

Orjinal Araştırma Makalesi/ Original Paper

Deneyisel Diyabet Modeli Oluşturulan Ratlarda Gebelik Süresince Hipokampusta Piramidal Nöron Sayısındaki Değişimin Stereolojik Olarak İncelenmesi

Stereological Investigation of Change in Hippocampal Pyramidal Neurons in During Pregnancy in Rats Occurred Experimental Diabetes Models

Azize YILDIZ^{1*}, Murat Çetin RAĞBETLİ², Neşe ÇÖLÇİMEN¹

¹ Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D, Van, TÜRKİYE.

² Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. Karaman, TÜRKİYE.

* Sorumlu yazar: Azize YILDIZ; E-mail: Azizetarlakyyildiz@gmail.com

ÖZET

Amaç: Diyabetes mellitus, dünya çapında hızla artan insülin eksikliği ya da insülin direnci sebebiyle oluşan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile belirgin yüksek mortalite ve morbiditeye sahip endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Hipokampustaki nöronal sistem üzerinde de etkileri olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızın amacı deneyisel diyabet oluşturulan ve normal sıçanlarda, gebelik döneminin her trimesterinde hipokampustaki piramidal nöron sayısına etkilerini stereolojik yöntemlerle değerlendirmektir.

Materyal ve Metot: Çalışma için sıçanlar rastgele olmak üzere iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n:18), Diyabetes mellitus grubu (n:18); Streptozotosin (STZ) ile deneyisel diyabet oluşturulan Diyabetes mellitus grubuna tek doz 45mg/kg Streptozotosin intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. Uygulamadan 72 saat sonra her iki gruptaki sıçanların açlık kan şekerleri ölçüldü. Diyabet grubunda açlık kan şekeri değeri 200 mg/dl üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi. Vajinal smear ve vajinal plak izlemi yapılarak gebelik tespiti yapıldı. Gebelik trimester dönemleri olan 7, 14 ve 21. günlerde anestezi altında sıçanlardan beyin dokuları çıkarılarak rutin ışık mikroskopik histolojik takip yapıldı. Her iki gruba sayısal yoğunluk hesaplaması amacıyla fiziksel disektör metodu uygulandı. Bunun için 5 µm kalınlığında ilki rastgele olmak üzere sonrakiler her 400µm'de bir ortalama beş çift kesit alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Işık mikroskopunda incelenerek, fotoğraflandı. Stereolojik incelemede tarafsız sayım çerçevesiyle nöron sayımı yapıldı. İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Bulgular: Stereolojik hesaplamalar sonucunda diyabet ve kontrol grupları arasındaki hipokampal nöron sayısında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu (p<0.05). Ancak trimesterler arasında gruplarda herhangi bir istatistiksel fark bulunmadı.

Sonuç: Diyabetin vücutta birçok zararlı etkisi olduğu bilinmekte olup çalışmamızda gebe sıçanlarda hipokampal nöron sayısında anlamlı azalmaya neden olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Gebelik, Hipokampus, Stereoloji, Streptozotosin.

ABSTRACT

Objective: Diabetes mellitus is an endocrine and metabolic disease increasing world wide with the markedly high mortality and morbidity due to carbohydrate, lipid and protein metabolism disorder caused by insulin deficiency or insulin resistance. Studies have also shown that it has effects on the neuronal system in the hippocampus. The aim of our study is to evaluate the effects of the pyramidal neuron number in the hippocampus in each trimester of pregnancy by stereological methods in experimentally induced diabetes and normal rats.

Material and Method: Rats were randomly divided into two groups for the study. Control group (n:18), Diabetes mellitus group (n:18); experimental diabetes was induced by streptozotocin (STZ). A single dose of 45mg/kg Streptozotocin was administered intraperitoneally (i.p) to the Diabetes mellitus group. No treatment was applied to the control group. Fasting blood glucose of rats in both groups was measured 72 hours after the application. In the diabetes group, those with a fasting blood glucose value above 200 mg/dl were considered as diabetes. Pregnancy was determined by monitoring vaginal smear and vaginal plaque. Routine light microscopic histological follow-up was performed by removing brain tissues from rats under anesthesia on the 7th, 14th and 21st days of pregnancy. Physical dissect or method was applied to both groups for numerical density calculation. For this, an average of five pairs of sections were taken at 5 µm thickness, the first of which was random, and the subsequent ones were every 400 µm. Sections were stained with Hematoxylin&Eosin. Examined and photographed under a light microscope. Neuron counting was performed with an unbiased counting frame in stereological examination. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

Results: As a result of stereological calculations, a statistically significant difference was found in the number of hippocampal neurons between diabetes and control groups (p<0.05). However, there was no statistical difference between the groups between trimesters.

Conclusion: It is known that diabetes has many harmful effects on the body, and in our study, it was determined that there was a significant decrease in the number of hippocampal neurons in pregnant rats.

Keywords: Diabetes, Hippocampus, Pregnancy, Stereology, Streptozotocin.

Atf Yapmak İçin: Yıldız A, Rağbetli MÇ, Çölçimen N. Deneyisel diyabet modeli oluşturulan ratlarda gebelik süresince hipokampusta piramidal nöron sayısındaki değişimin stereolojik olarak incelenmesi. *Van Sag Bil Derg* 2022, 15,(2)136-141.

<https://doi.org/10.52976/vansag-lik.1012527>.

Geliş Zamanı: 20/10/2021

Kabul Zamanı: 22/08/2022

Basılma Zamanı: 31/08/2022

GİRİŞ

Diyabetes mellitus, dünya çapında hızla artan insülin eksikliği ya da insülin direnci sebebiyle oluşan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile belirgin yüksek mortalite ve morbiditeye sahip endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Hipokampus'un öğrenme ve bellek oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda hipokampus lezyonları, bilgilerin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılmasında çeşitli sorunlara yol açar ve böylece yeni bilgilerin depolanması engellenmiş olur (Yonguç, 2009). Diyabet birçok organ ve doku üzerinde uzun dönemde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Hipokampustaki nöronal sistem üzerinde de etkileri olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Hipokampus histolojik olarak üç bölüme ayrılmaktadır ve bu üç bölümün tamamına hipokampal formasyon adı verilmektedir. Bilginin kısa süreli, uzun süreli hafızaya dönüştürülmesinde, hipokampus rol oynar (Tanbek, 2015). Hipokampusun bilhassa davranış oluşturma ve hafıza ile ilişkili fizyolojik olaylarda kayda değer rolü vardır. Amigdala, orbitofrontal korteks ve ön singulat korteksle birlikte hipokampus bilgi işleme sürecinde ve emosyonel bellekle deklaratif bellek oluşumunda rol oynar (Koç Okudur, 2013). Diyabetin hipokampustaki nöronal yapılarda nörotransmitter salgılanması ve nörotransmitterlerin reseptörlerle kombinasyonu düzeyinde yapısal, fonksiyonel ve kimyasal türlü bozulmalara ve nöronal apoptozise sebep olarak bilişsel işlevleri bozduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (Koroğlu ve ark., 2004). Biz de çalışmamızda Diabetes mellitus oluşturulan ve normal sıçanlarda, gebelik döneminin her üç trimesterinde de hipokampustaki piramidal nöron sayısında meydana gelen değişiklikleri stereolojik yöntemlerle değerlendirmeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik kurulundan etik onay alındı (24/08/2017, No: 2017/08). Otuz altı adet 2 aylık, yetişkin ortalama 190-250 gr. ağırlığında Wistar Albino cinsi dişi sıçan alındı. Sıçanlar randomize olarak 2 gruba (kontrol ve diyabet) ayrıldı. Deney hayvanları standart kafeslerde, 12/12 ışık/karanlık siklusu, 22±2 °C sıcaklıkta, standart pellet yem ve musluk suyuyla ad-libitum beslenmeye tabi tutuldular. STZ fresh olarak hazırlanıp 45 mg/kg tek doz intraperitoneal olarak uygulandı ve akabinde 72 saat sonra açlık kan şekeri seviyesi ölçüldü (Kannan ve ark., 2016). 200 mg/dl ve üzerindeki sıçanlar diyabet kabul edildi. Kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı. Bundan sonra sıçanların vajina girişine bir damla serum fizyolojik damlatılıp pamuklu çubuk yardımıyla smear alındı. Oda sıcaklığında smearler kurutularak fiksasyon sağlandı. Yüzde birlik toluidin mavisi ile 5 dakika boyanan preparatlar distile suyla yıkandıktan sonra entellan ile kapatıldı. Mikroskopta incelendi (Şekil 1). Diyabet ve kontrol grubundaki sıçanların siklus senkronizasyonu sağlanarak çiftleşme için bir gece boyunca 3 dişi 1 erkek olacak şekilde kafese konuldu. Vajinal plak tespit edilenler gebe olarak kabul edildi. Çalışmamızda birinci trimester için gebeliğin 7. günü, ikinci trimester için gebeliğin 14.günü, üçüncü trimester için gebeliğin 21. günü seçildi. Her iki gruptan gebeliğin 7. 14. ve 21.günlerinde 6 adet hayvanın anestezisi (ketamin, 50 mg/kg) altında beyin dokusu bütün olarak çıkarıldı. Dokular % 10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat tesbit edildi. Rutin ışık mikroskopik histolojik takip yapıldı. Her iki gruba sayısal yoğunluk hesaplanması amacıyla fiziksel disektör yöntemi uygulandı. Parafine gömülen dokulardan mikrotomla 5µm kalınlığında ardışık kesitler alındı. İlki rastgele olmak üzere sonrakiler her 400µm'de bir ortalama beş çift kesit alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandı ve entellenla kapatıldı. (Bancroft ve Stevens, 1996; Demir, 2001). Işık mikroskopunda

(Nikon (Y-IM) Eclipse, Japan) 100 'lük objektifte dokular incelendi ve fotoğraflandı. Sayısal yoğunluk hesaplama formülü kullanılarak hipokampusun piramidal hücre tabakasındaki cornu ammnos'in tüm alanlarındaki piramidal nöronlar ayırım yapılmadan sayıma dahil edildi. Stereolojik olarak, Sayısal Yoğunluk Hesaplama formülü kullanılarak tarafsız sayım çerçevesinin alanı bu büyütmeye 6500µm olarak ele alındı. Alan örneklemede ise ¼ oranı uygulanarak kareli alan cetvelimizin her dörtte bir alanı sayıma dahil edildi. Sayım yapılırken ilk kesitte gözlenip ikinci kesitte gözlenmeyen nöron çekirdekleri baz alınarak nöronlar sayıldı.

Sayısal Yoğunluk Hesaplama formülü:

$$N_v = N/V_{ref}$$

N_v : hücrelerin sayısal yoğunluğu (hücre/birim hacim), N : hücre sayısı ve V_{ref} : hipokampusun toplam referans hacmidir (Mayhew ve Gundersen, 1996).

Standart stereolojik yaklaşımda her gruptaki optimum örnek boyutunu belirlemek için hata katsayısı

(HK= Coefficient of Error; CE) ve değişim katsayısı (DK= Coefficient of Variation; CV) kullanılır (Gundersen ve Jensen 1987). Çalışmamızın HK ve DK değerleri literatür verileriyle uyumluydu.

İstatistikler minimum, maksimum, standart sapma, medyan ve ortalama değerler olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hesaplamalar SPSS istatistik paket programında yürütüldü ve anlamlılık düzeyi %5 olarak kabul edildi.

BULGULAR

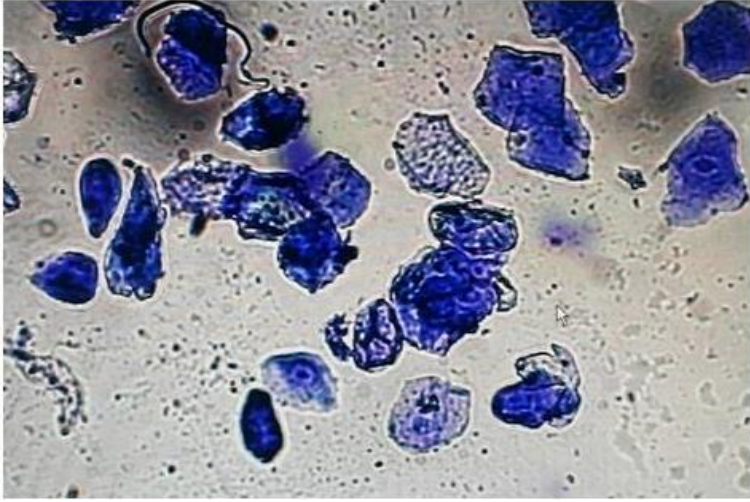
Stereolojik hesaplamalar sonucunda istatistiksel olarak diyabet ve kontrol grupları arasında hipokampal piramidal nöron sayısı bakımından anlamlı fark tespit edildi. ($p < 0.05$) (Tablo 1) (Şekil 1). Ancak trimesterler arasında (I, II. ve III) hipokampal piramidal nöron sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (Tablo 2) (Şekil 2, 3). Sıçanlara ait beyin dokusunda yapılan histopatolojik incelemede gruplar arasında fark izlenmedi.

Tablo 1. Gruplar arası karşılaştırma sonuçları

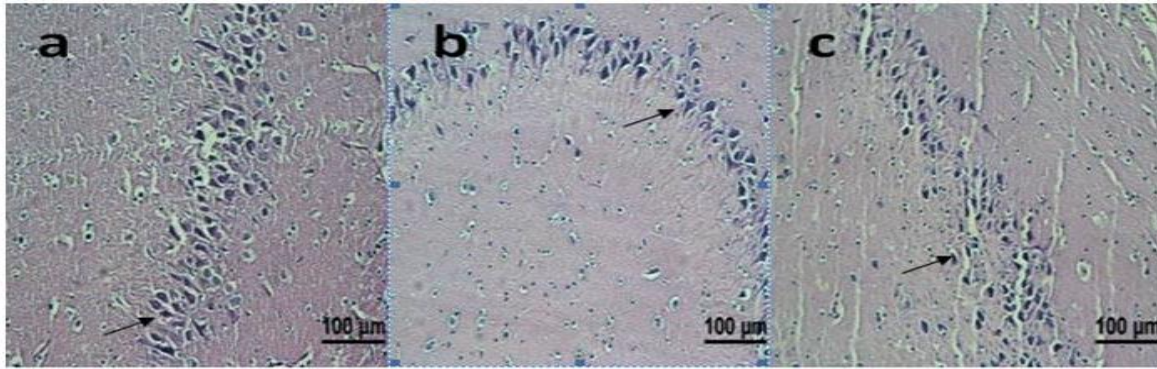
	Grup	Median	Mean	Std. Sap.	Minimum	Maximum	*p.
Hücre Sayısal Yoğunluk (mm^3)	Kontrol	569201	571754	77974	465807	704628	0,011
	Diyabet	446038	456828	128145	234876	745890	

Tablo 2. Gruplarda trimesterler arası karşılaştırma sonuçları

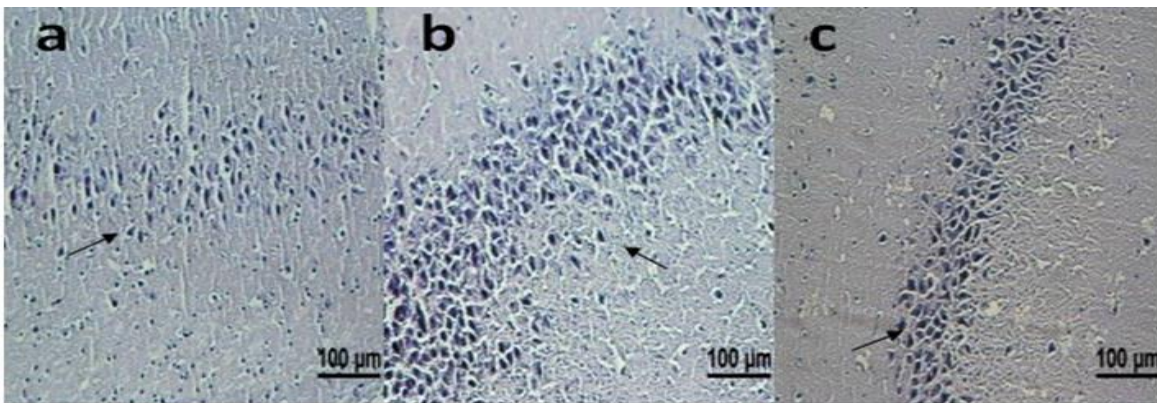
	Trimester	Kontrol					Diyabet					*p.
		Median	Ort.	SS	Min.	Max.	Median	Ort.	SS	Min.	Max.	
Hücre Sayısal Yoğunluk (mm^3)	T1	625628	639149	59875	587190	704628	424081	517215	199170	381673	745890	0,513
	T2	536702	549473	90727	465807	645909	425713	391682	108337	234876	480428	0,077
	T3	528471	526639	43506	482246	569201	469752	483302	40146	451684	528471	0,275



Şekil 1. Toluidin mavisi ile boyanmış östrus siklusu



Şekil 2. Diyabet grubu 1. trimester (a) 2. trimester (b) ve 3. trimester (c) piramidal hücrelerin görünümü (siyah ok) (Hematoksilen & Eozin, Scale bar 100 µm)



Şekil 3. Kontrol grubu 1. trimester (a) 2. trimester (b) ve 3. trimester (c) piramidal hücrelerin görünümü (siyah ok) (Hematoksilen- Eozin, Scale bar 100 µm)

TARTIŞMA

Hiperglisemi hafıza ve dikkat açısından bozulmalara sebep olabilir. Kronik hiperglisemi bilişsel bozulmaya ve sinapsal düzenlemede bozulmalara neden olabilmektedir. Hipergliseminin yanı sıra hipoglisemide bilişsel işlevlerde harabiyet yapmakta ve tekrarlayan hipoglisemi atakları bu yıkımı 1,5 – 2 kat artırmaktadır (Ünal ve ark., 2015). Beyin dokusu insülin üretmediği halde hipokampusda insülin reseptörleri tespit edilmiştir. Bu insülin reseptörlerinin beyindeki işlevleri gıda alımını azaltma, bilişsel fonksiyonlar, bellek ve nörodejeneratif bozukluklara sebep olmaktadır. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetes mellitusda kognitif işlevlerde azalma olduğu tespit edilmiştir (Ertörer, 2014). Yonguç ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada; STZ ile deneysel diyabet oluşturulan modelde Morris Su Labirenti (MWM) deneyinden ve stereolojik incelemelerden elde edilen veriler, STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda platformun yerini öğrenmede bozulmalara sebep olduğu ve hipokampusun piramidal katmanındaki toplam nöron sayısını azalttığı görülmüştür. Zhao ve arkadaşlarının (2016) yaptığı başka bir çalışmada STZ ile diyabet oluşturulan ratların hipokampusunda CA1'in kapladığı alanda azalma ve sinaptik yapılarda dejenerasyon saptanmıştır. Onar ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmalarında yine STZ kullanılarak oluşturulan diyabetin hipokampusda NLRP3 seviyesini artırarak ve nitrozatif stres oluşumuyla sıçanlarda öğrenme ve hafıza bozukluğuna sebep olduğunu göstermişler. Bizimde çalışmamızda diyabetik gebe sıçanların hipokampal piramidal nöron sayısında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Yapılan bir çalışmada kontrolsüz gestasyonel diyabetin postnatal dönemde sıçan yavrularının hipokampal nöronlar üzerinde nörotoksik etki yaptığı görülmüştür (Golalipour ve ark., 2012). Kontrolsüz diyabet gebe sıçanların yavrularında serebral purkinje hücrelerinde tahribata neden olmakta ve bu yavrularda motor ve davranışsal fonksiyonlarda bozulma görülmektedir (Hami ve

ark., 2016). Bu çalışmalar diyabetin yavru sıçanlardaki etkilerini göstermekte olup bizim çalışmamızda gebe sıçanların üzerinde olduğu için motor ve davranış fonksiyonları değerlendirilmedi. Sonuçta diyabetin vücudun birçok bölümünde hasara neden olduğu bilinmekte olup yaptığımız çalışmayla gebe sıçanlarda hipokampal nöron sayısında azalmaya neden olduğu tespit edildi ve daha ileri çalışmalarla desteklenmesinin uygun olacağı görüşündeyiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Van Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi (24-25 Temmuz 2020/ Van) özet sözlü bildiri olarak sunulmuştur

KAYNAKLAR

- Bancroft JD, Stevens A. (1996). Theory and Practice of Histological Techniques 4th Edition New York, Churchill Livingstone.
- Demir R. (2001). Histolojik Boyama Teknikleri Başvuru Kitabı. 1. Baskı Ankara, Palme yayıncılık .
- Ertörer ME. (2014). Diabetes mellitus ve bilişsel fonksiyonlar. *Türkiye Klinikleri J Endocrin*, 9(1), 6-12.
- Golalipour MJ, Kaboli Kafshgiri S, Ghafari S. (2012). Gestational diabetes induced neuronal loss in CA1 and CA3 subfields of rat hippocampus in early postnatal life. *Folia Morphologia*, 71(2), 71-77.
- Gundersen HJ, Jensen EB. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147(3), 229-263. doi:10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x, indexed in Pubmed: 3430576.
- Hami J, Vafaei-nezhad S, Ghaemi K, Sadeghi A, Ivar G, Shojae F, et al. (2016). Stereological study of the effects of maternal diabetes on cerebellar cortex development in rat. *Metab Brain Dis*, 31(3), 643-652. doi:10.1007/s11011-016-9802-5.
- Kannan P, Vijayaraj A, Sesh PSL, Narayanan V, Thangavel A, Pandiyan V. (2016). Antioxidant status in streptozotocin induced diabetic rats

- treated with vanadium complex. *Indian J Anim. Res*, 50(1), 57-62. doi: 10.18805/ijar.8564.
- Koç Okudur S. (2013). Ratlarda Hipokampus ve Subventriküler Zonda Hücrel Senesens Üzerine Kurkuminin Etkisi. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- Köroğlu Ş, Aşcıoğlu M, Küçük A. (2004). Sıçanlarda deneysel diyabetin öğrenmeye etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Derg.* 13(3), 52-58.
- Mayhew TM, Gundersen HJG. (1996). If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. Review. *J Anat*, 188, 1-15.
- Onar B, Özaçmak HS, Turan İ, Özaçmak VH. (2019). Diyabete bağlı kognitif bozukluk sıçanların hipokampuslarında NLRP3 ve nitrotirozin seviyelerinin artışı ile ilişkilidir. *Türkiye Diyabet ve Obezite Derg*, 3, 123-129. doi 10.25048/tjdo.2019.51.
- Tanbek K. (2015). Streptozotosin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Modelinde Metforminin Diyabetik Nöropati ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Ünal E, Akan O, Üçler S. (2015). Diyabet ve Nörolojik hastalıklar. *Okmeydanı Tıp Derg*, 31(Ek sayı), 45-51. doi: 10.5222/otd.2015.045
- Yonguç GN. (2009). Sıçanlarda Streptozotosin ile Oluşturulan Deneysel Diyabetin Uzaysal Öğrenme ve Hippocampus Nöron Sayısına Etkisi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Denizli.
- Zhao F, Li J, Mo L, Tan M, Zhang T, Tang Y, et al. (2016). Changes in neurons and synapses in hippocampus of streptozotocin-induced type 1 diabetes rats: a stereological investigation. *Anat Rec*, 299(9), 1174-1183. doi:10.1002/ar.23344.