Localisation of Aquaporin-1 In Diabetic Rat Retina and Ciliary Body

Diabetik Sıçan Retina ve Siliyer Cisiminde Aquaporin-1 Lokalizasyonu

Diabetik Retina ve Siliyer Cisiminde Aquaporin 1 / In Diabetic Retina And Ciliary Body

Sevil Çayli[1], Huseyin Ortak[2], Ufuk Taş[3], Erkan Söğüt[4], Fatih Ekici[5], Duygu Çakıl[5]
[1]Histoloji ve Embriyoloji A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.
[2]Göz Hastalıkları A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.
[3]Anatomi A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.
[4]Biyokimya A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.
[5]Fizyoloji A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.

Bu çalışma GOP Universitesi Bilimsel Arşatırma Projeleri tarafından desteklenmektedir.

Özet

Amaç: Aquaporinler, hücrelerin su içeriğini kontrol etmede kritik rol oynayan su kanallarıdır. Diabetik retinopati, aquaporin su kanallarının ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilir. Biz bu çalışmada, diabetik ve non-diabetik ratların retina ve siliyer cisminde aquaporin-1 dağılımını araştırmayı hedefledik. Gereç ve Yöntem: Diabetik ve non-diabetik ratların retina ve siliyer cisimleri immunohistokimyasal olarak incelendi. İmmunohistokimyasal değerlendirme için H-SCORE analizi kullanıldı. Bulgular: Aquaporin-1 immünoreaktivitesi, diabetik ve non-diabetik rat retinalarının gangliyon hücre tabakasında (GHT), iç nükleer tabakada (INT), iç pleksiform tabakada (IPT), iç segment (IS) fotoreseptör tabakasında (FT) ve retina pigment epitelinde (RPE) bulundu ve özellikle diabetik rat retinalarında belirgin bir artış tesbit edildi. Bu bulgulara ilaveten siliyer cisim epitel hücrelerinde positif immunoreaktivite görüldü. Diabetik ve diabetik olmayan sıçan retinaları arasında morfolojik olarak önemli bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte, iç nükleer tabaka (INT) ve dış nüklear tabaka (DNL) tabakaları arasındaki ayrım, diabetik sıçan retinalarında ortadan kalkmıştı. Tartışma: Bizim sonuçlarımız, aquaporin-1 immunoreaktivitesinin diabetik sıçan retinası ve siliyer cisminde, diabetik olmayan sıçanlara göre önemli şekilde arttığını gösterdi. Bu bulgulara göre diabetik sıçan retina ve siliyer cismindeki aquaporin-1 proteinin artışı, retinopatinin bir sebebi olabilir.

Anahtar Kelimeler

Aquaporin-1; Retina; Siliyer Cisim; Diabetes Mellitus, Sıçan

Abstract

Aim: Aquaporins are membrane water channels that play critical roles in controlling the water contents of cells. Diabetic retinopathy is associated with alterations in aquaporin water channel expression. We aimed to investigate the distribution of aquaporin 1 in non diabetic and diabetic rat retina and ciliary body. Materials and Methods: Eyeballs from diabetic and non diabetic rats were examined by immunohistochemistry. H-Score analysis was used for the evaluation of immunohistochemistry. Results: Aquaporin 1 immunoreactivity was found in the ganglionic cell layer (GCL), inner plexiform layer (IPL), the inner nuclear layer (INL), inner segment (IS) of photoreceptor layer (PRL) and retinal pigment epithelium (RPE) in diabetic and non diabetic rat retina and significantly increased in the diabetic rat retinas. In addition, epithelial cells of ciliary bodies were immunpositive for Aquaporin 1. No significant alterations were observed in the retinal morphology in the diabetic rats compared to non-diabetic rats. However, the demarcation between the INL and ONL was not noticed in diabetic retinas. Discussion: Our results indicate that Aquaporin 1 immunoreactivity in the diabetic rat retina and ciliary body significantly increases compared to non-diabetic rats. These results suggest that an increased expression of Aquaporin 1 in the diabetic rat retina and ciliary body may be one of the reason for retinopathy

Keywords

Aquaporin 1; Retina; Ciliary Body; Diabetes Mellitus; Rat

DOI: 10.4328/JCAM.842 Received: 26.10.2011 Accepted: 02.12.2011 Published Online: 01.10.2012 J Clin Anal Med 2012;3(4):439-442
Corresponding Author: Sevil Çaylı, Histoloji ve Embriyoloji A.D, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye.
T.: 03562129500/1231 E-mail: sevilcayli@yahoo.com

Giriş

Diyabet, insülin eksikliği ya da hedef dokuda insülin direnci nedeniyle oluşan ve sıklığı dünyada dramatik şekilde artan sistemik bir hastalıktır. Dünyadaki toplam diabetli sayısı, 2000'li yıllarda 171 milyon iken bu sayının 2030'lu yıllarda 366 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir.[1] Bu hastalığın kaygı verici bir durum almasının nedeni diyabetik mikrovasküler komplikasyonlardan dolayı erken morbidite ve mortalitedir. Diabetin en önemli komplikasyonlarından birisi körlüğe kadar giden retinopatidir. Retinopati, fundus muayenesinde ortaya çıkan vasküler lezyonlar ve makuler ödemle karekterizedir. Bu normal oftalmik muayene ile tesbit edilen bulguların yanında, histopatolojik inceleme sonucu ortaya çıkarılabilen bulgular da mevcuttur. Retinopatinin kesin patogenik mekanizması bilinmese de oluşumunda pek çok faktör suçlanmaktadır. Bu faktörler içerisinde son dönemlerde çalışılmaya başlanan aquaporin proteinlerindeki değişiklikler de yer almaktadır. Aquaporinlerin herbiri 30 kDa büyüklüğünde, membran proteinleri yapısında, bitki, hayvan ve daha alt mikroorganizmaların yapısında bulunabilen su geçiş kanallarıdır.[2] Bu güne kadar farklı dokularda gösterilebilen 10 taneden fazla aquaporin subgrubu bulunsa da, aquaporin-1 (AQP1), siliyer cisim epiteli ve koroid pleksusda en güçlü eksprese edilen formudur.[3] AQP1, non-pigmente siliyer epitelde eksprese edilir ve humor aköz sıvı dinamiğinde önemli fonksiyonlara sahiptir. AQP1'in aynı zamanda retina ve koroid dokusunda da varlığı gösterilmiştir. AQP1 delesyonu yapılmış ratlarda azalmış humor aköz üretiminden dolayı göz içi basıncında azalma olduğu tespit edilmiştir.[4] Retinada vasküler endotelial hücreler iç kan retina bariyerini oluşturur. Diyabetik retinopatide iç kan retina bariyerinin bozulduğu bilinmektedir. Retinada mikrovasküler endotelial hücrelerde AQP1 yokluğunun kan retina bariyerindeki bozulmasına bağlı görülen bulgularla paralellik gösterdiği bulunmuştur.[5] Bütün bu kaynaklardan anlaşıldığı üzere, AQP'lerin göz dokusundaki varlığı ve önemi güncel çalışma konusudur, fakat diyabetin AQP1 proteini üzerinde oluşturduğu etki henüz anlaşılamamıştır. Bu çalışmada diyabetik ve diyabetik olmayan sıçan retinalarında ve siliyer cisimde AQP1 immunolokalizasyonundaki değişiklikleri belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Diabet sıçan modelinin oluşturulması ve doku eldesi:

20 adet Wistar albino sıçanlar Gaziosmanpaşa Universitesi Deney Hayvanları laboratuarından sağlandı ve etik kurul raporu Gaziosmanpaşa Universitesi Deney Hayvanları etik kurulu tarafından verildi (2011 HADYEK-020). Tüm sıçanlar Laboratuar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı Kılavuzuna (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) uygun olarak bir muameleye tabi tutuldu. Sıçanlar kontrol (grup 1, n: 10) ve diabetik (grup 2, n:10) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Grup 2'deki sıçanlara 12 saat aç bıraktıktan sonra tek doz 60 mg/kg intraperitoneal streptozotosin injekte edildi. 24 saat sonra, deney grubundaki on hayvanın kan glukoz seviyesinin 250 mg/dl den yüksek olduğu belirlendi ve bunlar diabetik olarak kabul edildi. 45 günlük deney periyodunun sonunda sıçanlar ketamin/ksilazin (50/10 mg/kg) anestezisi altında kanları akıtılarak eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sıçanların göz dokuları çıkarılarak bouin fiksatifi içerisine atıldı. Dokular rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü.

İmmünohistokimyasal değerlendirme

Polilizinli lam üzerine alınan kesitlerde immünohistokimyasal AQP-1 proteinin lokalizasyonu belirlendi. İmmünohistokimyasal inceleme için daha önce Cayli ve ark, 2011 tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı.[6] Kısaca, elde edilen dokuların bir kısmı immünohistokimyasal değerlendirme için Bouin çözeltisinde tespit edilip parafin gömme uygulandı. 5µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lizin kaplı lamlarda (Sigma, St. Louis, MO, USA) toplandı ve bir gece 56°C' da inkübe edildi. Kesitler ksilen ve dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Daha sonra kesitler 2 kez pH'sı 6.0 olan 10mM sitratlı tampon içinde mikrodalga fırında kaynatıldı ve sonrasında soğuyana kadar 20 dk. bu tamponda bekletildi. Fosfat tamponlu salinle (PBS) 5'er dk. üç kez yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksidazla baskılandı. PBS'de 3'er kez 5'er dk. tekrar yıkandı. Kesitler spesifik olmayan reaksiyonu engellemek için 10 dk. bloklama serumla (ScyTek Laboratorları, USA) bloklandı. Sonrasında kesitler bir gece 4°C'da primer antikorlar eklenerek inkübe edildi. Primer antikor olarak poliklonal tavşan aquaporin 1 (1: 100, SantaCruz) kullanıldı. İnkübasyon sonrası, PBS ile oda sıcaklığında yıkamadan sonra sırayla biotinlenmiş sekonder antikorlar (ScyTek Laboratories, USA) ve peroksidaz-işaretli streptavidin (ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile toplam 50 dakika inkübe edildi. Peroksidaz aktivitesi, 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) (ScyTek Laboratories, USA) kromojeni ile inkübasyon sonucu görünür hale getirilip, Mayer'in hematoksileni (ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile zıt boyama yapıldı. Sonrasında, slaytlar su bazlı kapatma solusyonu (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, USA) ile kapatıldı. Kontroller için, kesitler primer antikorla benzer konsantrasyonda normal tavşan serumuyla inkübe edildi. Aquaporin 1 ile boyanan kesitler Leica mikroskop (Leica DM2500, Nussloch, Almanya) altında fotoğraflandırıldı.

İmmunohistokimyasal analizin değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi daha önce Cayli ve ark.[6] (2011) tarafından tarif edilen HSCORE analizi ile yapıldı. Aquaporin 1 immünreaksiyonunun şiddeti ve boyanan hücre sayısı şu şekilde değerlendirildi. Herbir kesit için ışık mikroskobu altında 40X büyütmede birbirinden habersiz iki araştırmacı tarafından rastgele beş alan seçildi ve bu alanlar içinde hücrelerin boyanma yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] hücre sayımı yapıldı. Hesaplama için HSCORE formulü kullanıldı [∑Pi(i+ l): i boyanma yoğunluğu skorunu, Pi boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir]. İki gözlemcinin hesapladığı skorların ortalaması alındı ve HSCORE değerleri grafikle gösterildi.

İstatistiksel Analiz

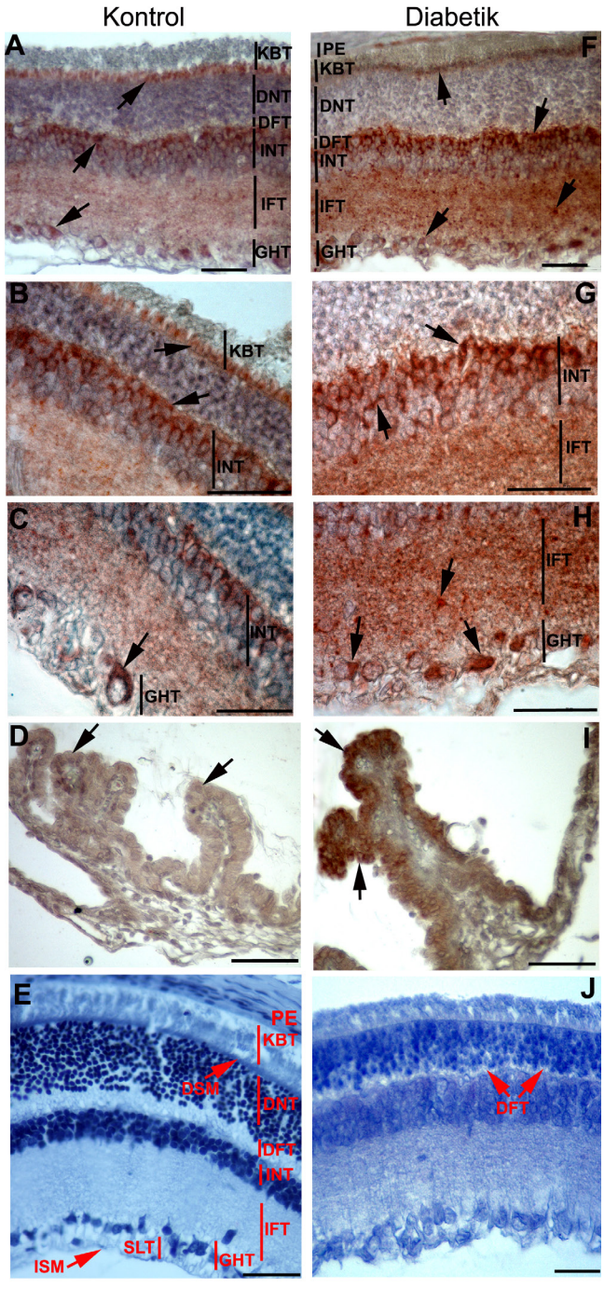
Istatiksel değerlendirme, HSCORE analizi sonucu elde edilen veriler normal dağılım göstermediği için, gruplar arası tüm karşılaştırmalar non-parametric ANOVA testi (Dunn metoduna göre) kullanılarak yapıldı. İstatiksel değerlendirmeler SigmaStat versiyon 3.5 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA) kullanılarak ve anlamlılık $P < .05$ olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

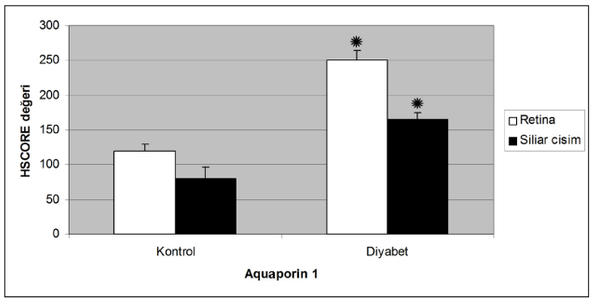
Diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanların retinalarında ve siliyer cisimlerinde Aquaporin 1' in immünohistokimyasal lokalizasyonu

Diabetik ve diabetik olmayan sıçan retina ve siliyer cisimlerinde Aquaporin 1'in karşılaştırmalı immunolokalizasyonları Şekil 1'de gösterildi. Sıçan retinasında Aquaporin 1 immuno positif hücreler, Gangliyon hücre tabakası (GHT), İç fleksiform tabakası (İFT), İç nüklear tabaka (İNT) ve koni-basil tabakasında (KBT) gözlendi (Şekil 1A-C ve F-H). Ayrıca, siliyer cisimde epitelyum hücrelerinde Aquaporin 1 lokalizasyonu belirlendi (Şekil 1 D ve İ). Aquaporin 1 immunpositivitenin hücre sitoplâzmasında olduğu gözlendi. Diabetik ve diabetik olmayan sıçanların retina ve irislerinde Aquaporin 1'in lokalizasyonları bakımından bölgesel fark görülmese de, Aquaporin 1 immun positif hücrelerin diabetik retinada daha yoğun boyandığı gözlendi. Özellikle, İFT ve İNT'daki Aquaporin 1 positif hücrelerin diabetik retina tabakasında daha yoğun olduğu saptandı. Histolojik kesitlerde diabetik sıçanlarda, retina tabakalarından Dış fleksiform tabakanın kalınlığı (DFT, Figure 1J, ok), diyabetik olmayan sıçanların retinasına göre daha inceydi. Bazı kesitlerde ise, diyabetik sıçanlarda iç nüklear ve dış nüklear tabaka arasında bir sınır olduğunu ayırmak mümkün değildi. Negatif kontrol kesitlerde hiçbir immünreaksiyon görülmedi (Şekil 1E ve J).

HSCORE analizi, hem Aquaporin 1 positif hücre sayısının hem de Aquaporin 1 boyanma yoğunluğunun diyabetik ve diyabetik olmayan retina ve iris tabakalarında farklı olduğunu gösterdi ($P < .05$) (Şekil 2).



Şekil 1. Diyabetik olmayan (Kontrol, A-D) ve diyabetik (F-İ) sıçan retina ve siliyer cisiminde Aquaporin 1 proteininin immunohistokimyasal lokalizasyonu. Aquaporin 1 immunopositif hücreler, retinanın pigment epitelyumu (PE), koni-basil tabakası (KBT), iç nüklear tabaka (INT) ve gangliyon hücre tabakasında (GHT) görülmektedir. Diyabetik sıçan retinasında ve siliyer cisiminde Aquaporin 1 positif hücrelerin daha yoğun boyandığı izlenmektedir (F-I). Primer antikor yerine, rabbit IgG kullanıldığı zaman herhangi bir immun boyanmaya rastlanılmamıştır (E, J). Histolojik kesitlerde diabetik sıçanlarda, retina tabakalarından Dış fleksiform tabakada (DFT, ok) kontrol retinaya göre bir incelme gözlendi (J).
Pigment epitelyumu (PE), Koni-Basil Tabakası (KBT), Dış sınırlayıcı membran (DSM), Dış nüklear tabaka (DNT), Dış fleksiform tabaka (DFT), İç nüklear tabaka (INT), İç fleksiform tabaka (İFT), Gangliyon hücre tabakası (GHT), Sinir lifi tabakası (SLT), İç sınırlayıcı membran (ISM). Bar: 50 µm.



Şekil 2. Diyabetik olmayan (Kontrol) ve diyabetik sıçan retina ve siliyer cisiminde Aquaporin 1 proteininin ifadelerinin HSCORE analizi ile karşılaştırılması. Diyabetik sıçan Aquaporin 1'in ifadesi anlamlı bir derecede kontrole göre artmıştır (*: $P < .05$).

Tartışma

Bu çalışma, diyabetik sıçan retina ve siliyer cisimciğinde, aquaporin 1 (AQ1) proteininin ifadesinin anlamlı oranda artığını göstermiştir. Diyabetik retinopati, retinal mikrovasküler yapıda disfonksiyona neden olan, endotel hasarı ve bunun sonucunda da, kan retina bariyerinde bozulma ve ödemle sonuçlanan sistemik bir hastalıktır.[7] Xun ve ark.[8] farelerde oluşturdukları prematüre retinopati modelinde, AQ1 proteininin dış retinada, özellikle rod ve koni tabakalarında lokalize olduğunu bulmuşlardır. Fukuda ve ark.[9] AQP1 ve AQP4'ün diabetik Torii sıçanların iç ve dış retinalarında farklı şekillerde lokalizasyonlarını göstermişlerdir. Bizim çalışmamız da bu bulguları destekler şekilde AQP1'nin diabetik sıçanlardaki artmış ifadesini göstermiştir, Fakat çalışmamızda AQP1'in immunoreaktivitesinde fark görülmesine rağmen, diabetik ve diabetik olmayan sıçan retina ve siliyer cisim morfolojilerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun nedeninin deneyde kullanılan sıçanların diabete maruz kalma süresiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Ruiz-Ederra ve Verkman[5] oluşturdukları retinopati modelinde AQP1'in siliyer epitelin non-pigmente tabakasında güçlü şekilde ifade edildiğini bulmuşlardır. Bu sonuçlar, AQP1'nin siliyer cisim epiteldeki artış ifadesini gösteren sonuçlarımızı destekler şekildedir. AQP1 kapiller endotel boyunca osmotik olarak indüklenen sıvı hareketi için önemli bir suyolu oluşturur.[10] O nedenle, bu proteinin miktarında meydana gelebilecek bir artış, makular ödem oluşumunda önemli olabilir. Nitekim AQP1 den yoksun sıçanlarda intraokuler basınçta azalma olduğu tesbit edilmiştir.[4,11]

Retinopatide retinal ödem gelişimi, retinal nöronları, sinir fibrillerini, kapillerlerini kompresyona uğratarak, dokulara oksijen ve glukoz difüzyonunu bozar. Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda retinal yüzeyel vasküler yapı etrafında AQP tiplerinde değişiklik saptanmıştır.[12] Yüzeyel damarlar normal grupta, AQP4 ile çevrelenirken, diyabetik grupta AQP1 ile çevrelenmiştir. Normalde iç retinal dokudan sıvı absorbsiyonu, AQP4 tarafından yönlendirilen glial hücreler tarafından yürütülür.[13] Bu çalışmada araştırmacılar retinadaki su transportunun özellikle yüzeyel damarlarda değiştiğini göstermişlerdir. Benzer çalışmalarda APQ1 düzeyindeki azalmayı akut beyin hasarından sonra tariflemişler ve bunun ödem oluşumu ve dinamiği ile ilgili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.[14] Bizim çalışmamızda, diyabetik retinada ödem görülmemesine rağmen AQP1 ifadesinde değişiklik fark edilmiştir.

Diyabetik rat retina ve siliyer epitel dokusunda AQP1 ekpresyonunun artmış olması, retinopati etiyopatogenezinde bu yapısal su kanalarının önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda, retinopatili hastalarda görme azlığının en büyük nedeni olan ödem oluşumunda bu proteinlerin rolünü akla getirmekte ve retinal ödemin tedavi yaklaşımında gelecekteki çalışmalara ışık tutacaktır.

Kaynaklar:

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004;27(5):1047-53
2. Verkman AS. Role of aquaporin water channels in eye function. Exp Eye Res 2003;76(2):137-43.
3. Stamer WD, Snyder RW, Smith BL, Agre P, Regan JW. Localization of aquaporin CHIP in the human eye: implications in the pathogenesis of glaucoma and other disorders of ocular fluid balance. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35(11):3867-72.
4. Zhang D, Vetrivel L, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. J Gen Physiol 2002;119(6):561-9.
5. Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Aquaporin-1 independent microvessel proliferation in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48(10):4802-10.
6. Cayli S, Ocakli S, Erdemir F, Tas U, Aslan H, Yener T, Karaca Z. Developmental expression of p97/VCP (Valosin-containing protein) and Jab1/CSN5 in the rat testis and epididymis. Reprod Biol Endocrinol 2011;9:117.
7. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. FASEB J 2004;18(12):1450-2.
8. Xun W, Liu Y, Qing G, Xun X, Dongqing Z, Haixiang W. Aquaporin 1 expression in retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. Prep Biochem Biotechnol 2009;39(2):208-17.
9. Fukuda M, Nakanishi Y, Fuse M, Yokoi N, Hamada Y, Fukagawa M, Negi A et al. Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. Exp Eye Res 2010;90(1):17-25.
10. Yang B, Folkesson HG, Yang J, Matthay MA, Ma T, Verkman AS. Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice. Am J Physiol 1999;276(1 Pt 1):C76-81.
11. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye. Prog Retin Eye Res 2008 Jul;27(4):420-33.
12. Iandiev I, Pannicke T, Biedermann B, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina. Neurosci Lett 2006;408(2):108-12.
13. Oshio K, Binder DK, Bollen A, Verkman AS, Berger MS, Manley GT Aquaporin-1 expression in human glial tumors suggests a potential novel therapeutic target for tumor-associated edema. Acta Neurochir Suppl 2003;86:499-502.
14. Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. Acta Neurochir Suppl 2003;86:525-8.