

## Streptozotosinle Oluşturulan Diabetin Sıçan Periferik Sinirleri Üzerine Etkisinin: Elektron Mikroskopik İncelenmesi

Gülten KARABAY\*, Ragıba ZAĞYAPAN\*\*, Gülnur TAKE\*\*\*

\* Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\* Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Ankara.

\*\*\* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

### ÖZET

Bu çalışmada sıçanlarda streptozotosinle (STZ) oluşturulan diabetin akut etkisinin periferik sinir üzerinde oluşturduğu yapısal değişiklikler elektron mikroskop düzeyinde incelenmiştir. Çalışmada denekler, 24 erkek Wistar albino sıçan, kontrol grubu, Sham grubu, 15 ve 30 günlük diabet grubu olacak şekilde dört grup olarak ayrılmıştır. Kontrol grubuna hiçbir şey uygulanmazken, Sham grubuna STZ'nin çözündüğü sodyumsitrat, diabetik gruba ise sodyumsitrat içinde çözünmüş 45mg/kg STZ uygulanmıştır. Enjeksiyonu takiben 15 ve 30. günlerde sıçanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi ve siyatik sinirlerinin medial bölgeleri çıkarılarak rutin elektron mikroskop takibine alındı. Doku kesitleri incelendiğinde hem 15 hem de 30 günlük diabetik grupta perinöryum ile sinir lifleri arasında belirgin bir açıklık meydana gelmiş ve miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf dejenerasyonları 30 günlük grupta daha belirgin bulunmuştur. Buna karşın, Schwann hücreleri ve miyelinsiz sinir lifleri normal yapıda gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada sıçanlarda STZ ile oluşturulan diabet, n.ischiadicus'ta dejeneratif değişiklikler oluşturmuş ve bu değişiklikler 30 günlük grupta daha belirgin bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler: Streptozotosin. Diabet. Periferik sinir. Elektron mikroskop.**

### An Ultrastructural Study of Effects of Streptozotocin Induced Diabetes on Rats Peripheral Nerves

#### ABSTRACT

In this study, structural changes caused by acute effects of STZ induced diabetes on peripheral nerves were investigated with electron microscope. Twenty four male Wistar Albino rats were divided into 4 groups: control, sham, 15 days and 30 days diabetic groups. Nothing applied to control group; sodium citrate, as STZ solvent, to Sham group and 45 mg/kg STZ solved in sodium citrate to diabetic group. 15 and 30 days after injections, rats were sacrificed under high dose anesthesia, and sciatic nerves were extracted for electron microscopic examination. A evident gap between perineurium and nerve fibres were observed in both 15 and 30 days diabetic groups. And in 30 days group, myelin sheath degenerations were more obvious in myelinated nerve fibres. On the other hand, Schwann cells and unmyelinated nerve fibres appeared normal. Consequently, STZ induced diabetes were seen to cause degenerative changes in n. ischiadicus and those changes were more evident in 30 days diabetic group.

**Key Words: Streptozotocin. Diabetes. Peripheral nerves. Ultrastructure.**

İnsülin bağımlı diabetes mellitus (DM), nöropati gibi uzun süreli sekonder komplikasyonlara neden olan kronik metabolik bir hastalıktır. Diabetik nöropatinin nedeninin genellikle hiperglisemi ile birlikte olduğu

azalma bulunmuştur<sup>5,6,7,8,9</sup>. Sharma ve ark.<sup>10</sup> diabetik hayvanları kontrol ile kıyasladıklarında miyelinli lif boyutlarının artışının yavaş bir oranda olduğunu göstermiştir. Bunun diabetin metabolik etkilerinden sekonder bir zarar olduğu öne sürülmüştür<sup>11</sup>. Streptozotosinle diabet oluşturulmuş sıçanlarda periferik duyu siniri anormallikleri kantitatif olarak değerlendirilmiş ve miyelinli sinir liflerinin azalması ile birlikte aksonal atrofi gösterilmiştir<sup>12</sup>. STZ ile diabet oluşturularak yapılan çalışmalarda periferik sinire ait çok sayıda çalışma bulunmasına karşın ultrastrüktürüne ait sınırlı sayıda çalışma bulunmuştur. Bu nedenle bu çalışmada STZ ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda n.ischiadicusta oluşan değişiklikler elektron mikroskop düzeyinde incelenecektir.

Geliş Tarihi: 10.08.2006

Kabul Tarihi: 26.12.2006

Dr. Gülten KARABAY  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Bağlıca Kampusu Eskişehir yolu 20. km  
06530 Etimesgut/ ANKARA  
Tel: 0312 234 10 10 / 1573  
Fax: 0312 234 11 80  
e-mail: gkarabay@baskent.edu.tr  
gultenkarabay@yahoo.com

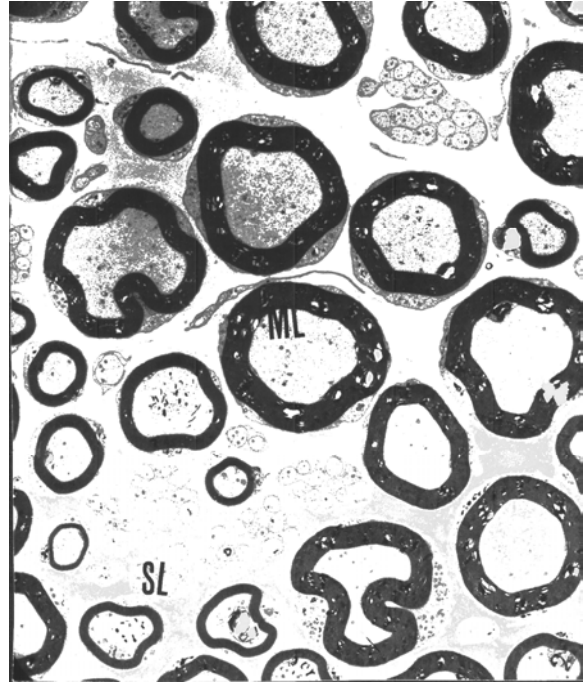
## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan Sprague Dawley sıçanlar Başkent Üniversitesi Labaratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden elde edildi. Üniversitemizin Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmada, ağırlıkları ortalama 200 gram olan 24 erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışma, 1.grup kontrol grubu (n=6), 2.grup Sham grubu (n=6) ve 3.grup STZ ile diabet oluşturulacak 15 günlük grup (n=6) ve 4.grup STZ ile diabet oluşturulacak 30 günlük grup (n=6) olacak şekilde dört grup olarak planlandı. Kontrol grubuna hiçbir şey uygulanmazken, Sham grubuna STZ'nin çözündüğü sodyumsitrat, diabetik gruba ise sodyumsitrat içinde (ph:4,5) çözünmüş 45mg/kg STZ, 35 mg/kg sodyum pentotal anestezi altında kuyruk venlerinden uygulandı. Enjeksiyon işlemi öncesi ve sonrasında tüm denekler serbest diyet ve su ile beslendi. Deneklerin bir ay süresince her hafta aynı saatte ağırlık ve kan şekerleri ölçüldü. Enjeksiyonu takiben 15 ve 30. günlerde sıçanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi. Siyatik sinirlerinin medial bölgeleri çıkarılarak %2,5'luk fosfat tamponlu gluteraldehitte tespit edildi. Daha sonra %1'lik osmium tetraoksitte postfiksasyon yapıldıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dokular propilen oksitten geçirildikten sonra Araldit CY212, DDSA (2-dodecenyl succinic anhydride), BDMA (benzyldimethyl amin) ve dibutilat karışımına gömülerek bloklandılar. Bloklardan alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak uygun alan seçildi. Alınan ince kesitler kurşun sitrat-uranil asetat ile boyandıktan sonra tek bir araştırmacı tarafından 906E TEM'da incelendi.

## Bulgular ve Sonuçlar

Bu çalışmada 15 ve 30 günlük diabetin periferik sinire etkisi elektron mikroskop düzeyinde incelendi. 15 günlük kontrol grubunda; perinöryum, endonöryum, miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri ve Schwann hücreleri normal yapıda izlendi. (Şekil 1-2) 15 günlük Sham grubu ise kontrol grubuna benzer bir görünümde izlendi.

15 günlük diabetik grupta bulunan deneklerde gözlenen değişiklikler şu şekildeydi; Perinöryum ile sinir lifleri arasında belirgin bir açıklık meydana gelmiş (Şekil 3) ve miyelinli sinir liflerinin miyelin kılıflarında dejenerasyonlar oluşmuştu. Buna karşın aksonların normal yapıda olduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda endonöryumda belirgin açılmalar bulunurken (Şekil 4). Schwann hücreleri ve miyelinsiz sinir lifleri normal yapıda gözlemlendi. Ayrıca endonöral kapillerlerde yapısal bir değişiklik saptanmadı.



Şekil 1:

15 Gün kontrol grubu; normal yapıda olan miyelinli (ML) ve miyelinsiz (SL) sinir lifleri X 2156.



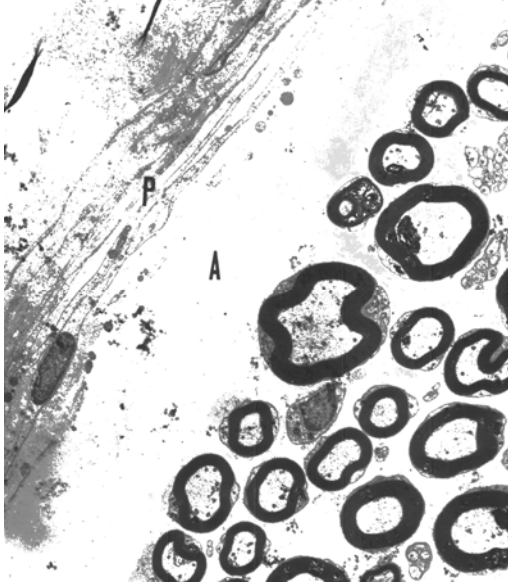
Şekil 2:

15 Gün kontrol grubu; normal yapıda perinöryumun (P) X 4646.

30 günlük kontrol grubu normal yapıda gözlenirken, Sham grubu benzer görünümde izlendi. 30 günlük diabet grubunda bulunan deneklerde, bazı alanlarda perinöryum ile sinir liflerinde belirgin bir açıklık meydana gelirken bazı alanlarda perinöryum, sinir liflerine yakın ancak son derece incelmış olarak gö-

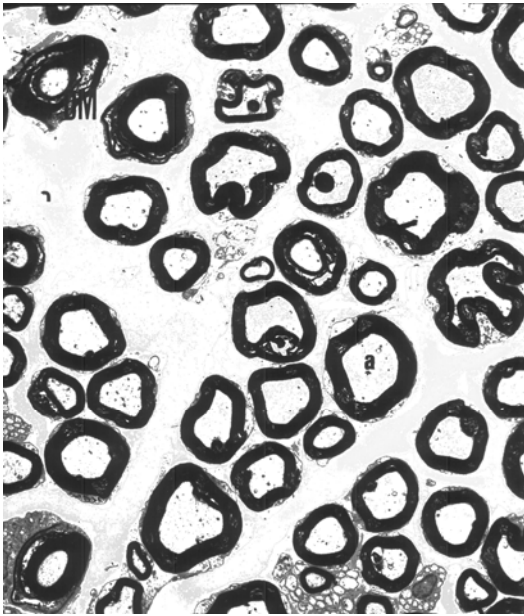
## Streptozotosinle Diabetin Sıçan Periferik Sinirleri Üzerine Etkisi

rüldü (Şekil 5-6). Miyelinli sinir tellerinde bulunan bazı aksonlarda çekilmeler olduğu dikkati çekerken (Şekil 7) miyelin kılıflarda oluşan dejenerasyonlar 15 günlük gruba göre daha belirgin bulundu. Miyelin kılıflar lif lif ayrılmış ve lifler arasında boşluklar oluşmuştu. Ayrıca miyelin kılıfın akson içine doğru parmak şeklinde çıkıntı oluşturması da belirgin dejenerasyon değişikliklerindendi (Şekil 8). Çalışmamızda bu grupta da endonöral kapillerlerde bir değişiklik saptanmadı.



Şekil 3:

15 Gün diabet grubu; perinöryum (P) ile sinir lifleri arasında büyük bir açıklık (A) bulunmakta X 2156.



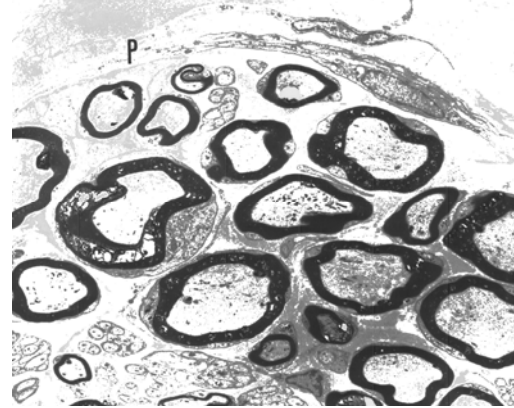
Şekil 4:

15 Gün diabet grubu; miyelinli sinir liflerinin miyelin kılıflarında bazı dejeneratif değişiklikler (DM) bulunmakla birlikte aksonlar (a) normal yapıda X 1293.



Şekil 5:

30 Gün diabet grubu; perinöryum (P) ile sinir lifleri arasındaki açıklık (A) 15 günlük gruptan daha fazla X 1670.



Şekil 6:

30 Gün diabet grubu; perinöryum (P) bazı alanlarda son derece incelmış ve lif lif ayrılmış durumda X 1670.



Şekil 7:

30 Gün diabet grubu; miyelinli sinir liflerinin miyelin kılıflarında birçok dejeneratif değişiklikler (DM) bulunmakla birlikte bazı aksonlarda da çekilmeler bulunmakta (ok) X 10000.



Şekil 8:

30 Gün diabet grubu; miyelin kılıfın akson içine parmak şeklinde oluşturduğu çıkıntı bu grubun belirgin dejenerasyonun (yıldız) değişikliklerinden X 4646.

## Tartışma

STZ ile diabet oluşturma sıçanlarda deneysel diabetik nöropati için kullanılan en yaygın modeldir ve sinir ileti hızının, ağrı eşiğinin ve kan akımının azalmasıyla karakterizedir. Bu işlevsel bozuklukların altında yapısal anormallikler olup olmadığı kesin değildir. Bu nedenle bu çalışmada STZ ile oluşturulan diabetin periferik sinire akut etkilerinin yapısal değişiklikleri incelenmiştir. STZ ile diabet oluşturulan maymunlarda<sup>13</sup>, Çin hamsterlerinde<sup>14</sup> db/db farelerde<sup>15</sup> ve STZ/alloksan-diabetik köpeklerde<sup>16</sup> belirgin işlevsel bozuklukların altında belirgin bir morfolojik bozukluk saptanmamıştır<sup>17</sup>. Ayrıca miyelinli lif yoğunluğunda da belirgin bir azalma görülmemiştir. Spontan diabetik köpeklerde<sup>18</sup> distalde miyelinli lif yoğunluğunda bir azalma görülmüş. db/db farelerde<sup>15</sup> ise akson çapında azalma saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da 30 günlük diabet grubunda bazı aksonlarda çekilmelerin olduğu gözlenmiştir.

Ağrılı nöropatilerde miyelinsiz liflerde anormalliklerin olduğu bildirilmiştir<sup>19,20,21</sup>. Buna karşın Schwann hücrelerinde ve miyelinsiz lif akson grupları arasındaki fark kontrole göre anlamlı bulunmamıştır<sup>27</sup>. Bizim çalışmamızda da Schwann hücrelerinde ve miyelinsiz sinir liflerinde değişiklik saptanmamıştır. STZ ile diabet oluşturulmuş Sprague Dawley cinsi sıçanlarda periferik sinirde diabete bağlı dejenerasyonların patofizyolojik ilişkisi araştırılmıştır. Fosfolipid sentezinde önemli role sahip, dolayısı ile

miyelin biyosentezinde gerekli olan lipoprotein lipaz varlığı akut dönem diabet ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında diabet sonrası 2. günde lipoprotein lipazın azaldığını 35 gün sonra da azalmanın devam ettiğini bildirmişlerdir. 35 gün sonunda 4 gün boyunca uygulanan insülinin lipoprotein lipazın oranını kontrole yakın değere ulaştırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak diabette oluşan miyelin kılıf kaybının lipoprotein lipaz düzeyindeki azalmayla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır<sup>22</sup>. Bizim çalışmamızda da miyelin kılıf dejenerasyonları 15 günlük diabetik grupta görülmüş ancak 30 günlük diabetli grupta daha belirginleşmiştir. Bu grupta miyelin kılıftaki ayrılmalar ve aksone doğru parmak şeklinde yapmış olduğu çıkıntılar dikkat çekici bulunmuştur.

Nöropatili diabetik hastaların endonöral kapillerinde bazal membran kalınlaşması, endotel hücre hipertrofisi, hiperplazisi ve perisit dejenerasyonu bildirilmiştir<sup>23</sup>. Bizim çalışmamızda 15 ve 30 günlük diabetik grupta endonöral kapiller kesitlerinde değişiklik görülmemiş ve bunun diabetik süresinin kısa olması ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Diabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda kapiller bazal membran alanında artış olmadığı öne sürülmüştür<sup>17</sup>. Bizim çalışmamızda da endonöral kapiller bazal membranında kalınlaşma saptanmamıştır. Yapılan birkaç çalışmada bu bulguların aksine kapillerin lümenal alanında belirgin artış ve endotel hücre boyutlarında azalma olduğu bildirilmiş ve bunun kan akımının artması ile orantılı olabileceği öne sürülmüştür. Alternatif olarak kan akımının azalmasına bağlı dilate bir endonöral vasküler yatağı ya da artmış arteriovenöz şanti da düşündürebileceği bildirilmiştir<sup>24,25</sup>. STZ diabetik sıçanlarda görülen azalmış sinir iletim hızı, sinir kan akımı ve değişmiş ağrı eşiği olarak adlandırılan üç yaygın fizyolojik anormallikler için yapısal bir temel olmadığı ayrıntılı morfolojik çalışmalarla gösterilmiştir<sup>26,27,28</sup>.

Sonuç olarak; bu çalışmada STZ ile diabet oluşturulan sıçanlarda diabetin akut etkisi sonucu siyatik sinirde birtakım yapısal değişiklikler saptanmıştır. Diabetin erken dönemlerinde görülen sinir işlev bozukluklarının intrinsik ve akson zarındaki fizyolojik anormalliklerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür<sup>29</sup>. Erken dönemde sinir akım hızında görülen anormallikler, daha proksimaldeki kan akımının nörahumoral kontrolündeki değişikliklerden kaynaklanan işlevsel değişimlere bağlı da olabileceği bildirilmiştir<sup>30</sup>.

## Kaynaklar

1. Mohseni S, Hildebrand C. Hypoglycaemic neuropathy in BB/W or rats treated with insulin implants: Electron microscopic observations. Acta neuropathol (Berl) 1998; 96:151-56.

## Streptozotosinle Diabetin Sıçan Periferik Sinirleri Üzerine Etkisi

- Baynes JW. Role of oxidative stres in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
- Nickander K.K, Schmelzer JD, Rohwer DA, Low P.A. Effect of alphatocopherol deficiency on induces of oxidative stres in normal and diabetic peripheral nerve. *J Neorol Sci.* 1994; 126: 6-14.
- Van dam PS, Bravenboer B, Van asbeck BS, Van oirschot JFLM, Marx JJM, Gispens WH. Effect of insulin treatment on endoneurial and systemic oxidative stres in relation to nerve conduction in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 1143-49.
- Sharma AK, Thomas PK, and DeMolina AF. Peripheral nerve fibre size in experimental diabetes. *Diabetes* 1977 ; 26: 689-92.
- Sharma AK, Thomas PK, Gabriel G, Stolinski C, Dockeri P, Hollins GV. Peripheral nerve abnormalities in the diabetic mutant mouse. *Diabetes* 1983; 32: 1152-61.
- Jakobsen J, Lundbeck K. Neuropathy in experimental diabetes. An animal model. *Br. Med J* 1976; 2: 278-79.
- Jakobsen J. Axonal dwindling in early experimental diabetes, I. A study of cross- sectioned nerves. *Diabetologia* 1976; 12: 539-46.
- Jakobsen J. Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin deficient diabetic rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat* 1979; 42: 509-18.
- Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fibre maturation and on body growth in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1981;53:257-65.
- Dockery P, Sharma AK. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci.* 1990;98: 327-45.
- Yagihashi S, Kamijo M, Watanabe K. Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. *Am J pathol* 1990; 136: 1365-73.
- Chopra JS, Sawhney BB, Chakravorty RN. Pathology and time relationship of peripheral nerve changes in experimental diabetes. *J Neurol Sci* 1977; 32: 53-67.
- Kennedy WR, Quick DC, Miyoshi T, Geritsen GC. Peripheral neurology of the diabetic Chinese hamster. *Diabetologia* 1982; 23: 445-52.
- Sharma AK, Thomas PK, Gabriel G, Stolinski C, Dockery P, Hollins GW. Peripheral nerve abnormalities in the diabetic mutant Mouse. *Diabetes*1983;32: 1152-61.
- Walker D, Malik RA, Anderson H, Gardiner TA., Boulton AJM. The effects of Sulindac on peripheral nerve morphology in the chemically induced diabetic dog. *Diabetologia* 1997; 40 (suppl.1): A550.
- Walker D, Carrington A, Canan C.A, Sawicki D, Sredy J, Boulton A.J.M. and Malik, R.A. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the preperal nerves of the streptozotocin diabetic rat. *J. Anat*, 1999;95: 419-27.
- Sharma AK, Malik RA, Dhar P, Mehra RD, Ahmed I, Lowrie CT. Peripheral nerve abnormalities in spontaneously diabetic dog.. *Int J Diabetes* 1995; 3: 130-39
- Britland ST, Young RJ, Sharma AK, Clarke BF. Association of painful and painless diabetic polyneuropathy with different patterns of nerve fibre degeneration and regeneration. *Diabetes* 1990; 39 :898-908.
- Llewelyn JG, Gilby SG, Thomas PK, King RHM, Muddle JR, Watkins PJ. Sural nerve morphometry in diabetic autonomic and painful sensory neuropathy. *Brain* 1990; 114: 867-92.
- Malik RA. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46: 50-3.
- Ferreira LD, Huey PU, Pulford BE, Ishii DN, Eckel RH. Sciatic nerve lipoprotein lipase is reduced in streptozotocin-induced diabetes and corrected by insulin. *Endocrinology* 2002; 143(4): 1213-7.
- Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 1995; 37: 498-504.
- Malik RA, Newrick PG, Sharma AK., Jennings A, Ah-see AK, Mayhew TM. Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia* 1989; 32: 92-102.
- Khara M, Zollman PJ, Smithson IL, Lagerlund TD, Low PA. Hypoxic effect of exogenous insulin on normal and diabetic peripheral nerve. *Am J Physiol* 1994; 266: 980-85.
- Sharma AK, Thomas PK. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J Neurol Sci* 1974; 23: 1-15.
- Brown MJ, Sumner AJ, Greene DA, Diamond SM., Asbury AK. Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Ann Neurol* 1980; 8: 168-78.
- Sugimura K, Windebank AJ, Natarajan V, Lambert EH, Schmid H, Dyck PJ. Interstitial hyperosmolarity may cause axon cylinder shrinkage in streptozotocin diabetic nerve. *J Neuropath and Exp Neur* 1980; 39: 710-21.
- Quasthoff S.: The role of axonal ion conductances in diabetic neuropathy: a review. *Muscle & Nerve* 1998; 21: 1246-55.
- Boulton AJM, Malik RA. Diabetic neuropathy. *Med Clin N Am* 1998; 82: 909-29.