

Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Ratların Karaciğer ve Böbrek Dokularında Pirüvat Kinaz Aktivite Düzeyleri

Seval YILMAZ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Bilal ÜSTÜNDAĞ

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 31.01.2001

Özet: Bu çalışmada, streptozotosin ile oluşturulan diabetik ratların karaciğer ve böbrek dokularında pirüvat kinaz enzim aktivitelerindeki değişiklikler incelenerek hastalıkla olan ilişkisi araştırıldı.

Diabetes mellitus, Wistar-Albino ratlara intra peritoneal olarak tek doz streptozotosin (60 mg/kg) verilmesiyle oluşturuldu. Streptozotosin verilmesini takiben 3. ve 12. günlerde ratların karaciğer ve böbrek dokularının pirüvat kinaz aktiviteleri Beutler yöntemine göre ölçüldü. Üç ve 12 gün süreyle diabet oluşturulmuş ratların karaciğer pirüvat kinaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı saptandı ($p<0,01$). Diabetik grubun 3. gündeki böbrek pirüvat kinaz aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik bulunmazken, 12. gündeki böbrek pirüvat kinaz aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$).

Sonuç olarak; diabetes mellitusda karbonhidrat metabolizması bozukluğunun bir sonucu olarak, karaciğer ve böbrek dokularının pirüvat kinaz aktivitelerinde günlere bağlı olarak değişikliklerin gerçekleştiği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Böbrek, karaciğer, pirüvat kinaz, streptozotosin

The Levels of Pyruvate Kinase Activity in Renal and Hepatic Tissues of Rats with Diabetes Induced by Streptozotocin

Abstract: In this study, the changes in pyruvate kinase enzyme activities in the liver and kidney tissues of rats with diabetes induced by streptozotocin were examined and the relations with the disease were investigated.

Diabetes mellitus was induced in Wistar-Albino rats by the administration of a single intraperitoneal dose of streptozotocin (60 mg/kg body weight). After streptozotocin was injected, the pyruvate kinase activities in the livers and kidneys of the rats were analysed according to Beutler's method on days 3 and 12. It was determined that liver pyruvate kinase enzyme levels in rats with diabetes induced with streptozotocin were decreased on days 3 and 12 in relation to the value obtained from the control group ($p<0.01$). Pyruvate kinase activity in kidney on day 3 in the diabetic group were not significantly different from that of the control group. However, on day 12 there were significantly higher pyruvate kinase levels in the kidneys of the diabetic group than in those of the control group ($p<0.001$).

In conclusion, it was observed that in diabetes mellitus, pyruvate kinase activities varied according to different days as a result of abnormalities in the carbohydrate metabolism.

Key Words: Kidney, liver, pyruvate kinase, streptozotocin

Giriş

Diabetes mellitus; insülin salgılanma yetersizliği ve hedef dokularda insülinin metabolik etkisine karşı gelişen direnç hali ile karakterize, genetik kökenli metabolik bir hastalıktır. Diabetes mellituslu hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelmektedir (1,2).

Diabetes mellitusda; özellikle karbonhidrat metabolizmasında bozukluklar oluşmakta ve gıdalarla alınan karbonhidrat düzeyine göre hücrenin insülin salgılaması uyarılarak, artan kan glikoz konsantrasyonu azaltılmaktadır (2).

Glikolitik yolun enzimlerden biri olan pirüvat kinaz (E.C. 2.7.1.40.), yolun son aşamasında fosfoenolpirüvati,

pirüvik asite dönüştüren ve karaciğer glikoz metabolizmasında anahtar bir enzimdir (3-5).

Alloksan veya streptozotosin, deneysel diabetes mellitus oluşturmak amacı ile yaygın olarak kullanılan diabetik etkenlerdir. Hayvanlarda travma, cerrahi uygulama, neoplazmalar yanında streptozotosin ve alloksan gibi diabetojenik etkenler ile pankreas β hücrelerinin zarar görmesi sonucu diabetes mellitusun oluşabileceği bildirilmiştir. Streptozotosin hem pankreatik insülin salınımının hem de tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olan hedef doku hücrelerindeki insülin reseptörlerinde azalma ile etkisini göstermektedir (6-8).

Karaciğer, glikoz fosforilasyonu için insüline ihtiyaç duyarken, böbrek, hiperglisemi esnasında glikozu kullanma ve glikoz transportu için insüline ihtiyaç duymayan (insülin bağımsız) bir organdır. Diabette, insülin yokluğunda enzim düzeyleri karaciğer ve böbrekte farklı olarak değişmektedir (9).

Çalışmada; streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratların karaciğer ve böbrek dokularında diabet süresine bağlı olarak pirüvat kinaz enzim aktivitesindeki değişikliklerin ve bu değişikliklerin hastalık ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada ağırlıkları 180-250 g arasında değişen Wistar-Albino ırkı toplam 24 adet erkek rat kullanıldı. Kontrol, streptozotosin verilmesini takiben 3 ve 12 gün süre ile diabet oluşturmak üzere toplam üç grup oluşturuldu. Diabet oluşturulacak ratların her birine 60 mg/kg olacak şekilde tek doz streptozotosin (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) 0,1 M sitrat-fosfat tamponunda çözülerek intra peritoneal olarak uygulandı. Kontrol grubuna sadece 0,1 M sitrat-fosfat tamponu enjekte edildi. Hayvanlar her üç grupta da eşit koşullar altında, eşdeğer besinler ile beslendiler. Her gün, ratların kuyruk venasından alınan kanın glikozu glikometrede (Ames) ölçülerek ve idrar glikozu strip ile değerlendirilerek diabetes mellitusun oluşumu kontrol edildi. İlaç uygulamasını takip eden 3. ve 12. günlerde kesilecek olan ratlar 1 gece önceden aç ve susuz bırakıldılar.

Üçüncü ve 12. günün sonunda eter anestezisi altında ratların karın ve göğüs bölgesi açılarak enjektör ile

kalplerinden kan alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi.

Karaciğer ve böbrek dokuları bekletilmeden soğuk serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) ile yıkanarak pirüvat kinaz aktiviteleri yönünden analiz edildi. Tüm dokular 1/10 oranında 1 M Tris HCl tamponu (pH 8) ile Potter-Elvehjem marka homojenizatörde (cam-cam) +4°C'de homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar soğutmalı santrifüj içerisinde (Sorvall RC-5B) +4°C'de 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar enzim kaynağı olarak kullanıldı. Pirüvat kinaz aktivitesi 340 nm'de NADH'in azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler ve ark.'nın (10) yöntemi ile, protein miktarı ise Lowry ve ark.'nın (11) yöntemi ile tayin edildi. Serum glikoz miktarı tayini ise, Technicon RA-XT otoanalizörde yapıldı.

Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen ortalama değerler açısından gruplar arasındaki istatistiksel farkın değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (Kruskal Wallis) kullanıldı. Grup içi değerlendirmelerde Tukey B testi kullanıldı.

Bulgular

Çalışmaya alınan gruplar arasındaki ağırlık değişimleri incelendi. Vücut ağırlıkları kontrol grubunda $200 \pm 3,7$ g, diabetes mellitus oluşturulan grupta 3. günde $196 \pm 4,4$ g, 12. günde $190 \pm 6,7$ g olarak saptandı (Tablo 1). Kontrol grubu ile diabetik grup karşılaştırıldığında diabetin 3. gününde vücut ağırlıkları yönünden bir farkın olmadığı ($p > 0,05$), 12. gününde ise vücut ağırlıklarının önemli derecede azaldığı saptandı ($p < 0,05$).

Kan glikoz düzeyi kontrol grubunda $136 \pm 3,8$ mg/dl olarak ölçülürken, streptozotosin uygulanan grupta 3. günde $398 \pm 8,2$ mg/dl, 12. günde $488 \pm 11,7$ mg/dl olarak ölçüldü (Tablo 1). Streptozotosin verilerek diabet oluşturulmuş her iki grupta da kan glikoz değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0,001$) gözlemlendi.

Karaciğer dokusunda yapılan çalışmada, pirüvat kinaz aktivitesi kontrol grubunda $3,20 \pm 0,97$, diabetes mellitus oluşturulmuş grupta 3. günde $1,59 \pm 0,42$ ve 12. günde $2,72 \pm 0,73$ U/g protein olarak saptandı (Tablo 1). Kontrol grubu ile streptozotosin uygulanmasının 3. günü arasında ve diabetin 3. günü ile 12. günü arasında önemli farklılıklar gözlemlendi ($p < 0,01$).

| | n | Vücut Ağırlıkları (g) | Kan Glikozu (mg/dl) | Karaciğer Pirüvat Kinazı (U/g protein) | Böbrek Pirüvat Kinazı (U/g protein) |
|-------------------------|---|-----------------------|---------------------|--|-------------------------------------|
| Kontrol Grup | 8 | 200±3,7 | 136±3,8 | 3,20±0,97 | 1,98±0,11 |
| Diabetik Grup (3. gün) | 8 | 196±4,4 | 398±8,2* | 1,59±0,42** | 1,96±0,07* |
| Diabetik Grup (12. gün) | 7 | 190±6,7*** | 488±11,7* | 2,72±0,73** | 5,24±0,26* |

* p<0,001,

** p<0,01,

*** p<0,05

Böbrek dokusunda pirüvat kinaz aktivitesi kontrol grubunda 1,98±0,11 U/g protein olarak ölçüldü. Diabet oluşturulmuş grupta ise, 3. günde 1,96±0,07 U/g protein, 12. günde 5,24±0,26 U/g protein değerleri ölçüldü (Tablo 1). Diabetin 3. günü ile kontrol grubu arasında önemli bir farklılık bulunmazken, diabetin 12. gününde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış saptandı (p<0,001). Streptozotosin uygulanmasından sonra 3. ve 12. gün arasında da önemli bir farklılık bulundu (p<0,001).

Tartışma

Yapılan çalışmalar ile, etiolojisinde bir çok değişik etkenin rol oynadığı gösterilmiş olan gerek kendiliğinden gelişen, gerekse deneysel olarak streptozotosin veya alloxan gibi diabetojenik etkenler ile oluşturulan diabetes mellitusun özellikle damarsal yapılar üzerinde yoğunlaşan komplikasyonları ile daha çok göz, böbrek, sinir ve arterlerde olmak üzere organizmada pek çok bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (12-14). Deney hayvanlarına streptozotosin uygulanması ile oluşturulan diabetes mellitusta streptozotosinin etkisiyle pankreasın tahribatına bağlı olarak çeşitli biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir (15).

Plaschke ve Hoyer (9) glikolitik ve glikoneogenetik enzimlerde streptozotosinin toksik etkisini araştırmak amacı ile yaptıkları bir çalışmada enzimleri in vitro 60 mmol streptozotosin ile inkübe etmişler ve enzim aktivitesinde belirgin bir değişikliğin olmadığını saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise (16) sadece asetil transferaz aktivitesinde streptozotosin ile inkübasyondan sonra önemli olmayan değişiklikler saptanmıştır. Streptozotosin enjeksiyonunu takiben 3. ve 6. haftalarda

ratların beyin korteksi ve hipotalamusunda glukojen konsantrasyonunda artma ve glikolitik enzim aktivitelerinde ise belirli bir azalma saptanmıştır (9).

Kan glikozundaki artış; metabolize glikoz için karaciğer veya perifer dokuların bozulmasının ve karaciğer ile böbrekte glukoneogenezisin aktivasyonunun başlıca sonucudur. Hepatositlerde glikoz fosforilasyon hızındaki değişiklikler kan glikoz düzeyinde düzensizliğe neden olabilir (17). Alloxan (200 mg/kg deri altı) veya streptozotosin (60 mg/kg damar içi) verilerek diabet oluşumunu takiben 4. haftada ratların vücut ağırlıklarının %22 azaldığı rapor edilmiştir (7).

Karaciğer, glikozun fosforilasyonu, metabolik yola glikoz-6-fosfatın girişi için insüline ihtiyaç duyar. İnsüline bağımlı olmayan bir organ olan böbrek ise, aynı fonksiyonlar için insüline ihtiyaç duymaz. Diabetes mellitusta, insülin yokluğundan karaciğerde ve böbrekte enzim aktiviteleri farklı etkilenmektedir. Diabette, genel doku kaybına karşılık böbrek ağırlığının arttığı bildirilmiştir (18). Saxena ve ark. (19) diabetik sıçanlarda böbrek ağırlıklarının yaklaşık olarak %30 arttığını, karaciğer ağırlığının ise %20 oranında azaldığını ayrıca, pirüvat kinaz aktivitesinin karaciğerde düşerken, böbrekte arttığını rapor etmişlerdir. Diabetes mellitusta karaciğer glikozu kullanmayan, böbrek ise kullanan bir dokudur (19).

Sochor ve ark. (7), 4 hafta süre ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Miethke ve ark. (20), diabet oluşturulmuş ratlarda karaciğerde ilk 24 saatte pirüvat kinaz aktivitesinin değişmediğini, 48 saat sonunda ise enzim aktivitesinin yaklaşık %70 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Tablo 1'de görüldüğü gibi

Tablo 1. Kontrol ve Diabetes Mellitus Oluşturulmuş Grupların Vücut Ağırlıkları, Glikoz Düzeyleri, Karaciğer ve Böbrek Pirüvat Kinaz Aktivite Düzeylerinin Günlere Bağlı Değişimleri.

diabetes mellitus oluşturulmuş grupta karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi günlere bağlı olarak istatistiksel önemli bir azalma göstermiştir. Bulgularımız Sochor ve ark.'nın (7, 18, 21) sonuçları ile uyum içerisinde dir.

Sochor ve ark. (21), deneysel olarak diabetes mellitus oluşturulmuş ratlarda; diabete bağlı olarak renal hipertrofi geliştiğini ve diabetin ilk 5 gününde böbrek pirüvat kinaz aktivitesinin değişmediğini, Grötsch ve ark. (15) ise, diabette glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi hariç karbonhidrat metabolizmasında bulunan pirüvat kinaz, laktat dehidrogenaz enzim aktivitelerinin böbrek korteksinde arttığını bildirmişlerdir. Khandelwal ve ark. (22), streptozotosin uygulanmış ratların kan glikoz düzeylerinin 5 kat, böbreklerinde glukojenin 30 kat arttığını saptamışlardır. Böbrek dokusunda yaptığımız çalışmada; böbrek pirüvat kinaz aktivitesi diabetin 3. gününde kontrol grubuna göre bir değişiklik saptanmazken, 12. gününde diabete spesifik değişiklikler olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Diabette böbrek büyümesi ile artmış pirüvat kinaz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki vardır. Diabetin 12. gününde pirüvat kinaz aktivitesindeki değişikliğin muhtemelen böbreklerde meydana gelen diabetik harabiyete bağlı olduğu düşünülmektedir. Pirüvat kinaz böbrek komplikasyonlarına katılabilir.

Diabette, pirüvat kinaz aktivitesinde azalma; pirüvat kinaz sentezinde azalmadan kaynaklanabilir. Ayrıca, kontrol edilmeyen diabette insülin yokluğunun veya

insülin sentez anormalliklerinin de pirüvat kinaz aktivitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (19). Açlıkta ve diabette insülinin düzeyinin düşmesi karaciğerde pirüvat kinaz miktarında bir azalmaya yol açmaktadır. Enzim miktarındaki değişiklik, primer olarak gen transkripsiyon düzeyindeki düşüşe de bağlı olabilir. Bu enzimin düşük aktivitesi diabetes mellitusda glikozun pirüvata dönüşme eğilimini azaltmaktadır (17).

Sonuç olarak, deneysel diabetes mellitus oluşturulmuş ratlarda glikoz metabolizmasının etkilendiği ve diabetes mellitusa bağlı olarak karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinin azaldığı, böbrek pirüvat kinaz aktivitesinde ise günlere bağlı olarak değişikliklerin gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Deneysel olarak diabetes mellitus oluşturulmuş ratlarda pirüvat kinaz enziminin etkilendiği tespit edilmiştir. Bu çalışma sonunda diabete bağlı ortaya çıkan hiperglisemi ve pirüvat kinaz aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin ratların böbrek dokusunda patolojik değişikliklere yol açabileceği gösterilmiştir.

Diabetes mellitusta ortaya çıkan bazı komplikasyonların nedeni olabileceği düşünülebilir. Böbreklerde diabetin 3. gününde bir değişiklik olmadığı, fakat 12. gündeki bulguların diabete spesifik değişiklikler olduğu gözlemlendi.

Böbrek medullası çok az mitokondri taşıdığı için ATP kaynağı olarak glikolize bağımlıdır.

Kaynaklar

1. Yedigün, M.: Diabetes Mellitus. İstanbul, Haseki Hastanesi Vakfı, 3-45, 1995.
2. Aksoy, T.: Karbonhidrat Metabolizması. Diabetes Mellitus. İstanbul, Alemdar Ofset, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 24-88, 1988.
3. Kaloyianni-Dimitriades, M.G., Beis, I.D.: Purification Catalytic and Regulatory Properties of Rana ridibunda Erythrocyte Pyruvate Kinase. Comp. Biochem. Physiol. 1984; 7B (2): 245-250.
4. Muirhead H.: Isoenzymes of Pyruvate Kinase. Biochem. Soc. Trans. 1990; 18 (2): 193-196.
5. Imamura K., Taniuchi K., Tanaka T.: Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase. J. Biochem. 1972; 72: 1001-1015.
6. Pillis S.J., El-Maghrabi M.R., Clauss T.H.: Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. Annu. Rev. Biochem. 1988; 57: 755-783.
7. Sochor, M., Kunjara, S., Baquer, N.Z., McLean, P.: Regulation of Glucose Metabolism in Livers and Kidneys of NOD Mice. Diabetes. 1991; 40: 1467-1471.
8. Feldman, E.C.: Disease of Endocrin Pancreas. In Textbook of Veterinary Internal Medicine. Disease of the Dog and Cat. Philadelphia. W.B. Saunders Company. (2nd Ed) Chapt. 67(2): 1615-1650, 1983.
9. Plaschke, K., Hoyer, S.: Action of the Diabetogenic Drug Streptozotocin on Glycolytic and Glycogenolytic Metabolism in Adult Rat Brain Cortex and Hippocampus. Int. J. Dev. Neuroscience. 1993; 11(4): 477-483.
10. Beutler E., Blume K.G., Kaplan J.C., Löhr G.W., Ramot B., Valentine W.N.: International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. Br. J. Haematol. 1977; 35: 311-340.
11. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J.: Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.

12. McLennan S., Yue D.K., Fisher E., Capogreco C., Heffernan S., Ross G.R.: Deficiency of Ascorbic Acid in Experimental Diabetes. 1988; 37: 359-361.
13. Handa H., Sakurama S., Nakagawa S., Yasukouchi T., Sakamoto W., Izumi H.: Glandular Kallikrein, Renin and Angiotensin Converting Enzyme of Diabetic and Hypertensive Rats. *Advan. Exp. Med. Biol.* 1989; 24: 443-448.
14. Valentovic M.A., Elliot C.W., Ball J.G.: Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes and Insulin Treatment on Angiotensin Converting Enzyme Activity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1987; 58 (1): 27-39.
15. Grötsch, H., Hropot, M., Kief, H., Klaus, E.: Enzymuria in Streptozotocin-Diabetic Rats. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1986; 24: 533-539.
16. Hellweg R., Nitsch R., Hock C., Jaksch M., Hoyer S.: Nerve Growth Factor and Choline Acetyltransferase Activity Levels in the Rat Brain Following Experimental Impairment of Cerebral Glucose and Energy Metabolism. *J. Neurosci. Res.* 1992; 31: 479-486.
17. Valera, A., Rodriguez-Gil, J.E., Bosch, F.: Vanadate Treatment Restores the Expression of Genes for Key Enzymes in the Glucose and Ketone Bodies Metabolism in the Liver of Diabetic Rats. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 4-11.
18. Sochor M., Baquer N.Z., McLean P.: Regulation of Pathways of Glucose Metabolism in Kidney. The Effect of Experimental Diabetes on the Activity of the Pentose Phosphate Pathway and the Glucuronate-Xylulose Pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 198: 632.
19. Saxena, A.K., Srivastava, P., Baquer, N.Z.: Effects of Vanadate on Glycolytic Enzymes and Malic Enzyme in Insulin-Dependent and -Independent Tissues of Diabetic Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 216: 123-126.
20. Miethke, H., Wittig, B., Nath, A., Zierz, S., Jungermann, K.: Metabolic Zonation in Liver of Diabetic Rats. *Biol-Chem Hoppe-Seyler.* 1985; 366: 493-501.
21. Sochor, M., Kunjara, S., Greenbaum, A.L., McLean, P.: Renal Hypertrophy in Experimental Diabetes. *J. Biochem.* 1986; 234: 573-577.
22. Khandelwal, R.L., Zinman, S.M., Knull, H.R.: The Effect of Streptozotocin-induced Diabetes on Glycogen Metabolism in Rat Kidney and its Relationship to the Liver System. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 197: 310-316.