme gruplarının tubulus proksimalislerinde yoğun immunoreaktivite (+3) tespit edilmesine karşın (Şekil 6A, 6C), her üç gruba ait böbrek dokusunun glomeruluslarında (Şekil 6A), damar endotelinde (Şekil 6B) ve tubulus distalislerinde (Şekil 6C) ise CAT immunoreaktivitesine (0) rastlanmadı.

RT-PCR Bulguları: RT-PCR sonuçlarına göre gruplar arasında, kontrol geni olarak kullanılan β -aktin mRNA ekspresyonunda beklenildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken (Şekil 7A), CAT mRNA ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlemlendi (Tablo 2). Buna göre, deneme grubu CAT geni ekspresyonu düzeyinin sham grubu CAT geni ekspresyon düzeyinden düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 7B), (Tablo 2).

Biyokimyasal Bulguları: Deneme grubunun, böbrek dokusundaki CAT enzimi aktivitesinin sham ve kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 2. Gruplar arasında CAT geni ekspresyonu karşılaştırması (CAT Normalized= CAT mRNA (arbitrary units)/ β -aktin mRNA (arbitrary units))

Table 2. Comparison of CAT gene expression between groups (CAT Normalized=CAT mRNA (arbitrary units)/ β -actin mRNA (arbitrary units))

Grup	n	CAT Normalized	SD	F
Deneme	9	0.270	0.056	21.210 *
Sham	9	0.667	0.253	

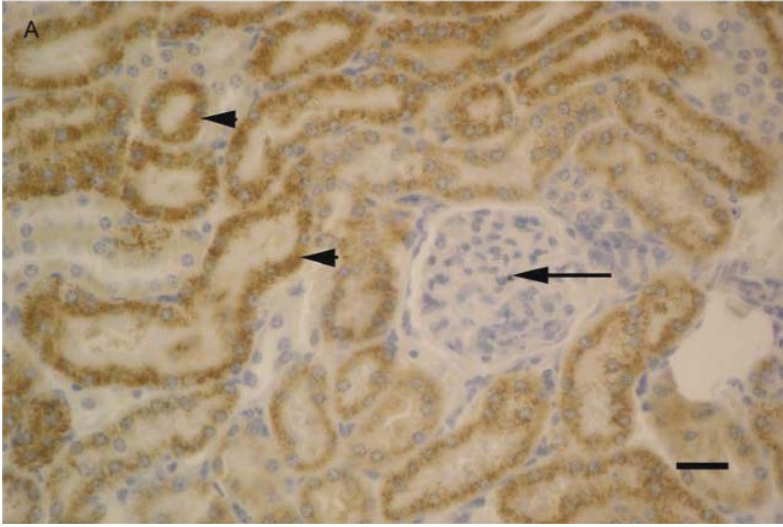
* $P < 0.05$

Tablo 3. Gruplar arasında CAT aktivitesi karşılaştırması

Table 3. Comparison of CAT activity between groups

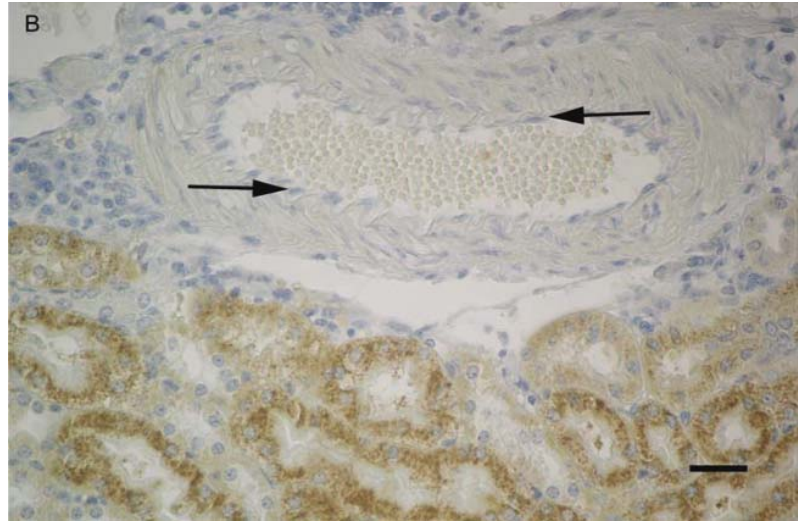
Grup	n	CAT U/mg Protein	SD	F	Anlamlı Fark
Deneme	15	0.013	0.0040	14.20 *	Sham, Kontrol
Sham	15	0.022	0.0049		Deneme
Kontrol	6	0.020	0.0049		Deneme

* $P < 0.05$



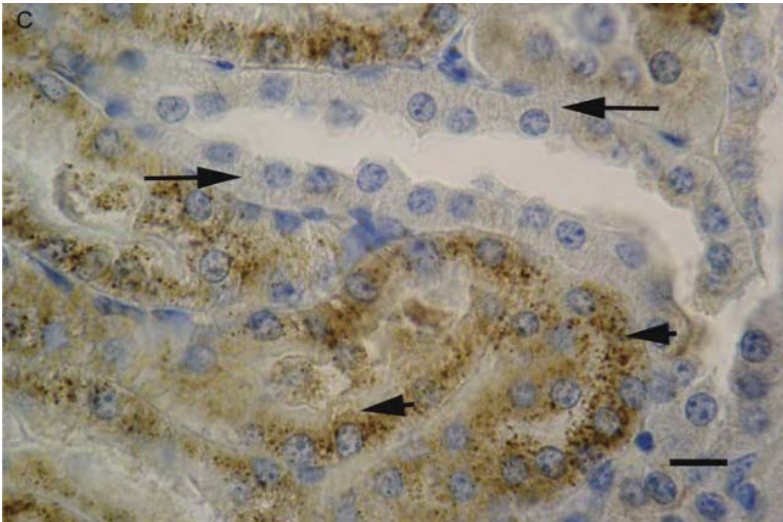
Şekil 6.A. Sham grubundan bir hayvanın 15. günde böbrek kesiti. Glomeruluslarda (ok) immuno-reaktivite gözlenmemesine karşın tubulus proksimalislerde (ok başları) immunoreaktivite görülmektedir. CAT immunoreaktivitesi (Bar=50 µm)

Fig 6.A. A renal section of a sham animal at 15th day. Immunoreactivity is not seen in the glomeruli (arrow), the reactivity is seen in proximal tubuli (arrowheads). CAT immunoreactivity (Bar=50 µm)



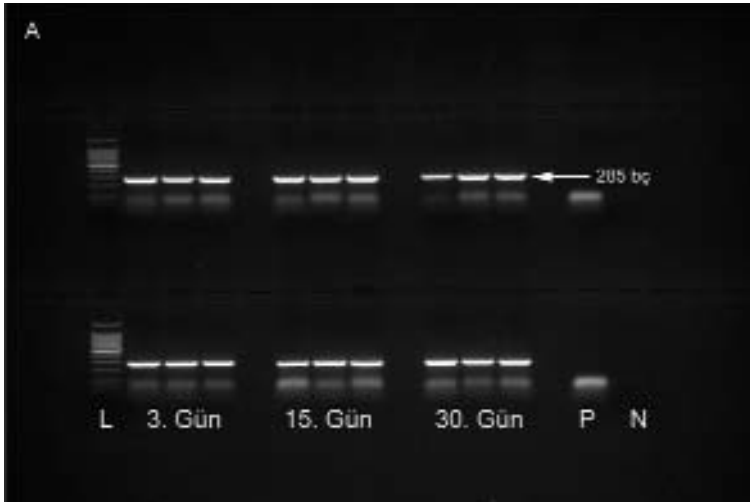
Şekil 6.B. Sham grubundan bir hayvanın 15. günde böbrek kesiti. Damar endotelinde (oklar) immuno-reaktivite görülmemektedir. CAT immunoreaktivitesi. (Bar=20 µm)

Fig 6.B. A renal section of a sham animal at 15th day. Immunoreactivity is not seen in the vascular endothel (arrows) of all groups. CAT immuno-reactivity. (Bar=20 µm)



Şekil 6.C. Sham grubundan bir hayvanın 3. günde böbrek kesiti. Tubulus distalis epitelyum hü-crelerinde CAT immunoreaktivitesi görülmemektedir (oklar: tubulus distalis, ok başları: tubulus proksimalis). CAT immunoreaktivitesi (Bar=20 µm)

Fig 6.C. A renal section of a sham animal at 3rd day. Catalase immunoreactivity is not seen in the distal tubuli (arrows: distal tubule, arrowheads: proximal tubule). CAT immunoreactivity (Bar=20 µm)

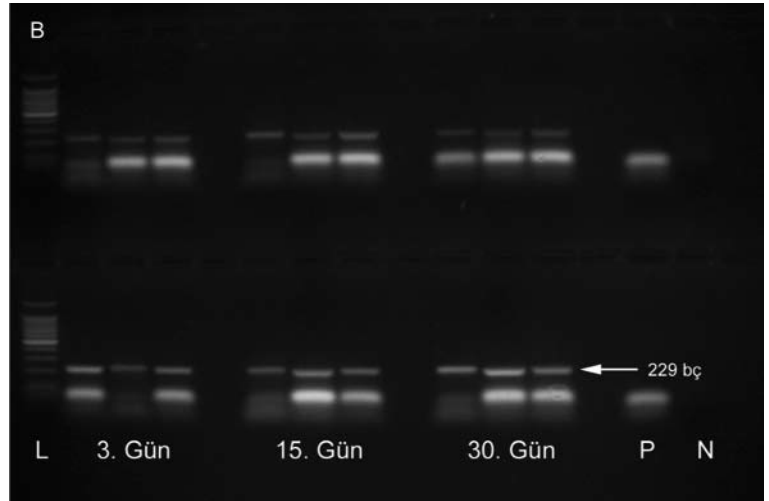


Şekil 7.A. β -aktin geni RT-PCR sonucu. Üst sıra deneme grubuna, alt sıra sham grubuna aittir (P=Pozitif kontrol, N=Negatif kontrol, L= 100 baz çifti (bç) DNA ladder)

Fig 7.A. The result of RT-PCR of β -actin gene. Upper line series belong to the experimental group, bottom line series belong to the sham group (P=Positive control, N=Negative control, L= 100 bp DNA ladder)

Şekil 7.B. CAT geni RT-PCR sonucu. Üst sıra deneme grubuna, alt sıra sham grubuna aittir (P=Pozitif kontrol, N=Negatif kontrol, L= 100 baz çifti (bç) DNA ladder)

Fig 7.B. Result of RT-PCR of catalase gene. Upper line series belong to the experimental group, bottom line series belong to the sham group (P=Positive control, N=Negative control, L= 100 bp DNA ladder)



TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada streptozotosin ile diabet oluşturulan farelerde; canlı ağırlık ve böbrek ağırlığındaki değişiklikler, böbrek dokusunda RT-PCR ile CAT gen ekspresyonu, histopatolojik olarak yapısal değişiklikler, immuno-histokimyasal olarak CAT enziminin lokalizasyonu ve dağılımı, spektrofotometrik olarak da CAT enzimi aktivitesi incelendi.

Göçmen ve ark.²⁹, 20 ve 30 günlük diabetik farelerde canlı ağırlık kaybını rapor etmiştir. Wada ve ark.³⁰ ise 24 hafta sonunda diabetik farelerin canlı ağırlığında kontrol grubu farelere göre belirgin bir şekilde düşüş olduğunu bildirmiştir. Hayashi ve ark.³¹, ratlarda diabet oluşturdukları bir çalışmada; 4 haftalık deney sürecinde canlı ağırlık bakımından diabetik grup ile kontrol grubu arasında benzerlik olduğunu bildirmiştir. Fujita ve ark.³², deneysel diabet oluşturdukları farelerde kontrol grubuna göre canlı ağırlıklarının azaldığını bildirmiştir. Imaeda ve ark.⁶, farelerde yaptıkları çalışmada STZ'nin diabetik grup-

ta canlı ağırlık kaybına yol açtığını ve bu kaybı ilk olarak çalışmanın 7. gününde tespit ettiklerini bildirmiştir. Çalışmamızda da diabetik grupta 7. gündeki canlı ağırlık değerlerinin grup içinde günlere göre istatistiksel olarak sadece 0. günden düşük olması ve 3, 15, 21 ve 30. günlere benzer olması, canlı ağırlık kaybının 7. günde belirginleştiğini göstermesi bakımından anlamlıdır. Canlı ağırlık kaybının, Andallu ve Varadacharyulu'nun³³ belirttiği gibi, aşırı yemeyeyle seyreden diabetik grupta dokulardaki aşırı protein yıkımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sechi ve ark.²⁰, deneysel diabet oluşturdukları farelerde (böbrek ağırlığı/canlı ağırlık)x1000 değerinin 16 günlük deney sürecinde diabetik grupta kontrol grubuna göre artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Wada ve ark.³⁰, farelerde diabet oluşturduktan 2 hafta sonra ve 24 hafta sonra (böbrek ağırlığı/canlı ağırlık)x100 değerinin diabetik grupta kontrol grubuna göre arttığını bildirmiştir. Bu çalışmada, sham ile kontrol gruplarına göre diabetik grupta böbrek ağırlığında artış olduğu saptandı. Bu artışın, diabetin böbreklerde oluşturduğu hipertrofiye kaynak-

landığı düşünülmektedir.

Johkura ve ark.³⁴, ratlarda böbrek tubulus epiteli peroksizomlarının ontojenik gelişimini incelemek için yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada, CAT primer antikorunu kullandıklarını ve postnatal 28. günde böbrek iç korteksi ile dış korteks tubulus epitelinde immuno-reaktif boyama görüldüğünü, medullada ise boyamaya rastlanmadığını bildirmiştir. Morikawa ve Harada³⁵ ise sıgır böbreğinde CAT lokalizasyonunu spesifik fluoresan boyaması ile proksimal tubulus epitelyum hücrelerinin sitoplazmasında tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada; proksimal tubulus epitel hücresi çekirdeklerinde, distal tubulus epitelyum hücrelerinde, glomeruluslarda ve böbrek damarları ile bağ dokusunda immuno-reaktif boyanmaya rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, immunohistokimyasal olarak proksimal tubulus epitel hücrelerinin sitoplazmasında spesifik boyanma gözlemlendi; fakat proksimal tubulus epitel hücresi çekirdekleriyle distal tubulus epitel hücrelerinde, glomeruluslarda ve böbrek damarlarında immuno-reaktif boyanmaya rastlanmadı. Diabetik grubun böbreklerdeki CAT immuno-reaktivitesindeki düşüşün, CAT mRNA ekspresyonundaki azalmaya bağlı olduğu bu çalışmanın RT-PCR sonucu ile desteklenmektedir.

Diabette böbrek CAT aktivitesindeki değişiklikler üzerinde farklı bulgular rapor edilmiştir. Alıcıgüzel ve ark.³⁶, diabetik gruptaki böbrek CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek seyrettiğini bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda, STZ ile oluşturulan deneysel diabette, böbrekteki CAT aktivitesinin diabetik grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir³⁷⁻³⁹. Bu çalışmada, CAT enzim aktivitesinin diabetik grupta sham ve kontrol gruplarına göre azaldığı tespit edildi. Diabetik gruba ait böbreklerdeki CAT enzim aktivitesinin, CAT mRNA ekspresyonu düzeyindeki azalmaya bağlı olarak düşük düzeyde seyrettiği düşünülmektedir.

Diabette böbrek CAT mRNA düzeyi ile ilgili farklı bulgular rapor edilmiştir. Yapılan bazı deneysel diabet çalışmaları, diabetik grupta kontrol grubuna göre CAT mRNA düzeyinin düşük olduğu bildirilmiştir^{38,40}. Yapılan bazı deneysel diabet çalışmaları da diabetik grupta kontrol grubuna göre CAT mRNA düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir^{20,39}. Hayashi ve ark.³¹, ratlarda deneysel diabet oluşturdukları çalışmada, 4 haftalık deney sürecinde böbreklerde CAT mRNA ekspresyonu bakımından diabetik grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Bu çalışmada, gruplar arası karşılaştırmada diabetik grupta sham grubuna göre CAT geni ekspresyonunda azalma tespit edildi. Diabette oluşan komplikasyonların, CAT enzimini gen ekspresyonu düzeyinde etkileyerek baskıladığı düşünülmektedir.

Öztürk ve ark.⁴¹, deneysel diabet oluşturulan sıçan böbreklerinde yaptıkları incelemede kontrol grubunda normal histolojik görünüme sahip böbrekler izlediklerini fakat diabetik grupta glomerül bazal membranında kalınlaşma, mezengial matrikste artış, bazı glomerüllerin Bowman kapsülü paryetal yapraklarında ve nadiren de tubulus bazal membranında kalınlaşma izlediklerini bildirmiştir. Vardı ve ark.⁴² STZ ile deneysel diabet oluşturdukları sıçanların böbreklerinde yaptıkları incelemede, hem glomerül hem de tubulus bazal membranı ve epitelinde glikojen birikimi, şişme ve vakuolizasyon gibi değişikliklerin oluştuğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, diabetik grupta tubulus epitel hücrelerinde hücre çekirdeği ve hücre boyutunda farklılıklara ilaveten fazla sayıda ve iri çekirdekçiklerin şekillenmesi gibi dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca, proksimal tubulusların apikal kısımlarında glikojen birikiminin azaldığı ve çekirdek sınırlarının düzensizleştiği de görüldü. Distal tubulus epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon dikkati çekti. Kan glikoz düzeyinin yüksek seyretmesinin etkisi ile böbrek dokusundaki hücrelerin yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana geldiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, DM'nin böbreklerde CAT enzimi gen ekspresyonunda dolayısıyla doku aktivitesinde belirgin bir şekilde azalmaya, ayrıca böbreklerin histolojik yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olduğu söylenebilir. Bu çalışma sonuçlarının, DM'nin gelişiminde antioksidanların önemini daha da netleştirebilmek amacıyla, daha ileri düzeydeki teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalara ışık tutacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Handa H, Sakurama S, Nakagawa S, Yasukouchi T, Sakamoto W, Izumi H: Glandular kallikrein, renin and angiotensin converting enzyme of diabetic and hypertensive rats. *Advan Exp Med Biol*, 247, 443-448, 1989.
2. McLennan S, Yue DK, Fisher E, Capogreco C, Heffernan S, Ross GR, Turtle JR: Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Relationships with collagen and polyol pathway abnormalities. *Diabetes*, 37 (3): 359-361, 1988.
3. Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Clauss TH: Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem*, 57, 755-783, 1988.
4. Sochor M, Kunjara S, Baquer NZ, Mclean P: Regulation of glucose metabolism in livers and kidneys of nod mice. *Diabetes*, 40 (11): 1467-1471, 1991.
5. Herr RR, Jahnke HK, Argoudelis AD: The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc*, 89 (18): 4808-4809, 1967.
6. Imaeda A, Kaneko T, Aoki T, Kondo Y, Nagase H: DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol*, 40, 979-987, 2002.
7. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50, 536-546, 2001.

8. Kondrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE: The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: Inhibition of pancreatic beta cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J*, 356, 31-41, 2001.
9. Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, McDaniel ML: Interleukin-1 β induces the formation of nitric oxide by β -cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the β -cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest*, 90, 2384-2391, 1992.
10. Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, Taljedal IB: Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells *in vitro*. *Biochem J*, 182, 17-25, 1979.
11. Yazıcı C, Köse K: Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Univ Sağ Bil Derg*, 13 (2): 56-65, 2004.
12. Serafini M, Del RD: Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep*, 9 (3): 145-152, 2004.
13. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*, 39, 841-852, 2005.
14. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I: Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Func*, 21, 291-296, 2003.
15. Sumner JB, Dounce AL: Crystalline catalase. *J Biol Chem*, 121, 417-424, 1937.
16. Masters C, Holmes R: Peroxisome: New aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol Rew*, 57, 866-882, 1977.
17. Klotz MG, Klassen GR, Loewen PC: Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol*, 14 (9): 951-958, 1997.
18. Karabulut AB, Özerol E, Temel İ, Gözükar EM, Akyol Ö: Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. *İnönü Univ Tıp Fak Derg*, 9 (2): 85-88, 2002.
19. Kanitkar M, Bhone R: Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *Rev Diabet Stud*, 1 (4): 185-192, 2004.
20. Sechi LA, Ceriallo A, Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E: Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*, 40, 23-29, 1997.
21. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159, 1987.
22. Kocamis H: Functional profiles of growth related genes during embryogenesis and postnatal development of chicken and mouse skeletal muscle. *Doktora Tezi*, Morgantown, West Virginia, 2001.
23. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL: Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254, 277-279, 1991.
24. Ferret PJ, Soum E, Negre O, Fradelizi D: Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol*, 3, 1-13, 2002.
25. Luna LG: Manual of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed., pp. 222-226. Mc Graw-Hill Book Comp, New York, 1968.
26. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29, 577-580, 1981.
27. Aebi H: Catalase *in Vitro*. *Methods Enzymol*, 105, 121-126, 1984.
28. SPSS 12.0: Windows and Smart Viewer, 2003.
29. Göçmen C, Seçilmiş A, Kumcu EK, Ertuğ PU, Önder S, Dikmen A, Baysal F: Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse. *Eur J Pharmacol*, 398, 93-98, 2000.
30. Wada J, Zhang H, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Hida K, Shikata K, Kanwar YS, Makino H: Gene expression profile in streptozotocin-induced diabetic mice kidneys undergoing glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 59, 1363-1373, 2001.
31. Hayashi K, Haneda H, Koya D, Maeda S, Isshiki K, Kikkawa R: Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, 52, 85-96, 2001.
32. Fujita A, Sasaki H, Ogawa K, Matsuno S, Matsumoto E, Furuta H, Nishi M, Nakao S, Tsuno T, Taniguchi H, Nanjo K: Increased gene expression of antioxidant enzymes in KKAY diabetic mice but not in STZ diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract*, 69, 113-119, 2005.
33. Andallu B, Varadacharyulu NC: Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta*, 338, 3-10, 2003.
34. Johkura K, Usuda N, Liang Y, Nakazawa A: Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes in developing rat kidney tissues. *J Histochem Cytochem*, 46 (10): 1161-1173, 1998.
35. Morikawa S, Harada T: Immunohistochemical localization of catalase in mammalian tissues. *J Histochem Cytochem*, 17, 30-35, 1969.
36. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U: Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med*, 142 (3): 172-177, 2003.
37. Wu YG, Lin H, Qi XM, Wu GZ, Qian H, Zhao M, Shen JJ, Lin ST: Prevention of early renal injury by mycophenolate mofetil and its mechanism in experimental diabetes. *Int Immunopharmacol*, 6, 445-453, 2006.
38. Reddi AS, Bollineni JS: Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF- β 1 in normal and diabetic rats. *Kidney Int*, 59, 1342-1353, 2001.
39. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S: Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 243, 147-152, 2003.
40. Haan JB, Stefanovic N, Nicolice-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, 544-551, 2005.
41. Öztürk F, Iraz Mustafa, Eşrefoğlu M, Kuruş M, Gül M, Otlı A: Deneyel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *İnönü Univ Tıp Fak Derg*, 12 (1): 1-4, 2005.
42. Vardı N, Iraz M, Gül M, Öztürk F, Uçar M, Otlı A: Diyabetin böbreklerde neden olduğu histolojik değişiklikler üzerine aminoguanidinin iyileştirici etkileri. *T Klin J Med Sci*, 26, 599-606, 2006.