

DeneySEL İnsülin Direncinde TQ'nun Karaciğer Dokusu TNF- α ve IL-1 β Gen İfadesine Etkisi

Semiha DEDE, Ayşe USTA, Veysel YÜKSEK, Hazel Berna GÖKTUĞ

*Biyokimya Anabilim Dalı, Van YYÜ Veteriner Fakültesi, Van, Türkiye
Kimya Bölümü, Van YYÜ Fen Fakültesi, Van, Türkiye
Özalp Meslek Yüksekokulu, Van YYÜ Van, Türkiye
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van YYÜ, Van, Türkiye*

sdede@yyu.edu.tr

Özet – *Nigella sativa*'nın aktif bileşeni olan timokinon (TQ), başta antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri olmak üzere birçok faydalı etkiye sahiptir. Bu çalışma, TQ'un deneysel olarak insülin direnci yapılan ratlarda, TNF- α ve IL-1 β gen ifadelerine etkisini araştırmak amacıyla planlandı. Materyal olarak erkek Wistar-Albino ratlar kullanıldı ve insülin direnci indüklenen (ID), tedavi (DT) ve profilaksi (TD) için TQ verilen ve metformin (DM) ile tedavi edilen gruplar hazırlandı. Deneme sonunda elde edilen karaciğer dokularında TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyon analizleri RT-PCR ile yapıldı. Bu analiz sonuçlarına göre; ID grubunda her iki genin yüksek oranda up regüle olduğu ve TQ ile tedavi ve korunma gruplarında kontrol ve metformin gruplarına yaklaşan değerler elde edildi. Terapötik ve profilaktik amaçlarla TQ uygulamasının insülin direnci kaynaklı olarak görülen inflamasyon parametrelerinin gerilemesinde faydalı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler – İnsülin Direnci, Timokinon, Karaciğer, TNF- α , IL-1 β

I. GİRİŞ

TQ, hastalık tedavilerinde ve önleyici tedavilerde çok sık kullanım alanı bulmaktadır. Pek çok yararlı etkisi son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar ve araştırmalarla ortaya konulan timokinonun (TQ)'un en önemli özelliklerinden birisi de antidiyabetik etkisidir ve hipoglisemiye neden olmaktadır. Ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirmekte ve hastalıklara karşı dirençli olmayı sağlamaktadır (1,2).

İnsülin direnci; klinik olarak bilinen bir miktarda ekzojen veya endojen insülinin, bir bireyde normal bir popülasyonda olduğu kadar

glikoz alımını ve kullanımını artıramaması olarak tanımlanır. İnsülin direnci, çeşitli hastalık ve vücutta yaşanan bazı fizyolojik ve metabolik değişiklik durumlarda ortaya çıkabilir. Bunları şöyle özetleyebiliriz: puberte, yaşlanma, hamilelik, fiziksel inaktivite, tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon, aterosklerotik kardiyovasküler hastalık, dislipidemi ovarial disfonksiyon, viral enfeksiyonlar, üremi, obezite, diyabetik ketoasidoz, akromegali, karaciğer sirozu, glukokortikoid fazlalığı, diüretikler, kortikosteroid, bazı oral kontraseptif vs. (3,4,5).

İnflamasyon, vücudun enfeksiyon, hastalık ve doku hasarı gibi durumlara verdiği doğal tepkidir. Bağışıklık sistemi; hasar görmüş hücreleri, tahriş edici maddeleri ve patojenleri tanır ve iyileşme sürecini başlatır. İnflamasyon koruyucu immünolojik hafızanın oluşması için önemlidir (6,7,8).

İnflamasyon olaylarında rolü olan markırlardan en önemlileri arasında yer alan IL-1 β (İnterlökin 1 Beta), bir sitokindir ve inflamatuvar yanıtın önemli bir aracısıdır. Sitokinler, bağışıklık tepkisinin ana araçları olan proteinli sinyal bileşikleridir. TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü), bu gen, tümör nekroz faktörü (TNF) süper familyasına ait çok fonksiyonlu bir proinflamatuvar sitokini kodlar. Bu sitokin esas olarak makrofajlar tarafından salgılanır. Sitokinler ve stres gibi uyaranlara hücrel yanıtarda yer alır ve enfeksiyonlara karşı immünolojik yanıtın düzenlenmesinde anahtar rol oynar (9).

Bu çalışma, antidiyabetik ve antiinflamatuvar bir ajan olarak önemli olan TQ'un, glukokortikoid ile indüklenen deneysel insülin direncinde bağışıklık sistemi üzerine etkilerinin IL-1 β ve TNF- α genleri üzerinden gözlemlenmesi amacıyla planlanmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Hazel Berna Göktuğ'un "Glukokortikoid ile indüklenen insülin direncinde timokinonun vitamin D metabolizması üzerine etkisi" isimli yüksek lisans tezinden sağlanan karaciğer dokuları kullanılmıştır. İnsülin direnci değerleri de bu tezden alınmıştır (10).

Hayvan materyali

Çalışma için, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden ağırlıkları 150 ile 200 gr arasında değişen 40 adet Wistar-Albino erkek sıçan sağlandı (TYL-2022-9847, Etik Kurul No: 2022/07-11).

Analiz gruplarının hazırlanması

Her biri yedi rattan oluşan altı deney grubu hazırlandı: kontrol (K), insülin direnci (İD), timokinon verilen (TQ), timokinon verilen ve insülin direnci oluşturulan (TQİ), insülin direnci oluşturulan ve timokinon verilen (İTQ) ve insülin direnci oluşturulan ve kontrol tedavisi için metformin verilen (IM). 15 günlük deney boyunca sıçanlar 12 saat karanlık, 12 saat ışık, 22 °C sıcaklıkta, sürekli yiyecek ve tatlı su erişimi olan kafeslerde tutuldu.

Kan örneklerinin alınması

Deney süresi sonunda hayvanların sol ventriküllerinden ketamin anestezisi altında kan alındı ve jel cam serum tüplerine yerleştirildi. Kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüjledikten sonra serum örnekleri tüplere yerleştirildi.

Numune toplama

Steril bir bıçak ve forseps yardımıyla, öldürülen sıçanlardan alınan 200 mg karaciğer dokusu, steril bir ortamda 2 ml'lik steril RNaz içermeyen tüplere yerleştirildi ve üzeri RNA stabilizatörü ile kaplandı. Doku dolu tüpler, mRNA izolasyonu tamamlanıncaya kadar -80°C'de tutuldu.

Doku homojenatının hazırlanması

Derin dondurucudan (-80 °C) alınan dokuların yaklaşık 80 mg'ı ortam sıcaklığında

çözdürüldükten sonra steril tüplere yerleştirildi. Dokuları homojen hale getirmek için 0,2 cc steril fosfat tampon eklendi. Dokular homojenize edildikten sonra 1500 rpm'de ve 4 °C'de santrifüjlendi. Tüpün üst kısmında kalan sıvı atıldıktan hemen sonra total RNA izolasyonuna başlandı.

İnsülin direncinin ölçülmesi

İnsülin direncini belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

HOMA IR= Plazma Glukozu(mg/dL) × açlık plazma insülini (mu/L)/405

Tablo 1. Gen sembolleri ve birincil diziler

Gen adı	Gen sembolü	Primer adı F (5'-3')	Primer adı R (5'-3')
Interl ökin 1 beta	IL-1β	GGATGATGACGA CCTGCTAGTG	CTTGTTGGCTTA TGTTCTGTC
Tüm ör nekro z faktö r-alfa	TNF-α	ACCACGCTCTTCT GTCTACTG	TGTCTTTGAGAT CCATGCCA

Toplam mRNA izolasyonu ve analizi

Tüm gruplarda sıçan karaciğer dokusundan elde edilen RNA izolasyon ürünlerinde, vitamin D metabolizmasında yer alan önemli genlerin ekspresyonu, real time-PCR ile belirlendi. Toplam RNA izolasyonu, toplam RNA izolasyon protokolüne (geneAll, Güney Kore) göre elde edilen karaciğer örneklerinden manuel olarak gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lardan termal döngü cihazında reverstranskriptaz enzimi kullanılarak cDNA elde edildi.

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

WizScript™ cDNA Synthesis Kit protokolüne göre, cDNA karışımı 200 ul'lik bir PCR tüpünde hazırlandı. Tüplere eklenen cDNA karışımı PCR tüplerine dağıtıldı. Rotor-Gene Q Software-Run cihazı (Wizscript cDNA sentez programı ile) ile aşağıdaki programa göre ters transkripsiyon yapıldı.

RT-PCR analizleri

Elde edilen cDNA'lar, hedef gen bölgesi için özel olarak tasarlanmış primerler yardımıyla amplifikasyon için stokta verilen her bir primerin dilüsyon miktarına göre seyreltildi. cDNA'lar, Qiagen marka Rotor Gen model gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Wizpure™ qPCR Master (SYBR) protokolüne göre, 36 PCR pleyt kullanılarak, her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı. PCR işlemi sonunda Erime Eğrisi, Rampa: 50-99 (1 derece artış), 90 °C 5" gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), genlerin ekspresyon seviyelerini ölçmek için kontrol geni olarak kullanıldı. Gen ekspresyon seviyelerini analiz etmek için Delta-Ct ve delta-delta Ct değerleri kullanıldı. Amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcında bir Ct (döngü eşiği) belirlendi. Kontrol grubu ve tekrarlı grupların Ct değerlerinin farkı, uygun ifadeyi belirlemek için kullanıldı.

III. BULGULAR

Çalışma sonucunda elde edilen veriler aşağıda verilmiştir. İnsülin direnci değerleri de

Göktuğ (10)'un yüksek lisans tezinden alınmıştır (Tablo 1). HOMA-IR düzeyleri ID grubunda en yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı. TQ verilen gruplarda ise kontrole yakın olduğu görüldü (Göktuğ, 2022).

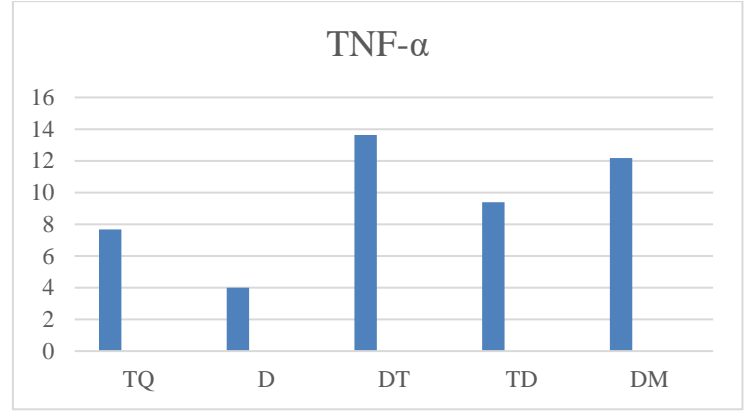
Tablo 1. Çalışma gruplarından elde edilen biyokimya sonuçları (10).

Gruplar	İnsülin (pq/ml)	Glukoz (mg/dl)	HOMA-IR
K grubu	1076±174,7 4a	214,5±16,6 bc	544±61,4b
İD grubu	1318±306,5 ab	336±58,35 a	1080±293,8a
TQ grubu	799±283,05 5a	231±20,3b	420±122,6b
TQİ grubu	1396±158,7 ab	186±18,4b c	682±125,6ab
İTQ grubu	1434±298,9 ab	127±9,2c	443±90,75b
İMT grubu	2329±372,5 ab	143±33,3b c	7

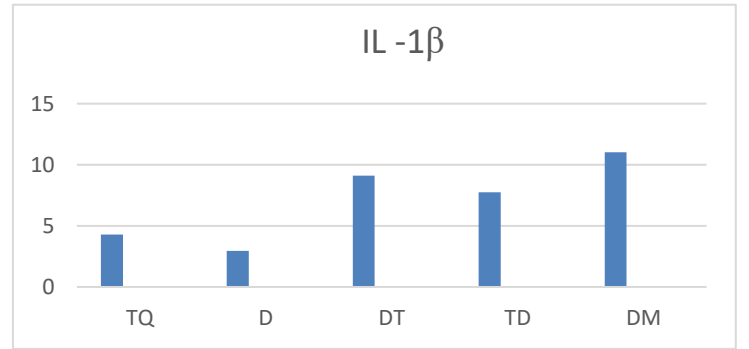
Bağışıklık sisteminde yer alan TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyon verileri aşağıda verilmiştir (Tablo 2, Şekil 1 ve 2). Bu verilere göre, her iki genin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış ve birbirine uygun bir şekilde, ID grubunda her iki genin yüksek oranda up regüle olduğu ve TQ ile tedavi ve korunma gruplarında kontrol ve metformin gruplarına yaklaşan değerler elde edildi. Bu gruplardaki söz konusu gen ekspresyonlarının kontrole göre down regule oldukları belirlendi.

Tablo 2. TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri

	C	TQ	ID	DT	TD	DM
TN F- α	1	1,474 269	18,76 536	0,023 683	0,444 421	0,064 704
IL-1 β	1	1,071 773	30,90 996	0,363 493	0,926 588	0,096 723



Şekil 1. TNF- α 'nın mRNA transkript seviyeleri



Şekil 2. IL-1 β 'nin mRNA transkript seviyeleri

IV. TARTIŞMA

Tip 2 diyabetli ve obez hastalarda sık rastlanan karın içi yağ dokusu artışı, hiperglisemi ve yağ hücreleri düşük seviyede seyreden inflamatuvarın göstergesi olarak, dolaşımda bulunan sitokinlerin yoğunluğunu tetikler. Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) diyabetik ve insüline dirençli koşullarda yüksek düzeyde bulunmaktadır. Aynı şekilde karaciğerde bulunan çeşitli immün hücre tipleri, insülin direncini işaret eder (11,12). Enflamasyon, insülin direnci, diyabet ve ilgili hastalıkların gelişimi ile ilişkili kritik süreçlerden biridir ve obezite artık kronik, düşük dereceli bir enflamasyon durumu olarak kabul edilmektedir (13).

Yağ dokusunun insülin direncini indüklediği kesin mekanizma hala belirsizdir. Yağ dokusu, hem

lipitlerin hem de glikozun metabolizmasını etkileyen çok sayıda biyoaktif molekül, yani adipokinleri ve sitokinleri sentezler ve salgılar. Lipitlerin adipositlerde birikmesi muhtemelen insülin direnci gelişimi ile ilişkilidir. Son çalışmalar, adipoz dokuda biyolojik olarak aktif lipitlerin birikmesinin, adipokinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini/sekresyonunu düzenleyebileceğini göstermektedir (14).

İnsülin direncinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılammıştır. Son yıllardaki deneysel araştırmalardan ve insan çalışmalarından elde edilen kanıtlar, doğuştan gelen bağışıklık yollarının ve enflamatuvar mekanizmaların da rol oynayabileceğini öne sürdü. Tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 ve IL-6 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu adipoz dokuda artar ve ekspresyonu sistemik inflamasyon ve eşlik eden insülin direnci ile bağlantılıdır (15)

IL-1 β ve TNF- α , güçlü proinflamatuvar aktivitelere sahip olan sitokinlerdir. TNF- α , akut inflamasyon sırasında makrofajlar/monositler tarafından üretilen ve nekroz veya apoptoza yol açan, hücreler içinde çok çeşitli sinyal olaylarından sorumlu olan bir inflamatuvar sitokindir. Tümör nekroz faktörü alfa, TNF/TNFR sitokin süper ailesinin bir üyesidir. Diğer aile üyeleri ile ortak olarak, TNF- α , bağışıklık sisteminin bakımı ve homeostazı, iltihaplanma ve konakçı savunmasında yer alır (16,17,18).

Bu çalışmada, bağışıklık sisteminde yere alan ve güçlü proinflamatuvar aktivitelere sahip olan sitokinlerden olan IL-1 β ve TNF- α gen

ekspresyonları deneysel insülin direncinin TQ ile önlenmesi ve korunmasındaki rolü araştırıldı. Bu analiz sonuçlarına göre, her iki genin de insülin direnci grubunda yüksek düzeyde arttığı saptandı. Böylece insülin direncinde karaciğer dokusu bağışıklık sisteminin önemli oranda etkilendiği görüldü. TQ'un tedavi ve korunma amacıyla kullanıldığı gruplarda ise bu genlerin ekspresyonlarının önemli oranda azalarak kontrol ve metformin tedavi gruplarına yaklaştığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre TQ kullanımının karaciğer dokusu bağışıklık sistemi üzerinde anlamlı düzeyde yararlı etkileri olduğu ortaya konuldu. Nitekim bu veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur. Örneğin; TQ'un insülin direnci durumlarında yararlı etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Balbaa ve ark. (19), başlıca etken maddesi olduğu *N. Sativa*'nın veya bunun anti-diyabetik ilaçlarla kombine tedavilerinin, beyin insülin sinyal yolunu güçlendirerek beyindeki insülin direnci için hastalık modifiye edici ajanlar olarak olası bir faydaya sahip olduğunu göstermektedir.

Alkolsüz steatohepatit (NAFLD), ilerlemiş fibroza yol açan ilerleyici bir karaciğer hastalığında, TQ'un karaciğer fonksiyonları, insülin direnci üzerindeki hepatoprotektif etkisinin değerlendirildiği çalışmada, TQ ile birlikte tedavinin tüm parametreleri iyileştirdiği saptandı. TQ'un insülin direnci, karaciğer hasarının bir rolü olduğunu düşündürecek şekilde önemli ölçüde iyileştirildiği bildirildi (20).

V. SONUÇLAR

Sonuç olarak, insülin direncine bağlı olarak karaciğer dokusunda önemli oranda artan her iki

genin, TQ'un tedavi ve profilaktik amaçlarla kullanılması ile normal düzeylere döndüğü ve TQ'un faydalı etkilerinin bir göstergesi olduğunu gösterdiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. S. Yılmaz, Serviks kanser hücre hattında timokinonun sisplatin sitotoksitesine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2018
2. Hamdan A, Haji Idrus R, Mokhtar MH. Effects of *Nigella sativa* on type*-2 diabetes mellitus: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health.*, 16(24):4911, 2019.
3. Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol.*, 12(12):721-737, 2016.
4. Carcamo-Orive I, Huang, NF, Quertermous, T, Knowles, JW. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in insulin resistance and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 37(11):2038-42, 2017.
5. Özdoğan Y, Göküstün KK, Türk ÖP. K vitamininin insülin direncine etkisi. *Ankara Sađ Bil Derg.*, 6(1):37-48, 2017.
6. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.*, 140(6):871-82, 2010.
7. Huang T, Tobias DK, Hruby A, Rifai N, Tworoger SS, Hu FB. An increase in dietary quality is associated with favorable plasma biomarkers of the brain-adipose axis in apparently healthy US women. *J Nutr.*, 146(5):1101-8, 2016.
8. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease – executive summary. *Endocr Pract.*, 23(4):479-97, 2017.
9. Genecards, Weizmann Bilim Enstitüsü [Internet] 2020. [Erişim Tarihi: 08 Ocak 2020]. Erişim adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CASP3>.
10. Göktaş H. B. Glukokortikoid ile indüklenen insülin direncinde timokinonun vitamin D metabolizması üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Van, 2022.
11. Festa A, D'Agostino Jr R, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.*, 51(4):1131-7, 2002.
12. Nikolajczyk BS, Jagannathan-Bogdan M, Shin H, Gyurko R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun.* 12:239-50, 2011.
13. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun.* 11:145-56, 2010.
14. Kojta I, Chacińska M, Błachnio-Zabielska A. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients.* 12(5):1305, 2020.
15. Wieser V, Moschen AR, Tilg H. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 61(2):119-25, 2013.
16. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 50(3):184-95, 2000.
17. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25(3):409-16, 2006.
18. Wang Y, Che M, Xin J, Zheng Z, Li J, Zhang S. The role of IL-1β and TNF-α in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother.* 131:110660, 2020.
19. Balbaa M, Abdulmalek SA, Khalil S. Oxidative stress and expression of insulin signaling proteins in the brain of diabetic rats: Role of *Nigella sativa* oil and antidiabetic drugs. *PLoS One.* 12(5):e0172429, 2017.
20. Awad AS, Abd Al Haleem EN, El-Bakly WM, Sherief MA. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 389(4):381-91, 2016.