

## MEDİAN DOZ ALLOKSANIN SIÇAN ENDOKRİN PANKREAS VE PLASMA GLİKOZ DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Dr. Osman ÖZCAN\*, Dr. Erdal KARAÖZ\*\*, Dr. Cumhuri KILINÇ\*\*\*, Dr. Kemal IRMAK\*

\* GATA Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, \*\* Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Bilim Dalı

\*\*\* GATA Biokimya Anabilim Dalı

### ÖZET

Alloksan, pankreas endokrin adacıklarındaki insülin salgılayan B hücrelerine toksik etkisinden dolayı diyabetik hayvan modeli oluşturmada kullanılan kimyasal ajandır. Bu çalışmada alloksanın, sıçan plazma glukoz düzeyine ve özellikle pankreas endokrin adacıklarında neden olduğu değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

Yetişkin Wistar norvegicus sıçanlara intravenöz olarak 70 mg / kg alloksan enjeksiyonu yapıldı. 8. hafta sonunda plazma glukoz düzeylerindeki ve pankreas endokrin adacıklarındaki değişiklikler ince yapı düzeyinde araştırıldı. Serum glikoz düzeyi kontrol grubunda  $125 \pm 18.9$  mg/dl alloksan grubunda ise  $192 \pm 35.5$  mg/dl olarak bulundu ( $P < 0.001$ ). Pankreasın dış salgı yapan bölümünde herhangi bir histopatolojik değişiklik izlenmedi. Pankreas endokrin adacıklarının ince yapı düzeyinde incelenmesinde, adacıkların kontrol grubundan daha küçük olduğu gözlemlendi. Adacıklar genelde A ve D hücrelerinden oluştuğu ve bu hücrelerde dikkati çekecek bir patoloji olmadığı gözlemlendi. B hücrelerinin ise sayılarının azaldığı, endoplazma retikulumu sisternalarının genişlediği, mitokondriyonlarda vakuolleşme olduğu ve granüllerde belirgin bir azalma olduğu saptandı.

Bu çalışma, alloksanın pankreas adacıklarındaki A ve D hücreleri üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığını, B hücrelerinin ise seçici olarak etkilendiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler : Alloksan, diyabet, pankreas, B hücresi, ince yapı

### GİRİŞ

İnsülin, 21 aminoasitli A ve 30 aminoasitli B zincirlerinin sülfidril (-SH) gruplarının ortaklaşa yaptığı disülfür köprüleri ile bağlanmış polipeptid yapısında

### SUMMARY

#### *The Effect of Median Dose Alloxan on Rat Endocrine Pancreas and Plasma Glucose Levels*

Alloxan is a chemical agent used to produce diabetic animal model with its toxic effect on pancreatic islet B cells. This study was planned to investigate the changes in pancreatic islets and plasma glucose levels after the administration of alloxan. Alloxan (70 mg/kg) were injected intravenously to adult Wistar norvegicus rats. At the end of the eighth week, plasma glucose levels were determined and pancreatic islets were investigated at the ultrastructural levels.

Plasma glucose level was  $125.1 \pm 18.9$  in control group while  $192 \pm 35.5$  in experimental group ( $P < 0.001$ ). Pathologic evidence of toxicity was not present in exocrin pancreas. Pancreatic islets were smaller in experimental group than in the control. A and D cells at the islets of Langerhans remained unaltered, while B cells decreased in number, having dilated individual profiles of endoplasmic reticulum, decreased secretory granules, and vacuolated mitochondrions. This study shows that alloxan has no toxic effect on A and D cells while selectively toxic on B cells of the pancreatic islets.

Key Words : Alloxan, diabetes, pancreas, B cell, ultrastructure

bir hormon olup, Langerhans adacığı B hücreleri tarafından sentezlenip salgılanmaktadır. B hücreleri tarafından salgılanan insülin hormonunun mutlak ya da göreceli yetersizliği sonucu oluşan tablo in-

süline bağlı diyabet (tip I diyabet)'tir (1). insülin salgılanışındaki yetersizlik karbonhidrat metabolizmasında bozukluklara yolaçarak, kanda aşırı glikoz birikmesine (hiperglisemi) ve idrarda aşırı şeker atılmasına (glikozüri) neden olur.

Alloksan monohydrate (Alloksan), insulin salgılayan B hücrelerine toksik etkisiyle diyabetik hayvan modeli oluşturmada sıklıkla kullanılan kimyasal ajandır. Alloksanın bu etkisi, pankreas endokrin adacık hücrelerinden insulin salgılamaktan sorumlu B hücresi üzerine seçici olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (1-22) Evan ve arkadaşları (8) intravenöz olarak 40 mg/kg alloksanın tek doz olarak uygulanmasına rağmen 80 hayvanın 13 ünde hiperglisemi gözlenmemesi ve 100 mg/kg dozun bir çok araştırmacı tarafından diyabetik olarak bildirilmesinden dolayı, bu çalışmada, insüline bağımlı diyabetes mellitus geliştirme modeli olarak kullanılan alloksanın 70 mg/kg tek dozda uygulanmasını takiben 8. hafta sonunda plasma glukoz düzeyine etkileri ve endokrin pankreas hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin ince yapı düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

GATA deneysel araştırma merkezinden alınan, ergin dişi Wistar norvegicus sıçanlara (n=10) tek doz intravenöz (i.v) yolla alloksan monohydrate (Sigma) 70 mg/kg verildi. Kontrol grubu hayvanlara (n=5) eşit hacimde serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) i.v. yolla uygulandı. Kontrol ve deney grubu aynı şartlar altında beslendi. Sekiz haftalık süre sonunda, bir gece aç bırakılan deney hayvanlarından intrakardiyak kan örnekleri alındı. Bu örnekler yarım saat bekletildikten sonra 2000 devir/dakika hızla 5 dakika santrifüj edildi. Serum glukoz düzeyleri Technicon RA 1000 otoanalizöründe glukoz oksidaz yöntemi ile enzimatik olarak ölçüldü. Elektron mikroskopik çalışmalar için, 8 nci hafta sonunda hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülerek pankreasları çıkartıldı. Doku örnekleri, önce M/15 fosfat tamponlu % 2'lik glutaraldehit

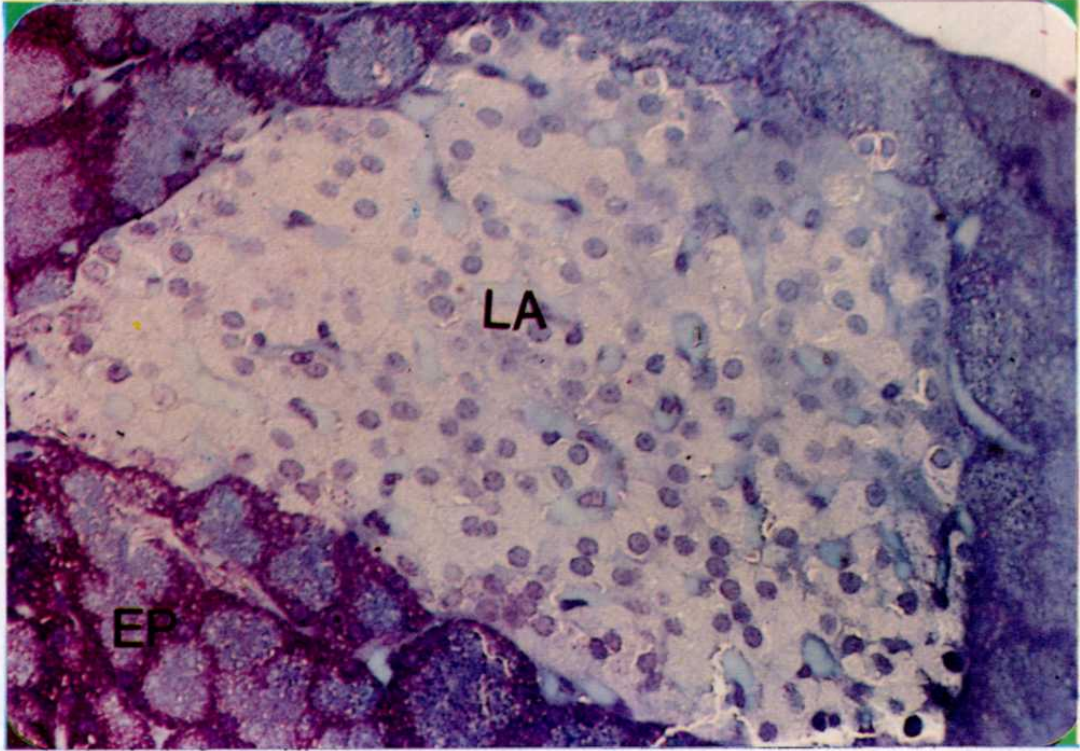
içinde + 4 C de bir gece tespit edildiler. Daha sonra, M/15 fosfat tamponuyla yıkanıp, aynı tampon içinde hazırlanmış % 1'lik osmium tetroksit içinde 60 dakika bırakılarak ikinci kez tespit edildiler. Bu tamponla tekrar yıkandıktan sonra oda ısısında yükselen etil alkol dizilerinden geçirilerek sudan kurtarıldılar ve eşit oranda araldit CY212 ve DDSA karışımına gömüldüler. Hazırlanan araldit bloklardan önce 1-2 mikrometre kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Yarı ince kesitler toluidin mavisi boyası boyanıp Olympus BHS/BHT tipi fotomikroskobu ile mikrofotografı çekildi. Daha sonra, LKB mikrotomuyla alınan 500-600 A°'luk ince kesitler önce %1'lik uranil asetat ile daha sonra da kurşun nitrat, kurşun asetat, kurşun sitrat karışımıyla (Sato) boyanarak Carl Zeiss Em 9S2 elektron mikroskobunda incelenip elektronmikrofotografı çekildi.

## BULGULAR

**Serum Glukoz Düzeyleri :** Ortalama glukoz düzeyi ve standart sapma; kontrol grubunda 129.1±18.9, diyabet grubunda 192±35.5 bulundu. İki grup ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı görüldü (P<0.001).

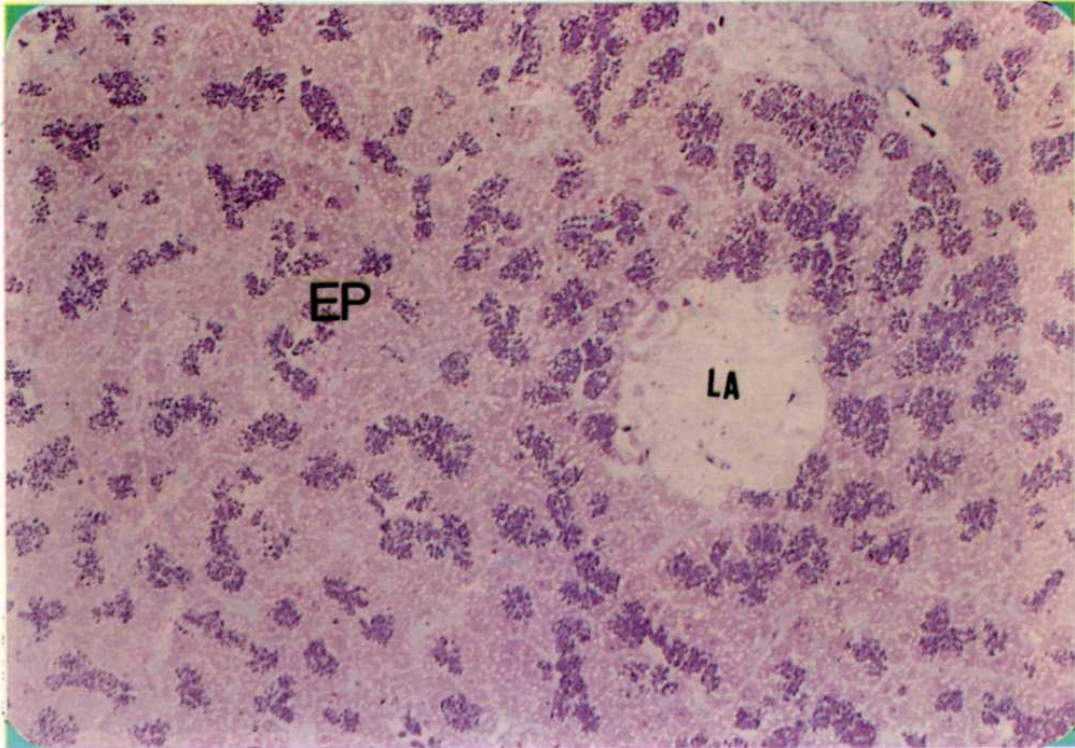
**Histolojik Bulgular :** Kontrol grubu olarak alınan ve tek doz i.v. serum fizyolojik verilen hayvanlardan elde edilen kesitlerin ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde normal histolojik ve sitolojik yapılar izlendi (Resim-1,4).

Deney grubunun ışık mikroskopik incelenmelerinde, ekzokrin pankreas ve endokrin pankreasın A, D hücre populasyonları, deney grubuyla aynı histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. Deney grubunda adacık hacmi ve B hücre sayısında azalma gözlenmişti (Resim-2,3). B hücrelerinin elektron mikroskopik incelemelerde ise kontrol grubuna göre; hücre granüllerinde belirgin bir azalma olduğu, granüllü endoplazma retikulumu sisternalarında kontrol grubunda gözlenmeyen genişlemeler ve mitondrilere vakuolleşmeler başlıca gözlenen yapısal değişikliklerdi (Resim-5,6).

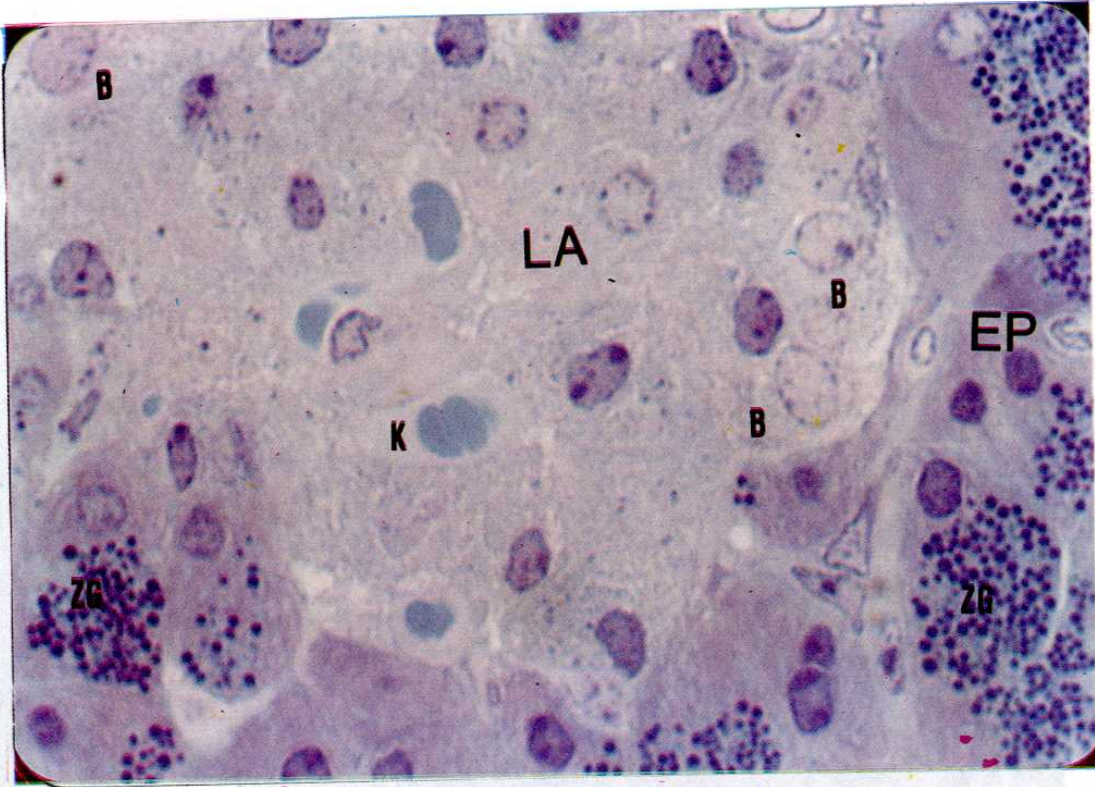


DK: Sarıgrın, X 480

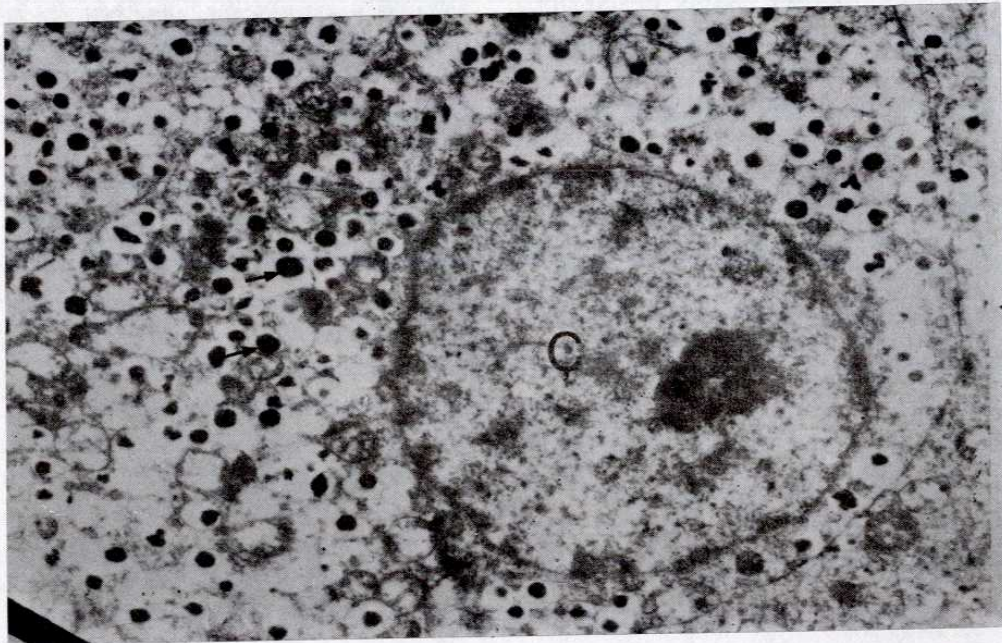
Resim 1. Kontrol grubu hayvanlara ait pankreasın normal yapı gösteren görünümü. LA; Langerhans adacığı, EP; Ekzokrin pankreas, Toluidin mavisi, X 480.



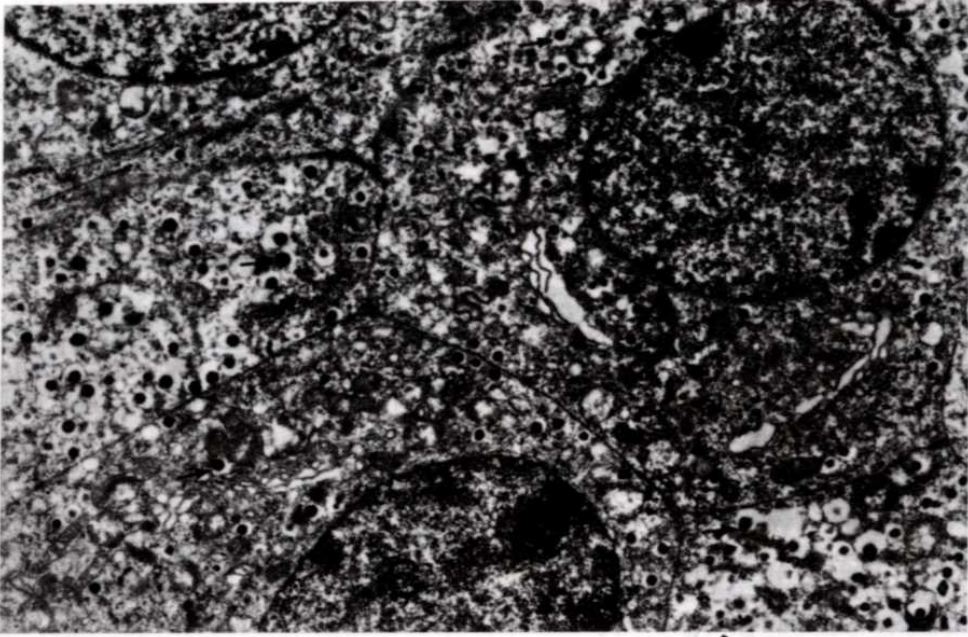
Resim 2. Intravenöz alloksan uygulandıktan sonra 8.nci haftadaki hayvanın pankreas dokusunun histolojik görünümü. LA; Langerhans adacığı, EP; Ekzokrin pankreas, Toluidin mavisi, X 240.



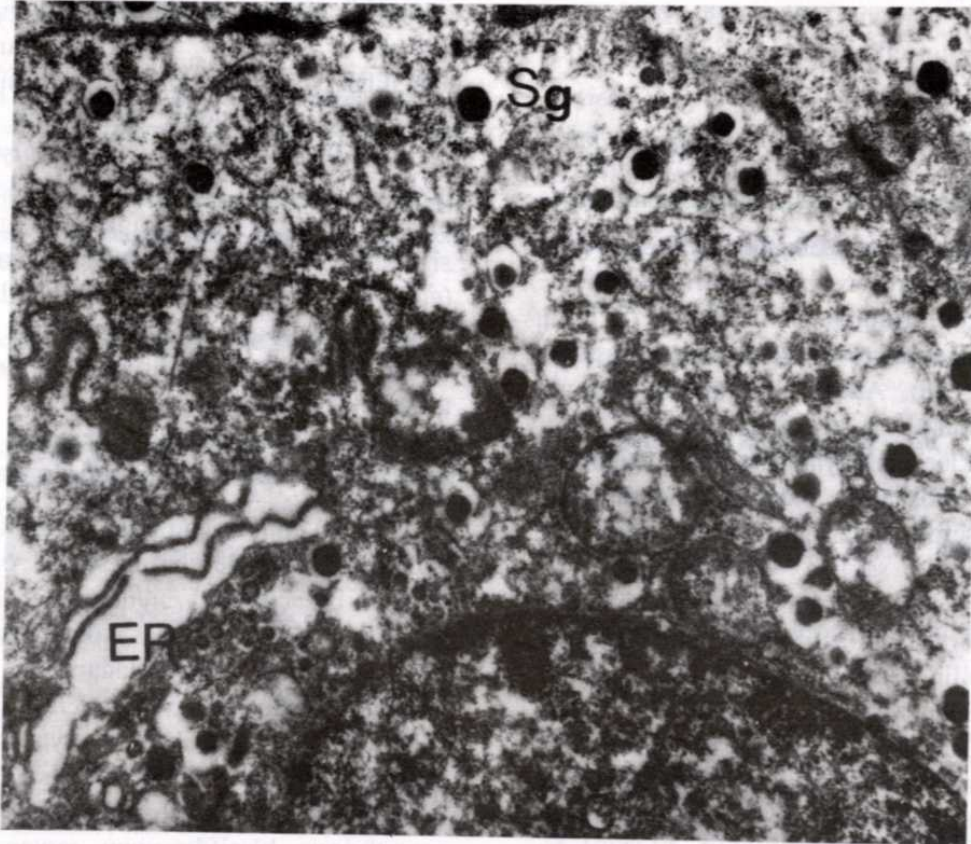
Resim 3 Resim 2 deki adacığın ileri büyütmadaki görünümü. LA; Langerhans adacığı, EP; Ekzokrin pankreas, ZG; Zimogen granüller, K; Kapiller, B; B hücreleri, Toluidin mavisi, X 1200.



Resim 4. Kontrol grubuna ait Langerhans adacık B hücresinin elektron mikroskopik görünümü. Ç; Çekirdek, Oklar; salgı granülü, M; Mitokondriyon X 8300.



Resim 5. Alloksan grubuna ait Langerhans adacık B hücrelerinin elektron mikroskoftaki görünümü. Salgı granülleri belirgin şekilde azalmış B hücreleri Ç; Çekirdek, Ok; Salgı granülü, X 6600.



Resim 6. Aynı kesitin daha büyük büyültmedeki görünümü. Endoplazma retikulumu sisternalarında genişlemeler izlenmekte. ER; Endoplazma retikulumu, Ç; Çekirdek, Sg; Salgı granülleri, X 16500.

## TARTIŞMA

Son yıllarda, yapılan birçok deneysel hayvan çalışmasında, alloksanın Langerhans adacıklarında seçici olarak B hücrelerini etkileyerek, diyabet oluşturduğu bildirilmiştir (1-22). Evan ve arkadaşları (8) intravenöz olarak 40 mg/kg alloksanı tek doz olarak 80 hayvana uyguladıklarında bu hayvanların 13 ünde hiperglisemi bulguları gözlememeleri ve 100 mg/kg alloksanın intraperitoneal veya intravenöz olarak tek doz uygulanması ile (6) hayvanların diyabetik olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda tek doz alloksan (70 mg/kg) intravenöz (kuyruk veninden) uygulandıktan 8 hafta sonra, hayvanların pankreas endokrin adacık hücrelerinde gözlenen başlıca yapısal değişiklikler; adacık hacminde, B hücre sayısında ve B hücre granüllerinde azalma, granüllü endoplazma retikulum sisternalarında genişleme ve mitokondrial vakuolleşmeyi içeriyordu. Bu değişiklikler, hayvanlardan alınan kan örneklerinde serum glukoz düzeylerindeki değişiklikler ile uyumlu idi. Ekzokrin pankreas dokusu ve A, D adacık hücrelerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemesi alloksanın etkisinin seçici olarak B hücrelerine olduğunu gösterdi.

Yakın zamanda yapılan birçok çalışma, "nasıl oluyorda alloksan sadece B hücreleri üzerine toksik etki yapıyor?" sorusuna yanıt alamamıştır. Alloksanın kolşisinin bilinen etkisine benzeyen antimitotik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu şekilde, B hücrelerinde salgı granüllerinin taşınımı ile ilgili mikrotubuller etkilenmekte ve hiperglisemi oluştuğu düşünülmektedir (16). Ancak, bu tür bir etki alloksanın seçici olarak B hücreleri üzerinde oluşturduğu değişiklikleri açıklayamamaktadır. Diğer bir çalışmada (20), alloksanın, proteinlerinin sülfidril gruplarıyla birleşerek, onları glutatyona indirgeyip oksitleyerek disülfid şekline dönüştürdüğü bildirilmektedir. Bu arada pek çok enzimin biyolojik aktivitesinin de serbest sülfidril gruplarının varlığına bağlı olduğu bilindiğinden, bu olayın B hücrelerindeki dejenerasyonu başlattığı düşünülmektedir. Özellikle, B hücrelerinin gerek mitokondriyal, gerekse ekstramitokondriyal olarak ATP-az'a bağımlı -SH (sülfidril) gruplarını diğer pankreas hücrelerine oranla en fazla bulundurduğu dikkate alınacak olursa, bu etkilemenin seçici olarak B hücrelerine yönelik olmasının nedeni açıklık ka-

zanabilir. Ayrıca, B hücrelerindeki mitokondriyal lezyonların olası açıklaması da bu olabilir.

Son zamanlarda, diyabette özellikle vasküler komplikasyonlu hastalarda lipid metabolizma ve yapısında önemli değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Bu olgularda, yapısal değişiklikler oksidatif özelliğindedir ve plazma lipoproteinleri ve hücre membranlarındaki lipidlerin oksidasyonu, diyabette vasküler hastalıkların gelişimi ile birlikte (6). Birçok araştırma, deneysel diyabet modelinde çeşitli dokularda (karaciğer, böbrek) dalak, kalp, testis, pankreas, iskelet kası ve intestinal mukozaya lipidlerin artmış peroksidasyonunun ve intrasellüler savunma enzimlerinin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz) azaldığını bildirmektedir (7, 17, 19, 23-29). Böylece, oksidatif baskının diyabetik vasküler hastalıkların gelişiminde bağımsız risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Pankreatik adacıklarda alloksanın neden olduğu serbest radikal (hidrojen peroksit, süperoksit anyon, hidroksil radikali) üretimindeki artış ile B hücrelerine seçici olarak toksik etkisi arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Alloksan uygulanmasında adacıklarda serbest radikal üretiminin arttığı, ancak antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz) varlığında azaldığı gözlenmiştir (2). Bu sonuçlar ile serbest radikal üretimindeki artışa bağlı olarak B hücre membranlarında gelişecek fonksiyonel bozulmalar ve sonraki hücre gelişmeler (endoplazmik retikulumda, mitokondriyonlardaki ve salgı granüllerindeki histopatolojik değişiklikler) arasında ilişki kurulabilir. Ayrıca, deneysel diyabet modelinde antioksidan enzimlerin ve diğer antioksidanların varlığında diyabetik etkinin azaldığını bildiren raporlar da bildirilmiştir (2,6,17).

Tüm bu çalışmalara rağmen, alloksanın pankreas endokrin adacık hücrelerine seçici olarak toksin etkisi tam bir açıklık kazanmamıştır. Yakın dönemde, genel olarak adhezyon molekülleri ve/veya reseptörleri olarak tanımlanan ve hücreleri işlevlerini, metabolik aktivitelerini, göç etmelerini, çoğalmalarını kontrol eden yapıların varlığı ortaya konmuştur (30-33). Acaba, yapılacak immunohistokimyasal çalışmalarla, B hücrelerine özgü reseptörlerin klasifikasyonu saptanabilir mi? Bu sorunun yanıtı, alloksanın B hücrelerine olan seçici etkisini açıklayabilir kanısındayız.

Sonuç olarak, bu çalışmada, 70 mg/kg alloxan uygulanmış sıçanların pankreas endokrin adacıklarındaki B hücrelerinde yapısal değişikliklere neden olduğu, bu değişiklikler daha yüksek doz uygulanan önceki bilgilere uygunluk göstermiştir.

Plazma glikoz düzeyi ile karşılaştırıldığında bu dozun deneysel diyabet oluşturmak için emin bir doz olmadığı ancak alloxanın toksik etki mekanizmasının araştırılması için yeterli olduğu fikrindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Meehan CJ, Davidson PM, Vong DG, Foulis AK. The partial diabetic pancreas: A histological study of a new animal model. *Pancreas* 1987; 2 (1): 91-8.
2. Asayama K, English D, Slonim AE, Burr TM. Chemiluminescence as an index of drug-induced free radical production in pancreatic islets. *Diabetes* 1984; 33 (2): 160-3.
3. Black HE, Rosenblum IV, Capen CC. Chemically induced (streptozotocin-alloxan) diabetes mellitus in the dog. Biochemical and ultrastructural studies. *Am J Pathol* 1980; 98 (2): 295-309.
4. Boquist L. A new hypothesis for alloxan diabetes. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1980; 88 (4): 201-9.
5. Chakravarthy BK, Gupta S, Gode KD. Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan-induced diabetic rats by (-) -epicatechin. *Life Sci* 1982; 31 (24): 2693-7.
6. Chertow BS, Webb MD, Leidy JW, Cordle MB. Protective effects of retinyl on streptozocin and alloxan-induced beta cell toxicity and diabetes in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; 63 (1): 27-44.
7. Cooper ME, Allen TJ, QJ, Q'Brien RC, Papazoglu D, Clarke Be. Nephropathy in model combining genetic hypertension with experimental diabetes mellitus. *Diabetes* 1990; 39: 1575-9.
8. Evan A, Pimong SA, Connors B. The effect of alloxan-induced diabetes on the kidney. *The Ana Rec* 1984; 208: 37-47.
9. Gorry KC, Baskin D, Brodsky J, Fujimoto WY. Responses of pancreatic B cells to alloxan and streptozocin in the guinea pig. *Pancreas* 1986; 1 (2): 130-8.
10. Jansson L, Sandler S. Alloxan-induced diabetes in the mouse: Time course of pancreatic B-cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability. *Virchows Arch* 1986; 410 (1): 17-21.
11. Mann GV, Adams L. The renal lesions associated with experimental diabetes in the rat. *Am J Pat* 1984; 50: 565-8.
12. Muller R, Laucke R, Trimper B, Cossel L. Tritium-Thymidine autoradiography of the rat pancreas after alloxan-induced diabetes mellitus. *Zentralbl Pathol* 1991; 137 (4): 360-5.13.
13. Nakamura M, Hamaguchi K, Ono J. The endocrine pancreas of alloxan-diabetic rats: Microangiopathy as revealed by electron microscopy. *Diabetes Res Clin Pract* 1989; 7 (3): 169-79.
14. Rosenblum IV, Borboly TA, Billhmer B, Coulston F. Biochemical and histological characterization of chemical-induced diabetes mellitus in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Ecotoxicol Environ Saf* 1981; 5 (4): 513-27.
15. Sandler S, Welsh N. Mechanism of pancreatic B-cell degeneration during the course of insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Paediatr Scand* 1985; 74 (320): 7-13.
16. Schmidt R, Muller H, Unger E, Vater W. Investigations of the alloxan effect on B-cell of the endocrine pancreas in special regard to the alloxan-metal-complex-theory. II. Effects of alloxan, alloxanic acid, Zn (2+), and ethyleneglycol-bis-(beta-aminoethylether) -N,N'- tetraacetic acid (EGTA) on the assembly of microtubulin proteins (MTP) into microtubules or MTP sheets in vitro. *Acta Histochem* 1990; 88 (2): 93-101.
17. Song Y, Yu JR. Preventive effect of bombesin on alloxan-induced diabetes in rat. *Sheng-Li Hsueh Pao* 1991; 43 (5): 428-35.
18. Spadella CT, Breim LC, Mercadante MC, de-Macedo CS, de-Macedo AR. Metabolic effect of pancreatic duodenal transplantation in diabetic rats. *Microsurgery* 1992; 13(3): 132-7.
19. Tesfarmariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263 (2/2): 321-6.
20. Uygun M, Erbenli T, Gürtekin M, Yılmaz G. Alloxan yoluyla diyabet oluşturulmuş sıçanlarda bazı adacık hücrelerinde gözlenen ince yapısal değişiklikler. IX. Ulusal Elekttron Mikroskopi Kitapçığı, 1989: 239.
21. Wilson C, Foulis AK, Imrie CW, Carter DC. Selective islet preservation during alloxan diabetogenesis: Studies on the syrian hamster. *Surg Res Commun* 1988; 3 (1-2): 105-11.
22. Zafirova M, Jablenska R, Popov A, Goranova I, Vassileva E, Duhault J. Morphological characteristics of the endocrine pancreas in alloxan diabetes after cyclosporin A administration. *Cell Mol Biol* 1991; 37 (6): 585-96.
23. Crouch R, Kimsey G, Priest DG, Sarda A. Effect of streptozocin on erythrocyte and rectal superoxide dismutase. *Diabetologia* 1978; 15: 53-7.
24. Loven DP, Scheal HP, Oberley LW, Wilson HD, Bruch L. Superoxide dismutase in the intestinal mucosa of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology* 1982; 111: 737-42.

25. Low PA, Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 873-7.
26. Matkovic B, Varga SI, Szabol L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Hom Metab Res* 1982; 14: 77-9.
27. Sato Y, Hatta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 1981; 25: 373-8.
28. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB Wistar) rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 1014-18.
29. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defence mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. *Diabetes* 1987; 36: 1014-8.
30. Jutila MA. Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 1992; 100: 191-201.
31. Kansas GH. Structure and function of I-selectin. *APMIS* 1992; 100: 287-293.
32. Reichardt LF, Tomoselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Ann Rev Neurosci* 1991; 14: 531-70.
33. Springer TA. Adhesion receptors of the immunosystem. *Nature* 1990; 246 (2) : 425-34.