

Deneysel Araştırma

Diyabetik Ratların Beyin Dokusunda Nesfatin Ekspresyonu Üzerine Tiaminin Etkileri

Ferhat BALGETİR¹, Nevin KOCAMAN²

¹Patnos Devlet Hastanesi, Nöroloji, Ağrı, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Diabetes Mellitus (DM) hastalarında metabolik ve damarsal bozuklukların beyin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar verdiği bilinmektedir. Tiamin (TİA)'ın nörofizyolojide önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada deneysel diyabet oluşturulan sıçan beyin dokusunda nesfatin ekspresyonu üzerine TİA'nın etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ergin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 6 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Tampon grubuna ise fosfat-sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. DM grubuna 50 mg/kg tek doz streptozotosin (STZ) i.p olarak verildi. DM+TİA grubuna ise 50 mg/kg tek doz STZ i.p olarak verilirken TİA 25 mg/kg/gün dozunda oral olarak uygulandı. Deney sonunda sıçanlar anestezisi altında dekapite edilip beyin dokuları çıkartıldı. Beyin dokuları histolojik takip sonrası parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitlere nesfatin ekspresyonunun için avidin-biotin-peroksidaz metodu uygulandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde histolojik skor oluşturuldu.

Bulgular: Nesfatin immünreaktivitesi kontrol ve tampon gruplarında benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nesfatin immünreaktivitesi DM grubunda anlamlı bir şekilde artmıştı. DM grubu ile karşılaştırıldığında ise nesfatin immünreaktivitesi DM+ TİA grubunda anlamlı olarak azalmıştı.

Sonuç: Bu çalışma ile diyabetik beyin dokusunda TİA'nın nesfatin yoluyla koruyucu etkiler yapabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, Nesfatin, Tiamin, Sıçan

ABSTRACT

The Effects of Thiamine on the Expression of Nesfatin in the Brain Tissue of Diabetic Rats

Objective: It's known that metabolic and vascular disorders impair functional and structural integrity of brain in diabetic patients. It's shown that thiamine (TIA) has an important role in neurophysiology. In this study; we aimed to investigate the effect of TIA on the expression of nesfatin in the brain tissues of diabetic rats.

Material and Methods: In this study, adult male Wistar albino rats were used. The experimental animals were divided into 4 groups, containing 6 animals in each group. In the control group; the rats didn't receive any drugs during the 6 weeks of the study period. Buffer group was administered phosphate-citrate buffer intraperitoneally (IP). In the DM group; 50 mg/kg single dose streptozotocin (STZ) was administered IP. DM+TIA group received 50 mg/kg single dose of STZ and started 25mg/kg/day of TIA orally after the induction of DM. At the end of the experiment, the rats were decapitated under the anesthesia and the brain tissues were removed. Brain tissues were embedded into paraffin blocks after the routine histological preparations. Avidin-biotin-peroxidase technique was used in determination of nesfatin expression. Histologic score was created in by the assessment of immunohistochemical staining.

Results: The immunoreactivity of nesfatin was found as similar in control and the buffer groups. Nesfatin immunoreactivity was found significantly increased in the DM group compared to the control group. Nesfatin immunoreactivity was found significantly decreased in the DM+TIA group compared to the DM group.

Conclusion: We can conclude that thiamin has protective effects via nesfatin on the brain tissues of diabetic rats..

Key Words: Diabetes Mellitus, Nesfatin, Thiamine, Rat

Gelişen dünyada, önemli bir sağlık sorunu haline gelen diyabetin görülme sıklığı endişe verici bir oranda artış göstermektedir (1). Diyabetik kişilerde hipergliseminin, çeşitli organ ve dokular üzerinde oluşan ciddi hasarlardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Diyabetin komplikasyonları arasında retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz sayılabilir (2). Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumu olarak tanımlanmaktadır (3). Tip I diyabetik hayvanlardan elde edilen deneysel veriler, bu

hayvanların merkezi sinir sistemlerinde (MSS)'lerinde hem yapısal hem de elektrofizyolojik bozukluklar geliştiğini; nörotransmitter seviyesinde, nöron yoğunluğunda, apoptotik aktivite ve bilişsel fonksiyonlarda önemli değişimlerin ortaya çıktığını göstermektedir (4). Diabetes mellitus (DM)'un beyinde oksidatif stres ve inflamasyonu artırdığına yönelik daha önceki çalışmalar araştırmacıları, diyabetin veya komplikasyonlarının tedavisinde farklı arayışlara sevk etmiştir (5). Tiamin (TIA), hemen hemen tüm organizmalarda, enerji metabolizmasında kofaktör

olarak görev yapmasının yanı sıra karbonhidrat, lipit ve aminoasit metabolizmasında da görev alan temel bir vitamindir (6).

Tiamin eksikliği sonucu birkaç temel mekanizma ile hücrede apoptoz ve nörodejenerasyon oluşur. TIA, tiamin fosfat ve tiamin bağımlı enzimlerdeki azalma oksidatif stresi çoğaltır ve nörodejenerasyona sürükler.

Tiaminin hem enerji yollarında hem de oksidatif strese karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında görev aldığı ortaya konması, sağlık alanında birçok hastalığın tanı ve tedavisinde yardımcı olacağını düşündürmektedir (7). Nesfatin-1'in ise anoreksijenik etkisine ilave olarak metabolik kontrolde önemli rol oynayan anti-hiperglisemik etkisi de rapor edilmiştir (8). Açlık plazma nesfatin seviyelerinin diabetik hiperfajinin patofizyolojisinde rol oynayabileceği, nesfatin'in başta Tip 2 DM olmak üzere metabolik hastalıkların tedavisindeki yararını değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır (9).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı laboratuvarında yapıldı. Çalışmada FÜDAM'dan temin edilen 24 adet, Wistar albino cinsi erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 eşit gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (n=6): Bu gruptaki sıçanlara çalışma süresince herhangi bir işlem yapılmadı. **Tampon grubu (n=6):** Bu gruba sadece 0,1 M fosfat-sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. **DM grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg olacak şekilde tek doz streptozotisin (STZ) 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürerek i.p olarak uygulandı. Açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi. **DM + TIA grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürerek i.p olarak verilmesinden sonra oluşan diyabeti takiben TIA 25 mg/kg/gün oral olarak uygulandı

Tüm gruptaki sıçanlar 6 haftalık deney sonunda ketamin (75mg/kg)+xylazine (10mg/kg) anestezisi altında dekapite edildikten sonra hızla çıkartılan beyin dokuları % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilip rutin histolojik doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4-5µm kalınlığındaki kesitlere avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulanarak Nesfatin (Rabbit Nesfatin-1 primary antibody, H-003-22, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA) immünre aktivitesi için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Pozitif kontrol için sıçan mide dokusu kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde Kuloğlu ve ark. (10) yaptığı şekilde; immünre aktivitenin

yaygınlığı (0.1: < % 25, 0.4: % 26-50, 0.6: % 51-75, 0.9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, + 0.5: çok az, + 1: az, + 2: orta, + 3: şiddetli) esas alınarak histolojik skor oluşturuldu (Histolojik skor = Yaygınlık x şiddet).

Elde edilen veriler ortalama standart sapma olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler SPSS version 21 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA, grup içi değerlendirmede ise paired t testi kullanıldı.

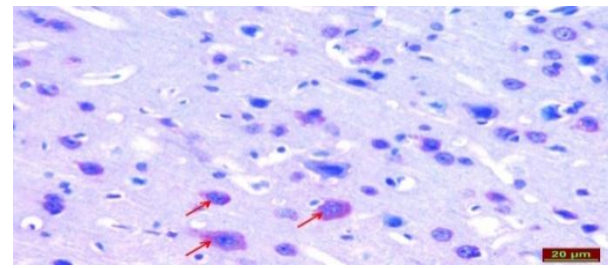
BULGULAR

Nesfatin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu Nesfatin immünreaktivitesi; kontrol (şekil 1) ve Tampon (şekil 2) grubunda benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Nesfatin immünreaktivitesi DM grubunda (şekil 3) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p<0.05$). DM grubu ile karşılaştırıldığında ise Nesfatin immünreaktivitesi DM+TIA grubunda (şekil 4,5) anlamlı olarak azalmıştı ve kontrole benzer izlendi ($p<0.05$). Tüm gruplara ait Nesfatin immünreaktivitesine ait histolojik skor Tablo 1'de özetlenmiştir.

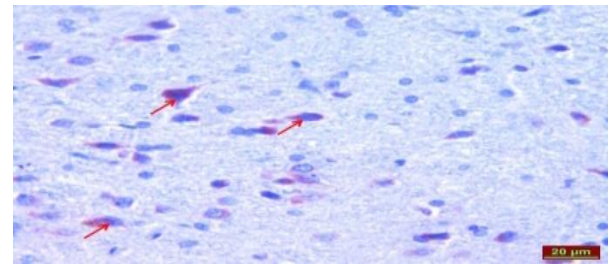
Tablo 1. Nesfatin immünreaktivitesi histolojik skor

	Nesfatin İmmünreaktivitesi
KONTROL	0.75±0.26
TAMPON	0.81±0.11
DM	2.40±0.46 ^a
DM+TIA	0.71±0.18 ^b

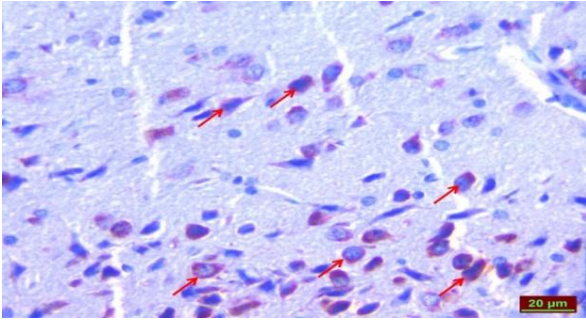
^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^bDM grubuna göre karşılaştırıldığında, $P<0.05$.



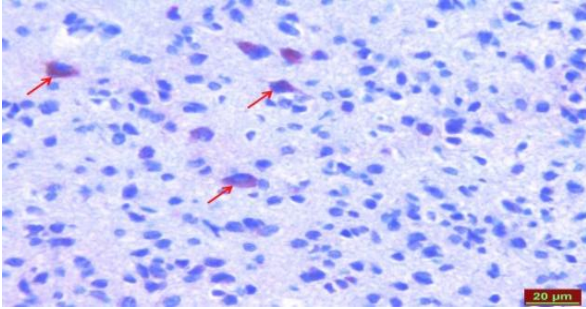
Şekil 1. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda nesfatin immünreaktivitesi (→).



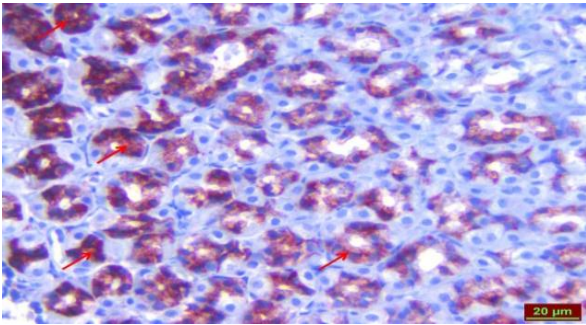
Şekil 2. Tampon grubuna ait beyin dokusunda nesfatin immünreaktivitesi (→).



Şekil 3. DM grubuna ait beyin dokusunda nesfatin immünreaktivitesi (→).



Şekil 4. DM + TIA grubuna ait beyin dokusunda nesfatin immünreaktivitesi (→).



Şekil 5. Nesfatin pozitif kontrol.

TARTIŞMA

Diabetes mellitusun fizyopatolojisinde, bozulmuş olan insülin salınımı ve insülin direnci rol oynamaktadır. İnsülin direncinin gelişmesinde ise genetik faktörler ile beraber inflamatuvar faktörler, hiperglisemi ve serbest yağ asitleri gibi çevresel faktörler de etkilidir. İnsülin reseptör ve insülin reseptör substrat 1 (IRS-1) polimorfizmi, beta 3 reseptör geni ve ayrılma protein (UCP) gen mutasyonları; bilinen genetik sebeplerdir (11). Diyabet; reaktif oksijen türleri (ROS)'nin artmış üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuç olarak artmış oksidatif stresle ilişkilidir (12). Diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarda mitokondrial fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak; oksidatif strese neden olan serbest radikal üretimi artarken, enerji metabolizmasında aksamalar meydana gelir (13). Bu bağlamda çalışmalar diyabetin, hastaların MSS işlevlerinde aksaklıklara neden olabileceğini göstermektedir (14). MSS'deki diyabetik

komplikasyonlar periferik sinir sistemindekinin aksine kolay fark edilemez (15).

Diyabetik ratların beyin dokularında ve serebral mikrodamarlarında oksidatif hasarı gösteren lipid peroksidasyon yan ürünlerinin arttığı, antioksidan savunmada rol oynayan süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin azaldığı ve hiperglisemiye bağlı Ca^{2+} homeostazının bozulduğu görülmüştür (16). Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetli hastalarda diyabetin etyolojisinde oksidatif stresin rol oynadığı gösterilmiş ve serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun arttığı görülmüştür (17). Serbest radikallerin artması glutatyonun (GSH) ve majör nörodejeneratif hastalıkların orjini olan oksidatif stresin karşılığı olan savunma sistemlerinin azalması ile sonuçlanır (18). Oksidatif stres ROS oluşumuna neden olmakla birlikte MSS'de de inme, Alzheimer ve Parkinson Hastalığı gibi akut ve kronik nörolojik hastalıklarda nörotoksisite için bir son basamak olarak belirtilmiştir (19). Deneysel diyabette antioksidanların nöronları koruduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (20). Alzheimer, Parkinson, Huntington, Wernicke-Korsakoff sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda tiamin eksikliğinin oksidatif stresi arttırması, enerji metabolizmasındaki tiamin bağımlı enzimlerin ve bu enzimlerin dahil oldukları süreçlerin oksidatif strese duyarlı olması, TIA varlığının oksidatif stres sürecini geri çevirmesinin yanında diğer antioksidanların tiamin eksikliği ile tetiklenen değişiklikleri geri çevirmesi; tiamin ile oksidatif stres arasındaki etkileşimi desteklemektedir (7). TIA eksikliği merkezi ve periferik sinir sisteminde ve sinir liflerinin miyelin kılıflarında dejenerasyonuna yol açabilir. MSS enerjisinin hemen hemen tamamı karbonhidratların metabolizmasına bağlıdır. TIA eksikliğinde sinir dokusunun % 50-60 oranında azalan glikoz tüketimi, yağ metabolizmasında türeyen keton cisimlerinin kullanımı ile karşılanır. TIA eksikliğinde MSS'nin nöron hücrelerinde sıklıkla kromatoliz, şişme ve iletişim bozukluğu olabilir (21). Yine tiamin eksikliğinin inflamatuvar yanıt ve oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir (22). TIA ve oksidatif stres ilişkisi DM'de iyice belirlenmiş olup diyabete bağlı gelişen komplikasyonların da TIA eksikliğine benzer şekilde artmış reaktif oksijen türleriyle ilişkisi belirlenmiştir (23).

Ayrıca, TIA'nın hayvan hücrelerinde impuls iletimi, immün sistem aktivasyonu ve sinyalizasyonunda önemli rolü olduğu da bilinmektedir (24). Aynı zamanda tiaminin, farelerde mitokondriyal toksinleri ve oksidatif stresin sebep olduğu apoptozisi engellediği bulunmuştur (25). İnsanlarda ve hayvanlarda beslenme üzerine etkileri olan mediatörler üzerindeki çalışmalar, gıda alımını yönlendiren mediyatörlerden biri olan Nesfatin'e yönelmemize sebep olmuştur (26). Nesfatin'in tuberal hipotalamik nöronlardan sadece gıda alımının düzenlenmesinde

değil aynı zamanda bazı beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, otonom regülasyonunda, stres, ruh hali ve paradoksal uykuda düzenleyici olarak rol aldığı bilinmektedir (27). Spesifik antikörler ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda bu proteinin özellikle hipotalamusun enerji dengesini düzenleyen paraventricüler, supraoptik ve arkuat nükleuslarında ve lateral hipotalamik bölgede yoğunlaştığını göstermiştir (28).

Düşük nesfatin düzeylerinin postreseptör sinyallerle ilgili ileti sistemlerinde aksaklıklara sebep olabileceği ve GLUT-4 reseptörünün glukoz transportunu bozarak insülin rezistanına yol açabileceği ileri sürülmüştür (29). Su ve ark. (8) Nesfatin'in antihiperглиsemik etkili olduğunu ve nesfatin'in intravenöz enjeksiyonunun hiperглиsemik ratlarda kan glukoz seviyesini önemli ölçüde azalttığı, bu antihiperглиsemik etkinin zaman, doz ve insülin bağımlı olduğu ayrıca periferik etkiyle oluştuğu tespit edilmiş ve diğer antihiperглиsemik ajanlarla

karşılaştırıldığında nesfatinin insüline yardımcı yeni bir sınıf olabileceği ifade edilmiştir.

Antihiperглиsemik etkili olduğu daha önceden rapor edilmiş olan nesfatin'in diyabetik sıçan beyin dokularında yüksek oranda belirlenmesi olağan bir durumdur. Yaptığımız bu çalışma ile DM grubu sıçan beyin dokularında nesfatin immünreaktivitesinin artmış olduğunu tespit ettik. Bu durumun, vücudun kendini savunma reaksiyonu olarak hiperглиsemiye reaktif olduğu ve muhtemel bir insülin resistansına karşı gelişebileceği yönünde değerlendirilmiştir. Tiamin ilave ettiğimiz tedavi grubunda ise nesfatin immünreaktivitesi literatür bilgileriyle uyumlu olarak düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak, TIA'nın diyabetik beyin hasarına karşı nöroprotektif etki gösterdiği aynı zamanda diyabetin tedavisinde Nesfatin'in de insüline yardımcı yeni bir ajan olarak gelecek vadedeceği konusunda kanaat oluşmuştur.

KAYNAKLAR

- Holt RIG, Cockram CS, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. Textbook of Diabetes. 4th ed. Singapore: Wiley-Blackwell 2010; 355: 810.
- Kikkawa R. Chronic complications in diabetes mellitus. Br J Nutr 2000; 2: 183-185.
- Akkaya H, Çelik S. Ratlarda diyabet öncesi ve sonrası oksidan-antioksidan durum. F.Ü. Sađ.Bil. Vet. Derg, 2010; 24: 5-10.
- Sima A, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. Eur. J. Pharmacol 2004; 490: 187-197.
- Ahn T, Yun CH, Oh DB. Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Toxicology Letters 2006; 166: 27-36.
- Gian Pietro S, Alessandro S. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. The Lancet Neurology 2007; 6: 442-455.
- Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. Neurochem Int 2011; 58: 248-260.
- Su Y, Zhang J, Tang Y, et al. The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. Biochem Biophys Res Commun 2010; 1: 1039-1042.
- Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. Regul Pept 2010; 159: 72-77.
- Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, et al. Irisin: a potentially candidate marker for myocardial infarction. Peptides. 2014; 55: 85-91.
- Kaku K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. JMAJ 2010; 53: 41-46.
- Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. Diabetic complications 2001; 77: 1-18.
- Tang J, Yan H, Zhuang S. Inflammation and oxidative stress in obesity-related glomerulopathy. Int J Nephrol 2012; 2012: 608397.
- Mc Carthy AM, Lindgren S, Mengeling MA, Tsalkian E, Engvall JC. Effects of diabetes on learning in children. Pediatrics 2002; 109: 9-10.
- Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. Diabetologica 1994; 37: 650-653.
- Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neuroscience 2000; 23: 542-549.
- 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: 335-339.
- Brown DR. Neurodegeneration and oxidative stress. Prion disease results from loss of antioxidant defence. Folia Neuropathol 2005; 43: 229-243.
- Suemori S, Shimazawa M, Kawase K, et al. Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47: 3975-3982.
- Piotrowski P, Wierzbicka K, Mieczyslaw S. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants Folia Neuropathol 2001; 39: 147-154.
- AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavusođlu H, Çađlayan Yeğen B (Çeviri Editörleri). 11. Baskı, İstanbul, Yüce Yayınları A.Ş & Nobel Tıp Kitapevleri, 2006: 875-876.
- Karuppagounder SS, Shi Q, Xu H, Gibson GE. Changes in inflammatory processes associated with selective vulnerability following mild impairment of oxidative metabolism. Neurobiol Dis 2007; 26: 353-362.
- Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. Diabetes Metab Res Rev 2008; 24: 371-377.
- Manzetti S, Zhang J, Van der Spoel D. Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. Biochemistry 2014; 53: 821-835.

25. Sheline CT, Choi DW. Cu²⁺ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 2004; 55: 645-6.
26. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood–brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372–2381.
27. Jago S, Salvert D, Renouard L et al. Tuberal hypothalamic neurons secreting the satiety molecule Nesfatin-1 are critically involved in paradoxical (REM) sleep homeostasis. *PLoS One* 2012; 12: 52525.
28. Oh I, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443:709–712.
29. Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul Pept* 2010; 159: 72-77.