

## Deneysel Araştırma

# Deneysel Diyabetik Ratarın Beyin Dokusunda İrisin İmmünreaktivitesi Üzerine Losartanın Etkileri

Ferhat BALGETİR<sup>a1</sup>, Nevin KOCAMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Patnos Devlet Hastanesi, Nöroloji, Ağrı, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, Elazığ, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Hiperglisemik metabolik bir hastalık olan Diabetes Mellitus (DM)'un, enerji metabolizmasında değişiklik yaptığı bilinmektedir. DM'un santral sinir sisteminde patolojik değişikliklere neden olduğu insanlarda ve deney hayvanlarında gösterilmiştir. Bu çalışmada deneysel DM oluşturulan sıçanların beyin dokusunda irisin ekspresyonu üzerine losartan'ın (LS) etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 18 adet ergin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 6 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. DM grubuna 50 mg/kg tek doz streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. DM+LS grubuna ise 50 mg/kg tek doz STZ i.p olarak verilmesinden sonra diyabetin oluşumunu takiben 10 mg/kg/gün LS oral olarak verildi. Deney sonunda sıçanlar servikal dekapitasyonla ötenazi edilip beyin dokuları çıkartılıp tespit edildi. Rutin histolojik takipler yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Beyin dokuları avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal irisin ekspresyonunun belirlenmesi için hazırlandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti esas alınarak histoskor oluşturuldu.

**Bulgular:** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İrisin immünreaktivitesi DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı. DM grubu ile karşılaştırıldığında ise irisin immünreaktivitesi DM+LS grubunda anlamlı olarak artmıştı.

**Sonuç:** Bu çalışma ile diyabetik beyin hasarı üzerine LS'nin nöronal alanlardaki irisin immünreaktivitesi aracılığıyla olumlu etkiler yapabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus, irisin, losartan, immünreaktivite, sıçan

### ABSTRACT

#### The Effects of Losartan on Immunoreactivity of Irisin on Brain Tissue of Experimental Diabetic Rats

**Objective:** Diabetes Mellitus (DM) is a hyperglycemic metabolic disorder that alters the energy metabolism. It was also observed that DM causes pathological changes on the central nervous system in both humans and experimental animal models. In this study; we aimed to investigate the effects of losartan (LS) on immunoreactivity of irisin on brain tissue of experimental diabetic rats.

**Material and Methods:** In this study; 18 adult male Wistar albino rats were used. Experimental rats were divided into 3 groups consisting 6 rats in each group. In the control group; the rats didn't receive any drugs during the 6 weeks of study period. In the DM group; 50 mg/kg single dose streptozotocin (STZ) was administered intraperitoneally (i.p). In the DM+LS group; 50 mg/kg single dose STZ was administered i.p and 10 mg/kg/day LS was started orally after the confirmation of DM. At the end of the experiment, all of rats were euthanized by cervical decapitation and brain tissues were removed and fixed. The brain tissues were processed to determine immunohistochemical localization of irisin by using avidin-biotin-peroxidase technique. Histoscore was created according to the diffusiveness and severity of immunoreactivity in assessment of immunohistochemical staining.

**Results:** There was a statistically significant decrease in the DM group in terms of irisin immunoreactivity compared to the control group. Irisin immunoreactivity was significantly increased in DM+LS group compared to DM group.

**Conclusion:** We can conclude that LS can improve diabetic brain damage with the help of irisin immunoreactivity located in neuronal areas.

**Key Words:** Diabetes Mellitus, irisin, losartan, immunoreactivity, rat

Günümüzde önemli bir sağlık sorunu haline gelen ve yaşam boyu süren Diabetes Mellitus (DM), akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini büyük ölçüde azaltan ve ekonomik olarak da önem arz eden kronik metabolik bir hastalıktır (1). DM, insülin sekresyonunun ve/veya insülin reseptör aktivitesinin azalmasına bağlı olarak gelişen hiperglisemi ve bunun sonucunda oluşan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluğuna sebep olan sekonder, metabolik bir hastalıktır (2). Hücre sel

düzeyde değerlendirildiğinde, diyabetik hayvanların santral sinir sistemlerine ait hücrelerin çekirdek şekillerinde ve kromatin görünümünde bozulmalar olduğu, mikrotübül sayılarının arttığı, endoplazmik retikulumlarında genişleme, parçalanma ve degranülasyon olduğu bildirilmiştir (3). Diyabetik hastalarda hem akut, hem de kronik metabolik ve vasküler bozukluklar beynin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar verebilir (4). Mitokondriyal zar proteinlerinden eşleşme bozucu proteinler (UCP)

<sup>a</sup>Yazışma Adresi: Dr. Ferhat BALGETİR, Patnos Devlet Hastanesi, Nöroloji, Ağrı, Türkiye

Tel:0424 05334800994

Geliş Tarihi/Received: 20.04.2016

e-mail: ferhatbalgetir@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 10.05.2016

hücrel enerji oluşumunda kilit rol oynar. Artan UCP1 ekspresyonu adenozin trifosfat (ATP) sentezini engelleyerek, enerjinin ısı oluşumu şeklinde açığa çıkmasına neden olur. Mitokondri iç zarı üzerinde yer alan ve mitokondriyal anyon taşıyıcı proteinlerin bir kısmını oluşturan UCP'ler bu süreçte etkin rol alırlar (5). Bilinen en önemli fizyolojik rolü, beyaz yağ dokudan kahverengi yağ doku gelişimini sağlamak olan irisin, enerji deposu olarak bilinen beyaz yağ doku seviyesini azaltıp enerji açığa çıkmasını sağlar. İrisin bu farklılaşmayı başta UCP1 olmak üzere diğer kahverengileşmeyi sağlayan proteinlerin düzeylerini arttırarak gerçekleştirir. Bu sebeple gelecekte obezite ve diyabet başta olmak üzere birçok metabolik hastalığın tedavisinde umut vaat eden bir ajan olarak öngörülmektedir (6). DM'nin sık görülmesi, hastalığın ya da sebep olduğu komplikasyonlarının tedavisinin kesin olarak yapılamaması ve tedavi maliyetlerinin yüksekliği araştırmacılar için diyabeti cazip bir konu haline getirmiştir. Bir anjiyotensin tip 1 (AT1) reseptör antagonisti olan losartanın infarkt alanını azaltıp, ventriküler fonksiyonları iyileştirdiği, kalp hücrelerinde apoptozisi inhibe ederek koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (7). Normalde hipertansif ratlarda eNOS aktivitesi azalırken losartan azalması durumunda böbrek eNOS aktivitesinin azalmadığı tespit edilmiştir (8). Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde bir antihipertansif olan losartanın, beyin dokusunda irisin ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) birimi ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı laboratuvarında yapıldı. Çalışmada FÜDAM'dan temin edilen 18 adet, Wistar albino cinsi 8-10 haftalık erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 3 eşit gruba ayrıldı.

**Kontrol grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara deney süresi olan 6 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

**DM grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürülerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi.

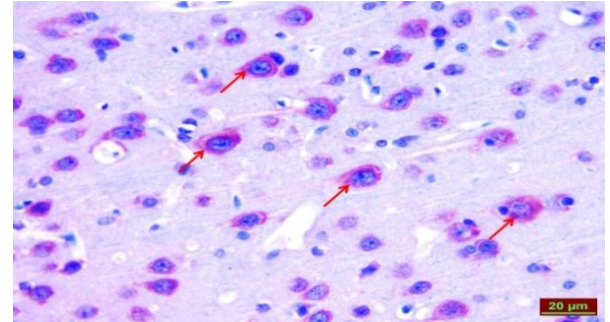
**DM + LS grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda çözülürülerek i.p olarak verilmesinden sonra oluşan diyabeti takiben losartan 10 mg/kg/gün oral olarak uygulandı.

Altı haftalık deney sonunda tüm gruptaki sıçanlar ketamin (75 mg/kg)+xylazine (10mg/kg) anestezisi altında dekapite edildikten sonra hızla çıkartılan beyin dokuları % 10'luk formaldehitte tespit edilip rutin

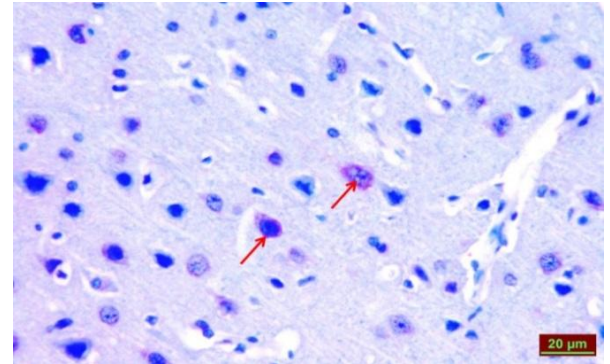
histolojik doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulanarak immünohistokimyasal olarak irisin (Rabbit Irisin primary antibody, H-067-17, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA) ekspresyonu belirlendi. Pozitif kontrol için sıçan kalp dokusu kullanıldı. Boyanan preparatlar Olympus BH2 fotomikroskopla incelenip fotoğraflandı. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin 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 histoskor oluşturuldu (histoskor = yaygınlık x şiddet). Elde edilen veriler ortalama standart sapma olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler SPSS version 21 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirmede Kruskal-wallis, grup içi değerlendirmede Mann Whitney U testi kullanıldı.

## BULGULAR

İrisin immünreaktivitesi için yapılan boyamanın ışık mikroskop ile incelenmesi sonucunda; kontrol grubu (Şekil 1) ile karşılaştırıldığında irisin immünreaktivitesi DM grubunda (Şekil 2) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştı (p<0.05). DM grubu ile karşılaştırıldığında ise irisin immünreaktivitesi DM+LS grubunda (şekil 3,4) anlamlı olarak artmıştı ve kontrole benzer izlendi (p<0.05). Tüm gruplara ait irisin immünreaktivitesine ait histoskor Tablo 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda irisin immünreaktivitesi



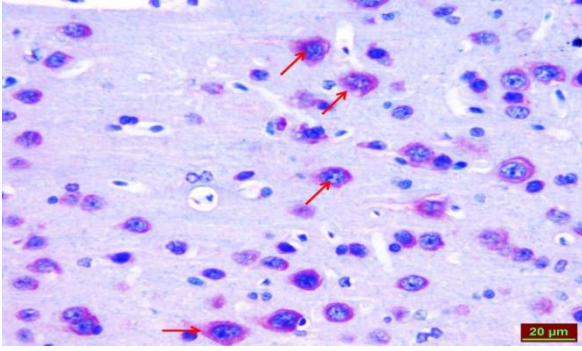
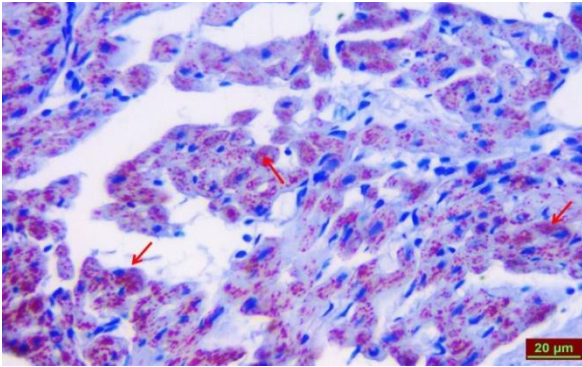
Şekil 2. DM grubuna ait beyin dokusunda irisin immünreaktivitesi

**Tablo 1.** Histolojik skor.

	İrisin immünreaktivitesi
<b>KONTROL</b>	0.40±0.07
<b>DM</b>	0.15±0.08 <sup>a</sup>
<b>DM+LS</b>	0.42±0.11 <sup>b</sup>

*a* Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

*b* DM grubuna göre karşılaştırıldığında,  $P < 0.05$

**Şekil 3.** DM + LS grubuna ait beyin dokusunda irisin immünreaktivitesi**Şekil 4.** İrisin pozitif kontrol.

## TARTIŞMA

Günümüzde yaşam şartlarındaki hızlı değişime bağlı olarak dünya genelinde hızla artan, yüksek mortalite ve morbiditeye sahip kronik bir hastalık olan diabetes mellitus (DM), aynı zamanda insülin eksikliği ya da insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile karakterize endokrin ve metabolik bir hastalıktır (9). DM kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumu olarak da tanımlanmaktadır (10). Oksidatif stres vasküler hastalıkların oluşmasına neden olmakla birlikte diyabeti takiben oluşan oksidatif strese bağlı organ hasarı (karaciğer, böbrek, pankreas) geliştiği gösterilmiştir. Diyabetli hastaların hepatositlerinde serbest radikallerin artışına bağlı olarak hepatosellüler karsinom insidansının artmış olduğu bildirilmektedir (11). STZ ile diyabet oluşturulan sıçan dokularındaki malondialdehid seviyelerinin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, artan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna paralel olarak istatistiksel bir

şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir (12). Diyabetin, akut serebral iskemik hasarın alevlenmesine neden olduğu bilinmektedir. Önceki çalışmalar geçici serebral iskeminin neden olduğu enfarktüs hacimlerinin diyabetik sıçanlarda, diyabetik olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir (13). İskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarının patofizyolojik mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamakla birlikte aşırı serbest radikal üretimi, hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon dengesizliği, renin-angiotensin sistemi, nötrofil, trombositler ve kompleman sisteminin reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (14).

Anjiyotensin 1 reseptörlerinin; hücre proliferasyonu, vazokonstriksiyon, apoptozis, hücre hipertrofisi, antinatriürezis, süperoksit üretimi, kollajen sentezi, endotelin salınımı, lipid peroksidasyonu, adezyon molekül yapımı, vasküler matriks genişlemesi ve sempatik aktivasyon gibi etkileri vardır (15). AT1 reseptör blokörlerinin ise dokular üzerinde; vazodilatatör, hemodinamik ve nörohormonal olarak yararlı etkileri bulunmaktadır (16). Losartan, ilk tespit edilen AT1 reseptör antagonisti olup yüksek selektivitesinden dolayı AT1 reseptör antagonistleri için bir prototip olmuştur (17).

İrisin, egzersiz uyarısı ile kaslardan salınan yağ hücrelerindeki yağ oksidasyonunu etkileyerek termoregülasyonu düzenleyen peptid yapıda bir hormondur. Kas ile yağ dokusu arasındaki iletişimde görev alan bu peptidin insülin direncinde ve enerji metabolizmasında etkili olduğu gösterilmiştir (6).

Son immünohistokimyasal çalışmalar, sıçan ve fare beyincisindeki Purkinje hücrelerinin irisin ekspresine ettiğini ortaya koymuştur (18). İrisinin parkinson ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklar üzerinde egzersizin olumlu etkilerine de aracılık edebileceği düşünülmektedir (19). Egzersizin etkisi ile beyaz yağ dokusu, kahverengi yağ dokusuna farklılaşarak metabolik aktivitesini arttırdığı ve bu durumun enerji balansını harcama yönünde değiştirerek kilo kontrolünde ve glukoz metabolizmasında iyileşmeyi sağladığı bildirilmiştir (20). Mitokondri iç zarı üzerinde bulunan ve mitokondriyal anyon taşıyıcı proteinlerin bir bölümünü oluşturan UCP'ler, başta ATP sentezi olmak üzere, insülin sekresyonu, glukoz ve lipid metabolizması, adaptif termogenez, mitokondriyal biyogenez, sinaptik iletim, nöronal farklılaşma, nöronal dejenerasyon, ROS üretimi ve hormon sekresyonu gibi birçok fizyolojik süreçte rol alırlar. Termojenik bir peptid olarak tanımlanan irisin, beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşümünü UCP1 ekspresyonunu artırarak gerçekleştirmektedir (21). Dolayısıyla irisin dokular üzerinde olumlu etkilere aracılık eden süreçlerde önemli rollere sahiptir.

Bu çalışmada, diyabetik sıçan beyin dokularında irisin immünreaktivitesi azalmış olarak tespit edilmiş olup bu bulguların, litaretür bilgilerine uygunluk arz ettiği görüldü.

Diyabetik beyin dokusunda meydana gelen iskemik ve oksidatif strese bağlı gelişebilen hasarı azaltacak olumlu etkilerinin olduğu bilinen losartan uygulanan sıçan beyin dokularında ise irisin immünreaktivitesi anlamlı bir şekilde artmış bulundu. Losartanın vazodilatatör ve hemodinamik olarak direkt etkileri yanında, antiapoptotik ve antioksidan etkilerini indirekt olarak irisin gibi hormonlar aracılığıyla yapabileceği ve diyabetik beyin hasarı üzerinde olumlu

etkiler oluşturabileceği düşünülmüştür. Mevcut bilgiler doğrultusunda irisinin UCP'ler aracılığıyla nöronal hücrelerde mitokondriyal fonksiyonlarda, nöronal farklılaşmada, nörogenez ve nörodejenerasyonda etkin rol oynayabileceği yönünde kanaat oluşmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma ile losartanın hem direkt hem de indirekt olarak irisin üzerinden etki ederek diyabetik beyin hasarı üzerine olumlu etkiler yapabileceği ve irisinin de sadece obezite ve diyabette değil, aynı zamanda nöronal alanlardaki fizyolojik ve moleküler bir takım süreçlerde de etkin rol oynayabileceği kanaatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Yeğin SÇ, Mert N. Deneysel Olarak Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda hba1c, mda, gsh-px ve sod miktarlarının tayini. YUU Veteriner Fakültesi Dergisi 2013; 24: 51-4.
- Heydari I, Radi V, Razmjou S, Amiri A. Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. International Journal of Diabetes Mellitus 2010; 2: 61-63.
- Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. Eur J Pharmacol 2004; 490: 187-97.
- Gispén WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neuroscience 2000; 23: 542-49.
- Echtay K.S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? Free Radic Biol Med 2007; 43: 1351-71.
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature 2012; 481: 463-8.
- Gerald B, Appel AS. Role in Hypertension, Cardiovascular Disease and Renoprotection Progress in Cardiovascular Diseases 2004; 47: 105-15.
- Cavanagh EM, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Insera F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. Am J Hypertens 2010; 23: 1318-25.
- Erukainure OL, Ebuehi OAT, Adeboyejo FO, Aliyu M, Elemo G. Hematological and biochemical changes in diabetic rats fed with fiber-enriched cake. J Acute Medicine 2013; 3: 39-44.
- Akkaya H, Çelik S. Ratlarda diyabet öncesi ve sonrası oksidan-antioksidan durum. FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg 2010; 24: 5-10.
- Çarlıoğlu A, Akdeniz D, Alkan R ve ark. Diyabetik ratlarda karaciğer, böbrek ve pankreas hasarında zofenoprilin etkisi. Turk Neph Dial Transpl 2014; 23: 118-24.
- Zhou QX, Liu F, Zhang JS, Lu JG, Gu ZL, Gu GX. Effects of triterpenic acid from *Prunella vulgaris* L. on glycemia and pancreas in rat model of streptozotocin diabetes. Chin Med J 2013; 126: 1647-53.
- Iwata N, Takayama H, Xuan M, et al. Effects of Etanercept against Transient Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International 2015;10: 10-1.
- AL Moens, MJ Claeys, JP Timmermans, CJ Vrints. Myocardial ischemia / reperfusion - injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. International Journal of Cardiology 2005; 100: 179-90.
- Schuijt MP, Basdew M, Van Veghel R, et al. AT receptor-mediated vasodilation in the heart: effect of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281: 2590-6.
- Vander A, Sherman J, Luciano D. Human Physiology. Circulation 2001; 14: 389.
- Van Rijinsover EW, Kwee-Zuiderwijk WJ, Feenstra J. Angioneurotic edema attributed to the use of losartan. Arc Intrem Med 1998; 158: 2063-5.
- Dun SL, Lyu RM, Chen YH, Chang JK, Luo JJ, Dun NJ. Irisin-immunoreactivity in neural and non-neural cells of the rodent. Neuroscience 2013; 240: 155-62.
- Mattson MP, Mark P. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. Cell Metabolism 2012; 16: 706-22.
- Dunstan D. Exercise and T2DM-move muscles more often. Nat Rev Endocrinol 2014; 7: 189-90.
- Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? Free Radic Biol Med 2007; 43: 1351-71.