

ORİJİNAL YAZI

DeneySEL Diyabette Probukol Uygulanmasının Endokrin Pankreas Dokusuna Etkisinin Ultrastrüktürel Olarak İncelenmesi

Gülten KARABAY*, Deniz ERDOĞAN**, Gülnur TAKE*, Çimen KARASU***

* Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD, Ankara.

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD, Ankara.

*** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada Streptozotosin ile oluşturulan diyabet modellerinde önemli bir antioksidan olan probukolün B hücreleri üzerine koruyucu etkisinin elektron mikroskop düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 200 – 250 gr ağırlığında, 7 – 8 haftalık toplam 24 adet erkek sıçan kullanılmış ve 3 grup oluşturulmuştur. 1. grup kontrol (n=8) (sodyum sitrat, i.p., tek doz), 2. grup kronik (8 hafta) diyabet (n=8) (50mg/kg, i.p. tek doz STZ), 3. grup ise diyabet (8 hafta) + probucol tedavisi (300mg/kg/gün, 3 hafta) uygulanan grup (n=8) olarak ayrılmıştır. Süre bitiminde alınan pankreas dokuları LEO 906E Transmission Elektron Mikroskopta değerlendirilmiştir. Yapılan elektron mikroskopik incelemelerde diyabetik grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, granül sayısının az olduğu, mitokondrion ve Golgi kompleksinde dejeneratif değişikliklerin varlığı gözlenmiştir. Diyabeti izleyen probucol tedavisi sonucunda ise granül sayısının normale yakın olduğu; ancak, organel dejenerasyonunun kısmen de olsa bulunduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, diyabetin B hücrelerinde oluşturduğu dejeneratif değişikliklerin probucol ile azaldığı; ancak, tamamen yok olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DeneySEL diyabet. Probucol. Ultrastrüktür.

The Ultrastructural Analysis Of The Effects Of Probucol On Endocrin Pancreas Tissue In Experimentally Induced Diabetes Mellitus

ABSTRACT

The aim of the present study is to investigate the protective effect of probucol, which is an antioxidant agent on beta cells in STZ induced diabetes mellitus model. In this study, 24, 7-8- week -old male rats, weighing 200-250 g were used, and the animals were divided into three groups. The control group received a single dose of sodium citrate (ip, n = 8), the 8 weeks chronic diabetes mellitus group received of a single dose 50 mg/kg STZ (ip, n = 8), the diabetes mellitus group received 300 mg/kg/day probucol for 3 weeks (n = 8). Electron microscopic examination revealed degenerative changes of mitochondria and Golgi complexes in diabetes mellitus group when compared with control group and beta cell granules were relatively decreased. When the samples from the diabetes mellitus group treated with probucol were evaluated, beta cell granule numbers were nearly normal, degeneration in organelle structure was reduced, but still present. As a conclusion probucol decreases the degenerative effects of diabetes mellitus on beta cells, but does not treat them all.

Key Words: Experimental diabetes. Probucol. Ultrastructure.

Diyabet mellitus kronik metabolik bir hastalıktır. Nedeni saf ya da bağlı insülin eksikliğidir¹. İnsüline bağlı diyabet (juvenil tip diyabet) pankreas B hücrelerinin destrüksiyonuna yol açan inflamasyon süreci ile sonuçlanır². Kronik diyabetin bir çok yan etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bunlar içinde mikroanjiyopati,

böbrek glomerülü ve retinada partikülizasyon, nöropati ve aterosklerozun hızlanması sayılabilir¹.

Diyabetin neden olduğu yan etkileri ortaya koyabilmek ereğiyle toksik ajanlar olan alloksan (ALX) ve streptozotosin (STZ) kullanılarak deney hayvanlarında oluşturulan diyabet modelleri son yıllarda sıklıkla başvurulan yöntem olmuştur. Yapılan çalışmalarda STZ ve ALX'in pankreas B hücrelerinde özellikle degranülasyona neden olduğu bildirilmektedir³. Bazı araştırmacılar ALX ya da STZ ile pankreas B hücrelerinde oluşan deformasyonun süperoksit dismutaz, vitamin E, nikodinamid ve probucol gibi bazı antioksidan ajanlar ile tedavisi sonucu iyileştirilebileceğini veya önlenebileceğini öne sürmüşlerdir^{4,5}. Bunlar içinde probucol son yıllarda üzerinde sıklıkla çalışılan antioksidandır.

Geliş Tarihi: 17.11.2004

Kabul Tarihi: 21.04.2005

Dr. Gülten KARABAY
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD
Eskişehir Yolu 20.km
Bağlıca Kampusü Etimesgut / ANKARA
Tlf: 0 312 234 10 10 / 1571-1572
e-mail: gultenkarabay@yahoo.com

Hipokolesterolemik bir ilaç olarak kullanılan probukolün⁶, önemli bir antioksidan olduğu bildirilmiştir⁷. Literatürde probukolün STZ'ye bağlı diabetteki B hücre yıkımını önleyebileceği bildirilmiştir⁸.

Ancak yapılan literatür araştırmalarında STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabet modellerinde probukolün etkisinin histolojik olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada STZ ile oluşturulan diyabet modellerinde probukolün B hücreleri üzerine etkisinin elektron mikroskop düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada 200 – 250 gr ağırlığında, 7 – 8 haftalık toplam 24 adet erkek sıçan kullanılmış ve 3 grup oluşturulmuştur. 1. grup kontrol (n=8), 2. grup kronik diyabet (n=8), 3. grup ise diyabet + probucol tedavisi uygulanan grup (n=8) olarak ayrılmıştır.

Diabet 50mg/kg STZ'nin i.p tek doz enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. STZ fizyolojik salin içinde çözülmüştür. Yaş uyumlu kontrol grubuna ise sadece fizyolojik salin enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu izleyen üçüncü günde, glukometre (Aque-Check, Roche) ile deneklerin kuyruk venlerinden alınan kanda, kan glukoz düzeyleri ölçülmüş ve STZ uygulanan sıçanlarda kan glukoz değerleri 330 – 399mg/dl arasında bulunarak diyabet oldukları kesinleştirilmiştir. Aynı yöntemle yaş uyumlu kontrol grubunda da ölçüm yapılmış ve kan glukoz düzeyleri 90 – 110mg/dl arasında belirlenmiştir. Kan glikoz düzeyleri haftada bir, aynı saatte ölçülmüştür ve sıçanların deney süresince serbest diyet ve su ile beslenmeleri sağlanmıştır. STZ enjeksiyonunu izleyen 8 hafta sonra kontrol ve diabet gruplarına ait pankreas dokuları alınmış, 3. grubu oluşturmak için ise 8 adet sıçana 300mg/kg/gün intraoral gavaj ile 3 hafta süreyle probukol tedavisi yapılmıştır. Süre bitiminde tüm pankreas dokuları rutin elektron mikroskop takibinden geçirilerek araldite gömülmüşlerdir. Alınan ince kesitler LEO 906E Transmission Elektron Mikroskopta değerlendirilmiştir.

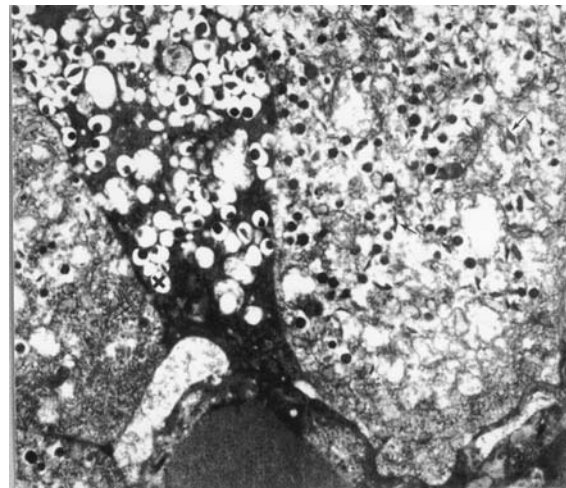
Bulgular

Kontrol grubu pankreas ince kesitlerinde Langerhans adacıklarında, salgılama döngüsünün farklı evrelerinde oldukları düşünülen açık ve koyu B hücreleri gözlenmiştir. Çekirdek ve sitoplazması yoğun boyanan B hücrelerinde granül içeriklerinin çoğunlukla boş olduğu izlenmiştir. Granül içeriği dolu olanlarda ise salgı materyalinin kristalin yapısı ilgiyi çekmiştir. Açık renk sitoplazmalı hücrelerde, çoğu granülün

kristalin yapıda kor bölge içerdiği belirgin olarak gözlenmiştir. Bu hücrelerde bol granüllü endoplazmik retikulum sisternası saptanmıştır. Bu bulgu hücrelerin aktif sentez aşamasında olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Tüm beta hücrelerinin mitokondriyonları normal yapıda izlenmiştir (Şekil 1).

8 haftalık diyabetli grupta ise B hücrelerinde granül sayısının kontrol grubuna göre son derece az olduğu, özellikle Golgi kompleksi bölgesinde yeni biçimlenen az yoğun granüller (öncül granüller) dikkati çekmiştir. Kontrol grubunda gözlenen kristaloid özlü granüller bu grupta izlenmemiştir. Granüllü endoplazmik retikulum tubuluslarının genişlediği ve içlerinin az yoğun bir materyal ile dolu olduğu gözlenmiştir. Mitokondriyonlar incelendiğinde ise, çoğunun son derece irileştiği, kristallarının silindiği ve bu şekilleriyle vakuölü andırdıkları ilgiyi çekmiştir (Şekil 2).

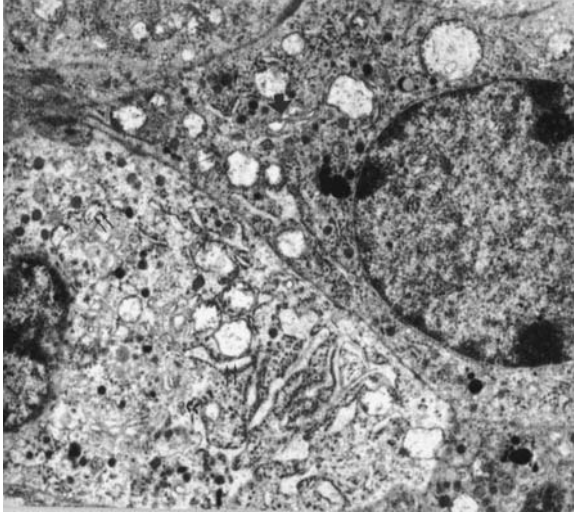
8 haftalık diyabeti izleyen 3 hafta boyunca probukol tedavisi uygulanan grupta beta hücrelerinin genel yapısal özelliklerinin kontrole yakın bir görünüm sergilediği gözlenmiştir. Granül sayısının kontrole yakın olduğu ancak kontrol grubunda gözlenen kristaloid öz yapısının çok az granülde bulunduğu gözlenmiş ve bir kısmının da az yoğun oldukları belirlenmiştir. Çoğu hücrede aktif salgılamanın bir göstergesi olarak, granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında aşırı dilatasyon ve içlerindeki az yoğun madde birikimi saptanmıştır. Golgi kompleksinin vakuollü olduğu, mitokondriyonlarda ise kontrol grubuna göre dejeneratif değişikliklerin halen sürdüğü dikkati çekmiştir (Şekil 3).



Şekil 1:

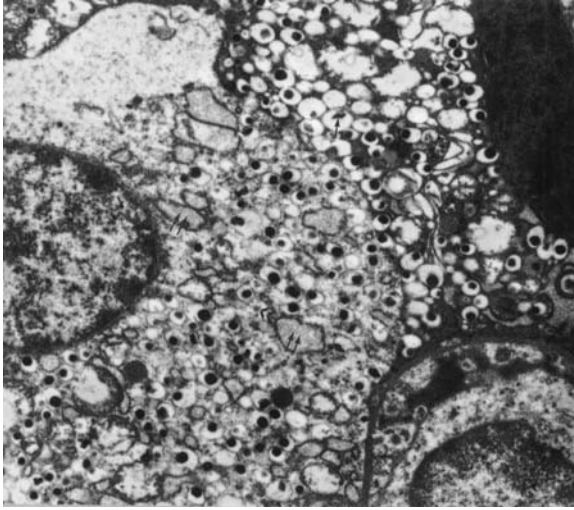
Kontrol grubu pankreas B hücresi. (*): İçerikleri boş olan granüller, (↑): Kristalin kor bölgesi içeren granüller, (↑↑): Granüllü endoplazmik retikulum tubulus ve sisternaları (Uranil asetat-kurşun sitrat X4500).

Probukol'ün Pankreas Ultrastrüktürüne Etkisi



Şekil 2:

Diyabet grubu pankreas B hücresi. (→): Golgi bölgesi, (↗): Öncül granüller, (↑↑): Genişlemiş ve içerikleri az yoğun materyal içeren granüllü endoplazmik retikulum tubulus ve sisternaları (Uranil asetat-kurşun sitrat X4500).



Şekil 3:

Diyabet + probukol tedavisi yapılan grupta pankreas B hücresi. (↑): Kristalin kor bölgesi içeren granüller, (↗): Öncül granüller, (↑↑): Aşırı dilate ve içleri az yoğun madde içeren granüllü endoplazmik retikulum tubulus ve sisternaları, (→): Vakuollü Golgi kompleksi (Uranil asetat-kurşun sitrat X4500).

Tartışma ve Sonuç

Diyabet kronik, metabolik bir hastalıktır⁸. Kronik diyabetin neden olduğu yan etkileri ortaya koyabilmek ereğiyle deney hayvanlarında oluşturulan diyabet modelleri son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır⁹. Günümüzde ALX ve STZ deney hayvanlarında diyabet modeli oluşturmada kullanılan toksik ajanların başında gelmektedir^{3,10}. Her iki kimyasal da pankreas B hücrelerinde deformasyona neden olmaktadır. Son

birkaç yıldır bu bileşiklerin neden olduğu deformasyonu açıklamak için iki yol olabileceği bildirilmiştir. Birincisinde; B hücrelerinde birikerek, ikincisinde ise B hücrelerinde birikerek serbest radikaller oluşturmak yoluyla olmaktadır¹¹.

B hücrelerinin düşük antioksidatif kapasiteleri olduğu için oksidatif değişikliklere çok hassastırlar. STZ metabolizasyonu sırasında bir dizi toksik ara ürün üretilir. Metil katyonları ve metil radikalleri gibi alkali ajanların yanında reaktif oksijen türevleri de üretilmektedir. Bu ürünlerin pankreas Langerhans adacıklarında deformasyona ve diyabetin patogenezinde rol oynadıklarına dair bir çok çalışma bildirilmiştir⁵. Gorogawa ve arkadaşları¹² oksidatif stresin mitokondriyal elektron transport zincirinde değişime neden olduğunu ve hücre içi hasarını özellikle bu şekilde indüklediğini bildirmişlerdir.

Aughseteen¹⁰ yaptığı çalışmasında STZ'nin Langerhans adacığını oluşturan hücrelerde neden olduğu yapısal değişiklikleri incelemiştir. Araştırmacı yüksek doz STZ tedavisinden 2 saat sonra sıçan pankreası B hücrelerinde kromatin birikimini ve merkezi yerleşimli B hücrelerinde sitoplazmik vezikülasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Çekirdekte piknozis ile birlikte mitokondriyon ve endoplazmik retikulum dejenerasyonunun işlemde 8 saat sonra, B hücre nekrozunun işlemde 12 saat sonra olaylandığını bildirmiştir.

Bu çalışmada düşük doz STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 8 hafta sonra pankreas B hücreleri incelendiğinde, özellikle mitokondriyon ve Golgi kompleksi düzeyinde değişiklik olduğu, granül sayısında da belirgin azalma olduğu izlenmiştir. Literatürde bildirilen B hücre nekrozunun olaylanmayışı ise STZ'nin düşük doz uygulanmasına bağlanmıştır.

Bazı araştırmacılar ALX ya da STZ ile pankreas B hücrelerinde oluşan deformasyonun süperoksit dismutaz, vitamin E, nikodinamid ve probukol gibi bazı antioksidan ajanlar ile tedavisi sonucu iyileştirilebileceğini veya önlenilebileceğini öne sürmüşlerdir⁴.

Probukolün STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara olan etkisini gözlemek amacıyla Yoshino ve arkadaşlarının¹³ yaptıkları bir çalışmada araştırmacılar diyabet oluşturmadan önce ratları %1'lik probukol içeren diyet ile beslemişler ve sonrasında 35 – 50mg/kg STZ'nin intravenöz uygulaması ile ratlarda diyabet oluşturmuşlardır. Araştırmacılar diğer yandan diyabetin spontan iyileşmesinde probukolün etkisini gözlemek ereğiyle iki hafta probukollü diyet ile beslenen gruba 25mg/kg STZ'yi intravenöz uygulamışlar ve aynı diyeti 2 hafta daha sürdürmüşlerdir. Enjeksiyondan iki hafta sonra normal diyetle beslenen gruba (n=13) sadece dört sıçanda iyileşme gözlenirken, probukollü diyetle beslenen (n=12) onbir sıçanda iyileşme gözlendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar STZ'nin in vivo diyabetojenik aktivitesinin önceden probukol tedavisi ile engelle-

nemediğini, ancak diyabetin iyileşmesinde probukol tedavisinin rolü olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar probukol tedavisi ile düşük doz STZ uygulaması sonucu oluşan diyabetin neden olduğu B hücre hasarının önlenebileceğini belirtmişlerdir.

Probukolün STZ ile oluşturulmuş diyabetteki etkilerinin yanında alloksan ile oluşturulmuş diyabette de etkin olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Matsushita ve arkadaşları¹⁴ alloxan ile diyabet oluşturulmuş ratlarda probukolün koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar 2 hafta %1 probukol içeren diyetle besledikleri ratlarda 50mg/kg, i.v. alloksan uygulayarak diyabet oluşturmuşlardır. Bir grupta da normal diyet uygulayıp aynı oranda alloxan ile diyabet oluşturmuşlardır. Normal diyetle beslenenlerin kan glukoz düzeyleri diğer gruba göre belirgin oranda yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar histolojik incelemelerinde de normal diyetle beslenen sıçanların Langerhans adacık hücrelerinin degranüle olduğunu, probukollü diyetle beslenenlerde ise adacık hücrelerinin çoğunun granül içeriklerinin kontrol grubuna benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak alloksan ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda probukol tedavisinin diyabetojenik etkileri azalttığı ancak yok etmediği, azaltıcı etkisinin ise kuvvetli antioksidan özelliğinden kaynaklandığı vurgulanmıştır.

Bu çalışmada STZ ile oluşturulmuş 8 haftalık diyabeti takiben 3 hafta probukollü diyetle beslenen grupta B hücrelerinin granül sayısının kontrole yakın olduğu ancak bir kısmının içeriklerinin az yoğun olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu salgı granüllerinin yeni şekillenmiş olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Çoğu hücrede aktif salgılamamanın bir göstergesi olarak, granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında aşırı dilatasyon ve içlerindeki az yoğun madde birikimi izlenmiştir. Golgi kompleksinde vakuoler görünüm, mitokondriyonlarda da şişkinlik ve kristolizis saptanmıştır.

Sonuç olarak STZ ile oluşturulan diyabetin neden olduğu dejeneratif değişikliklere probukol tedavisinin etkisinin ince yapı düzeyinde incelendiği bu çalışmada diyabetin B hücrelerinde, özellikle granül düzeyinde oluşturduğu dejeneratif değişikliklerin

probukol ile azaldığı ancak tamamen yok olmadığı belirlenmiştir. Organeller değerlendirildiğinde ise probukol tedavisinin yeterli iyileştirici etkisinin olmadığı, başka ajanlarla desteklenmeye gereksinim olduğu saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Hand AR, Weiss RE: Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest* 1984; 51: 429-40.
2. Burkart V, Kolb H: Protection of islet cells from inflammatory cell death in vitro. *Clin Exp Immunol* 1993; 93: 273-8.
3. Anderson LC: Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on the rat parotid gland. *Am J Physiol* 1983; 245: 431-7.
4. De K, Roy K, Saha A: Evaluation of alpha-tocopherol, probucol and ascorbic acid as suppressor of digoxin induced lipid peroxidation. *Acta Pol Pharm* 2001; 58: 391-400.
5. Heineke EW, Johnson MB, Dilbergen JE: Antioxidant MDL29,311 prevents diabetes in nonobese diabetic and multiple low-dose STZ-injected mice. *Diabetes* 1993; 42: 1721-30.
6. Kinoshita M: Anti-hyperlipidemic agents. *Nippon Rinsho* 2002; 60: 974-86.
7. Korchin VI, Lankin VZ, Iarkova RD: Antioxidant probucol prevents development of alloxan diabetes and decrease of antioxidant enzyme activity in rat tissues. *Biull Eksp Biol Med* 1992; 114: 279-82.
8. Cahill GF, Jr McDevitt HO: Insulin-dependent diabetes mellitus: The initial lesion. *N Engl J Med* 1981; 304: 1454-64.
9. Peschke E, Ebel H, Bromme HJ: "Classical" and "New" diabetogens-comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 158-64.
10. Aughstee AA: An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice. *J Elect Micros* 2000; 49: 681-90.
11. Guz Y, Nasir I, Teitelman G: Regeneration of pancreatic beta cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinol* 2001; 142: 4956-68.
12. Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y: Probucol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 57: 1-10.
13. Yoshino G, Matsushita M, Maeda E: Effect of probucol on recovery from streptozotocin diabetes in rats. *Horm Metab Res* 1992; 24: 306-9.
14. Matsushita M, Yoshino G, Iwai M: Protective effect of probucol on alloxan diabetes in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1989; 7: 313-6.