



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2013; 27 (2): 81 - 85  
<http://www.fusabil.org>

Nevin KOCAMAN  
Tuncay KULOĞLU

Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji Embriyoloji  
Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

### Deneyel Diyabet Oluşturulan Sıçan Böbrek Dokularındaki iNOS ve PARP İmmünreaktivitelerinin Belirlenmesi

**Amaç:** Diyabetik nefropati, diabetes mellitusun önemli komplikasyonlarından biridir. Nitrik oksit (NO), diyabetteki hemodinamik değişikliklerde etkili olan çok fonksiyonlu bir mediatördür. Poli ADP riboz polimeraz (PARP) ise apoptotik süreç boyunca DNA tamirinde rol oynayan bir enzimdir. Bu enzimin proteolitik yıkımı DNA onarımını engeller ve apoptoze neden olur. Ancak aşırı aktivasyonunda apoptozis ile sonuçlanmaktadır.

Bu çalışmada, Streptozotosin (STZ) ile deneyel diyabet oluşturulan sıçan böbrek dokusunda indüklebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve PARP immünreaktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç Yöntem:** Çalışmada 14 adet erişkin Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar grup I (kontrol) ve Grup II (Diyabet) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Diyabet oluşturulan gruba 60 mg/kg tek doz STZ, 0.1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4.5) çözülürülerek intraperitoneal olarak uygulandı. Tüm gruplardaki sıçanlar 10 haftalık deney sonunda anestezi altında dekapite edilip, böbrek dokuları çıkarıldı ve ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehitte tepit edildi, parafin bloklar hazırlandı. 5 µm'lik parafin kesitlerde avidin-biyotin peroksidaz metodu uygulanarak iNOS ve PARP immünreaktivitesine bakıldı. İmmünreaktivitenin şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +3'e kadar skorlanıp semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** iNOS ve PARP ekspresyonlarını belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopik incelemesinde; iNOS ve PARP immünreaktivitesi kontrol grubunda +1 yaygınlığında iken diyabetik grupta, kontrol grubuyla kıyaslandığında oldukça yoğun idi ve +3 şiddet ve yaygınlığında tesbit edildi.

**Sonuç:** Bu çalışma ile diyabetik grup böbrek dokularındaki hasarlanmaya, apoptozis sürecinde etkili olan iNOS ve PARP'ın önemli bir katkı sağladığı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Diabetes mellitus, iNOS, PARP, böbrek, immünohistokimya.*

### Determination of iNOS and PARP Immunoreactivity in Rats Kidney Tissues With Experimentally Induced Diabetes

**Objective:** Diabetic nephropathy is an important complication of diabetes mellitus. Nitric oxide (NO) is an effective multifunctional mediator for hemodynamic variance in diabetes. PoliADP ribose polymerase (PARP) is an enzyme that has a role in DNA repairing during apoptotic processes. Excessive activation of PARP results in apoptosis. In this study, it was purposed to examine the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and PARP immunoreactivities in kidney tissues of experimental diabetic rats induced by Streptozotosin.

**Materials and Methods:** Total of 14 male Wistar Albino rats were used in this study. Rats were divided in to the two groups as group I (Control) and Group II (Diabetes). In the Diabetes group, a single dose of 60 mg/kg STZ, which is dissolved in phosphate-citrate buffer (pH: 4.5) was injected intraperitoneally. All rats in both groups were decapitated under anesthesia and kidney tissues were removed and fixed in 10% formaldehyde solution for light microscopic investigations at the end of the 10 weeks. Paraffin blocks were prepared and 5 µm tissue sections were cut and stained with avidin-biotin peroxidase method to analyse iNOS and PARP immunoreactivities. The severity and prevalence of immunoreactivities were evaluated semiquantitatively by scoring from 0 to +3.

**Results:** In the light microscopic examination, diabetic grup II showed prominent +3 iNOS and PARP immunoreactivity whereas immunoreactivities of control group I were less and +1.

**Conclusion:** Thus, we concluded that iNOS and PARP, influence on apoptotic process, have important contributions on kidney damage in the diabetic group.

**Key Words:** *Diabetes mellitus, iNOS, PARP, kindey, immunohistochemistry.*

Geliş Tarihi : 01.05.2013  
Kabul Tarihi : 14.06.2013

#### Yazışma Adresi Correspondence

Nevin KOCAMAN  
Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji Embriyoloji  
Anabilim Dalı,  
Elazığ-TÜRKİYE

[drnkocaman@gmail.com](mailto:drnkocaman@gmail.com)

## Giriş

Diyabet, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluk sonucu insülinin hedef dokularda etkisinin kaybı, insülin eksikliği yada her iki sebebin beraber etkisi sonucu meydana gelir. Son zamanlarda diyabet öncüsü olarak kabul edilen metabolik sendrom, insülin direnci ve bozulmuş açlık glukozu olarak adlandırılan klinik tabloların sanıldığından daha ciddi birer risk faktörü olduğunu göstermiştir (1). Pek çok hastalık gibi diyabette de akut faz protein seviyelerinin artması, makrofajların, T lenfositlerin ve mast hücrelerinin aktiflenmesi bu hastalıkların gelişiminde özellikle inflamasyonun önemli rol oynadığını düşündürmektedir (2). Diyabetin uzun dönem komplikasyonları sonucunda görme kaybı ile sonuçlanan retinopati; renal yetmezliğe gidebilen nefropati; ayak ülserleri ve amputasyonla sonuçlanan periferik nöropati; gastrointestinal, genitoüriner, kardiyovasküler semptomlara ve seksüel disfonksiyona neden olabilen otonom nöropati gelişebilmektedir (3). Bu komplikasyonlar içinde diyabetin en önemli hedef organlarından biri böbreklerdir. Böbrek yetmezliği, diyabete bağlı ölüm nedenleri arasında miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada bulunmaktadır (4). Diyabetik nefropatinin patofizyolojisinde hipergliseminin renal hücrelerde neden olduğu oksidatif stresin artması, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunun artması ve aşırı PARP aktivasyonu sayılabilmektedir (5-6).

Hücre içi glikoz konsantrasyonlarındaki artış, glikozun heksozamin yolağına geçmesine ve diyabetin pek çok komplikasyonunun oluşumuna neden olabilmektedir. Hiperglisemi sonucu heksozamin yolağının hız sınırlayıcı enzimi olan glutamin fruktoz-6 fosfatamidotransferaz'ın aktivitesinin artması, daha fazla fruktoz-6 fosfat üretimine yol açmaktadır (6). Fruktoz-6 fosfat seviyelerinin artışı ve mitokondri iç zarında elektrokimyasal gradiyentin bozulması, hiperglisemiyle indüklenen mitokondrial superoksit yapımının artmasına ve gliser aldehit fosfat dehidrogenaz enziminin inhibisyonuna yol açar (6, 7). ATP sentezinin azalmasına neden olan bu durum, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu artırır. iNOS normal şartlar altında dokularda bulunmaz ve sadece patolojik süreçlerde tespit edilebilir. Transkripsiyonel seviyede kalsiyumdan bağımsız şekilde sentez edilir. Bazı proinflatuar uyarılar iNOS üretimini tetikleyebilirler (8). NO ile reaksiyona giren superoksit radikali, peroksinitrit (ONOO-) oluşturur. Aşırı superoksit üretimi, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesini azaltıp iNOS ekspresyonunu artırır. Bu durum peroksinitrit oluşumuna sebep olur. NO'dan çok superoksit üretimi, DNA yı tahrip eder. Hem DNA'nın harabiyeti hem de aşırı mitokondrial serbest oksijen radikali (SOR) üretimi PARP'ın aktivasyonuna yol açar. Bu durum hücre içi NAD+'nin konsantrasyonunu azaltarak glikoliz hızını, elektron transportunu ve ATP üretim hızını yavaşlatır (7). Tüm bu olaylar hücreyi ölüme götüren patofizyolojik mekanizmaların başlamasına neden olur. PARP aynı zamanda Ca/Mg'ye bağlı ve DNA onarımında rol oynayan Endonükleazları da inhibe

ederek hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (9). Birbiri ile bağlantılı tüm bu olaylar diyabetik komplikasyonlarının gelişiminde önemli rol oynarlar (7).

Bu çalışmada, oksidatif stres artışı ve apoptoz nedeniyle böbreklerde hasar oluşumuna neden olan diyabetin, bu süreçte rolü olan iNOS ve PARP'ın ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada erişkin, Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. 21 °C oda ısısında 12 saat ışık (7:00–19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00–7:00) tutulan sıçanlar her gün altları temizlenen kafeslerde tutuldular. Tüm sıçanlar aynı ortamda standart sıçan yemi verilerek ad libitum olarak beslenmeye tabi tutuldular. Denekler her biri 7 sıçan içeren 2 gruba ayrıldı. Denek sayıları, literatür bilgilerine dayanılarak ayarlandı.

Grup I; Kontrol grubu (n=7),

Grup II; Diyabet grubu (n=7).

Kontrol grubuna (Grup I) deney süresince hiçbir uygulama yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

Diyabet grubuna (Grup II) 60 mg/kg Streptozotisin (Sigma Chemical Co Louis Missouri) 0.1 M Fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4.5) çözülerek tek doz olarak, intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulandı. 72 saat sonra (son 12 saat aç bırakılan), kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dL'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

10 hafta boyunca her iki gruptaki deneklerin bakımı yapıldı ve deneyin sonunda tüm sıçanlar i.p. yolla ketamin (75 mg/kg)+xylazine (10 mg/kg) uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyon ardından sıçanların böbrek dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edildikten sonra doku takip işleminden geçirildi ve histokimyasal incelemeler için parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5–6 mm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antijen geri kazanımı için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika tutuldu. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, LabVision Corporation, USA) solüsyonu ile muameleden sonra primerler (iNOS rabbit poliklonal NOS2 antibody SC-651 Santa Cruz Biotech, USA) (Mouse monoklonal PARP-1 antibody SC-74470 Santa Cruz Biotech, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (30 dakika) (biotinylated Goat Anti-Poliyalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA), Streptavidin Alkaline Phosphatase (30 dakika) (TS-060-AP, LabVision Corporation, USA) ve Fast Red Substrate System (TA-

125-AF, LabVision Corporation, USA) ile inkübe edildi. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS (Phosphate Buffered Saline) ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 ışık mikroskopunda incelenip fotoğraflandı.

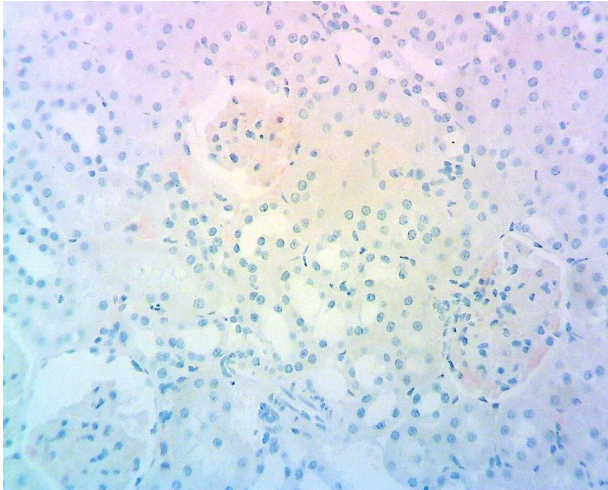
İmmünohistokimyasal boyanma değerlendirilirken intrastoplazmik boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar skorlanarak semikantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

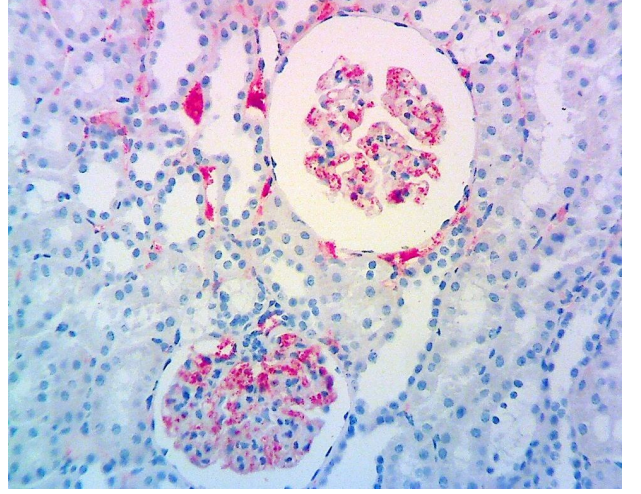
Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

### Bulgular

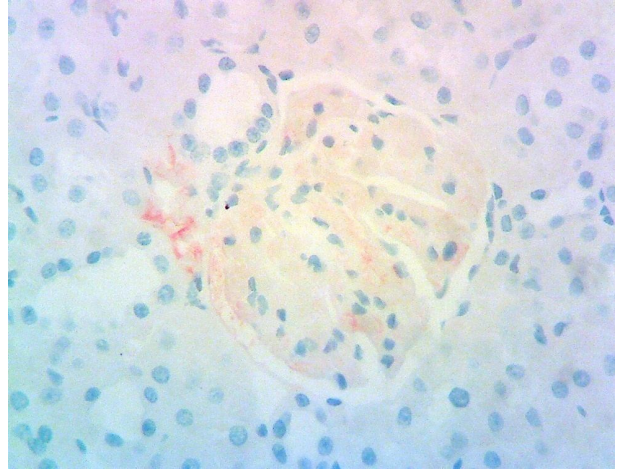
iNOS ve PARP immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; iNOS ve PARP immünreaktivitesi kontrol grubunda böbrek dokusunda sadece glomerüllerde gözlenirken proksimal, distal ve toplayıcı tübüllerde izlenmedi. Glomerüllerdeki boyamanın yaygınlığı ve şiddeti +1 olarak değerlendirildi (Şekil 1-3). Kontrol grubu ile diyabet grubu arasında iNOS ve PARP immünreaktivitesinin lokalizasyonunda bir farklılık yoktu. Ancak immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunda glomerüllerde +3 yaygınlığı ve şiddetinde gözlendi (Şekil 2-4).



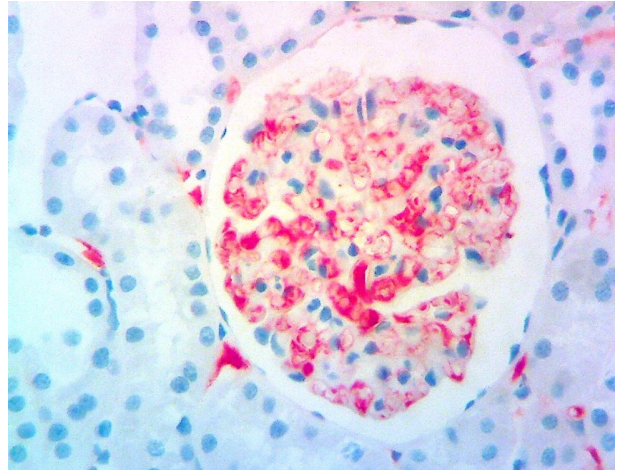
**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında iNOS immünreaktivitesi x200



**Şekil 2.** DM grubuna ait böbrek dokusunda +3 yaygınlığında iNOS immünreaktivitesi x200



**Şekil 3.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda +1 yaygınlığında PARP immünreaktivitesi X400



**Şekil 4.** DM grubuna ait böbrek dokusunda +3 yaygınlığında PARP immünreaktivitesi X400

## Tartışma

Diabetes mellitus; hiperglisemi, dislipidemi, glikozüri ve bunlara eşlik eden bir grup metabolik bozukluğu içine alan kronik bir hastalıktır (10). Makroanjiyopatik ve mikroanjiyopatik komplikasyonları olup mikroanjiyopatik komplikasyonlar; nefropati, retinopati ve nöropati olarak gruplandırılabilir (5). Diyabetik nefropati (DN); diyabetin geç bir bulgusu olmakla beraber, DN gelişmeden önce fizyolojik, patolojik ve klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır (11). Hücre içi glikoz konsantrasyonundaki aşırı artış, glikozun heksozamin yolağına geçmesine ve sonuçta diyabetin pek çok komplikasyonunun oluşmasına neden olabilmektedir (6). Hiperglisemi, serbest oksijen radikallerinin oluşum hızını artırırken, koruyucu antioksidan sistemlerin kapasitesini düşürür. Bu durum diyabete bağlı komplikasyonların oluşumu üzerinde etkili olabilir (12). Böbrek tübüllerinde görülen glikojen birikimleri, hücre ölümüne kadar gidebilen hasarların oluşumunda etkili olabilir (13). Diyabetik nefropati, böbreğin bütün bölümlerini kapsayan yapısal değişiklikleri içerir, fakat en karakteristik değişiklikler glomerüllerde saptanmıştır (14). Diyabetik nefropatinin erken dönemlerinde; glomerül ve tübüllerde hipertrofi, tübüler vakuolizasyon, glomerül ve tübül bazal membranlarında kalınlaşma, glomerüllerde mezangial matriks ve hücre artışı gibi histopatolojik değişikliklerin geliştiği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (15). Deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabet hastalarında oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir (16). STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulmuş bir çalışmada; glomeruler yumağın düzensiz bir görünüm alması, kapillerin genişlemesi, lökosit ve eritrosit birikimlerinin oluşumu gibi patolojilerin iNOS'un artması neticesinde oluştuğu sonucuna varılmıştır (17).

Hücre ile peritübüler mesafe arasında iyon taşınmasında çok fazla değişiklik olması, bazal membran genişlemelerine; hücrede enerji için gerekli olan ATP'nin azalması ise mitokondriyal bozulmalara neden olmaktadır (18). Böbrek tübüllerinde, özellikle proksimal tübülde, STZ ve sitokinlerin iNOS'u artırması, böbrek dokularındaki pek çok patolojik değişikliğin NO ile ilgili olabileceğine işaret etmektedir (13). Apoptozis sürecinde kaspazlar önemli bir yer tutmakta ve pek çok hücrede

inaktif proenzim formunda yaygın bir şekilde bulunmaktadırlar. Ancak bir kez aktive olduklarında bir proteaz kaskadının başlamasına izin veren diğer prokaspazları aktive edebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskat, apoptotik sinyal yollarını uyararak hücrelerin hızlı bir şekilde ölümüne neden olur. Kaspazlar spesifik olarak, bir Asparajin rezidüsü için mutlak gerekli substratlarında bir tetrapeptid sekansını tanıyarak parçalar. Efektör kaspazlar substratların bir bölümü üzerinde etki ederek hücrel proteinlerin proteolizisine ve apoptozis aracılığı ile ölümüne neden olurlar. En iyi tanımlanmış olan kaspaz substratı, DNA onarımında rol alan bir çekirdek proteini poly-(ADP-riboz) polimeraz (PARP)'dir. PARP spesifik kaspaz parçalanması için hedeflenmiş başlangıç proteinlerinden biridir (19). PARP, DNA tamirinden sorumlu nükleer enzim olup aşırı aktive olursa apoptoz ve nekroza sebep olur (20). Bu mantığa dayalı olarak yapılan bir çalışmada PARP'in inhibe edildiği farelerde, kontrol farelere göre septik şokun prognozunun daha iyi seyrettiği görülmüştür. Septik şok bakteriyel lipopolisakkaritlere bir yanittir. Bu durumda makrofajlar aktive olur. Birçok interlökinin ekspresyonu iNOS'u aktive eder. Bu inflamasyon sonucu oluşan reaktif oksijen ürünleri DNA ile reaksiyona girer. Bunun sonucunda endotel hücrelerinin DNA sarmalları kırılır. Bu durum PARP'in aşırı aktivitesine neden olarak, geniş kanamalarla birlikte endotel hücrelerini ölüme götürür (21).

Diyabet, dokularda serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonunu artırması nedeniyle hücrelerin apoptoza gidişini patolojik düzeyde artırmaktadır (16). Yaptığımız çalışmada diyabetik böbrek hasarının oluşumu ile iNOS ve PARP ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu görüldü. Diyabetik böbreklerde iNOS ve PARP immunreaktivitelerinin artmasının, SOR ve apoptotik mekanizmalarla hasar oluşumuna sebep olan diyabet için beklenebilir bulgular olduğu ve litaretür bilgileri ile de tamamen uyumluluk arzettiği görüldü.

Sonuç olarak bu çalışma ile apoptoz ve hücre sağkalımının hücrel mekanizmalarının ortaya konması ile diyabetik nefropati gibi pek çok hastalığın tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların güncelleştirilebileceği kanaatine varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Pfister R, Cairns R, Erdmann E, Schneider CA. Prognostic impact of electrocardiographic signs in patients with Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Results from the PROactive study. *Diabet Med* 2011; 28: 1206-1212.
2. Nakbi A, Koubaa N, Ben Hamda K, et al. Association between oxidative stress parameters and inflammation markers according to the gravity of the acute coronary syndrome. *Tunis Med* 2011; 89: 621-626.
3. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. 2. baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005: 2279-2295.
4. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2000: 511-517.
5. Noh H, Ha H, Yu MR, et al. High glucose increases inducible NO production in cultured rat mesangial cells. Possible role in fibronectin production. *Nephron* 2002; 90: 78-85.
6. Gürbüz E. Temel ve Klinik Endokrinoloji. 2. Baskı, İstanbul: Medikal Network, 2005: 349-373.
7. Lester P, Enrique C. Oxidative Stress and Disease California: Taylor & Francis Group, 2008: 18-302.
8. Parlakpınar H, Örum MH, Acet A. Aminoguanidin ve kardiyovasküler sistem. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2012; 2: 9-14.

9. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
10. Araz M. Diabetes Mellitus. 4. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2004: 2109-2123.
11. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983; 32: 64-78.
12. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res* 2002; 32: 225-30.
13. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: 3-12.
14. Osterby R, Asplund J, Bangstad HJ, et al. Neovascularization at the vascular pole region in diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 348-352.
15. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blantz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int* 1991; 39: 1176-1183.
16. Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006: 275-427.
17. Raji L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995; 48: 20-32.
18. Reddy S, Kaill S, Poole CA, Ross J. Inducible nitric oxide synthase in pancreatic islets of the non-obese diabetic mouse: a light and confocal microscopical study of its ontogeny, co-localization and up-regulation following cytokine administration. *Histochem J* 1997; 29: 53-64.
19. Eröz RK, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptosis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Düzce Tıp Dergisi* 2012; 14: 87-101.
20. Roy N, Cardone MH. The caspases: consequential cleavage. *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death*. Oxford: Oxford University Press, 2002: 93-135.
21. Gultekin N, Karaoglu K, Kucukates E. New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2008; 36: 120-130.