

Selenyum Kataraktının Oluşması Sırasında Vitamin E ve C'nin Etkilerinin Elektron Mikroskop Düzeyinde İncelenmesi

Aysel KÜKNER*, Şahap KÜKNER**, Enver OZAN***, Leyla CANPOLAT****, Nurhayat YEGAN*****, Alpaslan GÖKÇİMEN*****

ÖZET

12-14 günlük süt emen yavru ratlarda tek doz subkutan selenyum verilerek, 4 gün içinde nükleer katarakt oluşturulmuştur. Diğer iki deney grubuna ise selenyum ile E ve C vitamini verilerek bu antioksidanların katarakt oluşumunu önleyici etkisi yapısal düzeyde incelenmiştir. Deney gruplarının tümünde blyomikroskopik ve histolojik olarak katarakt gelişimi tespit edilmiştir. Enjeksiyon sonrası 12-24 saatte lens epitel ve ekvator bölgesinde vakuolizasyonun ortaya çıktığı görülmüştür. 48-72 saat sonra ise vakuolizasyonun yüzey bölgelerden korteksin daha derin bölgelerine uzandığı dikkati çekmiştir. E ve C vitamini verilen gruplarda, derin korteks bölgesindeki lens fibril dejenerasyonunun, selenyumlu gruba göre daha az olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Selenyum, Katarakt, E vitamini, C vitamini, Elektron mikroskop

T Klin Oftalmoloji 1995, 4: 36-41

SUMMARY

THE INVESTIGATIONS OF THE EFFECTS OF VITAMIN E AND C DURING SELENITE CATARACTOGENESIS AT THE ULTRASTRUCTURAL LEVEL

On the 12-14 days olds of suckling rats the nuclear cataract was occurred by injections a single subcutaneous dose of sodium selenite on the fourth day. Vitamin E and C together selenite were given another two groups rats and to it was examined to prevent their effect to the cataract formation at the ultrastructural level. On the all of the test groups, the cataract formation was established by biomicroscopical and histological. At the 12-24 hours after injection it was seen that the vacuolization occurred on the epithelium and equator regions of lens. After 48-72 hours, it was noted that the vacuolization penetrated from the superficial to deep regions of cortex. At the deep region of cortex, the degeneration on the lens fibrils was less in the group with selenite than in that of groups of vitamin E and C.

Key Words; Selenite, Cataract, Vitamin E, Vitamin C, Ultrastructure

T Klin J Ophthalmol 1995, 4: 36-41

Giriş

Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan kataraktın oluşması oldukça yavaş ilerleyen bir tablodur. Bunun için kata-

rakt oluşum evrelerinin incelenmesi için deneysel modeller geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar selenyum tuzlarının tek doz olarak yavru ratlara verildikten sonraki 4 gün içinde katarakt geliştiğini göstermiştir (1,2).

Geliş Tarihi: 14.11.1994

Yard.Doc.Dr.Fırat ÜTF. Histoloji ve Emb. ABD.

** Yard.Doc.Dr.Fırat ÜTF. Göz Hastalıkları ABD,

*** Prof.Dr.Fırat ÜTF. Histoloji ve Emb. ABD,

**** Araş.Gör.Fırat ÜTF. Histoloji ve Emb. ABD,

***** Araş.Gör.Fırat ÜVet.Fak. Histoloji ve Emb. ABD, ELAZIĞ

*fiu araştırma 31 Ağustos-2 Eylül 1994, Bursa, II. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi: A.Şahap KÜKNER

Fırat Üniv. Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi
Göz Hastalıkları ABD, ELAZIĞ

Katarakt oluşumunda rol oynayan etkenler genellikle oksijenin artmış toksik metabolitleridir. Bunlara karşı gözde primer ve sekonder koruyucu etkenler vardır. Bunlar askorbik asid, glutatyon, süperoksit dismutaz, katalaz'dır. Katarakt konusunda yapılan biyokimyasal çalışmalar hümeör aköz ve lenste hidrojen peroksidin 2-3 kat arttığı buna karşın askorbik asid, glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz'ın azaldığı bildirilmektedir (3,4). Özellikle hidrojen peroksidin hücre zarındaki lipidler yapısını bozduğu, zarın geçirgenliğinin bozularak hücre içine kalsiyum iyonunun girişinin arttığı gözlen-

**SELENYUM KATARAKTİMİN OLUŞMASI SIRASINDA VİTAMİN E VE C'NİN ETKİLERİNİN
ELEKTRON MİKROSKOP DÜZEYİNDE İNCELENMESİ**

mistir. Bunun sonucunda ise suda çözünebilir proteirlerin çözünebilir duruma gelerek çöktüğü ve lensin opaklaştığı saptanmıştır (5).

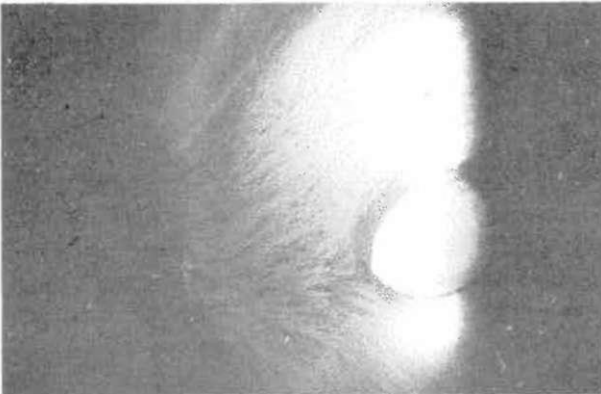
Kataraktın önlenmesi ya da ilerlemesinin durdurulması amacıyla araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle antioksidan olan E ve C vitaminlerinin hücre zarındaki lipid bozulmasını engellediği ya da en aza indirgediği gözlenmiştir (3,6,7).

Bizim de bu çalışmadaki amacımız, selenyum tuzları ile ratlarda katarakt oluşturma sürecinde E ve C vitaminleri vererek, lensin yapısında ortaya çıkan değişikliklerin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Ortalama ağırlıkları 20 gr olan Wistar tipi, süt emen 12-14 günlük yavru ratlar kullanıldı. Her grubun 10 denekten oluşturularak toplam 4 grup yapıldı. I.gruptaki deneklere tek doz subkutan 4 mg/kg Sodyum Selenit (Naz Se O3, Merck) serum fizyolojik içinde eritilerek enjekte edildi. II gruptaki deneklere aynı doz subkutan selenyum ile birlikte 500 mg/kg E vitamini (d.1.alfa tokoferol asetat) günlük intraperitoneal olarak verildi. III.gruptaki deneklere ise selenyumla birlikte 250 mg/kg C vitamini günlük subkutan olarak verildi. IV.grupta<; deneklere herhangi bir şey verilmedi ve kontrol grubu olarak kullanıldı.

Enjeksiyonlardan 12, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra kontrol ve her deney grubundan ikişer yavru eter ile öldürülerek lensleri çıkarıldı. Lensler 1/15 M fosfat tamponlu %2.5 Gluteraldehit ile 24 saat tespit edildi. Daha sonra dokular, fosfat tamponlu osmik asit ile ikinci kez +4 derecede 2 saat tespit edildiler. Etil alkol serilerinden geçirilen lensler DDSA+BDMA+Aradift Cy 212 karışımına gömüldüler. Aynı göze ait bloklardan alınan yarı ince kesitler ışık mikroskopunda incelenirken, ince kesitler elektron mikroskopunda incelendi. Olympus BH2 fotomikroskop ve Jeol 100 CX II elektron mikroskopu ile resimler çekildi.



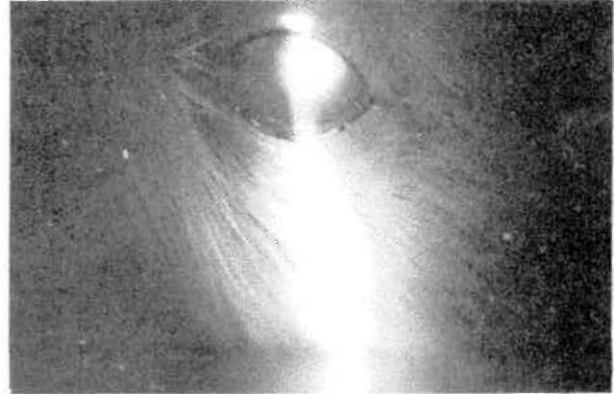
Şekil 1. Yavru rat gözünün biymikroskopik normal görünümü

Sonuçlar

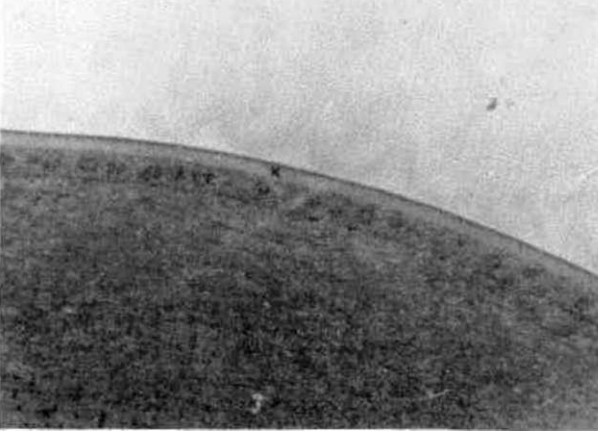
Selenyum, selenyum+vitamin E, selenyum+vitamin C verilen gruplardaki deneklerin hepsinde enjeksiyon sonrası 4 gün içinde katarakt geliştiği biymikroskop ile tespit edildi (Şekil 1,2).

Işık mikroskopik olarak, enjeksiyondan 12 saat sonra lens epiteii ve lens fibrilleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında normal yapılarını korudukları gözlenirken, 24 saat sonra subkapsüler bölgede, epitelde ve ekvator bölgesinde vakuolizasyonun başladığı saptandı. Vakuolizasyonun, enjeksiyon sonrası 48. ve 72. saatlerde yüzeyden korteks bölgesine doğru ilerlediği dikkati çekmekteydi (Şekil 3,4,5,6). 4.günde selenyumlu grupta lens çekirdeğinin saydamlığını yitirdiği ve kesifleştiği görüldü. Çekirdek çevresinde koyu bazofilik boyanmış derin korteks bölgesi, bozulmuş lens fibrilleri, daha açık boyanmış yüzeyel korteks bölgesi gözlemlendi. Vitamin E ve C verilmiş gruplarda ise çekirdek çevresindeki derin korteks bölgesinin daha açık boyandığı belirgindi (Şekil 7,8).

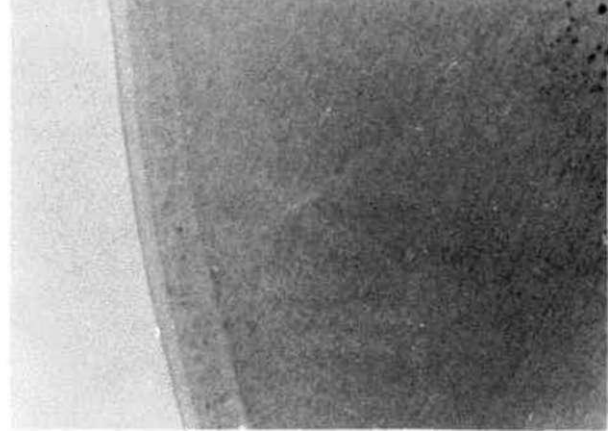
Elektron mikroskopik olarak incelendiğinde, selenyumlu grupta 12-24 saat sonra lens epitelinde ve lensin ekvator bölgesindeki fibrillerde vakuolizasyon, mitokondriyonların kristallerinde bozulma, şişme, vakuolier içinde zar kalıntıları gözlemlendi (Şekil 9,10,11). 48 saat sonra dejenerasyonun ilerlemesiyle epitel hücrelerinin arasındaki sınırların bozulduğu, çekirdek çevresinde (perinükleer alan) vakuolizasyon ve bunun çekirdek içine uzanması ve çekirdek sınırlarının düzensizliği dikkati çekmekteydi (Şekil 12). 4.günde epitel hücrelerinde vakuolizasyonun devam ettiği, granüler endoplazma retikülumun genişlediği, mitokondriyonların bozulduğu, yüzeyel korteks bölgesindeki lens fibrillerinde ise içlerinde miyelin figürler taşıyan vakuolier, genişlemiş perinükleer aralık ve yoğun kromatine sahip çekirdekler görüldü. Derin korteks bölgesinde ise lens fibrillerinin sınırları bozulmuş, içlerinde yoğun sitoplazmik madde içeren dejener alanlar belirgindi (Şekil 13,14,15). E ve C vitamini verilmiş gruplarda 72 saat sonra lens epitelindeki vakuolizasyon, perinükleer genişlemeler, miyelin fi-



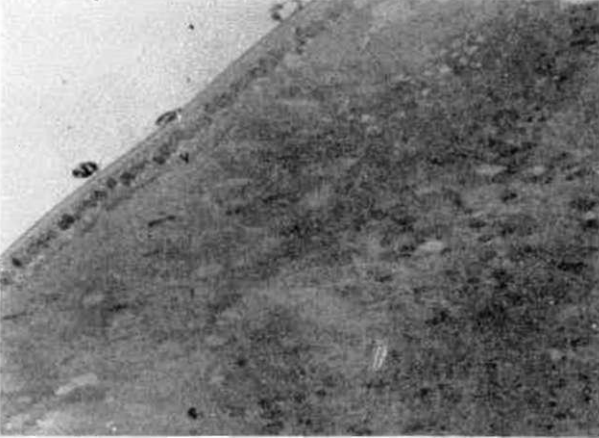
Şekil 2. Selenyum kataraktı rat gözünün biymikroskopik görünümü



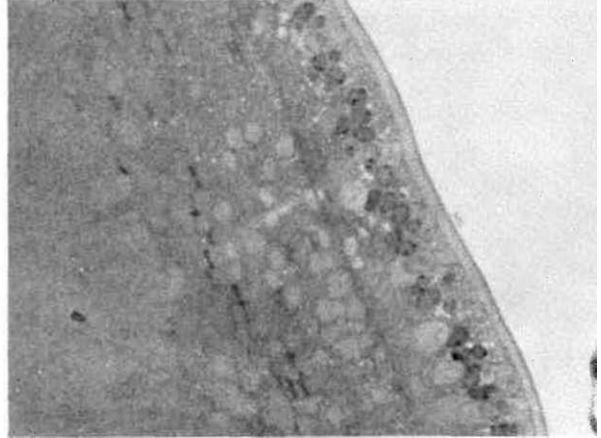
Şekil 3. Kontrol grubu. Lensin normal yapısı, kapsül (K), epitel (E), (ibril hücreleri (F) görülmekte (Toluidin blue-Azur II132X)



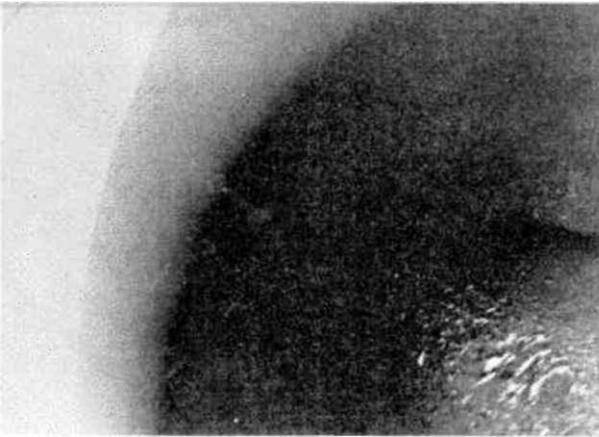
Şekil4. Selenyum verildikten 12 saat sonra lens epitel normal gruba benzer görünümde (Toluidin blue-Azur II132X)



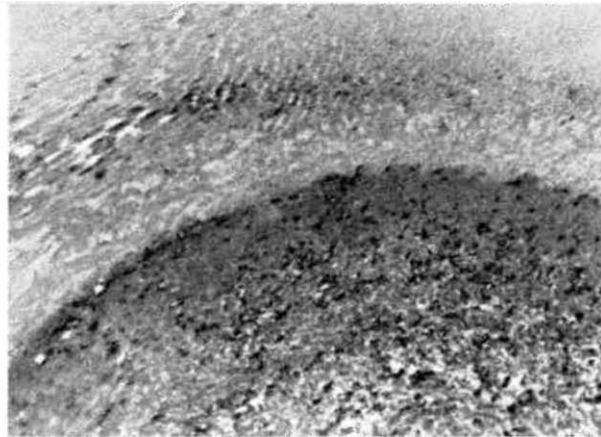
Şekil 5. Selenyum verildikten 24 saat sonra tensin ekvator bölgesindeki epitel hücrelerinde ve korteks bölgesindeki vakuolizasyon (V) görülmekte (Toluidin blue-Azur II66X).



Şekil 8. Selenyum+Vitamin C verilen grubun epitelinin 48 saat sonraki görünümü. Epiteldeki çok katıllık, açık ve koyu boyanmış hücreler, kodeksi de kapsayan vakuolizasyon izlenmekte (oluidin blue-Azur II132X).

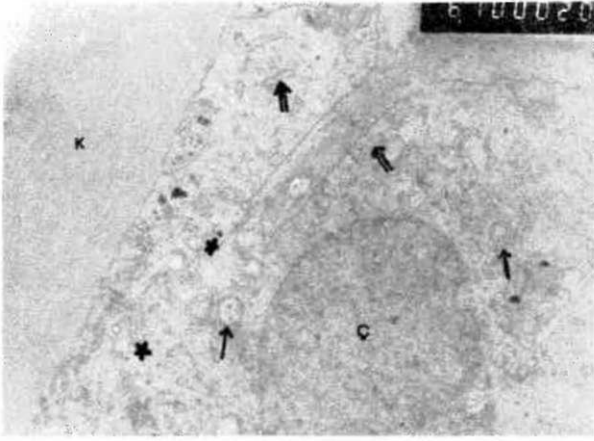


Şekil 7. Selenyum verildikten 4 gün sonra nükleer katarakt gelişmiş lensin görünümü (Toluidin blue-Azur II 33X).

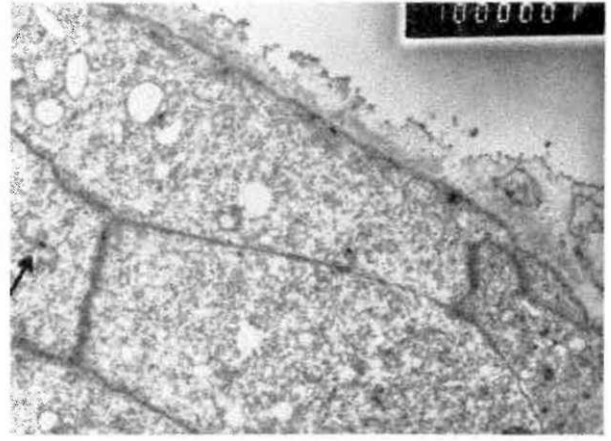


Şekil 8. Selenyum+Vitamin E verilmiş grupta, 4.günde lens çekirdeği ve derin korteks bölgesi daha az koyu boyanmış olarak izlenmekte (Toluidin blue-Azur II 66X).

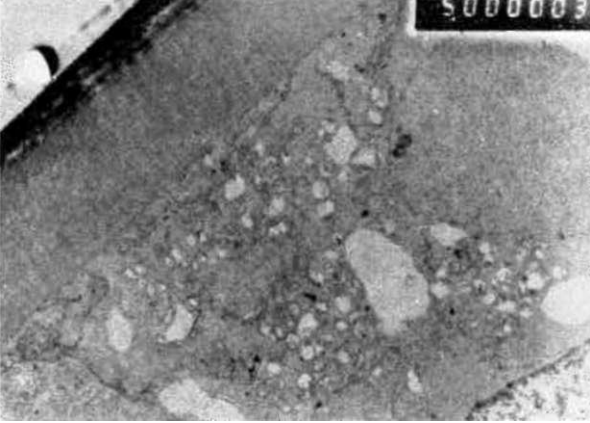
SELENYUM KATARAKTININ OLUŞMASI SIRASINDA VİTAMİN E VE C'NİN ETKİLERİNİN
ELEKTRON MİKROSKOP DÜZEYİNDE İNCELENMESİ



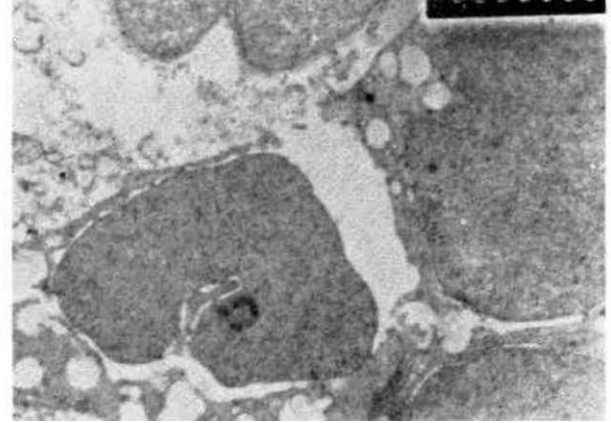
Şekil 9. Kontrol grup lens epiteli ve kapsülün elektron mikroskopik olarak görünümü. Kapsül (K), çekirdek (Ç), mitokondriyonlar (tek oklar), granüler endoplazma retikulumu (çift oklar), hücreler arası interdigitasyonlar (*) (Kurşun sitrat-uranil asetat X6700).



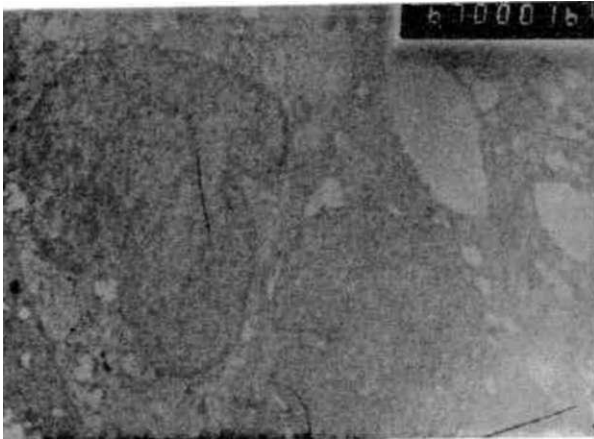
Şekil 10. Selenyum verildikten 12 saat sonra ekvator bölgedeki lens fibrilleri içindeki vakuolizasyon, mitokondriyonlarda bozulma, siyoplazmanın granüler olması ve bölünmekte olan bir mitokondriyon (ok) dikkati çekmekte (Kurşun sitrat-uranil asetat X10000).



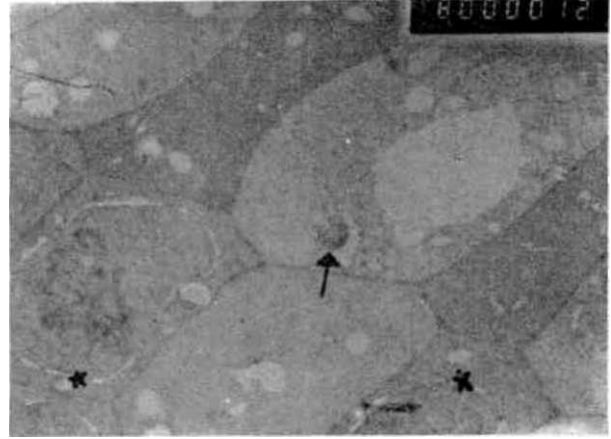
Şekilli. Selenyum verildikten 24 saat sonra epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve içlerinde zar kalıntıları gözlenmekte (Kurşun sitrat-uranil asetat X5000).



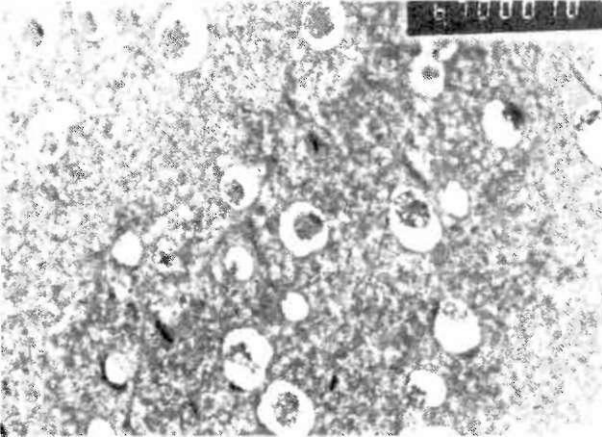
Şekil 12. Selenyum verildikten 48 saat sonra epitel çekirdeklerinin çevresinde vakuolizasyon, bozulmuş çekirdek ve hücre sınırları izlenmekte (Kurşun sitrat-uranil asetat X8000).



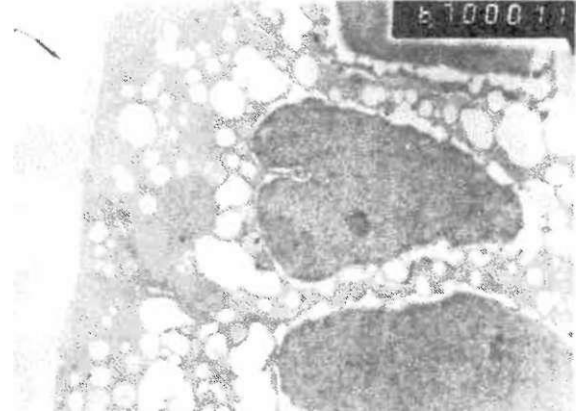
Şekil 13. Selenyum verildikten 4 gün sonra epitel hücrelerinin görünümü (Kurşun sitrat-uranil asetat X6700).



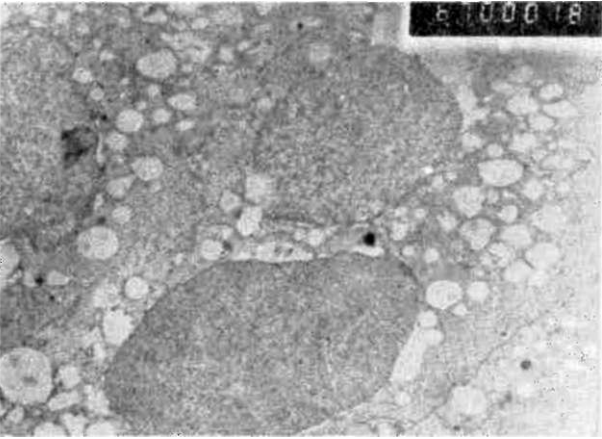
Şekil 14. 4günde yüzeysel korteks bölgesinde lens fibrillerindeki vakuolizasyon, miyelin figürler (ok), genişlemiş perinükleer alanlar (*) görülüyor (Kurşun sitrat-uranil asetat X8000).



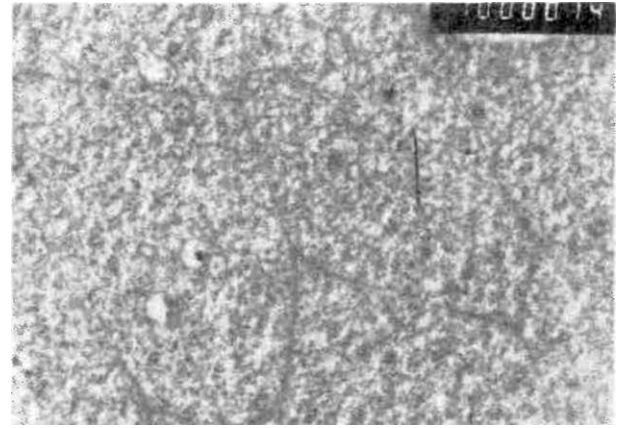
Şekil 15, Selenyumlu grupta 4.günde derin korteks fibrillerindeki dejenerasyon görülmekte (Kurşun sitrat-uranil asetat X6700).



Şekil16. Se+vit.E verilen grupta 72 saat sonraki epitel hücrelerinin görünümü (Kurşun sitrat-uranil asetat X6700).



Şekil 17, Se+vit.C verilen grupta 72 saat sonraki epitel hücrelerinin görünümü (Kurşun sitrat-uranil asetat X6700),



Şekil 18. Se+vit.E verilen grupta 4 gün sonra derin korteks bölgesindeki lens fibrillerinde dejener alanların selenyumlu gruba göre oldukça az olduğu izlenmekte (Kurşun sitrat-uranil asetat X10000).

gürlük görüldü (Şekil 18,17). Özellikle E vitamini verilen grupta derin korteks bölgesindeki lens fibrillerinde vakuolizasyonun, selenyumlu gruba göre çok daha az olduğu dikkati çekmekteydi (Şekil 18).

Tartışma

Diğer pek çok eser element denenmesine rağmen sadece selenyum tuzları ile deneysel katarakt oluşturulduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar, selenyumun yavru ratlarda 2.25 mg/kg tek doz olarak subkutan verilmesiyle 4 gün içinde katarakt oluştuğunu göstermektedir (1,8-10). Biz yaptığımız ön çalışmalarda bu doz ile katarakt oluşturamadık. Katarakt oluşturduğumuz doz 4 mg/kg idi.

Katarakt gelişmesinde, hidrojen peroksit ve oksijenin serbest radikallerinin artarak lipid peroksidasyonuna yol açtığı, bunun sonucunda doku yıkımı olduğu gösterilmiştir. Serbest radikallerin etkisini önleyecek olan anti-

oksidan maddelerden iki tanesi vitamin E ve C'dir. Vitamin E'nin serbest radikallerin oluşmasını önleyerek hücre zarını stabilize ettiği böylece hücrenin iyon dengesinin bozulmadığı, hücre içine Ca geçişini azalttığı bildirilmektedir (11-13).

Shearer ve ark (9), selenyum ile oluşturulan katarakta selenyumun lens içine girişinin ilk 12-24 saatte çok hızlı olduğunu bildirmektedir. İlk olarak lens epitelinde, subkapsüler ve ekvatoriyal bölgede vakuolizasyonun oluştuğunu gözlemişlerdir. Cenedella (14) selenyuma bağlı oluşan kataraktlarda lenste DNA yapımına bakarak perinükleer alanda vakuolizasyon ve içlerinde zar kalıntıları olduğunu gözlemiştir. Bu dejenerasyonu DNA yapımının bozulmasına bağlamıştır. Yazarların bu bulgularını yaptığımız çalışma sonucunda biz de gözledik. Tüm gruplarımızda metabolizmanın en aktif olduğu epitel ve ekvator bölgesinde vakuolizasyon belirgindi. Epitel hücre çekirdeklerinin çevresinde vaku-

SELENYUM KATARAKTININ OLUŞMASI SİRASINDA VİTAMİN E VE C'NİN ETKİLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOP DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

özasyon, içlerinde zar kalıntıları, mitokondriyonlarda bozulma görüldü. Çekirdek sınırlarının düzensizleştiği, vakuollerin yer yer çekirdek içine doğru ilerlediği görüldü. Bu dozlarda verilen E ve C vitaminlerinin, selenyumun lense verdiği hasarı engellemediği sonucuna varıldı.

Bhuyan ve ark (3), 3-aminotriazol ile katarakt oluşturduktan tavşanlara günlük 50 mg/kg vitamin E intramusküler olarak 5-16 hafta, bir başka gruba ise günlük 100 mg/kg oral 2-3 hafta verdiklerini ve sonuçta katarakt gelişiminin %50 oranında gerilediğini bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar ratlara 20 mikromol/kg selenyum vererek, 2,5 gr/kg E vitamini ile 3-6 hafta tedavi etmişler, hümeör aközde hidrojen peroksltin belirgin olarak azaldığını gözlemişlerdir. Ross ve ark (7) radyasyon, Creighfon ve ark (6) ise solumedrol ile invitro şartlarda katarakt oluşturmuşlar ve E vitamini ile tedavi etmişlerdir. Lenslerde 24-48 saat içinde vakuolizasyon, kortikal fibrillerde delikler, derin kortekste globüler dejenerasyon görmüşlerdir. E vitamininin kataraktı bir derece engellediğini gözlemişlerdir.

Selenyum ile E ve C vitamini verdiğimiz gruplarda 24-48 saat sonra gelişen vakuolizasyonun giderek derin korteks bölgesine ilerlediği gözlemlendi. Selenyumlu grupta derin korteks bölgesinde içleri granüler madde ile dolu dejenere alanlar dikkati çekmekteydi. Bu dejenere alanların, özellikle E vitamini verilen grupta daha az olması, verilen antioksidanın önleyici etkisi sonucu olabileceği düşünüldü. Ama genel olarak selenyumlu grupta gözlediğimiz subkapsuler vakuolizasyon, epitel hücrelerinde ve fibrillerde vakuolizasyon, miyelin figürler, mitokondriyonlarda bozulma, perlnükleer alanda genişlemeler antioksidan verilen gruplarda da görüldü.

Bu bulgular sonucunda, selenyum ile katarakt oluşma sürecinde bu dozlardaki E ve C vitamininin önleyemediğini, etkinin belirgin olmadığı yapısal düzeyde gözlenmiştir. Bu antioksidanların verilmiş süreleri uzatılarak ya da dozları değiştirilerek yapılacak bir dizi çalışmanın yararlı olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

1. Shearer TR, Anderson RS, Britton JL, Palmer EA. Early development of selenium-induced cataract: slit lamp evaluation. *Exp Eye Res* 1983; 36:781-8.
2. Ovalı T, Erbeni T, Gökhan N, Akarçay K, Özüesen E, Büyükdevrim S. Selenyum kataraktının ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi. *T Oft Gaz* 1991; 21:87-90.
3. Bhuyan CK, Bhuyan KD, Podos MS. The role of vitamin E in therapy of cataract in animals. *Annals New York Academy of Sciences*. 1982; 393: 169-71.
4. Bunce GE, Hess JL. Biochemical changes associated with selenite-induced cataract in the rat. *Exp Eye Res* 1981; 33:505-14.
5. David LL, Shearer TR. Calcium-activated proteolysis in the lens nucleus during selenite cataractogenesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1984; 25:1275-83.
6. Creighton MO, Sanwal M, Stewart-DeHaan PJ, Trevithick Jr. Modeling cortical cataractogenesis. 5. Steroid cataracts induced by solumedrol partially prevented by vitamin E in vitro. *Exp Eye Res* 1983; 37:65-75.
7. Ross WM, Creighton MO, Inch WR, Trevithick Jr. Radiation cataract formation diminished by vitamin E in rat lenses in vitro. *Exp Eye Res* 1983; 36:645-53.
8. Osta'dalova' I, Babicky* A, Obenberger J. Cataract induced by administration of a single dose of sodium selenite to suckling rats. *Experientia* 1977; 34:222-3.
9. Shearer TR, Anderson RS. Histologic changes during selenite cataractogenesis: a light microscopy study. *Exp Eye Res* 1985; 40:557-65.
10. Ovalı T, Öngör E, Özüesen E, Akarçay K, Gökhan N, Erbeni T. Selenyum kataraktının histolojik incelenmesi. *T Oft Gaz* 1990:147-9.
11. Bhuyan KC, Bhuyan DK. Molecular mechanism of cataractogenesis. III. Toxic metabolites of oxygen as initiators of lipid peroxidation and cataract. *Curr Eye Res* 1984; 3(1):67-81.
12. Burton GW, Traber MG. Vit E; Antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 1990; 10:357-82.
13. Varma SD, Chand D, Sharma YR, Kuck JR, Richards RD. Oxidative stress on lens and cataract formation; role of light and oxygen. *Curr Eye Res* 1984; 3(1):35-57.
14. Cenedella RJ. Direct chemical measurement of DNA synthesis and net rates of differentiation of rat lens epithelial cells in vivo: applied to the selenium cataract. *Exp Eye Res* 1987;44:677-90.