



Diyabetik Sıçanlarda Kemik Dokusunda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Losartan'ın Etkileri

The Effects of Losartan on Lipid Peroxidation and the Antioxidant System in the Bone Tissue of Diabetic Rats

Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA¹, Semir ÖZDEMİR², Barış Özgür DÖNMEZ³, Nurettin OĞUZ⁴

¹Akdeniz Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Antalya, Türkiye

²Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

³Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

⁴Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Yazışma Adresi

Correspondence Address

Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA

Akdeniz Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Antalya, Türkiye

E-posta: nozturk@akdeniz.edu.tr

Geliş tarihi \ Received : 15.03.2019

Kabul tarihi \ Accepted : 25.04.2019

Elektronik yayın tarihi : 05.08.2019

Online published

Bu makaleye yapılacak atf:

Cite this article as:

Öztürk Erboğa N, Özdemir S, Dönmez BÖ, Oğuz N. Diyabetik sıçanlarda kemik dokusunda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine losartan'ın etkileri. Akd Tıp D 2020;2:219-25.

Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA

ORCID ID: 0000-0002-8681-1415

Semir ÖZDEMİR

ORCID ID: 0000-0002-4807-7344

Barış Özgür DÖNMEZ

ORCID ID: 0000-0003-1066-5981

Nurettin OĞUZ

ORCID ID: 0000-0001-6864-8872

ÖZ

Amaç: Diyabet, kırık riskini artırabilecek osteopeni ve osteoporoz gibi kemik hastalıklarına yol açarken, serbest radikallerin diyabetle ilişkili kemik rezorpsiyonunda önemli rol oynadığı öne sürülmüştür. Anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörlerinin diyabetik hastalarda kemik kaybını ve kırılma riskini azaltabilmesi muhtemeldir. Bu nedenle çalışmamız, diyabetik sıçan femurlarında losartanın oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerini araştırmak ve böylece kemik kalitesindeki bozulmanın olası mekanizmasını açıklamak için tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Sıçanlar dört gruba ayrılmıştır: Kontrol (K), diyabet (D), losartanla tedavi edilen diyabet (D-LOS) ve losartanla tedavi edilen kontrol (K-LOS). Diyabet, tek doz streptozotocin (50 mg/kg) enjeksiyonu ile indüklennmiştir. Diyabetli sıçanlara 8 hafta boyunca 5 mg/kg/gün losartan uygulanmıştır. Kemik dokularında, 2-tiobarbiturik asit reaktif ürünlerinin düzeyi (TBARS), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri incelenmiştir.

Bulgular: Diyabet uygulaması ile kemik dokuda anlamlı düzeyde artan TBARS değerleri losartan uygulaması ile düşmüştür. Diğer yandan, D grubunda SOD aktivitesi azalırken KAT aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir ve losartan tedavisi SOD aktivitesi üzerinde etkili olmamıştır. Diyabet ile birlikte anlamlı düzeyde düşen GPx aktivitesi losartan tedavisi ile normal seviyelerine dönmüştür.

Sonuç: Bu bulgular, losartan tedavisinin diyabetik sıçan femurunda oksidatif stresin indüklediği kemik kalitesindeki düşüşü antioksidan enzimlerin modülasyonunu sağlayarak düzeltebileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, Losartan, Oksidatif stres, Antioksidanlar

ABSTRACT

Objective: Diabetes leads to bone disorders such as osteopenia and osteoporosis that can increase the fracture risk and free radicals have been suggested to play significant role in the bone resorption associated with diabetes. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may reduce bone loss and fracture risk in diabetic patients. This study was therefore designed to investigate the effects of losartan on bone quality and the antioxidant defense system in diabetic rat femurs.

Material and Methods: The rats were divided into four groups: Control (C), diabetes (D), losartan-treated diabetes (D-LOS) and losartan-treated control (C-LOS). Diabetes was induced by single injection of streptozotocin (50 mg/kg). The treated rats received 5 mg/kg/day of losartan for 8 weeks. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities and 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels were analyzed in bone tissue samples.

Results: Diabetes revealed a highly significant increase in the TBARS values of rat bones and losartan administration significantly lowered the TBARS levels. SOD activity was decreased in group

D but no change in CAT activity was observed and losartan treatment did not affect SOD activity. Diabetes resulted in a marked decrease in GPx that was increased significantly by losartan.

Conclusion: These findings indicate that losartan can prevent bone loss and improve the quality of diabetic rat femurs, most probably to reduction of reactive oxygen species and/or modulation of antioxidant enzymes.

Key Words: Diabetes, Losartan, Oxidative stress, Antioxidants

GİRİŞ

Diyabet farklı dokularda nefropati, nöropati, kardiyomiopati ve retinopati gibi birçok komplikasyona neden olurken kemikte de osteopeniye yol açmaktadır. Mekanizması henüz net olarak tanımlanamamış olan diyabetik osteopeni kemik kırılabilirliğini artırdığı gibi, kırık iyileşmesini geciktirmekte ve yaşam kalitesini düşürmektedir (1-5). Son yıllarda yapılan araştırmalarda diyabetli hastalarda özellikle kalça, humerus başı ve ayak bölgesindeki kırık risklerinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (3, 4, 6-8). Buna ek olarak, hem gözlemsel hem de hayvan modeli çalışmalarda diyabetin kemik kuvvetini azalttığı ve bunun da kırık riskinin artmasında etkin rol oynadığı ortaya konulmuş olmasına rağmen (3, 9), diyabetik osteopeniden sorumlu mekanizmalar net olarak açıklanmamıştır.

Oksidatif stres, hiperglisemi ve kilo kaybı gibi bazı diyabet ilişkili bozuklukların diyabetik osteopeni patogeneziinde rol aldığı önerilmektedir. Oksidatif stresin osteoblast ve osteoklast hücrelerini de içeren birçok hücre türünde selüler fonksiyon bozukluklarını indüklediği iyi bilinmektedir (10). Kemik metabolizmasıyla ilişkili yapılan bazı çalışmalarda oksidatif stresin osteoblastik değişimleri inhibe ettiği (10-12) ve osteoblast hasarına ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (10, 13, 14). Bu nedenle oksidatif stres artışı ve antioksidan enzimlerin aktivasyonundaki ya da ekspresyonundaki azalma diyabetik osteopeni patogenezi ile ilişkilendirilebilir.

Son yıllarda, diyabetin renin anjiyotensin sisteminin (RAS) aktivasyonunu artırdığı ve bu sistem inhibitörlerinin diyabetik komplikasyonları önemli ölçüde düzelttiği gösterilmiştir. Temel olarak RAS vasküler tonus, sıvı-elektrolit dengesi ve sempatik sinir sistemini etkileyen enzimatik bir yapıdır (15). Son yıllarda yapılan çalışmalarda renin, anjiyotensinojen, anjiyotensin I (Ang I), anjiyotensin II (Ang II) ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) gibi RAS elemanlarının kemik dokusu da (16, 17) dahil olmak üzere birçok dokuda lokal olarak sentezlendiği gösterilmiştir (18-21).

Yapılan çalışmalarda fare femuru kırıklarının iyileşme süreci ve yaş ilişkili osteoporosis ile RAS arasında bağlantı olduğu bulunmuştur ve bunun sonucu olarak kemik metabolizmasında lokal RAS fonksiyonlarının araştırılmasına ilgi artmıştır. Kemik metabolizmasına RAS'ın etkilerinin Ang II yoluyla üzerinden olduğu bulunmuştur (22). Ang II sinyal

yoluğunun aşırı aktivasyonu diyabet ilişkili organ fonksiyon bozukluklarında kritik bir öneme sahip gibi gözükmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kemik dokusunu da içeren farklı dokularda diyabetik komplikasyonların gelişiminde Ang II sinyal yoluğunun çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (23-25). Bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ve RAS bileşenlerinin inhibitörlerini içeren ilaçların kemik dokusu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (26, 27). Örneğin, antihipertansif ilaçlar ve beta blokörlerin yaşlı insanlarda kemik kırılma riskini azalttığı bulunmuştur (16, 28). Rejnmark ve ark. (26) yapmış oldukları çalışmada ACE inhibitörü içeren ilaçların vücuttaki ortalama kırık riskini %7, kalça bölgesindeki kırık riskini ise %14 oranında azalttığını ortaya koymuşlardır. Buna ek olarak, Lynn ve ark. (28) da benzer sonuçları bildirmişlerdir. Ayrıca, Shimizu ve ark. (29) yaptıkları çalışmada Anjiyotensin II tip 1 reseptörünü (AT1) hem bloke ederek hem de delesyonunu gerçekleştirerek kemik dokusundaki AT1'in aşırı stimülasyonunu bloke etmişler ve osteoporosisi engellemeyi başarmışlardır. Bu çalışmalar, ACE inhibitörlerinin ve anjiyotensin reseptör blokörlerinin indirekt olarak, kemik yapısının korunmasını sağlayarak kemik kırılması risklerini azaltabilecek teröpatik etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diyabetik farelerde, Losartan (AT1 blokörü) ve Captopril (ACE inhibitörü) ile yapılan çalışmalarda kemik mineral yoğunluğu ve kemik mikro yapısı ile ilgili parametrelerde düzelme gözlenmemiştir (30, 31). Ancak, kemik gücü ve kırılabilirliğinin sadece kemik mineral yoğunluğu ve kemik mikro yapısına bağlı olmadığı biliniyor. Tip II diyabetli hastalarda, kemik mineral yoğunluğunda azalma olmaksızın sıklıkla kemik kırılmaları meydana gelmektedir (32). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda farklı dokularda Ang II'nin aşırı üretiminin ROS aktivasyonunu ve ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (33, 34).

Farklı dokularda diyabet indüklü anormalliklerde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) önemli bir role sahip olduğunu gösteren kanıtlar her geçen gün artmaktadır (10, 35-38). Losartan, antioksidan savunma sistemini güçlendirerek ROS'nin artışı engelleyebilir. Ancak, AT1 reseptör blokörü olan losartan birçok dokuda çalışılmış olmasına karşın diyabetli hayvanlarda kemik dokusunda meydana getirebileceği biyokimyasal değişiklikler üzerine çalışılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, diyabetin sıçanların femur kemiklerinde oluşturabileceği değişikliklere ve antioksidan kapasitede üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır. Çalışma-

mızda, oksidatif stres indikatörü olan Tiobarbitirik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS), diyabetle birlikte artış gösterirken, bu artış RAS blokörü losartan tarafından anlamlı seviyede düşürülmüştür. Bu düzelme endojen bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından gerçekleştirilmiş gibi gözükmektedir. Diyabet grubunda düşmüş olan süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi losartan tedavisi ile düzeltilemezken, katalaz (KAT) aktivitesi değişmemiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik ve Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 250-300 gr'lık genç erişkin Wistar cinsi toplam 40 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen sıçanlar sıcaklığı $22\pm 2^\circ\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulmuştur. Deney süresince sıçanların yem ile suya herhangi bir kısıtlama olmaksızın ulaşmaları sağlanmıştır. Sıçanlar çalışmanın başlangıcında rastgele olmak üzere dört gruba ayrılmıştır: Kontrol (K;10), losartan kontrol (K-LOS;10), diyabet (D;10), losartan+diyabet (D-LOS;10). Diyabet hayvan modeli oluşturmak üzere, sıçanlara tek doz streptozotocin (STZ; 50 mg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (D ve D-LOS grupları). STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra sıçanların kan şekere düzeyleri ölçülerek, diyabetik olmayan hayvanlar deney dışı tutulmuştur. Kan şekere düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilip deneye alınmıştır. D-LOS grubuna dahil olan hayvanlara 8 hafta boyunca AT1 inhibitörü olan Losartan 5 mg/kg/gün gavaj yoluyla verilmiştir. Bu sürenin sonunda hayvanlara urethane (2 g/kg) verilerek öldürülüp femurları biyokimyasal parametrelerin ölçümü için alınmıştır ve ölçümler başlayana kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Biyokimyasal Ölçümler

Tiobarbitirik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın, 2-tiobarbitirik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofourometrik olarak okunması esasına dayanır (39). Özet olarak Femur dokusu, 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Almanya) homojenize edilmiştir ve sonrasında homojenatların 4°C 'da, 10000 x g'de, 15 dakika, santrifüj edilmesiyle süpernatantlar elde edilmiştir. 1 ml distile su içeren tüpe 50 ml süpernatant konulduktan sonra, 1 ml thiobarbitirik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle $95-100^\circ\text{C}$ arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 ml HCl

(5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofourometrede (Perkin Elmer Luminescence spectrometer, LS50B) okunmuştur.

SOD Aktivitesi

Femur dokusu, 1 mM EDTA içeren 20 mM soğuk HEPES (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir ve sonrasında homojenatların 4°C 'da, 1500 x g'de, 5 dakika santrifüj edilmesiyle süpernatantlar elde edilmiştir. Süperoksit dismutaz ölçümleri ticari bir kit (Cayman-706002) ile yapılmıştır. SOD aktivite ölçüm kitinde, hipoksantin ve ksantin oksidaz tarafından üretilen süperoksit radikallerinin belirlenebilmesi için tetrazolium tuzu kullanılmaktadır. Hem sitozolük hem de mitokondriyal aktivite ölçülmektedir.

KAT aktivitesi

Femur dokusu, 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Almanya) homojenize edilmiştir ve sonrasında homojenatların 4°C 'da, 10,000 x g'de, 15 dakika santrifüj edilmesiyle süpernatantlar elde edilmiştir. Katalaz aktivitesi ölçümleri ticari bir kit (Cayman-707002) ile yapılmıştır (40). Bu metodun temel prensibi hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında metanol ile katalaz enziminin reaksiyonuna dayanmaktadır. Üretilen formaldehide, kromojen olan purpald (4-amino-3-hydrazino-5-marcapto-1,2,4-traizole) ile spektrofotometrik olarak ölçülür. Bir ünite enzim aktivitesi, 25°C 'de dakikada 1 μmol formaldehit formasyonuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanır.

GPx aktivitesi

Femur dokusu, 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk Tris-HCl (pH= 7,5) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Almanya) homojenize edilmiştir ve sonrasında homojenatların 4°C 'da, 10,000 x g'de, 15 dakika santrifüj edilmesiyle süpernatantlar elde edilmiştir. GPx aktivitesi ölçümleri ticari bir kit (Sigma CGP-1) ile yapılmıştır (41). GPx aktivite kiti, glutatyon redüktaza bağlı bir reaksiyon aracılığı ile GPx aktivitesini ölçer. NADPH'den NADP'ye oksidasyon 340 nm'de absorbansta bir azalmaya eşlik eder. Absorbans kinetiği, NADPH sönümlenme katsayısı kullanılarak 340 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Bir birim enzim aktivitesi, 25°C 'de 1 mol NADPH'nin NADP'ye oksidasyonuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Deney sonuçlarının ilk aşamadaki analizleri için one-way anova kullanılmış, ilişkili grupların karşılaştırılması ise Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Değerler ortalama \pm SEM

olarak verilmiştir ve anlamlı fark $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Diyabet grubunda kan glikoz düzeyi diğer gruplardan anlamlı yüksek bulunmuştur (K: $107,51 \pm 8,27$ mg/dl; D: $497,93 \pm 78,27$ mg/dl; D-LOS: $482,62 \pm 80,55$ mg/dl; K-LOS: $112,06 \pm 5,35$ mg/dl) ve losartan tedavisi ile kan glikoz seviyelerinde anlamlı bir düzelleme gözlenmemiştir (K: $108,55 \pm 9,89$ mg/dl; D: $478,78 \pm 86,78$ mg/dl; D-LOS: $528,38 \pm 63,96$ mg/dl; K-LOS: $120,35 \pm 7,24$ mg/dl). Benzer şekilde D grubunda vücut ağırlığında bir azalma olmasına karşın (K: $201,38 \pm 26,08$ g; D: $212,86 \pm 16,88$ g; D-LOS: $218,38 \pm 21,08$ g; K-LOS: $211,20 \pm 30,09$ g) losartan tedavisi kilo kaybını önlememiştir (K: $211,23 \pm 24,74$ g; D: $189,42 \pm 27,88$ g; D-LOS: $201,53 \pm 23,68$ g; K-LOS: $220,78 \pm 22,36$ g).

Biyokimyasal Parametreler

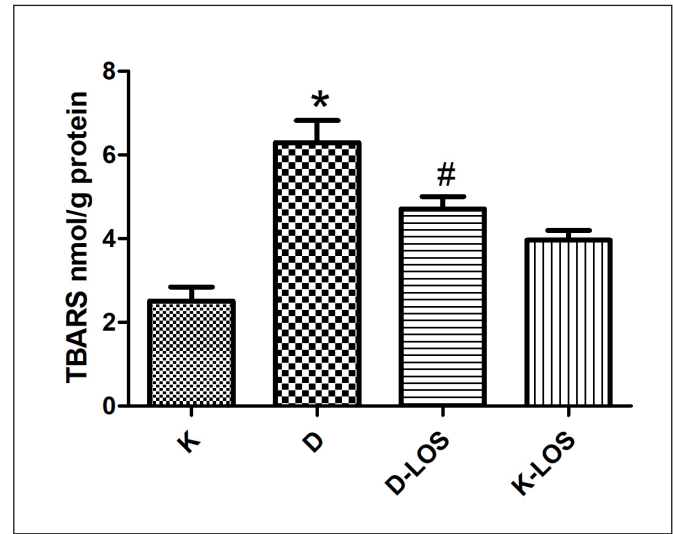
Diyabetin kemik dokusunda oluşturduğu değişikliklerde lipid peroksidasyonunun rolünün olup olmadığı araştırmak amacıyla TBARS seviyeleri incelenmiştir (Şekil 1). Sekiz haftalık deney periyodunun sonunda D grubunda TBARS seviyesinin K grubuna göre yaklaşık üç katlık bir artış gösterdiği ($p < 0,05$) ve losartan tedavisi ile bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düştüğü gözlenmiştir ($p < 0,05$). Diyabet grubunda SOD aktivitesinde belirgin bir düşüş olmasına karşın losartan tedavisi bu düşüşü değiştirmemiştir (Şekil 2). Diğer yandan KAT aktivitesi diyabet grubunda değişmemiştir ancak D-LOS grubunda beklenmedik bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 3). Ayrıca femur dokusunda diyabetle birlikte GPx aktivitesi de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir ve losartan tedavisi GPx aktivitesini kontrol seviyelerini yaklaştırmıştır (Şekil 4).

TARTIŞMA

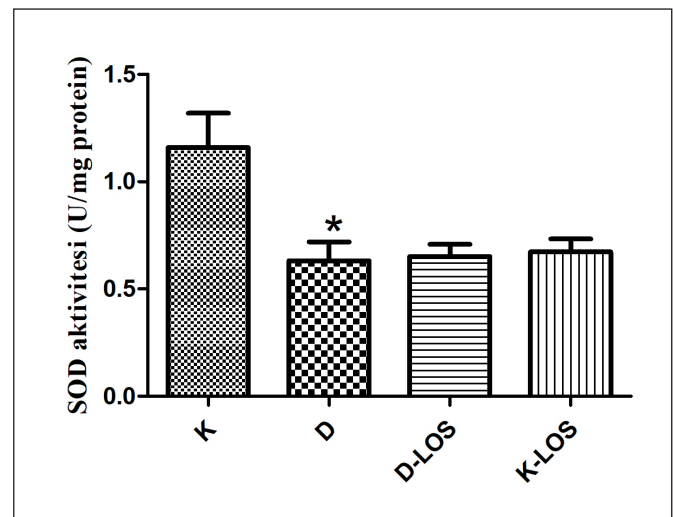
Diyabetin, kemik dokusunu da diğer birçok doku gibi etkilediği bilinmesine rağmen bu etkinin mekanizması henüz bilinmemektedir. Diyabetik koşullarda artmış kan şekeri ile indüklenen oksidatif stresin, kemik hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde hücresel disfonksiyonu indüklediği bildirilmektedir (10, 35). Zhen ve ark. (42) yaptıkları çalışmada diyabetik osteopeni insidansı için önemli bir faktör olduğu düşünülen oksidatif stres üretiminin uyarılması yoluyla kalıcı yüksek glikoz seviyesinin, osteoblast farklılaşmasını etkileyebildiğini, kemik oluşumunu bozduğunu ve kemik mineralizasyonunu inhibe edebildiğini bildirmişlerdir. Yapılmış olan birçok deneysel çalışmada diyabetik dokularda ROS miktarının aşırı düzeyde arttığı gösterilmiştir (24, 38, 43). ROS, fizyolojik koşullar altında bile serbest oksijen radikalleri, hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit gibi bir dizi kimyasal reak-

siyon ile üretilir ve GPx, GSH, SOD ve CAT gibi endojen antioksidan sistemleri tarafından temizlenir. Ancak, bu iki sistem arasındaki denge, artan serbest radikal oluşumu ve/veya antioksidan savunma mekanizmalarının baskılanması nedeniyle değiştiğinde, ROS, DNA, proteinler ve lipitlere ciddi zararlar verebilir (35).

Son araştırmalar, AT1R'nin ROS jenerasyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (44, 45). Blakely ve ark. (46), Ang II'nin AT1R aracılı ROS üretimini ve oksidatif nöronal hasarı indüklediğini göstermiştir. Benzer şekilde, Rajagopalan ve ark. (47), farelerde Ang II infüzyonunun losartan tarafından önemli ölçüde baskılanmış olan vasküler süperoksit üretimini artırdığını göstermiştir. Bu bulgular, AT1R'nin oksidatif strese önemli bir mekanizma

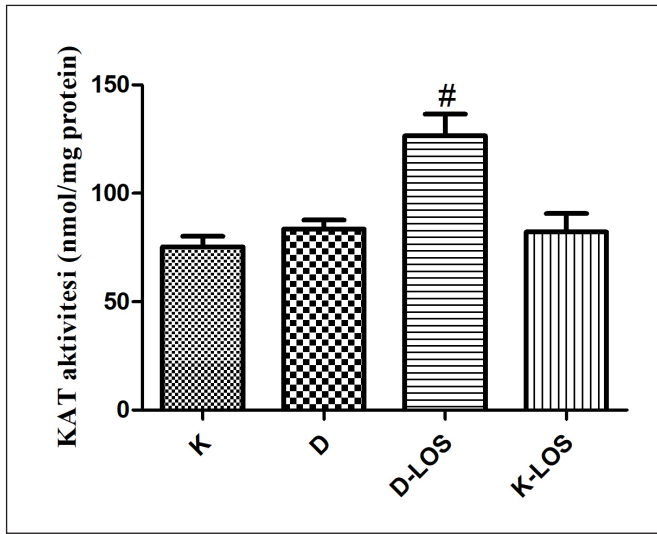


Şekil 1: Kemik dokusunda ölçülen gruplara ait TBARS değerleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmiştir K (n=10), D (n=10), D-LOS (n=10) ve K-LOS (n=10). * $p < 0,05$ vs K grubu, # $p < 0,05$ vs D grubu.

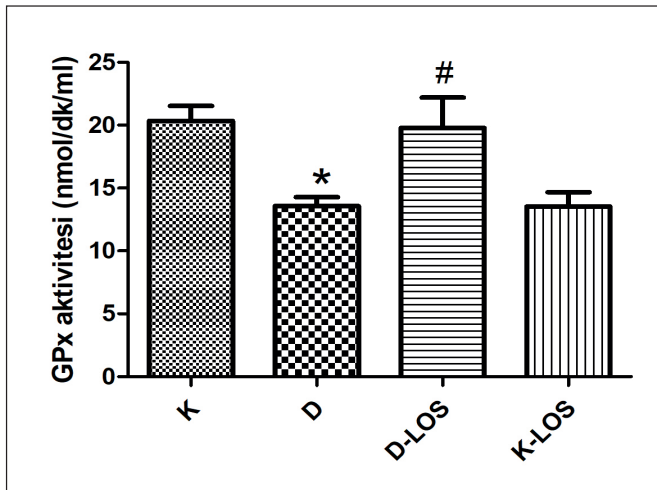


Şekil 2: Kemik dokusunda ölçülen gruplara ait SOD Aktiviteleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmiştir. K (n=10), D (n=10), D-LOS (n=10) ve K-LOS (n=10). * $p < 0,05$ vs K grubu.

olduğunu düşündürmektedir. AT1 reseptörünün losartan ile blokajının anti-inflamatuvar ve anti-osteoklastik etkiler gösterdiği böylelikle alveolar kemik kaybını önlediği gösterilmiştir (48). Anjiyotensin yolağının losartan aracılı inhibisyonu ile kemik kütlelerinin arttığı ve iskelet gelişimi sırasında büyüme plakasında kondrosit hipertrofini hızlandırdığı gösterilmiştir (49). Daha önce yapılan bir çalışmada renal hasarlanmada losartan tedavisinin TBARS seviyelerini düşürdüğü ve KAT aktivitesinde artışı tetiklediği gösterilmiştir (44). Çalışmamızda, diyabetik sıçan femurunda TBARS seviyelerinin oldukça yükseldiğini ve AT1 reseptör blokörü olan losartanın bu artışı anlamlı seviyede azalttığını gözlemledik.



Şekil 3: Kemik dokusunda ölçülen gruplara ait KAT Aktiviteleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmiştir. K (n=10), D (n=10), D-LOS (n=10) ve K-LOS (n=10). # p<0,05 vs D grubu.



Şekil 4: Kemik dokusunda ölçülen gruplara ait GPx Aktiviteleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmiştir. K (n=10), D (n=10), D-LOS (n=10) ve K-LOS (n=10). * p<0,05 vs K grubu, # p<0,05 vs D grubu.

Diyabetik sıçanlarda endojen antioksidanların değişmiş aktiviteleri, bu hayvanlarda düşük kemik kalitesinin arkasındaki majör faktörlerden birisinin oksidatif stres olduğu hipotezimizi destekler. Diyabetik hayvanlarda KAT aktivitesinde değişiklik elde etmezken, GPx aktivitesinin kontrole göre anlamlı düzeyde düştüğünü ölçtük. Diyabette antioksidan enzimler için bugüne kadar birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiş ve bu tutarsızlıkların nedenleri açık bir şekilde ele alınmamıştır. İncelenen doku tipi, incelenen enzimin ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesindeki zamansal değişiklikler bu varyasyonların altında yatan sebepler olabilir. Normal koşullar altında süperoksit anyonu SOD enzimi aracılığıyla dismutasyona uğrayarak H₂O₂'ye dönüştürülür ve sonrasında KAT ve/veya GPx enzimleri aracılığıyla detoksifiye edilir. KAT, H₂O₂'nin yüksek miktarlarda detoksifikasyonu için tercih edilen bir yol gibi görünürken, GPx düşük konsantrasyonlarda daha aktif olan yoldur (50, 51). Bu, muhtemelen enzimin substrata affinitesini belirleyen Km değeri ile ilişkilidir. Katalazın Km değeri, GPx'in Km değerinden daha büyüktür ve Km değeri ne kadar küçük ise enzimin substrata olan affinitesi o kadar yüksektir. Dolayısıyla KAT aktivitesinde artış için ortamda daha yüksek oranda H₂O₂ bulunması gerekmektedir (51). Özet olarak diyabetin erken aşamalarında GPx, tercih edilen enzim olabilir, ancak ilerleyen aşamalarda, oksidatif stres miktarlarındaki artış ile birlikte GPx inhibe edilebilir ve KAT aktive olabilir.

Kontrol hayvanlarında losartan uygulaması sonrasında KAT aktivitesinin artmasının sebebini bilmiyor olmamıza rağmen, bu bulgu losartanın normal ve hastalık koşullarında farklı etkiler oluşturabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, insan ve hayvan çalışmaları, diyabetin, GPx enziminin katalitik bölgesinde yer alan selenyumda önemli bir azalmaya neden olduğunu ve eksikliğinin esas olarak azalmış GPx aktivitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (52, 53). Ayrıca, oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan doku, enzimlerin aktivitesindeki bu farklılıkların nedeni olabilir. Sistemik oksidatif stres ürünlerinin ve antioksidan enzimlerin durumunun değerlendirilmesinin önceki raporlarda çok yaygın olmasına rağmen, TBARS, GSH, GPx, SOD ve CAT gibi parametrelerin lokal ölçümlerinin nadiren yapıldığını belirtmek önemlidir (10, 35, 43).

Sonuç olarak çalışmamız, özellikle kemik dokusunda oksidatif stresin yoğunluğu hakkında doğrudan kanıtlar sağlamak ve artmış ROS üretimi ile diyabetik osteopeninin etiolojisi arasında nedensel bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca RAS'ın blokajının antioksidan savunma sistemini güçlendirerek kemik kalitesinin artmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *J Orthop Res* 2002; 20(6):1210-6.
2. Lieberman D, Fried V, Castel H, Weitzmann S, Lowenthal MN, Galinsky D. Factors related to successful rehabilitation after hip fracture: A case-control study. *Disabil Rehabil* 1996; 18(5):224-30.
3. Schwartz AV. Diabetes Mellitus: Does it affect bone? *Calcif Tissue Int* 2003; 73(6):515-9.
4. Özdemir S. Anjiyotensin II Reseptörünün Deneyisel Diyabetik Sıçan Kalbi Elektriksel Aktivitesindeki Rolü. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, 2004.
5. Inzerillo AM, Epstein S. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5(3):261-8.
6. Keegan TH, Kelsey JL, Sidney S, Quesenberry CP Jr. Foot problems as risk factors of fractures. *Am J Epidemiol* 2002; 155(10):926-31.
7. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001; 24(7):1192-7.
8. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, Jamal SA, Black DM, Cummings SR. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(1):32-8.
9. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 54(1):1-8.
10. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: A possible role of oxidative stress. *Bone* 2007; 40(5):1408-14.
11. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(4):509-19.
12. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(1):197-207.
13. Chen RM, Wu GJ, Chang HC, Chen JT, Chen TF, Lin YL, Chen TL. 2,6-Diisopropylphenol protects osteoblasts from oxidative stress-induced apoptosis through suppression of caspase-3 activation. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042:448-59.
14. Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells: The effects of glutamate and protection by purines. *Bone* 2006; 39(3): 542-51.
15. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: Distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100(5): 481-92.
16. Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Inagami T, Ezura Y, Noda M. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem* 2009; 284(8):4857-64.
17. Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S, Nimura Y, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res* 2009; 24(2):241-50.
18. Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* 2004; 47(2):240-8.
19. Inaba S, Iwai M, Furuno M, Kanno H, Senba I, Okayama H, Mogi M, Higaki J, Horiuchi M. Role of angiotensin-converting enzyme 2 in cardiac hypertrophy induced by nitric oxide synthase inhibition. *J Hypertens* 2011; 29(11): 2236-45.
20. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144(6):2179-83.
21. Sakai K, Agassandian K, Morimoto S, Sinnayah P, Cassell MD, Davison RL, Sigmund CD. Local production of angiotensin II in the subformal organ causes elevated drinking. *J Clin Invest* 2007; 117(4):1088-95.
22. Gebru Y, Diao TY, Pan H, Mukwaya E, Zhang Y. Potential of RAS inhibition to improve metabolic bone disorders. *Biomed Res Int* 2013; 932691(10):22-7.
23. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart: on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35(6):1183-8.
24. Ozdemir S, Tandogan B, Ulusu NN, Turan B. Angiotensin II receptor blockade prevents diabetes-induced oxidative damage in rat heart. *Folia Biol* 2009; 55(1):11-6.
25. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: Distribution, signalling and function. *Clin Sci* 2001; 100(5):481-92.
26. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: A nationwide case-control study. *J Hypertens* 2006; 24(3): 581-9.
27. Donmez BO, Ozdemir S, Sarikanat M, Yaras N, Koc P, Demir N, Karayalcin B, Oguz N. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs. *Pharmacol Rep* 2012; 64(4):878-88.
28. Lynn H, Kwok T, Wong SY, Woo J, Leung PC. Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone* 2006; 38(4):584-8.

29. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *Faseb J* 2008; 22(7):2465-75.
30. Zhang Y, Diao TY, Gu SS, Wu SY, Gebru YA, Chen X, Wang JY, Ran S, Wong MS. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on bones in mice with type 1 diabetes induced by streptozotocin. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014; 15(3):218-27.
31. Diao TY, Pan H, Gu SS, Chen X, Zhang FY, Wong MS, Zhang Y. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *J Bone Miner Metab* 2014; 32(3):261-70.
32. Nyman JS, Even JL, Jo CH, Herbert EG, Murry MR, Cockrell GE, Wahl EC, Bunn RC, Lumpkin CK Jr, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. *Bone* 2011; 48(4):733-40.
33. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 2):F79-90.
34. Fang F, Liu GC, Zhou X, Yang S, Reich HN, Williams V, Hu A, Pan J, Konvalinka A, Oudit GY, Scholey JW, John R. Loss of ACE2 exacerbates murine renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2013; 8(8):e71433.
35. Hamada Y, Fujii H, Kitazawa R, Yodoi J, Kitazawa S, Fukagawa M. Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-induced diabetic osteopenia: A novel role of oxidative stress and therapeutic implications. *Bone* 2009; 44(5):936-41.
36. Nakhaee A, Bokacian M, Akbarzadeh A, Hashemi M. Sodium tungstate attenuate oxidative stress in brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 2010; 136(2):221-31.
37. Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: The diabetic bone: A cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds* 2011; 10(1):16-32.
38. Aydemir M, Ozturk N, Dogan S, Aslan M, Olgar Y, Ozdemir S. Sodium tungstate administration ameliorated diabetes-induced electrical and contractile remodeling of rat heart without normalization of hyperglycemia. *Biol Trace Elem Res* 2012; 148(2):216-23.
39. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39(12):2522-6.
40. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174(1):331-6.
41. Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1985; 113:490-5.
42. Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications* 2010; 24(5):334-44.
43. Liang W, Luo Z, Ge S, Li M, Du J, Yang M, Yan M, Ye Z. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. *Eur J Pharmacol* 2011; 670(1):317-24.
44. Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, Grujic Milanovic J, Jovovic D, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, Miloradovic Z. Losartan improved antioxidant defense, renal function and structure of postischemic hypertensive kidney. *PLoS One* 2014; 9(5):e96353.
45. Behl T, Kotwani A. Potential of angiotensin II receptor blockers in the treatment of diabetic retinopathy. *Life Sci* 2017; 176:1-9.
46. Blakely PK, Huber AK, Irani DN. Type-1 angiotensin receptor signaling in central nervous system myeloid cells is pathogenic during fatal alphavirus encephalitis in mice. *J Neuroinflammation* 2016; 13(1):196.
47. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97(8):1916-23.
48. Queiroz-Junior CM, Silveira KD, de Oliveira CR, Moura AP, Madeira MF, Soriani FM, Ferreira AJ, Fukada SY, Teixeira MM, Souza DG, da Silva TA. Protective effects of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in infection-induced and arthritis-associated alveolar bone loss. *J Periodontal Res* 2015; 50(6):814-23.
49. Chen S, Grover M, Sibai T, Black J, Rianon N, Rajagopal A, Munivez E, Bertin T, Dawson B, Chen Y, Jiang MM, Lee B, Yang T, Bae Y. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. *Mol Genet Metab* 2015; 115(1):53-60.
50. Pieper GM, Jordan M, Dondlinger LA, Adams MB, Roza AM. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes* 1995; 44(8):884-9.
51. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 2004; 24(7):1531-40.
52. Kljai K, Runje R. Selenium and glycogen levels in diabetic patients. *Biol Trace Elem Res* 2001; 83(3):223-9.
53. Gur S. Effects of sodium selenate treatment on altered responses of left and right atria from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44(1):9-15.