

Diyabetli Ratlarda Glikokonjugatların Gingival Hücrelerdeki Ekspresyonu

Expression of Glicoconjugats in the Gingiva Cells of the Experimentally Diabetic Rats

Sabri Fatih Kurşunlu¹, Ayşegül Bildik², Veli Özgen Öztürk¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Aydın

²Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın

Özet

AMAÇ: : Diyabetes Mellitus periodontal sağlığı olumsuz yönde etkilerken, periodontal enfeksiyonların da glisemik kontrolü olumsuz etkilediği bilinmektedir. Enfeksiyonların şekillenmesinde bakteriyel karbonhidrat rezidüleri ile organlardaki karbonhidratlara spesifik proteinlerin (lektinler) etkileşimleri esansiyeldir. Dolayısıyla, bakterilerin dişeti dokusundaki migrasyonunda ve dokuya tutunmasında glikokonjugatların rolü çok önem taşımaktadır.

Bu çalışmada deneysel diyabet oluşturulmuş ratların dişeti dokusundaki hücrelerin hücre yüzeyindeki ve ekstrasellüler matriksdeki galaktoz, laktoz, N-asetil galaktozamin ve N-asetilglukozamin ünitelerinin ekspresyon ve lokalizasyonlarındaki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER: 10'ar adet sıçan test ve kontrol grubunu oluşturmuştur. Sıçanlarda diyabet oluşturmak için; 0,01 M sodyum sitrat tamponu içinde streptozotocin 50mg/kg intraperitoneal olarak tek doz enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara deney grubuna benzer şekilde aynı oranda 0.01 M sodyum sitrat tamponu intraperitoneal olarak uygulandı. Ötenazi uygulanan ratların dişetlerinden. 6 µm inceliğindeki kriostat kesitler alındı. Dokular, glikoz (ECL, ECA, WGA), Galaktoz (EEL, GSL I, BSL I), Laktoz (RCA I, RCA120) ile biotinlenmiş olan lektinler ile inkübe edildi, lektinlerin bağlantı yerleri DAB (3'-3'-Diaminobenzidin) renk substratı ile görünür hale getirildi. Reaksiyonların değerlendirilmesi ışık mikroskopunda gerçekleştirildi.

BULGULAR: Araştırma sonunda, dişeti dokusunda bulunan glukoz ve laktoz ünitelerine spesifik lektinlerle bağlanmanın kontrol grubunda, deneme grubuna göre daha şiddetli olduğu görülmüştür.

SONUÇ: Diyabetli ratların dişeti dokusundaki bu değişimlerin hangi mekanizma ile meydana geldiği ve dişeti hastalıklarının patogenezinde nasıl bir etkisinin bulunduğunu ortaya koymak için ileri çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir

Anahtar Kelimeler: Diyabet, lektin, glikoprotein, glikokonjugat, dişeti bağ doku

Abstract

OBJECTIVE: Diabetes negatively affects periodontal health, it is known that periodontal infections negatively affect the glycemic control.. Interactions of bacterial carbohydrate residues and specific proteins for carbohydrates (lectins) in the organs are essential for the formation of the infections. Therefore, glycoconjugates are very important for the migration of bacteria to the gingiva cause saprodonia and adhesion to tissues. In this study, we aimed to assess the alternations of galactose, lactose, N- acetyl galactoseamine and N- acetyl glucoseamine which are located in the cell surface and extracellular matrix of gingiva cells belong to the rats experimentally diabetes caused.

METHODS: In this study constituted each test and control groups of 10 rats, To create diabetes in rats, 0.01 M sodium citrate buffer in a single dose of streptozotocin 50mg/kg was injected intraperitoneally. Similar to the control group animals, the experimental group was administered intraperitoneally at the same rate of 0.01 M sodium citrate buffer. Euthanasia of rats with the gums. Kriostat-thin sections were obtained 6 microM. Tissues, glucose (ECL, ECA, WGA), galactose (EEL, GSL I, BSL I) and lactose (RCA I, RCA120) with the lectins were incubated with biotinylated, lectins, joints DAB (3'-3'-diaminobenzidine) was visualized by color substrate. Evaluation of reactions carried out under the light microscope.

RESULTS: Research at the end of the gingival tissue in the glucose, lactose, and mannose units fukoz lektinlerle spesifik binding in the control group, more severe than in the experiment; sialic acid units to connect the trial group were more intense.

CONCLUSION: The mechanism by which these changes in gingival tissue of rats with diabetes to occur, and how the impact on the pathogenesis of gum disease that is thought to be necessary to establish the new work is done.

Key words: Diabetes Mellitus, lectin, glycoprotein, glicoconjugat, gingiva

GİRİŞ

İnsülin hormonunun yetersizliği ya da insülin reseptörünün insüline karşı hassasiyetinin kaybolması sonucu kan şekerinin yükselmesi ile ortaya çıkan diabetin, organizmada birçok komplikasyonlara yol açtığı bilinmektedir.¹ Bu komplikasyonlardan birinin de periodontal hastalık olduğu, diabetlilerde daha şiddetli seyrettiği ve hızla ilerlediği araştırmalarda gösterilmiştir. Periodontal hastalığın başlangıcını, ilerleyişini ve şiddetini etkileyen hastalıkların başında diabet gelmektedir.² Diabetle birlikte, periodontal dokularda vasküler değişiklikler meydana gelmektedir. Oral mikrofloradaki değişiklikler, kollajen üretiminde azalma ve kollajenaz aktivitesinde artış sonucu periodontal dokulardaki yıkım artmaktadır.³

Diyabetik hastalarda yaygın şekilde gözlenen periodontal hastalık, günümüzde major bulgulara ek olarak kabul görmektedir. Diyabetik bireylerde gözlenen periodontal hastalığın etki mekanizmasına dair yapılan çalışmalarda, mikroanjiopati, kollajen metabolizması, konak cevabındaki değişiklikler ve subgingival floraya bağlı değişimler sayılabilir.⁴

Lektinler genellikle şekerlere spesifik olarak bağlanabilen protein ya da glikoprotein yapısındaki maddelerdir.⁵ Enfeksiyonların şekillenmesinde bakteriyel karbonhidrat rezidüleri ile organlardaki lektinlerin etkileşimleri esansiyeldir. enfeksiyonların oluşumunda da lektin-karbonhidrat etkileşimlerinin rol oynadığına dair yayınlar bulunmaktadır.⁶ Lektinlerle glikokonjugatların karbonhidrat üniteleri arasında anahtar kilit prensibi esasına göre şekillenen karbonhidrat-protein etkileşimleri; hücreler arası haberleşmede, sinyal transferinde, hücre içi protein transportunda, döllenmede, hücre farklılaşmasında, hücre adezyonunda, büyümenin kontrolünde, interferon ve sitokin salgılanması gibi immunolojik olaylarda, makrofajların fagositoz için uyarılmasında, patolojik olaylarda hücrelerin transformasyonunda, metastazda, embriyogenezde, ekzostoz ve endostozda rol oynarlar.^{7,8,9}

Diabet ve lektinlerle ilişkili çalışmalar genellikle mannoz bağlayan lektinler üzerine yoğunlaşmıştır. Diabetli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli dokularda mannoz bağlayan lektinin miktarının arttığı ve insülin ile mannoz bağlayan lektin'in baskılandığı belirlenmiştir.¹⁰ Lektinlerle ilgili çok fazla sayıda çalışma olmasına rağmen dişeti dokusu, diabet ve lektinler arasındaki ilişkiler hakkında çalışma yok denecek kadar azdır, özellikle yapılan literatür

araştırmalarında diabetik hastaların diş eti dokusunun lektinlerle olan ilişkilerine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bugüne kadar diyabetli ratların gingival dokusunda glikokonjugatların yapılarında ve lokalizasyonunda bir değişimin olup olmadığı konusunda bir çalışma yapılmamıştır. Araştırmanın amacı deneysel diabet oluşturulan ratların diş eti dokusunda hipergliseminin, glikokonjugatların yapılarında ve lokalizasyonunda bir değişime neden olup olmadığı araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma da toplam 20 adet Wistar dişi sıçan iki gruba ayrılarak 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 test 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 deneme grubuna (n=10) tek doz enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara deney gurubuna 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, test grubunda 367,7±41 mg/dl olarak bulunmuştur. Test grubundaki bütün hayvanların diyabetli olduğu belirlendikten sonra (kan glikoz düzeyi > 300mg/dl) ratlara hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötanazi uygulandı.

Histokimyasal Analiz: Ötanazi uygulanan ratların gingiva 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 içersindeki %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 kez beşer dakika PBS'de yıkanan dokular biotin ile işaretlemiş WGA lektin ile inkübe edildi. Lektinlerin

bağlantı yerleri DAB (3'-3'-Diaminobenzidin) renk substratı kullanılarak görünür hale getirildi. Hücreler hematoksilen ile 3-5 saniye süre ile karşı boya yapıp, dehidre edildi ve entellan kullanılarak kapatıldı. Reaksiyonların değerlendirilmesi ışık mikroskopunda gerçekleştirildi.

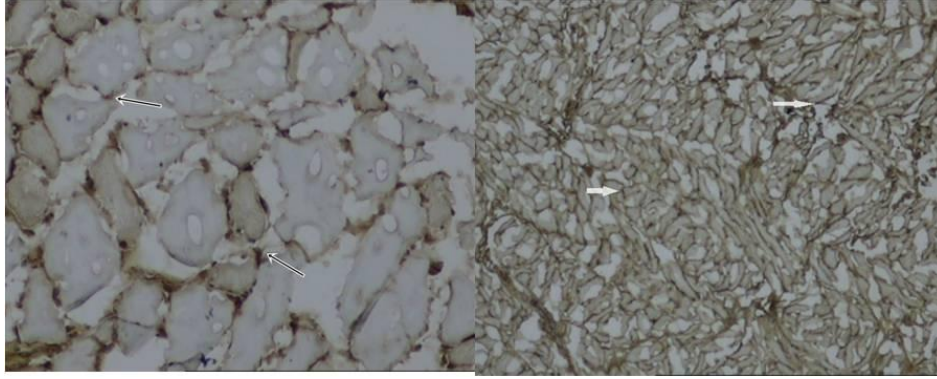
Bu işaretli lektinler sırasıyla: N-asetilglukozamine spesifik [Erythrina Cristagalli Lectin (ECL, ECA)], Galaktoza spesifik Euonymus Europaeus Lectin (EEL), N-asetilgalaktozamine spesifik [Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL I, BSL I), Laktoza spesifik Ricinus Communis Agglutinin I (RCA I, RCA₁₂₀) ile biotinlenmiş olan lektinler, üretici firmanın belirttiği konsantrasyonlarda PBS içinde sulandırılıp hücreler üzerine damlatıldı gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Bağlanmamış

lektinleri uzaklaştırmak için tekrarlanan yıkama işleminden sonra hücreler ABC (avidin-peroksidaz kompleksi) ile aynı şekilde 1 saat boyunca reaksiyona sokuldu.

BULGULAR

N-asetilglukozamine spesifik biotin işaretli ECL boyamalarında kontrol grubundaki hayvanların gingival bağ dokusunda yoğun olarak N-asetilglukozamin ünitelerinin bulunduğu, test grubu gingival bağ dokusunda da N-asetilglukozamin ünitelerinin bulunduğu ancak burada görülen reaksiyonun şiddeti kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Resim 1).

Galaktoz ünitelerine spesifik EEL lektin ile yapılan boyamalarda hem kontrol grubu hem de test grubu bağ dokusunda bulunan bazı hücrelerin tek tük

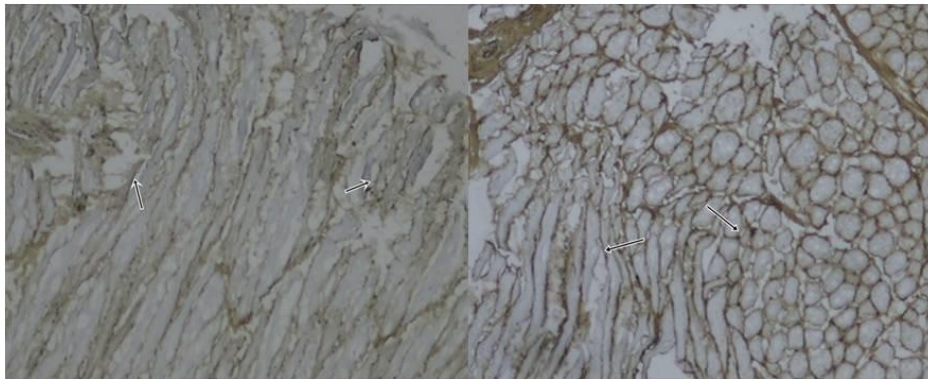


Resim 1: Test ve Kontrol grubuna ait N-asetilglukozamine spesifik biotin işaretli ECL boyama görüntüleri (10 µm)

reaksiyon verdikleri gözlenmiştir. Reaksiyonların şiddetinin her iki grupta da çok hafif olduğu görülmüştür (Resim 2)

N-asetilgalaktozamine spesifik GSL-I ile yapılan boyamalarda test ve kontrol gruplarında bağ dokudaki fibroblast hücrelerine benzer hücrelerde pozitiflik olduğu görülmüştür. Reaksiyonların şiddeti

açısından gruplar arasında önemli bir farklılığın varlığı tespit edilmemiştir (Resim 3). N-asetilgalaktozamine spesifik RCA kullanılarak yapılan boyamalarda test ve kontrol gruplarında bağ dokuda pozitiflik olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki boyamaların reaksiyonları deney grubundakiler göre daha şiddetli olduğu görülmüştür (Resim 4).



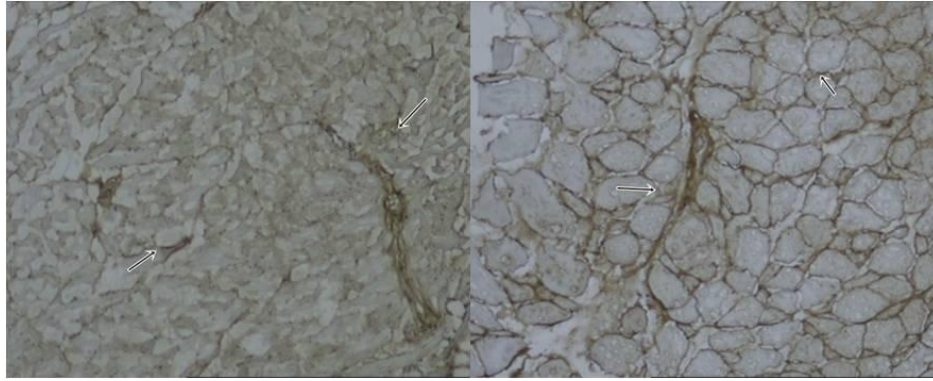
Resim 2: Test ve Kontrol grubuna ait Galaktoz ünitelerine spesifik EEL lektin ile boyama görüntüleri (10 µm)

TARTIŞMA

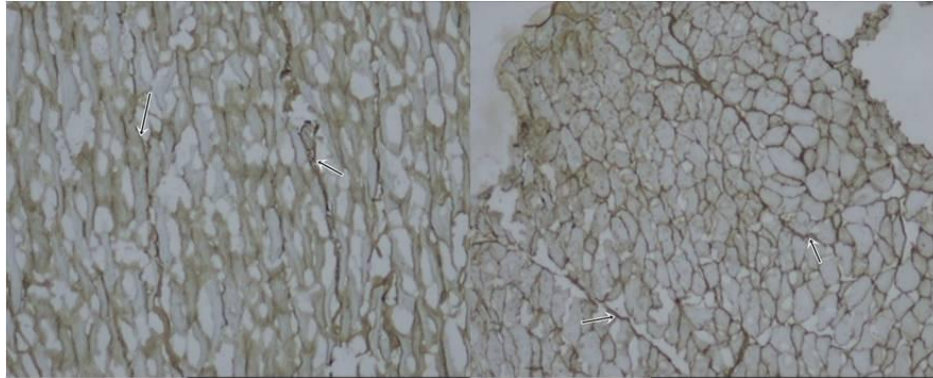
Diyabet ve lektinlerle ilişkili çalışmalar genellikle mannoz bağlayan lektinler üzerine yoğunlaşmıştır. Diyabetli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli dokularda mannoz bağlayan lektin miktarının arttığı ve insülin ile mannoz bağlayan lektin'in baskılandığı belirlenmiştir⁸. Diyabetik bireylerde lektin seviyesindeki değişikliklerin gingiva dokusu ile ilişkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bampton ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 15 farklı lektin kullanılarak gingival epitelyum, sulkular epitelyum, bağ dokusu ve bazal membran ile olan bağlanma ilişkileri araştırılmıştır¹¹. PSA, RCA₁₂₀ ve BSL I'i de içeren yedi farklı lektin ile yapılan çalışmada sağlıklı ve gingivitisli bireylerin

gingival dokularında iç ve dış gingiva dokusu üzerinde lektin bağlanmalarını gözlemlenmiştir, fakat herhangi bir farklı bulguya rastlanmamıştır¹².

N-asetilglukozamine spesifik biotin işaretli ECL boyamalarında kontrol grubundaki hayvanların diş etinin bağ dokusunda yoğun olarak N-asetilglukozamin ünitelerinin bulunduğunu ortaya koymuştur. Deney grubundaki hayvanların bağ dokusunda da N-asetilglukozamin ünitelerinin bulunduğu ancak burada görülen reaksiyonun şiddeti sağlıklı dokulardakine oranla çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular diyabetli bireylerde ortaya çıkan dişeti hastalıkları ile bağ dokudaki N-asetilglukozamin moleküllerinin miktarı arasında bir ilişkinin bulunabileceğini düşündürmektedir.



Resim 3: Test ve Kontrol grubuna ait N-asetilgalaktozamine spesifik GSL-I ile yapılan boyama görüntüleri (10 µm)



Resim 4: Test ve Kontrol grubuna ait N-asetil galaktozamine spesifik RCA ile yapılan boyama görüntüleri (10 µm)

Oral, gingival, sulkular ve bağ epitelinde çeşitli lektinlerle yapılan histokimyasal bir çalışmada BPA gingival ve sulkular epitelyum tabakalarında pozitif boyanma gösterirken bağ dokusu epitelinde negatif reaktivite göstermiştir. GSL I, gingival ve sulkular epitelyumun bazal ve supra-bazal tabakalarında ve ayrıca bağ dokusu epitelinin apikal bölgesinde pozitif boyanma göstermiştir¹³.

N-asetil galaktozamine spesifik GSL-I ile yapılan boyamalarda diyabetli ratların diş eti dokusundaki N-asetil galaktozamin ünitelerinin sağlıklı hayvanlarınkine göre bir farklılık göstermediği ortaya çıkmıştır. Bu bulgu galaktoz ünitelerinde olduğu gibi diş eti dokusunda bulunan N-asetil galaktozamin ünitelerinin de miktar ve lokalizasyon yönünden artan kan glükozundan etkilenmediğini göstermektedir.

Hormia ve Virtanen RCA₁₂₀ 'yi de içeren ondört 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 RCA lektinleri ile bağlandığını görmüşlerdir¹⁴. Ancak laktoza spesifik RCA kullanılarak yapılan boyamalarda deney ve kontrol gruplarında bağ dokuda pozitiflik olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki boyamaların reaksiyonları deney grubundakiler göre daha şiddetli olduğu görülmüştür. Bu iki farklı bulgunun yöntemsel farklılıktan doğduğu kanısındayız.

Galaktoz ünitelerine spesifik EEL lektin ile yapılan boyamalarda hem kontrol grubundaki hem de deney grubundaki hayvanların bağ dokusunda bulunan bazı hücrelerin tek tük reaksiyon verdikleri gözlenmiştir. Reaksiyonların şiddetinin her iki grupta da çok hafif olduğu görülmüştür. Bu bulgular galaktoz ünitelerinin diş eti dokusundaki miktarı ve lokalizasyonu ile kan glikoz konsantrasyonu arasında bir ilişkinin bulunmadığını göstermektedir. Sonuçlar N -asetil glikozamine spesifik lektinlerle elde edilen reaksiyon bulgularına yakındır.

Ancak glikoz ve laktoz gibi karbonhidrat ünitelerinin bağ doku da yapılan histokimyasal boyamalarda diyabetli dişeti bağ dokusunun kontrol grubuna göre daha az boyanması, hipergliseminin beklenen sonuçların aksine karbonhidrat ünitelerinin miktarını artırmadığı, azalttığını göstermektedir. Galaktoz ünitelerinin ise kan glikoz konsantrasyonundan etkilenmediği görülmektedir. Diyabetli ratların dişeti dokusundaki bu değişimlerin hangi mekanizma ile meydana geldiği ve dişeti hastalıklarının patogeneğinde nasıl bir etkisinin bulunduğunu ortaya koymak için yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, hipergliseminin dişeti dokusu konjugatlarında azda olsa bir değişime neden olduğu ancak bu değişimin mekanizmasının anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Garcia R. Periodontal treatment associated with improved glycaemic control in type 2 diabetic patients. *J Clin Periodontol* 2005; 32(3):266-72.
2. Almas K, Al-Lazzam S, Al-Quadairi A. The effect of oral hygiene instructions on diabetic type 2 male patients with periodontal diseases. *J Contemp Dent Pract.* 2003 Aug 15;4(3):24-35.
3. Kiran M, Arpak N, Unsal E. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2005 Mar;32(3):266-72.
4. Mealey BL, Oates TW. Diabetes Mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006; 77:1289-303.
5. 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.
6. Virtanen I, Kariniemi AL, Holthöfer H, et all. Fluorochrome-coupled lectins reveal distinct cellular domains in human epidermis. *J Histochem Cytochem* 1986;34:307-315.
7. 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.
8. Hormia M, Virtanen I, Saccharide residues in human gingiva as revealed with fluorochrome-coupled lectins. *Journal Periodont Res* 1989; 24, 2, 137-145.
9. Newcomb GN, Powel RN. Gingival langerhans cells. Human gingival langerhans cells in health and disease. *J Periodon Res* 1986; 21: 640-652.
10. Hansen TK, Thiel S, Knudsen ST., et al. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrino Metab.* 2003 Oct;88(10):4857-61.
11. Bampton JLM, Shirlaw PJ, Topley S, et all. 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.
12. Murase N, Hosaka M, Takai Y., et al. Histochemical demonstration of lectin-binding sites and keratin in inflamed human gingiva. *J Periodontal Res.* 1985 Nov;20(6):625-36.
13. Takata T, Nikai H, Miyauchi M., et al. Lectin binding of rat gingival epithelia. *J Periodontal Res.* 1990 May;25(3):152-5.
14. Hormia M, Virtanen I. Saccharide residues in human gingiva as revealed with fluorochrome-coupled lectins. *J Periodontal Res.* 1989 Mar;24(2):137-45.

Yazışma Adresi:

Dr. Sabri Fatih KURŞUNLU
Adnan Menderes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji AD Aydın Türkiye
Tel : 0 533 432 68 71
E-posta : kursunlufatih@hotmail.com