

DeneySEL Latirizm Modelinde Doksisisiklinin Kollajen Yapısı Üzerine Olan Etkilerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi

Araştırma

Study

Nilgün Şentürk*, Gonca Çayır Keleş**, Figen Kaymaz***
Levent Yıldız****, Gökhan Açıköz**, Ahmet Yaşar Turanlı*

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Samsun

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, Samsun

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

**** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Samsun

Özet

Latirizm kollajen sentezinde çapraz bağlanıtıda önemli bir enzim olan lizil oksidazın inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkan defektif kollajen sentezi ile karakterize bir durumdur. Bir latirojen ajan olan beta-aminopropionitril (β -APN) bağ dokusu metabolizmasının çalışılması için uygun bir ajandır.

Tetrasiklinlerin kollajenaz ve jelatinaz gibi matriks metalloproteinazlarını inhibe ettiği bilinmektedir. Doksisisiklin antimikrobiale tetrasiklinlerden en etkili matriks metalloproteinaz inhibitörüdür. Bu çalışmada deneySEL olarak oluşturulmuş latirizm modelinde, sistemik doksisisiklin uygulamasının kollajen yapısı üzerine olan etkilerinin elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada ağırlıkları 250-300 gram olan 30 Wistar rat kullanıldı. Yirmi rat deney grubu (grup 2 ve grup 3) 10 rat ise kontrol grubu (grup 1) olarak değerlendirildi. Deney grubunda (grup 2, 10 rat) günlük hazırlanan β -APN'in 40 gün subkutan olarak uygulanması ile latirizm oluşturuldu. Kırkıncı günde bu gruptan deri biyopsileri alındı. Üçüncü gruba 40 gün BAPN uygulamasını takiben oral yoldan 15 gün süreyle 21 mg/gün dozda suda çözünmüş doksisisiklin uygulandı. Ellibeşinci gün sonunda gün sonunda bu ratlardan alınan deri biyopsileri diğerleri ile birlikte morfolojik olarak incelendi. Serum IL-6 değerleri ELISA metodu ile çalışıldı.

Doksisisiklin uygulanan grupta (grup 3) morfolojik ve biyokimyasal olarak iyileşme olmadığını gözlemledik.

Sonuç olarak; oral yoldan iki hafta süreyle uygulanan doksisisiklin deneySEL olarak oluşturulmuş latirizm modelinde, kollajen yapısı üzerine morfolojik ve biyokimyasal olarak iyileştirici etki göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Latirizm, kollajen, doksisisiklin, IL-6

Şentürk N, Keleş GÇ, Kaymaz F, Yıldız L, Açıköz G, Turanlı AY. DeneySEL latirizm modelinde doksisisiklinin kollajen yapısı üzerine olan etkilerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi. TÜRKDERM 2001; 36: 248-252

Summary

Background and Design: Lathyrism is characterized by defective collagen synthesis due to inhibition of lysyl oxidase, which is essential for interfibrillar cross-linking. Lathyrinic agent β -aminopropionitrile (β -APN) accepted as a suitable agent for the study of connective tissue metabolism. Tetracyclines are known to inhibit the matrix metalloproteinases such as collagenase and gelatinase. Doxycycline is the most potent matrix metalloproteinase inhibitor among antimicrobial tetracyclines. Our purpose was to investigate the role of doxycycline on collagen structure in experimentally induced lathyrism by electron microscopically and biochemically.

Materials and Methods: Thirty Wistar rats weighting between 250-300 gm were used in this study. Twenty rats were used as test (group 2 and 3) and 10 rats were used as control group (group 1). Experimental lathyrism was created with daily subcutaneous injection of lathyrinic agent β -APN for 40 days in 20 rats (group 2 and 3). At day 40, skin biopsies were taken from 10 rats of the test group (group 2) to evaluate the effect of β -APN on dermal collagen. After 40 days, in the third group (10 rats) doxycycline 21 mg daily was administered orally for 15 days. In the first group (10 rats) no medication was performed after 40 days. At day 55, skin biopsies were taken from the first and third group. Serum IL-6 levels were measured by ELISA.

Results: We did not observe remarkable improvement in the third group both electron microscopically and biochemically.

Conclusion: Administration of doxycycline by oral route did not improve the structure of collagen both morphologically and biochemically, in experimentally induced lathyrism.

Key Words: Lathyrism, collagen, doxycycline, IL-6

Şentürk N, Keleş GÇ, Kaymaz F, Yıldız L, Açıköz G, Turanlı AY. Morphologic and biochemical effects of doxycycline on collagen structure in experimental lathyrism. TÜRKDERM 2001; 36: 248-252

Latirizm kollajen yapısındaki çapraz bağların oluşmasında rol oynayan, lizil oksidaz enziminin inhibisyonuna bağlı olarak gelişen, hasarlı kollajen sentezi ile karakterize bağ dokusu hastalığıdır¹⁻³.

Latirizm, bazı baklagillerde ve tahıllarda bulunan Lathyrus türleri ve bunların toksik içeriklerinin vücuda alınması ile oluşmakta, insanları ve pek çok hayvan türünü etkileyebilmektedir.

Alındığı Tarih: 21.11.2002 **Kabul Tarihi:** 09.12.2002

Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr. Nilgün Şentürk, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji AD, 55139 Kurupelit-Samsun

Latirojenler lizil oksidaz enzimini inhibe ederek kollajenin çapraz bağlantısını engelleyen maddeler olarak bilinmektedir^{4,6}. Latiritik ajan olan beta-aminopropionitrile (β -APN) bağ dokusu metabolizma çalışmalarında büyük kabul görmektedir. Deneysel latirizm modelinin patolojik etkisi kırıkta, kemik, fibröz ve elastik bağ dokusu gibi kollajen içeriğinin fazla olduğu dokularda incelenmektedir¹.

Tetrasiklinlerin antimikrobiyal etkilerinin yanısıra memeli kollajenazını ve diğer birçok matriks metalloproteinazlarını (MMP) inhibe edici etkisi vardır⁷. Antimikrobiyal tetrasiklinler içinde, doksisisiklinin en etkili matriks metalloproteinaz inhibitörüdür.

Yapılan çalışmalarda tetrasiklinlerin, sitokinleri de içeren (IL-1 β , TNF α , IL-6) pro-enflamatuar ve otoimmün mediatörlerin salgılanmasını etkilediği de gösterilmiştir⁸. IL-6 dokudaki yaralanma ve konak enfeksiyonu gösteren, konak cevabının önemli mediatörlerinden biridir.

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulmuş latirizm modelinde sistemik doksisisiklin uygulamasının elektron mikroskopik olarak kollajen yapısı üzerine ve biyokimyasal olarak serum IL-6 düzeylerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve Gereçler

Bu çalışmada ağırlıkları 250-300 gram olan 30 adet "Wistar rat" kullanıldı. Yirmi rat deney grubu (grup 2 ve grup 3) 10 rat ise kontrol grubu (grup 1) olarak değerlendirildi. Deney grubunda (grup 2, 10 rat) β -APN'in (Sigma A-3134) 5mg β -APN/ 0.4 ml hacim/100gr vücut ağırlığı dozunda her gün taze olarak hazırlanarak 40 gün boyunca subkutan olarak uygulanması ile deneysel latirizm oluşturuldu. Kırkıncı günde bu gruptan deri biyopsileri alındı. Üçüncü gruba 40 gün B-APN uygulamasını takiben 15 gün süreyle 21 mg/gün dozunda suda çözülmüş doksisisiklin oral yoldan uygulandı. Ellibeş gün sonra bu ratlardan ve kontrol grubundan alınan 1 mm³ büyüklüğündeki doku örneklerine % 5'lik gluteraldehit ile primer fiksasyon 2 saat ve %2'lik osmiyum tetroksit ile post fiksasyon 1 saat süre ile yapıldı. Doku örnekleri dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi ve epoxy resin içine gömüldü. Bir mikron kalınlığında alınan doku örnek kesitleri toluidin mavisi - azur II ile boyandı. Olympus BH2 mikroskopunda fotoğraflandı. Leica Ultracut R ultramikrotomda alınan 70nm kalınlığında kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile kontrastlandı. Zeiss 9S2 elektron mikroskopunda fotoğraflandı.

Ratlardan alınan kan örnekleri 1000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum IL-6 düzeyi Endogen ELISA kiti (Endogen Rat Interleukin-6 ELISA, Pierce Endogen Inc. Wobum MA, USA) kullanılarak 450-550 nm'de standart ELISA cihazında ölçüldü.

İstatistiksel değerlendirme için Kolmororov Smirnov ve One Way ANOVA (Post Hoc Tukey HSD) testleri kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart sapma olarak verildi.

Sonuçlar

Kontrol grubunda epidermis, basal lamina ve kollajen fibrillerin normal yapı ve görünümde olduğu izlendi. İkinci grupta epidermis yapısında inceleme, keratohiyalin granüllerde artış, bazal laminada inceleme ve düzensizleşme, kollajen yapısında bozulma, fibroblastlar içinde endoplazmik retikulumun genişlemesine bağlı vakuolizasyon dikkati çekmekteydi (Resim 1,2). Üçüncü grupta ise epidermiste inceleme, bazal membrandaki düzensizlik ve kollajen yapısındaki bozulmanın devam ettiği gözlemlendi. Keratohiyalin granülleri ve fibroblastlar içindeki vakuolizasyon azalmıştı (Resim 3,4).

ELISA yöntemi ile, ortalama serum IL-6 değerleri birinci grupta 12.2 \pm 1,3, ikinci grupta 23,016 \pm 4,6 ve üçüncü grupta 27,9 \pm 2,8 olarak ölçüldü (Grafik 1). Birinci gruba oranla iki ve üçüncü grupta IL-6 değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.001, F=59,8).

Tartışma

Bizim çalışmamızda; β -APN'in düşük dozda her gün subkutan olarak enjekte edilmesiyle latiritik ratlar oluşturulmuştur. Akut lezyonların oluşmasını engellemek amacıyla β -APN düşük dozda ve 40 günlük deney periyodunda uygulanmıştır.

Deney hayvanlarından ratlarda; tetrasiklinlerin oral yoldan uygulamanın daha etkili olduğu⁵ ve tedavi edici dozunun 21 mg/gün olarak bildirilmesi^{5,6} nedeni ile çalışmamızda doksisisiklin oral yoldan bu dozda verilmiştir.

Golub ve arkadaşları⁷⁻¹¹ tetrasiklinlerin diğer antibiyotiklerden farklı olarak, kollajenaz aktivitesini inhibe ettikleri ve bu ilaçların yeni keşfedilen özellikleri sayesinde aşırı kollajen yıkımı ile seyreden bazı medikal ve periodontal hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar getireceği görüşünü ortaya atmışlardır. Bu enzimin aktivasyonu bağ dokusunun temel yapı proteinlerinden olan kollajen yıki-

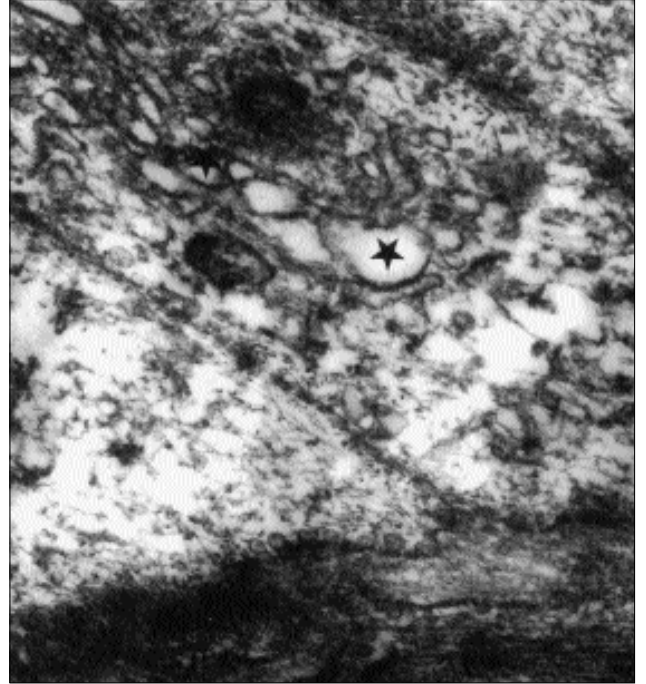
mında önemlidir. Bu şekildeki patolojik kollajenolizis, RA, osteoartrit, DM, büllöz dermatolojik hastalıklar, korneal ülserler ve periodontitiste önemli bir olaydır⁸.

Yapılan çalışmalarda tetrasiklinlerin kollajenaz aktivitesini baskılama özelliklerini ilacın Ca^{2+} ve Zn^{2+} gibi metal iyonlarına bağlanma özelliğine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Çünkü bu enzim normal konformasyonunu ve hidrolitik aktivitesini sürdürmek için bu katyonlara bağımlıdır. Tetrasiklin ailesinin ekstrasellüler kollajenaz aktivitesini baskılama gücü farklılık göstermektedir. Semisentetik tetrasiklinler, yani doksisiklin ve minosiklin, tetrasiklin hidroklorürden daha etkilidir. Doksisiklin bunlar içinde en güçlü olanıdır ve bu etkisi Zn^{2+} katyonuna daha sıkı bağlanmasından kaynaklanmaktadır¹². Bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda semisentetik doksisiklin kullanılmıştır.

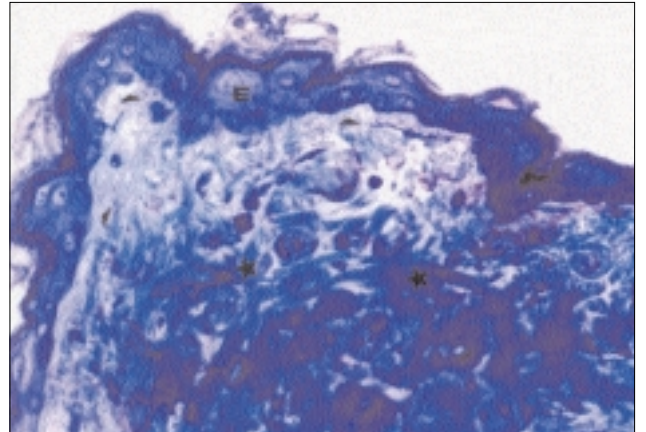


Resim 1: Epidermis kalınlığında azalma, keratohyalin granüllerde artış ve kollajende disorganizasyon. E: epidermis, Ok: bazal membran, *: kollajen lif (Boya: Toluidin mavisi-azur II, X400).

Tetrasiklinler, antimikrobiale etki dışındaki özellikleri nedeni ile büllöz pemfigoid, dermatitis herpetiformis, piyoderma gangrenosum, rosacea, ve alfa-1 antitripsin eksikliği panniküliti gibi bazı enfeksiyöz olmayan dermatolojik hastalıkların tedavisinde etkilidirler. Bu etkisinin; nötrofil fonksiyonlarını ve fosfolipaz A2'yi inhibe etmesine, doku yıkımı ve inflamasyon sonrasında nötrofiller tarafından oluşturulan reaktif oksijen ürünlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir¹².

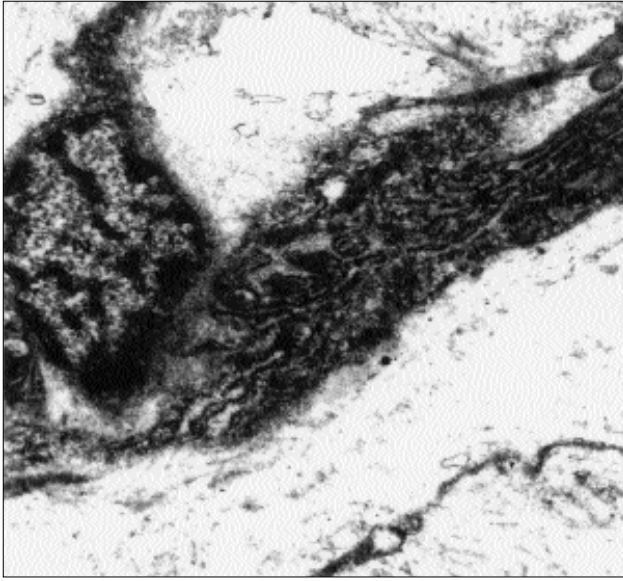


Resim 2: Bazal laminada incelmeye ve endoplazmik retikulumda vakuolizasyona (Uranil asetat-kurşun sitrat, X25000).

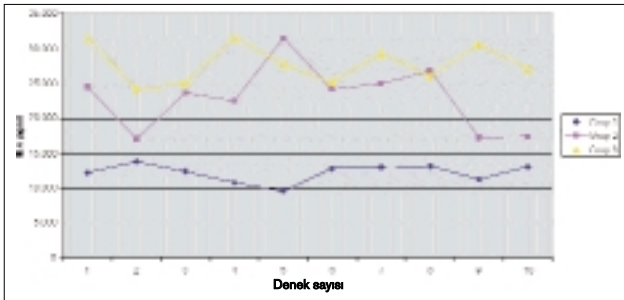


Resim 3: Epidermiste incelmeye, kollajen kalınlaşmış ve düzensiz. E: Epidermis, ok: Basal membran, * Kollajen lif (Toluidin mavisi-azur II, X400).

IL-6; fibroblast, endotel hücreleri, aktive olmuş T hücreleri ve aktif makrofajlar tarafından üretilmektedir. IL-6, enfeksiyon ya da yaralanma sonrası oluşan akut cevapta interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) kadar önem taşımaktadır. IL-6 aynı zamanda immun sistemde B hücresi farklılaşmasında rol almaktadır. Bu sitokinin kemik rezorpsiyonunu arttırdığı da bilinmektedir¹³⁻¹⁵. Tetrasiklinlerin sitokin üretimini inhibe ettiği gösterilmiş ve bu durum, tetrasiklinlerin ekstrasellüler matriks içinde MMP aktivitesini baskılamasına ve dolayısıyla patolojik yıkımın ilerlemesini önlemesine bağlanmıştır⁸. Kloppenburg ve arkadaşları bir tetrasiklin türevi olan minosiklin kullanan 65 romatoid artritli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, minosiklin kullanan grupta plasebo grubuna göre serum IL-6 ve romatoid faktör düzeylerinin tedavi sonrasında düştüğünü ve tetrasiklinlerin antienflamatuar etkilerinin bu sitokinin sentezinin inhibe edilmesine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir¹⁶.



Resim 4: Bazal laminada incelleme devam ediyor, vakuolizasyon kaybolmuş. N: Fibroblasta ait çekirdek, * endoplazmik retikulum (Uranil asetat-kurşun sitrat, X22500).



Grafik 1: Serum IL-6 değerlerinin gruplara göre dağılımı.

Çalışmamızda latiritik grup ve doksisisiklin uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum IL-6 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit ettik ($p<0.001$). Beklenenin aksine doksisisiklin uygulanan grupta IL-6 seviyelerinde herhangi bir düşüş saptamadık, bundanda öte doksisisiklin uygulanan grupta da latiritik gruba göre IL-6 seviyesi anlamlı olarak yüksekti ($p<0.01$). Aynı zamanda elektron mikroskopik olarak da kollajen yapısında düzelme olmadığını saptamamız; bu doz ve sürede uygulanan doksisisiklinin ultrastrüktürel parametreler ve serum IL-6 seviyesi üzerine herhangi bir olumlu etki oluşturmadığını desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada oral doksisisiklin uygulamasının çapraz bağlantısı engellenerek oluşturulmuş defektif kollajen üzerine etkili olmamasını, tetrasiklinlerin yeni kollajen sentezi üzerine etkili olmayıp, etkilerinin daha çok yıkımı engellemesi yönünde olmasına bağlı olabileceğini düşündük. Bu konuda daha detaylı sonuç elde edebilmek için farklı dozlarda ve farklı tetrasiklin türleriyle yapılacak daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Baden E, Bouissou H. The effect of chronic beta-aminopropionitrile intoxication on the periodontium of the rat. A light microscopic and histochemical study with review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55(1):34-46.
2. Cho M, Garant PR. The effect of beta-aminopropionitrile on the periodontal ligament. I. Ultrastructure of fibroblasts and matrix. *J Periodontal Res.* 1984;19(3):247-60.
3. Shore RC, Berkovitz BK, Moxham BJ. Histological study, including ultrastructural quantification, of the periodontal ligament in the lathyrin rat mandibular dentition. *Arch Oral Biol.* 1984;29(4):263-73.
4. Karimbux NY, Ramamurthy NS, Golub LM, Nishimura I. The expression of collagen I and XII mRNAs in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol.* 1998;69(1):34-40.
5. Grevstad HJ. Doxycycline prevents root resorption and alveolar bone loss in rats after periodontal surgery. *Scand J Dent Res.* 1993 Oct;101(5):287-91.
6. Weiner GS, DeMarco TJ, Bissada NF. Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat. *J Periodontol.* 1979 Dec;50(12):619-23.
7. Golub LM, Lee HM, Lehrer G et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res.* 1983 Sep;18(5):516-26.
8. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998; 12: 12-26.
9. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: a new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res* 1984; 19: 651-655.

10. Golub LM, Goodson JM, Lee HM, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. *J Periodontol.* 1985 Nov;56(11 Suppl):93-7
11. Golub LM, Wolff M, Lee HM, et al. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontal Res.* 1985 Jan;20(1):12-23.
12. Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol.* 1993;64(8 Suppl):819-27.
13. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigava M, Myoukai F, Kurihara H, Murayama Y. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont* 1994; 65: 147-153.
14. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today* 1990; 11: 443-449.
15. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990; 145: 3297-3303.
16. Kloppenburg M, Dijkmans BA, Verweij CL, Breedveld FC. Inflammatory and immunological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with minocycline. *Immunopharmacology* 1996; 31(2-3): 163-9.