

DİABETİK RATLARDA N-ASETİL GLİKOZAMİN EKSPRESYONU VE LOKALİZASYONU

EXPRESSION AND LOCALIZATION OF N-ACETYL GLUCOSAMINE IN DIABETIC RATS

Sabri Fatih Kurşunlu¹, Ayşegül Bildik¹, Hasan Akşit², Kamil Seyrek³

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye, ²Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye, ³Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

Yazışma Adresi:

Sabri Fatih Kurşunlu
Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Aydın – Türkiye
E posta: kursunlufatih@hotmail.com
Kabul Tarihi: 22 Ekim 2012

Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi
ISSN: 2146-9601
e-ISSN: 2147-2238

bsbd@balikesir.edu.tr
www.bau-sbdergisi.com

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada diabetik ratlarda diş eti dokusu gingiva da WGA Lektinin lokalizasyonu ve ekspresyonunun araştırılması amaçlandı.

YÖNTEMLER: Toplam 20 adet Wistar dişi sıçan iki gruba ayrıldı ve incelendi. 10 adet sıçan kontrol grubu olarak seçilirken kalan 10 adet sıçan ise diyabetik deney grubu olarak çalışıldı. Yirmi bir günlük deney süresinden sonra sıçanlar dekapitasyon yöntemi ile öldürüldü. Diş eti dokusundan 6 µm inceliğindeki kriostat kesitler alındı. Gruplar N-Asetil Glikozamin'e spesifik (WGA Triticum vulgare agglutinin) lektini kullanılarak histokimyasal olarak incelendi.

BULGULAR: Çalışmamızda WGA kullanılarak yapılan boyamalarda, her iki grupta boyanmanın gerçekleştiği ve kontrol grubunda boyanma deney grubundakilerine oranla daha fazla olduğu görülmüştür.

SONUÇ: Diş eti kas dokusunda bulunan glikoproteinlerin N asetil glikozamin ünitelerine spesifik lektinle yapılan histokimyasal boyamalar sonucunda diabetli dokularda; kontrollere göre N asetil glikozamin ünitelerine bağlanmanın daha düşük olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, periodontal hastalık, lektin, gingiva

SUMMARY

OBJECTIVE: In this study, the WGA lectin gingival gum tissue in diabetic rats to investigate the localization and expression.

METHODS: A total of 20 Wistar female rats were divided into two groups. The remaining 10 rats were selected as a control group of 10 rats in the experimental group were diabetic. Twenty-one days after the experimental period, the rats were killed by decapitation method. Six-µm thick cryostat sections that were obtained from the gingiva of all rats were examined by histochemical staining. Groups were analyzed histochemically using N-Acetyl Glucosamine specific (Triticum vulgare agglutinin WGA) lectin.

RESULTS: In this study using WGA staining, staining occurred in both groups and the control group was more staining than the experimental group was observed.

CONCLUSION: Glycoproteins in the muscle tissue of the gum as a result of histochemical staining with lectin that specific N acetyl glucosamine units, connecting to N acetyl glucosamine units diabetic tissues were lower compared to the control.

Keywords: Diabetes mellitus, periodontal disease, lectin, gingiva

GİRİŞ

Diş eti dokusu gingiva, dişe ve alveol kemiğinin periosteumuna sıkıca tutunmuş bağ dokusu tabakasıdır. Gingiva, gingival mukoza ve bağlantı epiteli olmak üzere iki bölümden oluşur. Epitel ile altında uzanan lamina propria arasında çok sayıda bağ dokusu papillaları bulunur. Larnina propria kollajen liflerden zengin sıkı bir bağ dokusudur. Bağlantı epiteli kemiğe sıkıca tutunur. Hücreler ile bu materyal arasında hemidesmozomlar yer alır. Böylece çok sıkı bir bağlantı gerçekleşmiş olur¹.

Periodontitis, alveol kemiği, sement ve periodontal ligament gibi diş destek dokularının kronik iltihabıdır ve şeker hastalığının komplikasyonlarından olduğu artık araştırmacılar tarafından kabul görmektedir. Periodontal infeksiyonların sadece periodontiyumda lokalize olduğu ileri sürülmüşse de günümüzde bu görüş değişmiştir². Diyabet periodontal sağlığı olumsuz yönde etkilerken, periodontal infeksiyonların da glisemik kontrolü olumsuz etkilediği bilinmektedir. Stres, puberte, menstruasyon ve hamilelik dönemlerindeki hormonal değişiklikler

periodontal kapiller permeabilite ve subjinjival florayı değiştirir ve PH gelişimini artırmaktadır³. Diabete bağlı olarak periodontal dokularda ortaya çıkan metabolik bozukluklar ve mikroanjopatiler doku direncini olumsuz yönde etkilemektedir^{4,5}. Periodontal hastalıkların diyabet üzerine etkisini araştıran çalışmalar, ilerlemiş periodontal hastalıkların zayıf glisemik kontrol ve diğer sistemik komplikasyonlarla (kardiovasküler hastalık ve ölüm oranı, proteinüri ve nefropati) ilişkili olduğunu göstermiştir⁶. Bir çalışmada şiddetli periodontiti olan diyabetik vakalarda periodontiti olmayan diyabetik vakalara kıyasla glisemik kontroldeki kötüleşme riskinin 6 kat arttığı gözlenmiştir. Diyabetik bireylere uygulanan periodontal tedavinin glisemik kontrolde iyileşme sağlayabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır^{6,7}. Kontrol altında olmayan diyabetik bireyde yürütülen bir çalışmada, periodontal tedavi ve sistemik antibiyotik tedavisinin diyabetin kontrolü üzerine etkileri değerlendirilmiştir⁷. Periodontal hastalık ve diyabet arasındaki ilişki, uzun yıllardan beri araştırılmış ve genel olarak da periodontal hastalığın diyabetlilerde, non-diyabetlilere göre daha sık ve şiddetli olarak seyrettiği bildirilmiştir. Bu güne kadar diyabetli ratların diş eti dokusundaki glikokonjugatların yapılarında ve lokalizasyonunda bir değişimin olup olmadığı konusunda bir çalışma yapılmamıştır. Glikokonjugatların belirlenmesi amacıyla *Triticum vulgare* (WGA) lektinleri kullanıldı ve bu konudaki eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma da toplam 20 adet Wistar dişi sıçan iki gruba ayrıldı ve incelendi. 10 adet sıçan kontrol grubu olarak seçilirken kalan 10 adet sıçan ise diyabetik deney grubu olarak çalışıldı. Çalışmanın hayvanlar üzerinde gerçekleştirilebilmesi amacıyla ADÜ-HADYEK'ten gerekli izinler 16.06.2009 tarihinde alınmıştır (No: B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2009/025). Deneye başlamadan önce hem kontrol hem de deney grubunda bulunan bütün sıçanların açlık kan glikoz düzeyleri belirlendi. Sıçanlarda diyabet oluşturmak için; 0,01 M sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) içinde streptozotisin (572201, Calbiochem) 50 mg/kg intraperitoneal olarak deney grubuna (n=10) tek doz enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara deney grubuna benzer şekilde aynı oranda 0.01 M sodyum sitrat tamponu intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyonu takiben 21 gün sonra

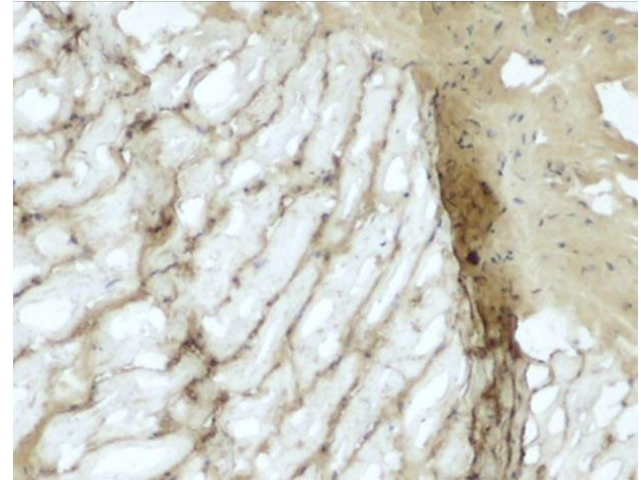
hayvanlar 12 saat süre ile aç bırakıldı ve tekrar serum glikoz düzeyleri ölçüldü. Kan glikoz düzeyi kontrol grubunda ort. 182.5±33.6 mg/dl, deney grubunda 367,7±41 mg/dl olarak bulunmuştur. Deneme grubundaki bütün hayvanların diyabetli olduğu belirlendikten sonra (kan glikoz düzeyi > 300mg/dl) ratlara hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı.

Histokimyasal Analiz: Ötenazi uygulanan ratların diş etlerinden örnekler alındı ve bu dokular -20°C'de muhafaza edildi. 6 µm inceliğindeki kriostat kesitler alındı. Kesitler, % 1'lik paraformaldehid (PBS, pH 7.4) içinde 10 dakika süre ile oda ısısında tespit edildi. Takiben iki kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Peroksidaz aktivitesini bloke etmek için 30 dakika süre ile H₂O₂'nin metanol içerisindeki %2'lik solüsyonunda bırakıldı. PBS (10 mM, pH 7.4) ile 10 dakika yıkanacak olan kesitler, spesifik olmayan bağlanma noktalarını bloke etmek için %2'lik sığır albumini (BSA, Sigma) çözeltisinde 30 dakika süre ile inkübe edildi. Üç defa beşer dakika PBS'de yıkanan dokular biotin ile işaretlemiş WGA lektin ile inkübe edildi.

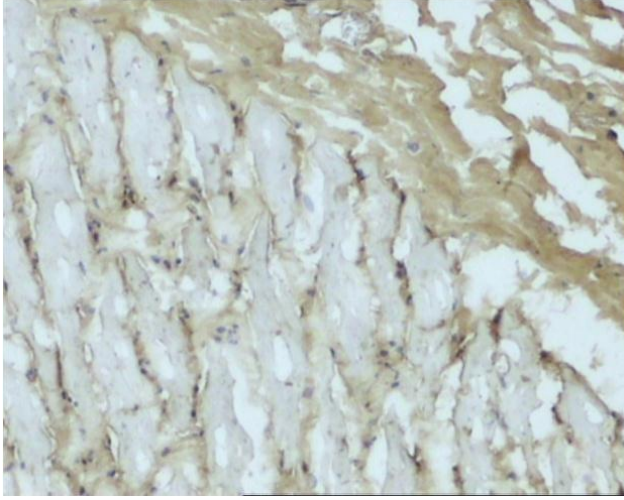
BULGULAR

N-asetilglikozamin ünitelerine spesifik bir lektin olan WGA kullanıldığında hem kontrol grubundaki hem de deney grubunda ki dokuların N-asetilglikozamin ünitelerinin çok yoğun olmamakla birlikte bağ dokusunda var olduğunu ortaya koymuştur. WGA kullanılarak yapılan boyamalarda kontrol grubu (Şekil 1) deney grubundakilerine (Şekil 2) oranla daha fazla olduğu görülmüştür.

Şekil 1. Kontrol grubu - WGA lektin ile boyanmış kas hücre membranları ++ pozitiflik. 10 µm.



Şekil 2. Deney grubu – WGA lektin ile boyanmış kas hücre membranları + pozitiflik. 10 µm.



TARTIŞMA

Lektinler karbonhidrat bağlayan proteinlerdir, en az iki şeker bağlama bölgesi içerirler, enzimatik aktivite göstermezler ve insan, bakteri veya bitki kaynaklı olabilirler Genellikle çeşitli epitellerdeki glikokonjugat dağılımları^{8,9}, gelişim ve farklılaşma üzerine çalışmalarda kullanılırlar¹⁰. Lektinlerle ilgili çok fazla sayıda çalışma olmasına rağmen diş eti dokusu, diyabet ve lektinler arasındaki ilişkiler hakkında çalışma yok denecek kadar azdır, özellikle yapılan literatür araştırmalarında diyabetik hastaların diş eti dokusunun lektinlerle olan ilişkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Periodontal hastalığın başlangıcını, ilerleyişini ve şiddetini etkileyen hastalıkların başında diyabet gelmektedir¹¹. Diyabetle birlikte, periodontal dokularda vasküler değişiklikler meydana gelmektedir. Oral mikrofloradaki değişiklikler, kollajen üretiminde azalma ve kollajenaz aktivitesinde artış sonucu periodontal dokulardaki yıkım artmaktadır¹². Periodontitisli bireylerin dişeti dokularında lenfosit ve makrofajların baskın olduğu yoğun inflamatuvar hücre varlığı gösterilmiştir¹³. Diyabetin periodontitis gibi bakteriyel infeksiyonlar için yüksek risk grubu olduğu bilinmekte ve periodontitis ile diyabet arasındaki ilişki uzun yıllardan beri birçok araştırma için konu oluşturmaktadır^{4,14}. Hatta periodontal hastalıklar diyabetin komplikasyonu olarak kabul edilmiştir. Diyabetin, bireylerde nasıl bir değişim yaparak periodontal hastalık için yatkınlık oluşturduğu hala merak konusu olmaya devam etmektedir. Bu anlamda nötrofil kemotaksisi, fagositoz gibi konak cevabında gözlenen

önemli bazı dejenerasyonların periodontitis görülme sıklığı ve şiddetinin artmasında etkili olduğu bulunmuştur^{5,16}. Her geçen gün yeni veriler elde edilmekte, diyabet ve periodontitis ilişkisi ile ilgili pek çok bilimsel yorum yapılmaktadır. Periodontitisin diabetli bireylerde daha şiddetli ve fazla oranda görülmesindeki mekanizmayı açıklamaya yönelik yapılmış çoğu klinik ve epidemiyolojik çalışma, iddia edilen bazı zıt görüşlere rağmen¹⁷, diabetli (Tip 1 ve 2) bireylerde diabetli olmayanlara göre daha yüksek oranlarda periodontitis gözlendiğini göstermektedir¹⁸. Ayrıca, kontrol altında olmayan diabetlilerde kontrol altındakilere göre daha yüksek oranlarda gingivitis ve periodontitis gözlenmektedir^{19,20}. Bampton ve ark.²¹ tarafından yapılan bir çalışmada 15 farklı lektin kullanılarak gingival epitelyum, sulkular epitelyum, bağ dokusu ve bazal membran ile olan bağlanma ilişkileri araştırılmıştır. N-Asetil Glikozamin'e spesifik WGA'nın gingival, sulkular ve bağ dokusu epitelyumunda pozitif olduğu belirlenirken bazal membranda negatif olduğu gözlenmiştir. WGA nında içinde olduğu yedi farklı lektin ile yapılan çalışmada sağlıklı ve iltihaplı insan gingiva dokularında iç ve dış gingiva dokusu üzerinde lektin bağlanmalarını gözlemlenmiştir, fakat herhangi bir farklı bulguya rastlanmamıştır²². Hormia ve Virtanen²³'in yaptıkları çalışmada WGA yı da içeren dört farklı lektin ile insan gingiva dokusu üzerine yaptıkları çalışmada bu lektinlerin bağlanması ile ilgili yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla paralel bulgular ortaya koymuştur. Diş eti bağ dokusunun WGA lektinleri ile bağlandığını görmüşlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ide M, McPartlin D, Coward PY, Crook M, Lumb P, Wilson RF. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol* 2003; 30(4): 334 -340.
2. Garcia R. Periodontal treatment associated with improved glycaemic control in type 2 diabetic patients. *J Clin Periodontol* 2005; 32(3):266-72.
3. Løe H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16:329-34
4. Mealey BL, Oates TW. Diabetes Mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006; 77:1289-303.
5. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006; 77:591-598.
6. Oliver RC, Tervonen T. Diabetes—a risk factor for periodontitis in adults. *J Periodontol* 1994; 65, 530-538.

7. Newcomb GN, Powel RN. Gingival langerhans cells. Human gingival langerhans cells in health and disease. *J Periodontal Res* 1986; 21: 640–652.
8. Murase N, Hosaka M, Takai Y. Histochemical demonstration of lectin-binding sites and keratin in inflamed human gingiva. *J Periodont Res* 1985; 20: 625. 14.
9. Virtanen I, Kariniemi AL, Holthöfer H, and Lehto VP. Fluorochrome-coupled lectins reveal distinct cellular domains in human epidermis. *J Histochem Cytochem* 1986;34:307–315.
10. Steffensen B, Lopatin DE, Caffesse RG, Hanks CT. Blood group substances as differentiation markers in human dento-gingival epithelium. *J Periodont Res* 1987; 22, 451–455,
11. Almas K, Lazzam S, Quadairi A. The effect of oral hygiene instruction on diabetic type 2 male patients with periodontal disease. *J Contemp Dent Pract* 2003; 15:24-35.
12. Kiran M, Arpak N, Ünsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2005;32:266-72.
13. Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H, Case D. Cell populations associated with active probing attachment loss. *J Periodontol* 1992; 63:748-752.
14. Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1994; 21(6):375-379.
15. Lamey PJ, Darwazeh AMG, Fisher BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992; 9:410-416.
16. Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetic patient. A case report. *J Periodontol* 1991; 62, 394-401.
17. Goteiner D, Vogel R, Deasy M, Goteiner C. Periodontal and caries experience in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 1986; 113(2):277- 9
18. Thorstensson H, Hugoson A. Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1993; May;20(5):352-8.
19. Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1994; 21(6):375-379.
20. Sasrowijoto SH, van der Velden U, van Steenbergen TJ, Hillemans P, Hart AA, de Graaff J, Abraham-Inpijn L. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol* 1990; Apr;17(4):233-42.
21. Bampton JLM, Shirlaw PJ, Topley S, Weller P, Wilton JM. Human junctional epithelium. Demonstration of a new marker, its growth in vitro and characterization by lectin reactivity and keratin expression. *J Invest Dermatol* 1991; 96:708-717.
22. Murase N, Hosaka M, Takai Y. Histochemical demonstration of lectin-binding sites and keratin in inflamed human gingiva. *J Periodont Res* 1985; 20: 625. 14.
23. Hormia M, Virtanen I, Saccharide residues in human gingiva as revealed with fluorochrome-coupled lectins. *Journal of Periodontal Research* 1989; 24, 2, 137–145.