

Ekzojen Adacık Amiloid Polipeptid Enjeksiyonunun Diyabetli Olmayan, Streptozotosin ile Tetiklenmiş Diyabeti Olan ve Adacık Nakli Yapılan Sıçanlarda İnterlökin-1Beta ve Glisemi Düzeyleri Üzerine Etkinliğinin Değerlendirilmesi

An Evaluation of Exogen Islet Amyloid Polypeptide Injection Efficacy on Interleukin-1Beta and Glycemia in Nondiabetics, Streptozotocin-Induced Diabetics and Rats with Islet Transplantation

Pınar Kasapoğlu,¹ Aslı Özdemir,¹ Ayşe Kurşun Ökten,¹ Umut Can Küçüksezer,¹
Ali Osman Gürol,¹ Günnur Deniz,¹ M. Temel Yılmaz²

¹Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İletişim adresi:

Dr. Pınar Kasapoğlu
Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, 34093 Çapa, İstanbul, Türkiye
Tel: +90 505 - 617 44 27

e-posta: proxy75@hotmail.com

©2013 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2013.110

Geliş tarihi: 19 Aralık 2011
Kabul tarihi: 13 Haziran 2012

Amaç: Bu çalışmada sağlıklı, diyabetli, nakil yapılan ve amilin enjeksiyonlu sıçanlarda interlökin 1beta (IL-1β) ve glisemi düzeylerine ekzojen amilin enjeksiyonunun etkisi araştırıldı.

Gereç ve yöntemler: Hayvanlar, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan tedarik edildi. Her biri 200-280 g olan 4-6 aylık 24 eşsoylu Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Nakil yapılmayan gruplar 12 erkek-12 dişi, nakil yapılan gruplar ise toplam 24 erkek alıcı-72 dişi verici hayvandan oluşturuldu. Her bir alıcı hayvan için üç donörden adacık izole edildi. Hayvanlar öncelikle nakil yapılan (TX) ve nakil yapılmayan olarak iki ana gruba ayrıldı. Bunlar da kendi arasında diyabetli (STZ) ve diyabetli olmayan, ayrıca amilin enjeksiyonlu (A) ve amilin enjeksiyonsuz olarak gruplandırıldı. Sağlıklı kontrol (C), sağlıklı + amilin (A), STZ diyabetik (STZ), STZ diyabetik + amilin (STZ A), nakil yapılan (TX), nakil yapılan + amilin (TX A), STZ diyabetik + nakil yapılan (STZ TX) ve STZ diyabetik + nakil yapılan ve amilin (STZ TX A) olmak üzere toplam sekiz grup oluşturuldu. Planlanan gruplara göre [STZ enjeksiyonundan (Sigma Aldrich 55 mg/kg) 4-5 gün sonra, nakli (700±100 adacık) takiben (0. gün) ve amilin enjeksiyonundan (Bachem 30 µg/kg) iki saat sonra] üç günlük kan alımı ve glikoz ölçüm takibi yapıldı. İnterlökin-1β ölçümü serumdan lüminex yöntemiyle, adacık nakli ise genel anestezi altında laparotomik cerrahi ile vena portadan karaciğere yapıldı.

Bulgular: Kontrol grubuna göre; TX A, STZ A, STZ TX A gruplarının (p<0.01, p<0.05, p<0.05), TX grubuna göre, TX A grubunun (p<0.001) ve STZ grubuna göre, STZ TX A grubu 1. gün IL-1β değerleri anlamlı düzeyde arttı (p<0.05). Glisemi düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, A ve TX A gruplarında azaldı (p<0.01, p<0.001). TX A grubu da, A grubuna göre daha düşük 1. gün glikoz düzeylerine sahip idi (p<0.05) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Sonuç: Nakil sonrası özellikle TX A grubunda görülen IL-1β artışı, amilin birikiminin olası zararlı etkilerini göstermektedir. Ancak, eş zamanlı glikoz düşüşü amilin ve reddedilmeyen adacıkların glikoregülatör rolüne bağlı olabilir. Amilin mekanizmasının daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Amilin; sitokin; diyabet; adacık; sıçan; transplantasyon.

Objectives: This study aims to investigate the effect of exogen amylin injection on interleukin-1beta (IL-1β) and glycemia levels in healthy, diabetic, with transplantation and with amylin injection rats.

Materials and methods: Subjects were obtained from Istanbul University, Institute of Experimental Medical Research, Department of Laboratory Animal Biology and Biomedical Application Techniques. Twenty-four inbred Wistar albino rats weighing between 200-280 g and at 4-6 month of age were utilized. Non-transplantation groups were composed of 12 males-12 females, while transplantation groups were composed of 24 male recipients-72 female donors. Islets were isolated from three donors for each recipient animal. The subjects firstly divided into two main groups, including those with transplantation and non-transplantation. Then they were divided into diabetic (STZ) or non-diabetic and/or with amylin injection (A) or non-amylin injection groups. A total of eight groups were generated including healthy control (C), healthy + amylin (A), STZ diabetic (STZ), STZ diabetic + amylin (STZ A), transplantation (TX), transplantation + amylin (TX A), STZ diabetic + transplantation (STZ TX) and STZ diabetic + transplantation and amylin (STZ TX A). Blood collection and glucose measurement were done for three days in all groups [four to five days after STZ injection (Sigma Aldrich 55 mg/kg), subsequent to transplantation (700±100 islet) and two hours after amylin injection (Bachem 30 µg/kg)]. Interleukin-1β measurement was performed in serum with Luminex method, whereas islet transplantation was carried out via vena porta to liver with laparotomy surgery under general anesthesia.

Results: Interleukin-1β level was significantly increased on the first day in TX A, STZ A and STZ TX A groups compared to controls (p<0.01, p<0.05, p<0.05), in TX A compared to TX group (p<0.001) and in STZ TX A group compared to STZ group (p<0.05). Glucose levels were decreased in group A and TX A groups compared to controls (p<0.01, p<0.001). TX A first day glucose levels were lower compared to A group (p<0.05) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Conclusion: The increase of IL-1β after transplantation observed particularly in TX A group may indicate the hazardous effect of amylin accumulation. However, concomitant decrease of glucose may be due to glycoregulatory role of amylin and nonrejected islets. The mechanism of amylin must be further investigated.

Key words: Amylin; cytokine; diabetes; islet; rat; transplantation.

Diabetes mellitus, pankreas beta (β) hücrelerinin harabiyeti ve insülin direncine yol açan çeşitli patogenetik mekanizmaların rol oynaması nedeni ile; İnsülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluktan kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize kronik ilerleyici bir metabolik hastalıktır. Amilin [adacık amiloid polipeptid (IAPP)], kalsitonin geni ile ilgili peptid [calcitonin-gene related peptide (CGRP)] süper ailesinin, 37 aminoasitlik polipeptittir.^[1] Beta hücrelerindeki insülin salgı granüllerinde, beslenmeye yanıt olarak insülin ile birlikte üretilip beraberce salınır.^[2] Transgenik farelerde yapılan bir çalışma ile beslenmede artmış yağ alınımının adacık beta hücrelerinde amilin sekresyonuna bağlı olarak amiloid adlı maddelerin birikimine neden olabileceği, böylece insülin sentez ve salgılanmasını bozarak diyabete yol açabileceği belirtilmiştir.^[3] Diyabetli hastalarda da amiloid, hücre dışında beta hücrelerine bitişik olarak birikmeye başlayarak, hücre için gerekli besin maddelerinin plazmadan beta hücrelerine girişini engellemektedir.^[3,4] İmmünohistokimyasal boyama ve *in situ* hibridizasyon teknikleri kullanılarak diyabetiklerin çoğunun, diyabetik olmayan kontrollerin ise %40'ının pankreatik dokularında amiloid artıkları gösterilmiştir. Bu veriler, hiperglisemi varlığında, beta hücresi içinde amilin konsantrasyonu artışını ve amiloid olarak birikme olasılığını sergilemektedir.^[4,5] Tip 1 diyabette [insüline bağımlı diabetes mellitus, insulin dependent diabetes mellitus (IDDM)] beta hücrelerinin tamamı veya tamamına yakını harabiyete uğradığından amilin sentezi de gerçekleşmemektedir. Nakledilen insan adacıklarında hızlı bir şekilde geliştiği görülen amiloid birikintilerinin, başarısız olmuş nakillerin bilinmeyen bir iştirakçisi olması ihtimali şaşırtıcı bir şekilde artmaktadır. Amilin birikintileri ve amiloid oluşumunun inhibitörleri böylece sadece diyabet için değil, adacık nakillerinde de terapötik özelliğe sahip olabilir.^[6]

Ekzojen insülin enjeksiyonu, total pankreas nakli ve pankreatik adacık nakli tip 1 diyabet tedavisi için başvurulan tedavi yaklaşımlarıdır. Pankreatik adacık nakli, bölgesel anestezide cildi yöntemlerle uygulanabilmesi, immünolojik yönlendirmelere açık olması gibi nedenlere dayanılarak yeni bir tedavi yaklaşımı çerçevesinde tüm dünyada yaygınlaşmaktadır.^[7] Bir alıcıya adacık nakli yapıldığı takdirde dolaylı olarak amilin sentezi de sağlanacağından, redde önemli rolleri olduğu bilinen sitokin düzeylerine olası etkisi araştırılması gereken bir konudur. Bu nedenle, çalışmamızda amilin enjeksiyonu uygulanan ve nakil yapılan gruplar oluşturularak, interlökin (IL)-1 β ve glikoz düzeylerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney hayvanları

Çalışmada kullanılan 120 adet Wistar albino türü sıçan, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tip Araştırma

Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan tedarik edildi gerekli koşullar altında Helsinki Deklarasyonuna uygun şekilde muhafaza ve muamele edildi. Nakil yapılmayan gruplarda 200-300 gram ağırlığında 12 erkek ve 12 dişi olmak üzere toplam 24 sıçan kullanıldı. Nakil yapılan gruplarda ise toplam 24 erkek alıcı sıçan kullanıldı. Verici olarak 72 dişi sıçan seçildi ve her bir alıcı için üç vericiden adacık izole edildi. Nakil yapılan ve nakil yapılmayan gruplar da kendi içlerinde herbirinde altı sıçan olacak şekilde dörder altgruba ayrıldı. Hayvanların gruplandırılması Tablo 1'de verilmiştir.

Deneysel diyabetin oluşturulması

55 mg/kg olacak şekilde tartılan streptozotocin (S-0130 Sigma-Aldrich, Almanya) serum fizyolojik ile sulandırılarak karın içine enjekte edildi. Üç-dört gün sonra kan şeker düzeyleri 200 mg/dl üzerinde olan sıçanlar deney için seçildi.

Amilin uygulaması

500 μ g sıçan amilini (H-9475, Bachem AG, İsviçre) %0.9 NaCl (1 ml/kg) içerisinde çözülerek solüsyon hazırlandı ve 30 μ g/kg olacak şekilde subkutan olarak uygulandı. Nakil yapılan gruplarda amilin enjeksiyonu yapıldıktan iki saat sonra adacık nakli gerçekleştirildi. Nakilden iki saat sonra kan örnekleri toplandı (0. gün). Sıçanlara nakil sonrası +1. ve +2. günde enjeksiyon yapıp iki saat sonra yeniden kan örnekleri alındı ve glikoz takibi yapıldı. Aynı işlemler diğer deney gruplarına da uyarlandı.

Langerhans adacık izolasyonu

Anestezisi uygulanan sıçan sırtüstü yatırılarak karın içi açıldı, koledok kanalı görünür hale getirildi. Duodenuma girdiği noktada akış engellendi, koledoka ince bir kesi atıldıktan sonra kanül yardımıyla 10 mL Hank's solüsyonu verilerek pankreas şişirildi. Çevre organlardan ayrılan pankreas petri kabına alınarak temizlendi, derin

TABLO 1

Hayvanların gruplandırılması

| | Sayı |
|--|------|
| Nakil yapılan gruplar | |
| Amilin uygulanmayan diyabetik olmayanlar (TX) | 6 |
| Amilin uygulanan diyabetik olmayanlar (A+TX) | 6 |
| Amilin uygulanmayan diyabetikler (STZ+TX) | 6 |
| Amilin uygulanan diyabetikler (A+STZ+TX) | 6 |
| Nakil yapılmayan gruplar | |
| Amilin uygulanmayan diyabetik olmayanlar (kontrol) | 6 |
| Amilin uygulanan diyabetik olmayanlar (A) | 6 |
| Amilin uygulanmayan diyabetikler (STZ) | 6 |
| Amilin uygulanan diyabetikler (A+STZ) | 6 |

bir beher içerisinde mekanik olarak küçük parçalara ayrıldı, parçalar cam tüpe alındı ve doku çöktükten sonra Hank's solüsyonu pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Enzimatik parçalama için pankreas başına 4 mg kolla-jenaz p (11213857001, Roche Applied Science, Almanya) eklenerek 37 °C'de %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Tüp, homojenizasyon için 1-2 kez su içerisinde çalkalandı. Solüsyon kuru buz üzerindeki behere alınarak soğuk Hank's solüsyonu ilavesi ile birkaç kez yıkanarak enzimatik sindirim durduruldu. Mikroskop altında elle toplama yöntemi ile adacıklar toplandı.

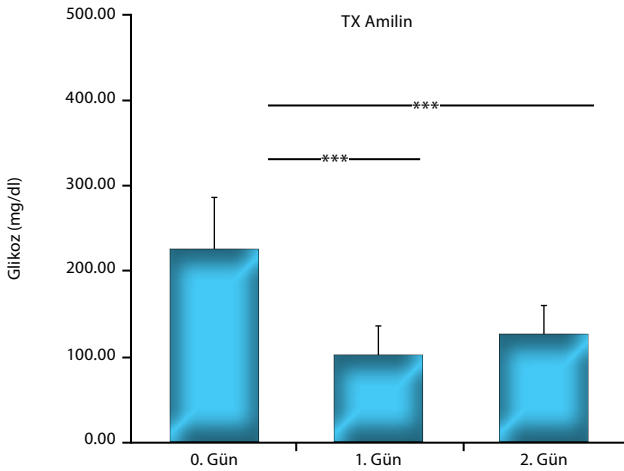
Floresan diasetat (FDA) - propidyum iyodid (PI) ve Dithizon (DTZ) boyama

Adacıklar için kullanılmak üzere 420 µl PI (P-4170-10 Sigma Aldrich, ABD), 280 µl FDA (F1303, Life Technologies, ABD) ve 9.3 ml Hank's karışımı hazırlandı. Bu karışımdan yaklaşık 50-60 adacık için 1.5 ml kullanılarak canlılık tayini için boyama yapıldı.

25 mg DTZ (108K1283, Sigma Aldrich, ABD) tartıldı 2.5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) (D-5879-100ML Sigma Aldrich, ABD) içerisinde eritildi ve Hank's ile 25 ml'ye tamamlandı. Filtre takılmış enjektör ile adacıklar üzerine 5-6 damla DTZ damlatıldıktan kısa bir süre sonra mikroskop altında değerlendirildi. Böylece izole edilen dokunun gerçekten Langerhans adacığı olup olmadığı belirlendi.

Adacık nakli

İntraportal adacık nakli için ketamin (Pfizer-Ketalar, Türkiye. Katalog no: 002099) -ksilazin



Şekil 1. Amilin enjeksiyonlu nakil (TX A) grubunun günlere bağlı glikoz düzeyleri. Alıcı sıçanlara 30 µg/kg olacak şekilde subkutan amilin enjeksiyon yapıldı. İki saat sonra 550±100 adacık transplante edildi (allograft) ve takip eden 2. saat sonunda (0. gün) kan örneği alınıp glikoz ölçümü yapıldı. Tekrar nakil yapılmaksızın, +1. ve +2. günde aynı işlemler tekrarlandı (n=6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

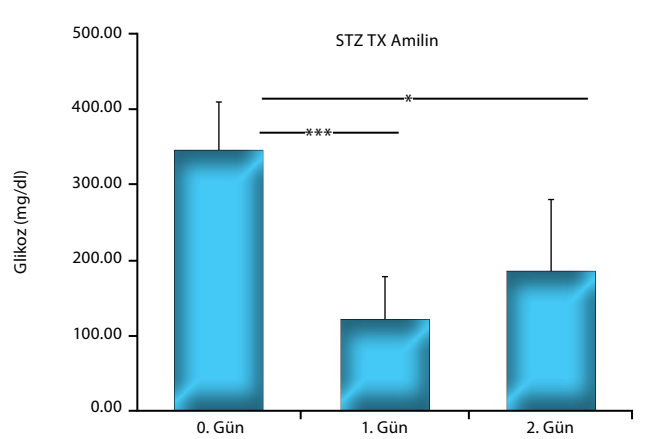
(Bayer-Rompun, ABD. Katalog no: B266), anestezisi altında tutulan hayvanın periton boşluğu laparatomik cerrahi ile açılarak portal ven görüntüledi ve önceden toplanmış 500-1000 µl Hank's solüsyonu içinde bulunan adacıklar, 24 G (gauge) kelebek kateterle 2 ml'lik enjektör kullanılarak portal vene enjekte edildi. Kanama iyice duruncaya kadar kanülasyon noktasına baskı uygulandı. İşlem süresince bağırsak sürekli Hank's solüsyonu veya serum fizyolojik ile nemli tutuldu. Kanama durdurulduktan sonra organlar dikkatlice yerleştirilip kaslı ve tüylü doku sırası ile dikildi.

Sitokin analizi

Toplanan örnekler Luminex yöntemi ile değerlendirildi. Sitokin analizi için (K.N.RCYTO-80K, Millipore Rat Cytokine/Chemokine Panel, ABD) 200 µl tampon kuyucuklara pipetlendi ve oda ısısında 10 dakika çalkalandı sonra tampon uzaklaştırıldı. Kuyulara 25'şer µl standart, tampon, örnekler, matriks solüsyonu ve boncuklar eklendi ve bir gece boyunca 4 °C'de çalkalandı. İki kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı, 25 µl antikor eklendi ve iki saat oda ısısında inkübe edildi. 25 µl streptavidin-fiko-eritrin eklendi ve 30 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edildi. Yıkama yapıldı, kuyulara 150 µl kaplama sıvısı eklendi ve hazırlanan plaklar cihazda okutularak değerlendirme yapıldı.

İstatistiksel analiz

Gruplar arası anlamlılığın değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc analiz için Bonferroni testi kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Student's t-testi kullanıldı ve (p<0.05) olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



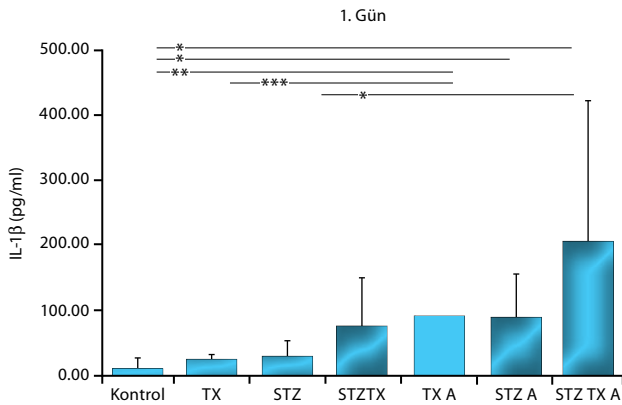
Şekil 2. Diyabetik amilin enjeksiyonlu nakil (STZ+TX+A) grubunun günlere bağlı glikoz düzeyleri. Streptozotosinle diyabetik yapılan (55 mg/kg) alıcı sıçanlara subkutan amilin enjeksiyonu (30 µg/kg) yapıldı. İki saat sonra 550±100 adacık transplante edilip (allograft) 0. gün kan örneği alındı ve glikoz ölçümü yapıldı. +1. ve +2. gün amilin enjeksiyonundan iki saat sonra glikoz ölçümü yapıldı (n=6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

BULGULAR

Amilin enjeksiyonlu nakil grubunun 1. ve 2. gün glikoz değerlerinde 0. güne göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 1). Diyabetik amilin enjeksiyonlu nakil grubunda 0. güne göre 1. gün ($p<0.001$), 1. güne göre 2. gün ($p<0.05$) glikoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 2).

Gruplar arası sitokin ve glikoz değerlendirilmesi

K grubuna göre; TX A, STZ A, STZ TX A gruplarının 1. gün IL-1 β değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.01$, $p<0.05$). TX grubuna göre, TX A grubu 1. gün IL-1 β değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). STZ grubuna göre, STZ TX A grubu 1. gün IL-1 β değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.05$) (Şekil 3). K grubuna göre; STZ, STZ TX, TX A, STZ A, STZ TX A gruplarının (sırası ile; $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.001$), TX grubuna göre; STZ, STZ TX, STZ A, STZ TX A gruplarının 0. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı (sırası ile; $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$). STZ grubuna göre; A, TX A, STZ TX A gruplarının (sırası ile; $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.05$), STZ TX grubuna göre; A, TX A gruplarının 0. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı (sırası ile; $p<0.01$, $p<0.05$). A grubuna göre; TX A, STZ A, STZ TX A gruplarının ($p<0.001$), TX A grubuna göre; STZ A, STZ TX A gruplarının 0. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$) (Şekil 4). K grubuna göre; STZ A, STZ gruplarının 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$), TX A, A gruplarının ise 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$, $p<0.01$). TX grubuna göre; STZ, STZ A gruplarının 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). STZ grubuna göre; STZ TX A, TX A, A, STZ TX gruplarının 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$). STZ TX grubuna göre; STZ

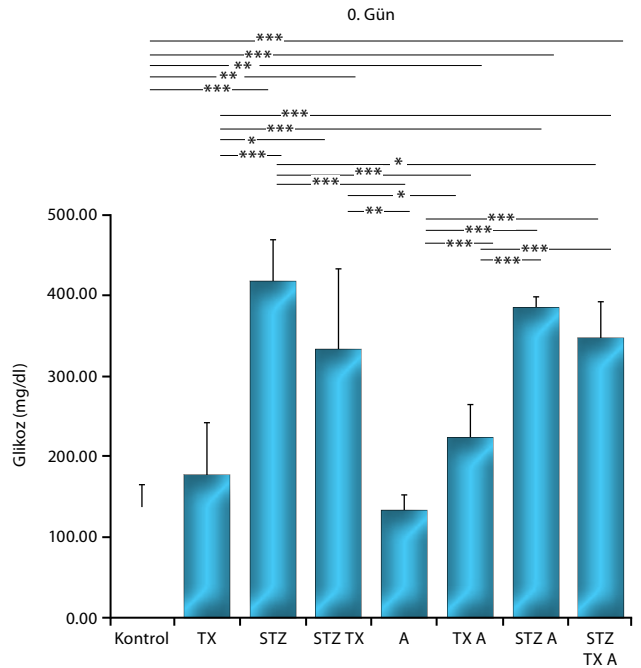


Şekil 3. Gruplar arası IL-1 β düzeylerinin 1. gün değerleri. Gerekliğinde sırasıyla; STZ enjeksiyonu, nakil ve amilin enjeksiyonu uygulanan gruplardan alınan kan örneklerinden serumlar elde edilerek LUMINEX yöntemi ile IL-1 β düzeyleri (pg/ml) ölçüldü ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

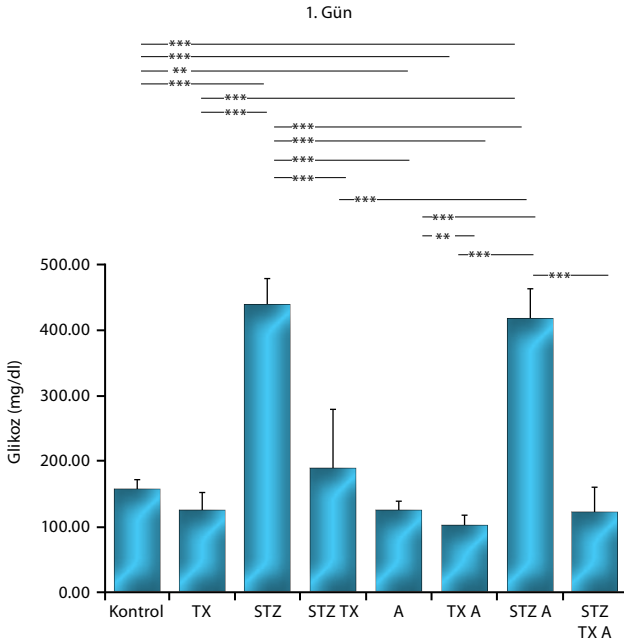
A grubunun 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). A grubuna göre; TX A grubunun 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.05$), STZ A grubunun ise arttı ($p<0.001$). TX A grubuna göre; STZ A grubunun 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). STZ A grubuna göre; STZ TX A grubunun 1. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$) (Şekil 5). K grubuna göre; STZ A, STZ TX, STZ gruplarının 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı (sırası ile; $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.001$), A ve TX A gruplarının glikoz değerleri ise azaldı (sırası ile; $p<0.05$, $p<0.01$). TX grubuna göre; STZ A, STZ TX, STZ gruplarının 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı (sırası ile; $p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.001$). STZ grubuna göre; STZ TX A, TX A, A gruplarının 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$). STZ TX grubuna göre; TX A, A gruplarının 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.05$). A grubuna göre; STZ A grubunun 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). TX A grubuna göre; STZ A grubunun 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede arttı ($p<0.001$). STZ A grubuna göre; STZ TX A grubunun 2. gün glikoz değerleri anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$) (Şekil 6).

TARTIŞMA

Amilin, beta hücrelerindeki insülin salgı granüllerinde, beslenmeye yanıt olarak insülinle birlikte üretilip salınmaktadır.^[2] Beta hücrelerinde amilin sekresyonu artışı ve hiperglisemiye bağlı olarak amiloid birikimi,



Şekil 4. Gruplar arası glikoz düzeylerinin 0. gün değerleri. Çalışmaya alınan tüm grupların ilk gün (0. gün) glikoz düzeyleri, kuyruk veni kanı kullanılarak ölçüldü. Veriler mg/dl üzerinden değerlendirildi ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.



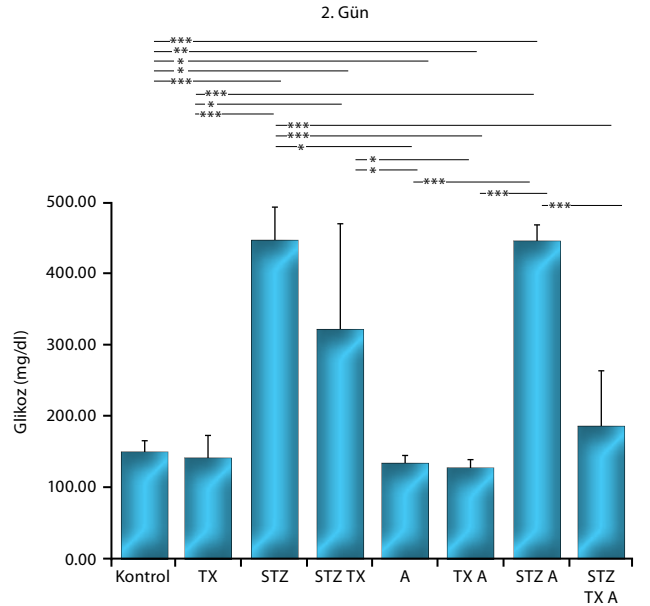
Şekil 5. Gruplar arası glikoz düzeylerinin 1. gün değerleri. Çalışmaya alınan tüm grupların ikinci gün (+1. gün) glikoz düzeyleri, kuyruk veni kanı kullanılarak ölçüldü. Veriler mg/dl üzerinden değerlendirildi (n=6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

insülin sentez ve salgılanmasını bozarak diyabete neden olabilmektedir.^[3,4]

Tip 1 diyabette beta hücreleri harabiyete uğradığından amilin sentezi de gerçekleşmemektedir. Pankreatik adacık nakli, tip 1 diyabet tedavisi için başvurulan tedavi yaklaşımlarındandır. Bir alıcıya adacık nakli yapıldığı takdirde, dolaylı olarak amilin sentezi de sağlanacağından, redde önemli rolleri olduğu bilinen sitokin düzeylerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda, amilin enjeksiyonlu nakil grubunun 0. ve 1. gün glikoz değerlerinin yanı sıra 0. ve 2. gün glikoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (p<0.001). Nakil esnasındaki cerrahi girişimin etkisiyle 0. gün glikoz artışı oluştu ve TX grubunda günler arasındaki glikoz düzeyleri arasında fark oluşmadı. Bu veriler sonucunda amilin enjeksiyonunun TX A grubunun 1. ve 2. gün glikoz düzeylerinde 0. güne kıyasla anlamlı bir azalma meydana getirdiği görüldü.

Diyabetik amilin enjeksiyonlu nakil grubunun 0. ve 1. gün arasında (p<0.001), 0. ve 2. günleri arasında (p<0.05) glikoz düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Diyabetik hayvanlarda yapılan nakil ve amilin enjeksiyonu ile 1. günde oluşan normoglisemi beklenen bir durumdur fakat bu anlamlılık düzeyinin 2. günde azalması nakledilen adacıkların reddedilmiş olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 6. Gruplar arası glikoz düzeylerinin 2. gün değerleri. Çalışmaya alınan tüm grupların üçüncü gün (+2. gün) glikoz düzeyleri, kuyruk veni kanı kullanılarak ölçüldü. Veriler mg/dl üzerinden değerlendirildi (n=6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Diyabetik ajan olan STZ'nin etki süresi kullanılan hayvana, uygulanan bölge ve doza bağımlı olarak değişmektedir.^[8] Bizim çalışmamızda diyabetik amilin enjeksiyonlu grubun 0. ve 2. günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.05). İkinci güne doğru oluşan bu artış hayvanların fizyolojik yapısına bağlı olarak, STZ etkisinin artarak devam ediyebileceğini gösterdi.

Kontrol grubu ile TX A (p<0.01), STZ A (p<0.05), STZ TX A (p<0.05) grupları arasında 1. gün IL-1 β düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Tüm çalışma grupları içerisinde sağlıklı olan kontrol gruplarına karşılık, amilin enjeksiyonlu grupların 1. gün IL-1 β düzeylerinde artış görüldü. IL-1 β 'nin otoimmün aktivasyonla veya doğrudan beta hücrelerine yönelik sitotoksik etkisi ile redde önemli rol aldığı gösterilmiştir.^[9] Sıçan amilini insanlarda olduğu gibi amiloidojenik değildir, insan amilini ise gen dizisindeki birkaç değişiklikten dolayı çeşitli mekanizmaların tetiklenmesi ile aşırı düzeyde amilin fibrilleri oluşturup diyabete neden olmaktadır.^[10] Nakil sonucunda nakledilen adacıklara karşı artan IL-1 β , nakille sağlanan doğal amilin sentezi ve ekzojen olarak verilen sıçan amilini etkisi ile ancak 1. günde oluşan artışın, TX A grubunun diğerlerine göre daha anlamlı bir fark oluşturmasını sağlamış olabilmekle beraber sıçan amilini aşırı birikiminin de zararlı olabileceğini göstermektedir.

Gruplar arası glikoz 0. gün düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol ve TX grubuna göre belirlenen

artışlar STZ ve nakil sırasındaki cerrahi girişimden kaynaklanmakta idi. Diğer tüm farklılıklar bu verilerin yanı sıra A grubunda oluşan glikoz düşüklükleri ile açıklanabilir. Gruplar arası glikoz 1. gün değerlerinde özellikle K ve A grupları ($p<0.01$), K ve TX A grupları ($p<0.001$), A ve TX A grupları ($p<0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. Bu azalma amilinin glikoz düzenleyici rolüne ve redde uğramayan adacıklara bağlıdır. Hayvan modellerinde, amilinin glikoz düzenleyici rolü olduğu açıktır. Amilin; ekzojen olarak yani yemeye bağlı glikozun dolaşıma giriş hızını, mide boşalmasını inhibe ederek yavaşlatır iken, endojen olarak yani karaciğerden kaynaklanan glikozun dolaşıma giriş hızını glukagon salınımını baskılayarak azaltmaktadır.^[11] İkinci gün glikoz değerlerinde görülen K ve A grupları arasındaki ($p<0.05$) anlamlı azalma amilinin glikoz düzenleyici rolüne bağlıdır.

Daha uzun süreli amilin enjeksiyonu ile kilo kontrolü, glikoz takibi, plazma amilin konsantrasyonu ve sitokin düzeyleri gibi parametrelerin değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

Amiloidojenik özellikteki insan amilini, özellikle tip 2 diyabet gelişiminde önemli bir faktördür. Bu çalışmada kullanılan sıçan amilini ise amiloidojenik özelliğe sahip değildir bu nedenle sağlıklı gruplarla amilin enjeksiyonlu gruplar arasında enflamatuvar belirteçler açısından büyük farklılıklar oluşmamaktadır. Transgenik insan adacık amiloid polipeptidi (human islet amyloid polypeptide; HIP) sıçanları, insan amilini kullanılarak gen transfer yöntemleri ile oluşturulan hayvanlardır. Transgenik modeller ilaç adaylarının etkilerinin, amiloidozisin geri çevrilmesi veya inhibisyonunu test etmek için oldukça önemlidir.^[12]

Sonuç olarak, transgenik (HIP) sıçanlarının kullanıldığı bir grup ya da sentetik amilin analogu (pramlintinid) kullanılan bir grup gibi karşılaştırma yapılabilecek gruplar oluşturularak yapılacak çalışmalarda elde edilecek verilerle bu çalışmada elde edilmiş verilerin karşılaştırılması bu çalışmada elde edilen verilerin güçlenmesini sağlayacaktır.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 1997;11:167-239.
2. Pittner RA, Albrandt K, Beaumont K, Gaeta LS, Koda JE, Moore CX, et al. Molecular physiology of amylin. *J Cell Biochem* 1994;55 Suppl:19-28.
3. Altuntaş Y. Tip 2 diabetes mellitus'un patogenezi. In: Yenigün M, Altuntaş Y, editörler. Her yönüyle diabetes mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s. 219-37.
4. Narita R, Toshimori H, Nakazato M, Kuribayashi T, Toshimori T, Kawabata K, et al. Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pancreatic islet amyloid deposition in diabetic and non-diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1992;15:3-14.
5. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:827-31.
6. Potter KJ, Scrocchi LA, Warnock GL, Ao Z, Younker MA, Rosenberg L, et al. Amyloid inhibitors enhance survival of cultured human islets. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:566-74. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.02.013.
7. Diyabet tedavisinde yeni yaklaşımlar. Available from: http://kogem.kocaeli.edu.tr/Diyabet_tedavisinde_yeni_yaklaşımlar.pdf [Erişim tarihi: 29.06.2010]
8. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46.
9. Aydemir DM. Preklinik ve klinik tip 1 diyabette interlökin 1 beta ve CD95'in otoimmün destruksiyondaki rolü. [Yüksek Lisans Tezi], İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı; İstanbul; 1998.
10. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr Rev* 2008;29:303-16. doi: 10.1210/er.2007-0037.
11. Phillips KL, Horowitz M. Amylin. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 2006;13:191-8.
12. Wookey PJ, Xuereb L, Tikellis C, Cooper ME. Amylin in the periphery. *ScientificWorldJournal* 2003;3:163-75.