

Alloksan İle Oluşturulan Deneysel Diyabetin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Akut Etkilerinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Selen Bahçeci*, Naime Canoruç**, Yusuf Nergiz*, Sevda Söker*, Deniz Gökalp***, Mehmet Erdem Akbalık****, Yekbun Tutuş*

ÖZET

Diyabetik kardiyomiyopati diyabetin en önemli komplikasyonlarından biridir. Diyabetin kalp ve aorta üzerindeki akut dönem etkileri yeteri kadar bilinmemektedir. Biz bu çalışmamızda diyabetin kardiyovasküler sistem üzerindeki akut etkilerini ışık mikroskopik düzeyde incelenmesini amaçladık.

Çalışmamızda 20 adet Spraque-Dawley rat kullandık ve diyabet oluşturmak için 150 mg/kg alloksan intraperitoneal, kontrol grubuna ise 1ml SF, İP uyguladık. Yirmidört saat sonra sıçanların kuyruk veninden kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Kan glikoz düzeyleri 250 mg/dl'den fazla olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi ve 4 IU/d human insülinle tedavi edildiler. Yedi gün sonra ketamin anestezisi altında sakrifiye edildiler. Kalp ve aort dokusu % 10'luk nötral formalinde tesbit edildi. Kesitler parafine gömüldü, 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı, Hematoksilen-Eozin ve Heidenhein'in Azan modifikasyonu ile boyandı.

Kontrol grubunun kalp kası hücrelerinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Diabetik grupta; kalp kası hücrelerinde yer yer heterojen bir görünüm, bazı kalp kası hücrelerinde hidropik değişiklikler, perivasküler ve interstisyel alanda minimal düzeyde fibrozis izlendi. Kontrol grubunda aort normal histolojik yapıda izlendi.

Diyabetik grupta aortun tunika media tabakasında düz kas hücrelerinde belirgin anizostozis, düz kas hücre çekirdeklerinde bir azalma gözlemlendi. Diabetes Mellitus'un erken dönemlerinde kalp kası ve aort kas hücrelerinde minimal düzeyde de olsa dejeneratif değişikliğe ve fibroze neden olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Deneysel Diyabet, Alloksan, Kardiyovasküler Sistem

Light Microscopic Evaluation of Cardio-vasculare System in Alloksan-induced Diabetic Rats in Acute Period

SUMMARY

Diabetic cardiomyopathy is one of the chronic complication of diabetes and acute effects of diabetes on heart and aorta is not clear. We aimed to determine acute effects of diabetes on cardio-vasculare system with light microscopy.

We used 20 Spraque-Dawley rats and applied 150 mg/kg alloxan, intraperitoneally for inducing diabetes and 1 ml SF in control group. After 24 hours, venous blood samples were measured. Blood glucose levels higher than 250 mg/dl were accepted as DM and treated with 4 IU/d human insülin. After 7 days rats were sacrificed under ketamin anaesthesia. Heart and aorta were fixed in 10 % buffered formalin. The sectiones were embedded in paraffin and were serially sectioned at 5 µm thickness, then stained with Hematoxyline-Eosine (H&E) and Heidenhein's Azan modification.

There was no histopathological changes in cardiac muscle cells in control group. But there was a heterogen appearance in cardiac muscle cells and we determined some hydropic degenerations in some of the cardiac muscle cells and a minimal fibrosis in perivascular and interstitial area in diabetic group. All histological stratums of aorta were seen normally in control group. In diabetic group, there was a clear anisostosis in smooth muscle cells and decreased in nucleus of smooth muscle cells in tunica media.

We concluded that DM is caused degeneration and fibrosis in cardiac muscle cells and effective on smooth muscle cells in aorta in acute period.

Key Words: Experimental Diabetes Mellitus, Alloxan, Cardio-Vasculare System.

*Dicle Üniv. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji A.D.

** Dicle Üniv. Tıp Fak. Biyokimya A.D.

*** Dicle Üniv. Tıp Fak. Endokrinoloji Bilim Dalı

**** Dicle Üniv. Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji A.D.

GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yolaçan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (1). DM uzun dönemde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalardan elde edilen veriler, DM'un, aterosklerotik hastalıklar ve özellikle Koroner Kalp Hastalığı (KKH) açısından yatkınlık oluşturan önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. DM'da, her iki cinsiyette ve tüm yaşlarda kardiyovasküler hastalık insidansı daha yüksektir; bu risk erkeklerde ortalama iki kat, kadınlarda ise dört kat daha fazladır. Koroner arter hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalık gibi aterosklerotik komplikasyonlar, diyabetik hastalarda en sık morbidite ve mortaliteye yol açan nedenlerdir (2). Etkin bir insülin tedavisi ile bu tip komplikasyonların önlenilebileceği veya geciktirilebileceği üzerine yapılmış çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (3). Klinik ve deneysel çalışmalar DM'un kronik dönemde kardiyak disfonksiyonlara neden olduğunu da göstermiştir (4-7). Bununla birlikte DM'un erken dönemde kalp ve aort dokusu üzerine yaptığı etkiler çok açık değildir. Biz bu çalışmamızda; DM'un akut dönemde kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinin ışık mikroskopik düzeyde incelenmesini amaçladık.

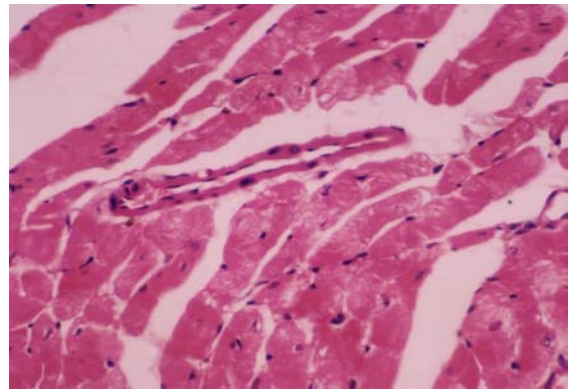
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 250-300 gram ağırlığında, 20 adet erişkin tipi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Deney hayvanları kontrol ve diyabet grubu olmak üzere 2 gruba ayrıldı (n=10). Diyabet grubuna 1 ml % 0.9'lük serum fizyolojik (SF) içerisinde 150 mg/kg Alloxan, kontrol grubuna ise 1 ml % 0.9'lük SF, intraperitoneal (İP) olarak uygulandı. Alloxan uygulamasından 24-48 saat sonra ratların kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz oksidaz yöntemiyle glukoz düzeylerine bakıldı. Glukoz düzeyi 250 mg/dl'yi aşan ratlar diyabetik olarak kabul

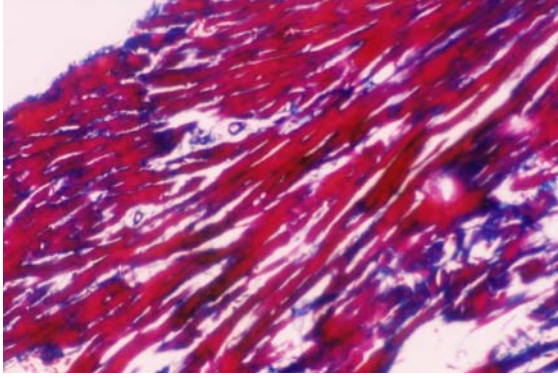
edildi. Diyabetik ratlara günde 2 kez 4 IU insan NPH insülini İP yoldan uygulandı. Alloxan uygulamasının 7. günü ratlar ketamin (50-200 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildiler. Derhal kalp ve torasik aorta dokusu bulunarak çıkarıldı, küçültüldü ve histolojik inceleme için kalp ve aort doku örnekleri %10'lük nötral formalin solüsyonu içinde 24 saat süreyle tesbit edildi. Daha sonra akar suda yıkandı ve takiben % 70, %80, %90, % 96 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemine tutuldu. Kalp ve aort dokusu her defasında 15 dakika olmak üzere toplam 45 dakika ksilolde şeffaflaştırıldı. Etüvde 58°C'de 1'er saat olmak üzere iki ayrı parafin banyosundan geçirilerek taze parafinde blok yapıldı. Parafine gömülen dokular mikrotomda 5 µm kalınlıkta kesilerek Hematoksilen-Eozinle ve Heidenhein'in Azan modifikasyonu ile boyandılar. Kesitler Olympus Cx 21 ışık mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Kalp Kası: Kontrol grubunun kalp kası hücrelerinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Kalp kası hücreleri normal görünümlü, koyu boyanmış çekirdek ve daha soluk boyanan sitoplazmaları ile izlendi (Şekil 1,2). Kalp kası hücreleri arasında perivasküler infiltrasyon görülmedi.

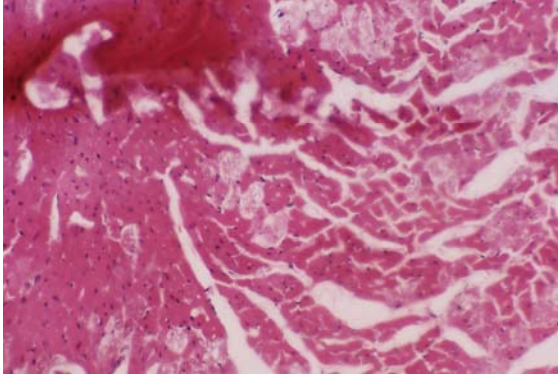


Şekil 1. Kontrol grubu kalp kası; Kalp kası hücrelerinde perivasküler infiltrasyon yok (H&E – orijinal büyütme X 164).

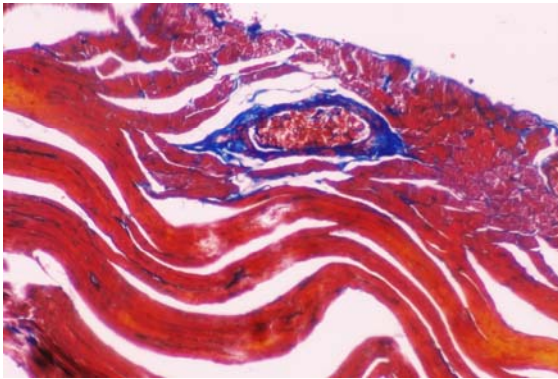


Şekil 2. Kontrol grubu kalp kası: Kas liflerinin longitudinal seyri. (Heidenhein'in Azan modifikasyonu-orijinal büyütme X82).

Diabetes mellitus oluşturulan grupta; kalp kası hücrelerinde yer yer heterojen görünüm, bazı kalp kası hücrelerinde hidropik değişiklikler, perivasküler ve interstisiyel alanda minimal düzeyde fibrozis izlendi (Şekil 3-4).

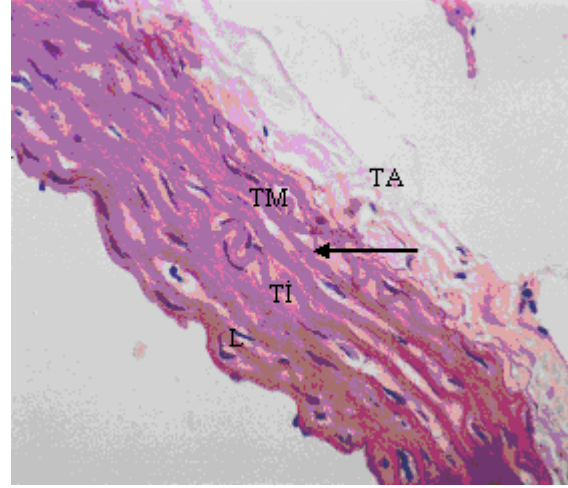


Şekil 3. Diyabet grubu kalp kası. Kalp kası hücrelerinde yer yer heterojen dağılım (H&E, orijinal büyütme X82).



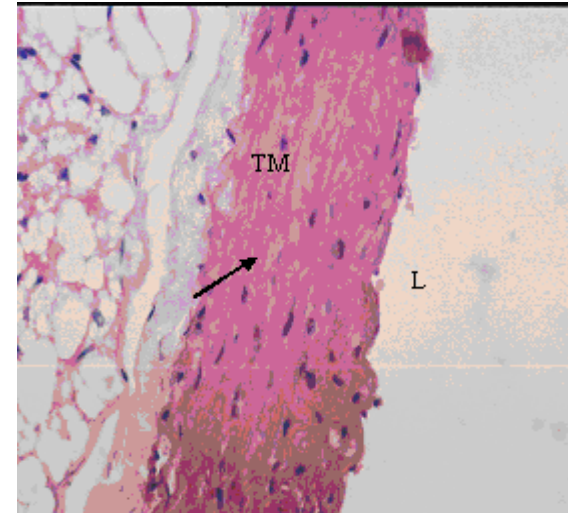
Şekil 4. Diyabet grubu kalp kası; Kalp kası hücrelerinde perivasküler fibrozis (Heidenhein'in Azan modifikasyonu- orijinal büyütme X82).

Aort dokusu: Kontrol grubunda aortun tunika intiması, mediası ve adventisyası normal histolojik yapıda izlendi. Endotel ve subendo telial tabakada herhangi bir patoloji görülmedi. Kas hücrelerinin dizilimi ve morfolojisi normal olarak izlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Aort kontrol grubu, damarın histolojik tabakaları normal izlenmektedir. Ok: Düz kas hücresi, Tİ: Tunika intima, TM: Tunika media, TA: Tunika adventisya, L:Lümen (H-E, orijinal büyütme X164).

Buna karşın diyabetik grupta aortun tunika intima ve adventisya tabakalarında herhangi bir patoloji izlenmezken; tunika media tabakasında düz kas hücrelerinde belirgin anizostozis, düz kas hücre çekirdeklerinde bir azalma gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6. Aort diyabet grubu, tunika mediadaki düz kas hücre çekirdeklerinde azalma. Ok: Düz kas hücre çekirdeği, TM:tunika media, L: Lümen (H-E, orijinal büyütme X164).

TARTIŞMA

DM derhal tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır. Genellikle mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla birlikte seyretmektedir. Erken dönemde dahi çok önemli organlarda dejenerasyonlar oluşmaktadır. Diabetik kardiyopatide DM'un kronik komplikasyonlarından biridir. Kardiyak etkilenme arasında vasküler değişiklikler (koroner ateroskleroz) ve kontraktıl disfonksiyonun sık gözlendiği literatürde bildirilmiştir. DM'lu hastalarda kardiyak ölümlerin asıl nedeni koroner atheroskleroza bağlanmakta iken; son zamanlarda oluşan myokardial fibrozis ve kalp kası hücre hasarının kalp disfonksiyonuna neden olduğu klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (5). Bununla birlikte DM'un erken dönemde kalp dokusu üzerine yaptığı etkiler çok açık değildir. Streptozotosin kullanılarak oluşturulan deneysel diyabetik rat modellerinde 4. haftada ventriküler kalp kası hücrelerine ait mitokondriyonlarda şişkinlik ve dejenerasyon olduğu, 8. haftada interkalat disklerde dilatasyon ve dejenerasyon, hücre içerisinde glikojen birikimi, 12. haftada myofibrillerde dejeneratif değişiklikler, lipid birikimi ve çekirdekte kromatin kondensasyonu, olduğu bildirilmiştir (8-10). Alloksan uygulanarak diyabet oluşturulan tavşanlarda 10.haftada mitokondriyonlarda şişkinlik ve fragmentasyon, mitokondriyal matriks içerisinde elektron yoğun amorf maddelerin varlığı kristolizisin varlığı gözlenmiştir. Ek olarak stoplazmada lipid ve glikojen birikimi olduğu, sarkoplazmik retikulum dilatasyonu ve dilate sarkoplazmik retikulum içerisinde değişik yoğunluktaki madde birikimi gözlenmiştir (11). Çalışmamızda alloksan uygulanarak diyabet oluşturulan sıçanların 7. günde alınan kalp kası örneklerinde minimal düzeyde de olsa dejeneratif değişikliğe ve fibrozise rastladık. DM oluşturulan ratlarda çok erken dönemde bile kalpte çeşitli histopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığını gözledik.

Nishigaki ve arkadaşları STZ-diyabetik mongolian gerbil'lerde aortadaki nitrik oksit sentaz, glikasyon son ürünlerinin ve NF-kB lokalizasyonunu immunohistokimyasal, ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel olarak çalışmışlar (12). Çalışmalarında 1. haftada diyabetik grupta endotelde ve medial hücreler-

de anlamlı bir değişikliğe rastlamamışlar. Çalışmalarının 1. ayında M.gerbil'lerde endotelde şişme ve kas hücrelerinde anizostozis gözlemlenmişler. Biz ise diyabet gelişiminden 1 hafta sonra sakrifiye ettiğimiz ratların aort dokusunda tunika intima ve adventisyalarında herhangi bir patolojiye rastlamazken; tunika mediadaki düz kas hücrelerinde belirgin anizostozis ve düz kas çekirdeklerinde azalma izledik.

Sonuç olarak DM'un akut dönemde kalp kası hücrelerinde minimal düzeyde de olsa dejeneratif değişikliğe ve fibrozise neden olduğu ve dolayısıyla kalp dokusunun hastalığın erken döneminden itibaren etkilenmeye başladığı sonucuna vardık. Yine DM'nin aort gibi oldukça önemli bir damar üzerinde çok erken dönemde bile angiopatik değişikliklere neden olduğunu gözlemledik. Bu yüzden DM tanısı alan hastaların tanı aldığı dönemden itibaren düzenli kardiyak takibinin yapılması, ayrıca makro-vasküler ve mikro-vasküler komplikasyonlar açısından bu hastaların takip edilmesi gerekliliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yenigün M, Altuntaş Y, Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001: 51-67
2. Yenigün M, Altuntaş Y, Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001: 637-696
3. Bailey C.J., Potential new treatments for type 2 diabetes, TIPS.2000,21:259-265
4. Take G, Karabay G, Yazıcı AC, Erdoğan D. Dişi Sıçanlarda Streptozotosin ile Oluşturulmuş Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde Gösterilmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2004; 30: 199-204
5. Can B, Uğur M, Güven MC, Saran Y, Turan Y, Turan B. Ultrastructural Changes of Cardiac Cells in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi.2001: 5; 87-92
6. Hileeto D, Cukiernik M, Mukherjee S, et al. Contributions of endothelin -1 and sodium hydrogen Exchange -1 in the diabetic myocardium. Diabetes Metab Res Rev.2002; 18:386-394



7. Akula A, Kota MK, Gopisetty SG et al. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*.2003; 48:429-435

8. Zhu XX, Zhou XP, Zhong XL, Zhong CS, Yu YF. Streptozotocin induced cardiomyopathy in diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*.1993; 106: 463-466

9. Seager MJ, Singal PK, Orchard R, Pierce GN, Dhalla NS. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin – induced chronic diabetes. *Br J Exp Path*.1984, 65: 613-23

10. Cai F. Studies of enzyme histochemistry and ultrastructure of the myocardium in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*.1989, 69:276-278

11. Bhimji S, Godin DV, McNeill JH. Myokardial ultrastructural changes in alloxan-induced diabetes in rabbits. *Acta Anat (Basel)*.1986; 125:195-200

12. Nishigaki R, Onda M, Yamada N, Yokoyama M, Naito Z, Asano G, Suganuma MS, Shichinohe K, Aramaki T. Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase, advanced glycation end product and NF-kB in aorta of streptozotocin treated Mongolian gerbils. *J Nippon Med Sch*;1996: 66; 166-175

Yazışma Adresi

Selen BAHCECİ

Dicle Univ. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji A.D.

E-mail: sbahceci@dicle.edu.tr

