

Diabetik Sıçanlarda İskemi-Reperfüzyon Hasarının Retinaya Etkisinin Histomorfometrik Analizi

Nazmi ZENGİN¹, Selçuk DUMAN², Mehmet OKKA³, Emin KURT³,
Murat AKTAN⁴, Sultan MERMER⁵

ÖZET

Diabetes mellitus'un komplikasyonlarının patogeneğinde iskemik olaylar büyük rol oynamaktadır. Bu çalışmada streptozotosinle diabet oluşturulmuş ratların retinasına iskemî-reperfüzyon hasarının etkileri histolojik ve histomorfometrik analizlerle araştırılmıştır. Sonuçlarımız diabetin normal tolerans süresinden daha kısa iskemide bile retinayı iskemî-reperfüzyon hasarına daha yatkın hale getirdiğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, iskemî-reperfüzyon hasarı, retina
SUMMARY

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY ON THE RETINA OF DIABETIC RATS

Ischemia plays an important role in the pathogenesis of complications of diabetes mellitus. In the present study, we investigated the effects of ischemia-reperfusion injury on streptozotocin-diabetic rat retina by histologic and histomorphometric analysis. Our results suggested that diabetic state made the retina more susceptible to ischemia-reperfusion injury even in ischemic periods shorter than the tolerance time of normal retina. *Ret-vit 1995; 3:165-9*

Key Words: Diabetes mellitus, ischemia-reperfusion injury, retina

Retinanın vazooklüsif ve vazoproliferatif hastalıklarında önemli rol oynayan iskemî hipoksi, besin yoksunluğu, metabolit birikimi ve toksik kimyasal maddelerin salınımı gibi bir çok faktörün rol aldığı karmaşık bir olaydır. Retinanın iskemîye tolerans süresi insanlar ve hayvanlarda (türe göre değişebilmekle birlikte) 90 dakika kadardır.¹ Bu süre aşılsa ödem, hücre ölümü ve apoptozis benzeri nekroz gelişir.^{2,3} İrreverzibl hasar oluşmadan reperfüzyon sağlanırsa retina fonksiyonları açısından son derece olumsuz olan bu olaylar engellenir. Son yıllarda reperfüzyonun bazen sadece reverzibl düzeyde hasarlanan ve kurtarılması mümkün olan retina hücrelerinde letal harabiyete yol açtığı anlaşılmıştır.²⁻⁶

Literatürde iskemî-reperfüzyon hasarı ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur.⁶⁻¹² Bu çalışmalarda genellikle normal deneklerin kullanıldığı dikkat çekmektedir. Çalışmamızda patogeneğinde iskemî olayların büyük rol alması nedeniyle diabet oluşturduğumuz sıçanların gözlerinde iskemî-reperfüzyon hasarının retina üzerindeki etkileri histolojik ve morfolojik analizlerle değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada her iki cinsten, 170-230 gr ağırlığında 20 adet Wistar albino sıçanın 40 gözü kullanıldı. Rastgele seçimle 2 kontrol (nk1=10, sağlıklı göz), (nk2= 10, diabetli göz), ve 2 deney grubu (n1= 10, 30/10 iskemî-reperfüzyon uygulanan göz), (n2= 10, 30/45 iskemî reperfüzyon uygulanan göz) oluşturuldu. Deney gruplarındaki (n1,n2) sıçanlara eter anestesizi altında kuyruk veninden 75 mg/kg streptozotosin verilerek diabet oluşturuldu. 45 gün sonra glukoz oksidaz metodu ile kan şek-

Geliş:10.11.1994

Kabul:24.2.1995

Yazışma:Nazmi Zengin Selçuk ÜTFGöz HastABDKonya

1 Yrd Doç Dr. Selçuk ÜTF Göz Hast ABD

2 Doç Dr. Selçuk ÜTF Histoloji-Embriyoloji ABD

3 Uz Dr Selçuk ÜTF Göz Hast ABD

4 DrDoktora Öğr. SelçukÜTFHist-Embriyoloji ABD

5 Dr. Selçuk ÜTF Histoloji-Embriyoloji ABD

Tablo

Kontrol ve deney gruplarında histomorfometrik ölçüm sonuçları (miliµ+standart sapma)

	Normal	Diabetik	30/10 isk/rep	30/45 isk/rep
Total	144.6±12.9	241.4±8.35	347.1±19.2	381±10.9
Dış granüler	31.34±5.16	59.54±6.05	73.8±10.1	112.6±36.8
Dış pleksiform	6.75±1.35	13.68±1.76	12.85±0.72	25.6±13.7
İç granüler	14.92±1.97	26.86±2.08	42.3±15.1	112±13.7
İç pleksiform	43.28±1.36	47.25±3.93	65.5±13.7	104.1±30.5

kerleri 400 mg/ml ve üzerinde tespit edilen diabetli sıçanlarda (170-230 gr) intraperitoneal ketamin hidroklorür (40-80 mg/kg) ile anestezi sağlandı. Pupiller %1 atropinle dilate edildikten sonra Stefanson ve ark.⁷ nın tanımladığı şekilde santral retina arteri, silier arterler ve retrobulber bağ dokusu 3/0 ipek sütür kullanılarak 30 dakika süre ile ligatüre edildi. Daha sonra ligatür çözülerek n1 grubunda 10 dk, n2 grubunda ise 45 dk süreyle reperfüzyon sağlandı. Sıçanlar dekapite edildikten hemen sonra her iki göze enükleasyon uygulandı.

Postportem gözler %10 formolinde tespit edilerek rutin alkol serilerinden geçirildi. İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında oluşan değişikliklerin retinanın farklı yerlerinde farklı şekilde olabileceğini 13 göz önüne alarak tüm gözlerde optik sinir fovea arasındaki bölgeden elde edilen parçalardan 5 mikron kalınlığında parafin kesitler alındı ve hematoksilin eozin ile boyandı. Işık mikroskopu ile klasik histolojik değerlendirmelerin yanı sıra oküler mikrometre ile total retina çapı ve retinanın 4 tabakası (dış granüler, dış pleksiform, iç granüler, iç pleksiform tabakalar) mikron seviyesinde ölçüldü. Olympus PM-10AD foto ataşmanlı mikroskop ile preparatların mikrofotografaları çekildi.

Ölçüm sonuçları Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

a) Rutin histolojik değerlendirme

Işık mikroskopik değerlendirmelerde 30 dk iskemiye takiben 10 dk'lık reperfüzyon (n1 grubu) sonrasında retinanın dış granüler ve iç pleksiform tabakalarında başlayan değişikliklerin 45 dk'lık reperfüzyon (n2 grubu) sonrasında daha da arttığı belirlendi (Res 1-4). Bu değişiklikler n1 grubunda tabakaların kontü-

ründe bozulma ve ödem oluşması şeklindeydi. n2 deney grubunda ise en önemli bozukluk retinanın bazı bölümlerinde daha belirgin olmak üzere iç pleksiform ve iç granüler tabakanın diğer tabakalardan kopacak şekilde bir bütünlük oluşturması biçimindeydi. n2 grubunda retinanın bazı bölümleri ise diabetik kontrol grubundaki değişikliklere benzerlik gösteriyordu.

b) Morfometrik değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarına ait histomorfometrik ölçüm sonuçları Tablo'da gösterilmiştir.

1. Total retina kalınlığı

Normal ve diabetik gözlerde total retina kalınlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.02$). Aynı şekilde diabetik kontrol grubu ile n1 ve n2 grubu arasındaki ve n1 ile n2 grubu arasında da total retina kalınlığı açısından anlamlı farklar saptandı (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.01$ ve $p<0.01$).

2. Dış granüler tabaka kalınlığı

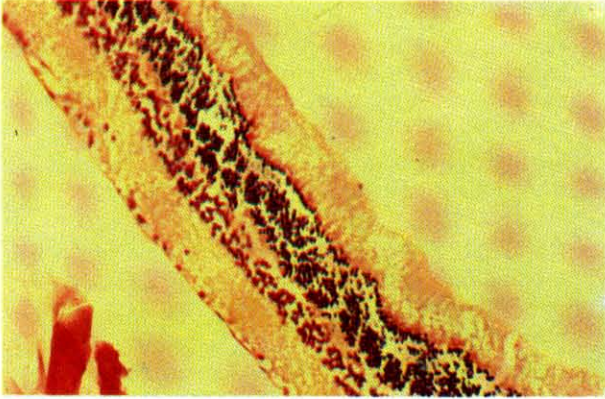
Bu parametre açısından yapılan değerlendirmede normal ve diabetik kontrol grupları ve diabetiklerle n1 grubu arasındaki farkın düzeyinde anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.01$ ve $p<0.03$).

3. Dış pleksiform tabaka kalınlığı

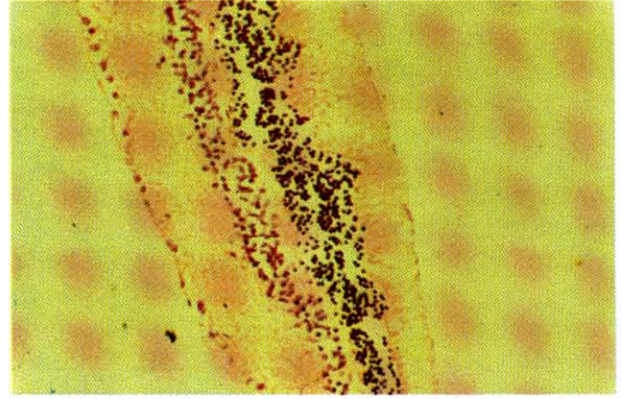
Bu tabaka üzerinde yapılan morfometrik analizler sonucu normal ve diabetli kontrol grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0.02$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi.

4. İç granüler tabaka kalınlığı

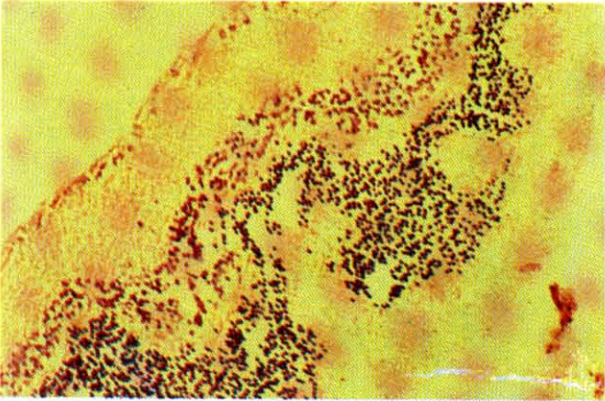
İç granüler tabaka ile ilgili değerlendirmelerde normal ve diabetik kontrol grupları arasında ($p<0.01$), diabetik grupla n1 deney grubu arasında ($p<0.04$), diabetik grupla n2 grubu arasında ($p<0.02$) ve n1 ile n2 grupları arasın-



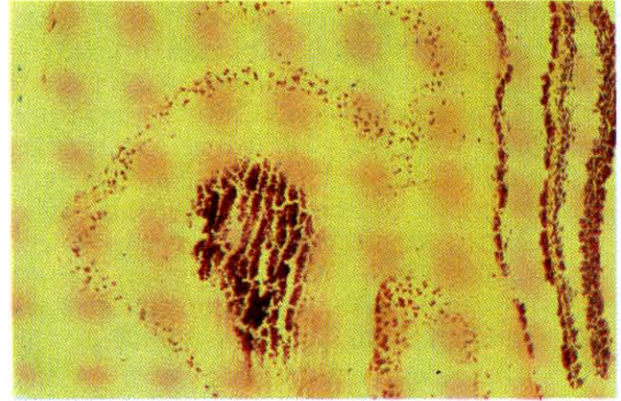
Resim 1: Kontrol grubunda retinanın histolojik görünümü (HE, FMBx100)



Resim 2: Diabetik grupta retinanın histolojik görünümü (HE, FMBx100)



Resim 3: 30 dak. iskemiyi izleyen 10 dak. reperfüzyondan sonra retinanın histolojik görünümü (HE, FMBx100)



Resim 4: 30 dakika iskemiden sonra 45 dak. reperfüzyonu takiben retinanın histolojik görünümü (HE, FMBx100)

da ($p < 0.03$) istatistiksel olarak farkların anlamlı düzeyde olduğu bulundu.

5. İç pleksiform kabaka kalınlığı

Burada yapılan morfometrik analizlerde ise sadece diabetik kontrol grubu ile n1 deney grubu arasında ve n1 ile n2 deney grupları arasında anlamlı fark olduğu ($p < 0.01$ ve $p < 0.05$), ancak diğer gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmadığı belirlendi.

TARTIŞMA

İskemi-reperfüzyon hasarının kalp, ince barsak gibi dokulardaki zararlı etkileri eskiden beri bilinmektedir.^{8,9} Yakın zamanlarda bu olayın retina üzerindeki etkileri de çeşitli yöntemlerle iskem-reperfüzyon oluşturularak incelenmeye başlanmıştır. Bu yöntemler arasında optik sinir ligasyonu, fototromboz,

sentrifügasyon, azotla asfiksasyon, fotokoagülasyonla damarların tıkanması, transvitreal diatermi ve göziçi basıncının yükseltilmesi sayılabilir.^{10,15} Bizim kullandığımız yöntem silier arterleri ve retrobulber bağ dokusunu da içine alan, güvenilirliği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmış, nispeten basit ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir.

Bulgularımız diabetik sıçanlarda 30 dakikalık kısa süreli iskeminin retinada ışık mikroskopik düzeyde saptanabilen histolojik değişikliklere yol açtığını ortaya koymaktadır. Daha önce normal deneklerin kullanıldığı çok sayıda deneysel çalışmada reperfüzyon süresi ne olursa olsun bu kadar kısa süreli iskeminin her hangi bir olumsuz etki yapmadığı bildirilmiştir.^{5,6,16,17} Çalışmamızda sağlıklı kontrollerde iskem-reperfüzyon oluşturulmadığı için sonuçların kontrollerle doğrudan karşılaştırıl-

ması imkanı yoktur ancak literatür verileriyle karşılaştırıldığında diabetik sıçanlarda çok kısa sürelerde bile iskemi-reperfüzyon hasarı olduğu görülmektedir. Bu durum diabetin retinayı iskemi-reperfüzyon hasarına daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Bununla birlikte çalışmamızda kullandığımız histopatoloji tekniklerinin sonuçlarımızı etkileyebileceğini belirtmeliyiz. İskemi-reperfüzyon konusunda yapılan birçok çalışmada^{5,6,18} parafin kesitler kullanılmış olmakla birlikte histomorfik çalışmalar için en uygun gömme biçiminin 1 mikronluk kesitlere dahi imkan verebilen plastik olduğu hatırdta tutulmalıdır.¹⁹

Diabetin retinaya etkisi konusunda geleneksel olarak mikrovasküler değişikliklerin rolü üzerinde durulmaktadır.²⁰ Bugün kontrast duyarlılık renkli görme testleri ve ERG gibi yöntemlerle damarsal değişikliklerin ortaya çıkmasından daha önce retina fonksiyonlarının bozulduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda diabet süresi 45 gündür. Primatlar için oldukça kısa olan bu süre ratlarda histopatolojik incelemelerle ortaya konabilecek mikrovasküler değişikliklerin ortaya çıkması için yeterli olmaktadır. Ancak nispeten kısa süreli diabette değişikliklerin daha çok periferik kısımda, uzun süreli diabette ise hem periferde hem de merkezde olduğu ortaya konmuştur.²¹ Çalışmamızda merkezi retinadan yapılan kesitler değerlendirildiği için retinayı iskemi-reperfüzyon hasarına duyarlı kılan temel olay mikrovasküler bozukluklardan ziyade Zhang ve ark.²²'nin belirttiği gibi hipergliseminin iske-miyi artırıcı etkisi olabilir. Son yıllarda bu etkinin serbest radikaller yoluyla olabileceği üzerinde durulmaktadır. Aynı aktif oksijen türevlerinin iskemi-reperfüzyon hasarında da rol oynadığı bilinmektedir.^{5,6,15,17,18} Ortak bir mekanizmanın etkili olabileceği bu iki durumun birlikte bulunması sonucu retinadaki hasarın daha fazla olması ve daha kısa sürede ortaya çıkması beklenir. Bulgularımız bu görüşü destekler niteliktedir. Ancak diabet gibi kronik olaylarda iskemi-reperfüzyon hasarının özelliklerini kesin bir açıklığa kavuşturabilmek için daha büyük denek grupları üzerinde çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Hayreh SS, Weingeist T: Experimental occlusion of the central retinal artery of the retina. IV. Retinal tolerance time to acute ischemia. *Br J Ophthalmol* 1980; 64: 818-25
2. Shakup M, Ashton N: Ultrastructural changes in focal retinal ischemia. II. *Br J Ophthalmol* 1966; 50: 325-54
3. Buchi ER: Cell death in rat retina after pressure-induced ischemia-reperfusion insult: Electron microscopic study. II. Outer nuclear layer. *Jpn J Ophthalmol* 1992; 36: 62-8
4. Bucci ER: Degeneration der Netzhaltzellen der Ratte bei druckdingtem Ischemic Reperfusion-Schaden: Eine electronmikroskopische studie. *Klin Monatsbl Augenheilk* 1992; 200: 494-7
5. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P: Ischemia and reperfusion induced histological changes in the rat retina. Demonstration of a free radical mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 1471-8
6. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P: Free radical mediated effect in reperfusion injury: A histological study with superoxide dismutase end EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* 1991; 23: 225-34
7. Stefanson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T: Experimental Ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 1050-4
8. Schlafer M, Kane PF, Wiggins VY, Kirsh MM: Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of the cardiac ischemic injury. *Circulation* 1982; 66 (Suppl 1): 85-92
9. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM: Ischemic Injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9-12
10. Turnbull W: The effect of experimental retinal anemia in rats. *Trans Can Ophthalmol Soc* 1948; 11: 116-34
11. Reinece RD, Kuwabara T, Cogan DG, Weiss DR: Retinal vascular patterns. V: Experimental ischemia of the cat eye. *Arch Ophthalmol* 1962; 47: 450-75
12. Smith GG, Baird CD: Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased ocular pressure. *Am J Ophthalmol* 1982; 45 (Suppl): 133-6
13. Marmor MF, Dalal R. Irregular retinal and RPE damage after pressure-induced ischemia in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2570-5

14. Mosinger JJ, Olney JW: Phototrombosis-induced ischemic neuronal degeneration in the cat retina. *Exp Neurol* 1989; 105-13
15. Stefanson E, Novack RI, Hatchell DJ: Vitrectomy prevents retinal hypoxia in branch retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:284-9
16. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P: Modification of ischemia-reperfusion-induced ion shifts (Na, K, Ca, mg) by free radical scavengers in the rat retina. *Ophthalmic Res* 1993; 25: 1-9
17. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M: Modification of reperfusion-induced ionic imbalance by free radical scavengers in spontaneously hypertensive rat retina. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 609-20
18. Faberowski N, Stefanson E, Davidson RC: Local hypertension protects retina from ischemia. A quantitative study in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 2309-13
19. Emanuele PV. Ocular histotechnology. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds. *AFIP Laboratory methods in histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology, 1992: 109-22
20. Marane CW, Matschinsky FM: Biochemical manifestations of diabetes mellitus in microscopic layers of cornea and retina. *Diabetes Met Rev* 1989; 5: 1-15
21. Schroder S, Palinski W, Schmid-Schonbein GW. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathology* 1991; 139: 81-100
22. Zhang H, Agardh I, Agardh CD: Hydrogen peroxide production in ischaemic retina: Influence of hyperglycemia and postischaemic oxygen tension. *Diabetes res* 1991; 16: 29-35