

## 당뇨쥐 OLETF에서 망막조직의 미세구조적 변화

박준모<sup>1</sup> · 이지은<sup>2</sup> · 엄부섭<sup>2</sup>

양산 부산대학교 의학전문대학원 안과학교실<sup>1</sup>, 부산대학교 의학전문대학원 안과학교실<sup>2</sup>

**목적:** 유전적으로 제2형 당뇨병에 이환된 당뇨쥐(OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, Japan)와 정상쥐(LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka)의 망막을 비교하였다.

**대상과 방법:** LETO 쥐와 OLETF 쥐 각각 5마리씩 출생 후 10주, 50주에 몸무게, 혈당을 측정했다. 50주 때 투사전자현미경으로 망막을 관찰하고, Scion Image<sup>®</sup>로써 망막모세혈관 기저막의 두께, 혈관주위세포 크기를 비교하였다.

**결과:** 50주령 OLETF 쥐는 LETO 쥐에 비해 체중과 혈당 모두 유의하게 증가했다( $p<0.05$ ). 그리고 50주령의 OLETF 쥐에서, 혈관주위세포의 평균면적 및 기저막 평균두께가 의미 있게 크게 측정되었고( $p<0.05$ ), 내과립층과 외과립층의 세포밀도 모두 의미 있게 감소하였다( $p<0.05$ ). 망막색소상피 높이는 유의한 차이가 없었다.

**결론:** OLETF 쥐의 망막변화는 비교적 빠르게 50주만에 나타났으며, 인간의 당뇨망막병증 변화와 유사했다. 특히 특징적인 초기 변화인 모세혈관 형태변화를 확인했다. OLETF 쥐는 제2형 당뇨병 관련 당뇨망막병증 연구의 좋은 동물 모델이 될 것이다.

(대한안과학회지 2010;51(1):112-119)

당뇨병은 신경, 신장, 망막에 주요 합병증을 일으키는 대사 질환이며, 우리나라에서도 식습관의 변화 및 수명의 연장 등으로 유병률 및 합병증의 빈도가 급격히 증가하는 실정이다. 특히, 당뇨망막병증은 실명의 중요한 원인 중 하나로서, 초기 비증식당뇨망막병증에서 후기 증식당뇨망막병증까지 서서히 진행되는 당뇨병의 합병증이다. 이런 망막 변화를 야기하는 정확한 병리학적 기전은 모르지만, 내피세포 기저막의 비후, 혈관주위세포의 소실, 미세혈관류, 모세혈관의 세포감소, 신생혈관 발생 등을 포함한 망막 혈관계의 이상이 당뇨망막병증의 기초가 된다고 알려져 있다.<sup>1</sup>

당뇨망막병증의 효과적인 치료법 및 예방법 개발이 힘든 이유 중 하나는 제 2형 당뇨병의 적절한 동물모델이 없기 때문이다. 이전 연구들에서 많이 사용되어 왔던 스트렙토조신으로 유발시킨 당뇨쥐는 제 1형 당뇨병의 모델이었으며, 그 외 일부 자발적으로 발생한 당뇨병을 앓은 개, 원숭이, 쥐 등도 대상이 되었으나, 스트렙토조신으로 유발시킨 경우와 함께 연구대상에 포함시킨

발표들이 대부분이었다.<sup>2-4</sup> 즉 제 1형 당뇨병을 대상으로 한 발표들이 대부분이었으며, 제 2형 당뇨병의 모델은 없었다.

그러나 임상적으로는 제 2형 당뇨병이 더욱 흔한 점과 당뇨망막병증이 장기간에 걸쳐 발병하는 당뇨 합병증임을 고려해 볼 때 제 1형 당뇨병 모델을 통한 당뇨망막병증 연구로는 한계가 있을 수밖에 없으며, 제 2형 당뇨병의 대상 모델이 필요하게 되었다. 이에 저자는 제 2형 당뇨병 환자의 병리학적 특징들과 매우 유사한 특징들을 가져 제 2형 당뇨병의 모델로 알려진 당뇨쥐(OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, Japan)를 대상으로,<sup>5</sup> 인간의 당뇨망막병증 연구의 모델로 적합한지 조사하였다.

### 대상과 방법

오츠카 제약회사(Otsuka pharmaceutical company, Japan)에서 분주되어 유전적으로 처리된 비인슐린성 당뇨병에 이환된 50주령의 당뇨쥐(OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, Japan)를 사용하여 망막조직을 관찰하였다.

OLETF 쥐 5마리와 대조군으로 LETO 쥐(Long-Evans Tokushima Otsuka) 5마리를 대상으로 생후 10주와 50주에 몸무게를 측정하고 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였으며, 50주령 때 모든 대상에서 안구적출 후 안구에서 공막을 포함하여 망막을 잘라서 망막 조직을 채취하였다. 채취한 조직을 2.5% glutaraldehyde로 전고정을 하였고, 1% osmium tetroxide를 이용해 후고정을 하였다. 고정이 끝난 조직들은 동일한

■ 접 수 일: 2009년 3월 12일 ■ 심사통과일: 2009년 9월 8일

■ 책임저자 엄 부 섭

부산시 서구 아미동 1가 10  
부산대학교병원 안과  
Tel: 051-240-7321, Fax: 051-242-7341  
E-mail: bsoum@pusan.ac.kr

\* 본 논문의 요지는 2008년 대한안과학회 제100회 추계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

\* 본 논문은 2004년도 부산대학교 의학연구소 연구비(2004-24)에 의해 연구되었음.

**Table 1.** Blood glucose level and body weight at 10- and 50-week-old OLETF\* and LETO† rats (Mean±SD)

	OLETF* (n <sup>‡</sup> =5)	LETO† (n <sup>‡</sup> =5)	p-value
10 weeks			
Body weight (g)	393.0±33.9	328.5±23.3	0.25
Blood glucose (mg/dl)	223.8±26.4	177.4±30.1	0.31
50 weeks			
Body weight (g)	783.5±35.2	622.0±23.7	<0.05
Blood glucose (mg/dl)	215.2±20.2	138.0±10.2	<0.05

\* OLETF=Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty; † LETO=Long-Evans Tokushima Otsuka; ‡ n=examined number of rats.

완충액으로 수세한 다음 알콜농도 상승 순으로 탈수하여 Epon 812 혼합액으로 포매하여 굳혔다. 포매가 끝난 조직들은 1 µm 두께로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 ultramicrotome (Leica, Reichert SuperNova, Germany)을 이용해 50~70 nm 두께의 초박절편을 얻어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과형 전자현미경 (JEM 1200EX-II, JEOL, Japan)으로 형태학적 변화를 관찰하였다.

모든 쥐에서 한 눈당 3개의 망막 조직 표본을 만들었으며, 투과형 전자현미경을 6000배로 하여 총 60개의 조직 표본을 관찰한 후, 외망상층에 존재하면서, 큰 혈관에 인접해 있는 모세혈관을 촬영하였다. 이 모세혈관들 중 Stitt et al<sup>6,7</sup>이 제시한 선별기준 즉, 혈관주위세포가 불연속적인 단일층을 이루고, 혈관 당 3개 미만의 혈관내피세포가 존재하는 모세혈관을 찾아, 각 군당 10개씩 총 20개를 다시 선별하였다. 모세혈관의 기저막의 두께와 혈관주위세포의 면적을 구하기 위해 Scion Image® (Scion Image Version Beta 4.0.2 for windows 95 to XP) 프로그램으로 각막 병변을 분석했던 다음의 방법을 사용하였다.<sup>8</sup>

우선 원활한 화상처리를 위해 Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA)으로, 흑백명암조정 (gray scale)을 이용한 변환과정을 거쳤다. 색은 Red (R), Green (G), Blue (B)에 의해 표시되며, Photoshop®의 채널을 이용하여 R, G, B 중 혈관주위세포가 가장 강조되는 채널을 선택한 후, 사진을 BMP 형식으로 저장했다. 그리고 Scion Image®에서 변환된 사진 파일을 열고, 진행메뉴(Process menu)의 도구 중 회선접촉장치(Apply LUT)를 선택하고, 선택메뉴(Options menu)의 명암단계(Density slice)를 선택하여 혈관주위세포가 붉게 염색되도록 조절했다. 그리고 도구막대(Toll bar)에서 선택범위를 택하여 혈관주위세포만을 둘러싼 후, 측정메뉴(Measurement options)의 면적(Area)를 선택하여 혈관주위세포의 면적을 산출했다. 또한 모세혈관 기저막 두께를 구하고자, 앞선 방법과 유사하게 Photoshop®으로 사진을 모세혈관 기저막이 가장 강조되게 변환한 후, 도구막대에서 길이 측정 도구를 선택하였다. 그 다음 모세혈관 전체에 걸쳐

약 12도 간격으로 기저막을 가로지르는 최단거리를 30번 측정하였으며, 사진 내에 있는 scale bar를 이용하여 사진에서의 계측 거리를 실제 거리로 환산하였다. 측정오차를 줄이기 위해 맹검법으로 시행되었으며, 30번 측정의 평균값을 해당 모세혈관의 기저막 두께로 정하였다.

앞서와 마찬가지로, 각 군당 30개의 망막 조직 표본을 만들었으며, 이중 조직상태가 양호한 20개의 조직을 골라, 총 40개의 조직을 대상으로 6000배의 배율에서 외과립층, 내과립층을 촬영한 후 20×20 µm의 크기 내에 포함된 세포수를 측정하여 밀도를 비교하였다. 또한 망막색소상피를 촬영한 후 모양을 관찰하고, scale bar를 이용하여, 가장 두꺼운 부분을 기준으로 망막색소상피세포의 두께와 모양을 관찰하고 기저 주름(basal infoldings)의 높이를 측정하였다.

기저막의 두께, 혈관주위세포의 면적, 내과립층과 외과립층의 세포밀도, 그리고 망막색소상피의 높이 비교를 위한 통계 분석은 SPSS 11.5 (SPSS inc., Chicago, IL) 프로그램을 이용하여 student t-test를 시행하였으며, p<0.05일 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

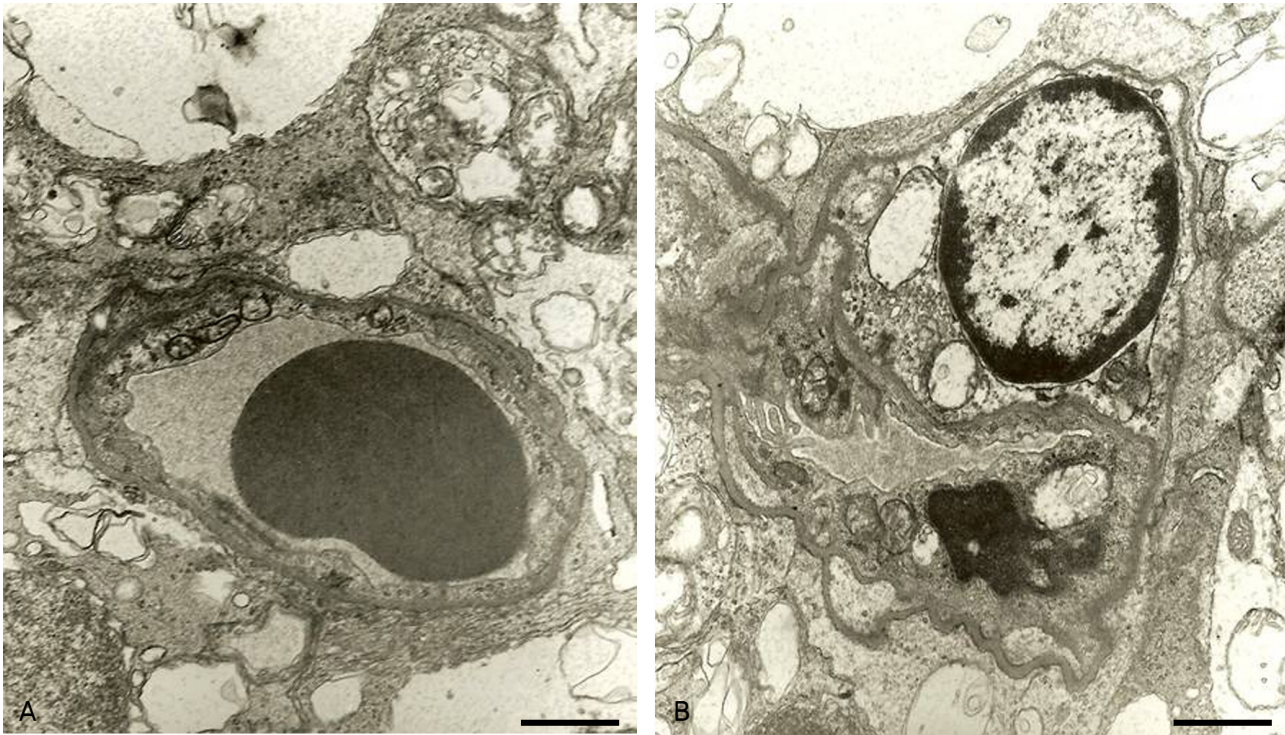
## 결 과

### 혈당과 체중

각각 5마리씩의 LETO 군과 OLETF 군의 10주째 평균 혈당은 각각 177.4 mg/dl, 223.8 mg/dl로 측정되었으며, 평균 체중은 328.5 g, 393 g으로 측정되었으며, 유의한 차이는 보이지 않았다. 50주째 측정된 평균 혈당은 LETO 군에서 138.0±10.2 mg/dl, OLETF군에서 215.2±20.2 mg/dl였고, 평균 체중은 LETO 군에서 622.0±23.7 g, OLETF 군에서 783.5±35.2 g로써 LETO 군에 비해 OLETF 군에서 혈당과 체중 모두가 유의하게 높게 측정되었다(p<0.05, Table 1).

### 전자현미경 소견

50주령의 OLETF 군의 망막 외망상층의 모세혈관에서,



**Figure 1.** Electron micrographs of the outer plexiform layer of a 50-week-old LETO (A) and OLETF rat (B). The basement membrane of the retinal capillary of the OLETF rat is thickened and the capillary lumen is narrow, tortuous and irregular. The cytoplasm of endothelial cells and pericytes of the OLETF rat are degenerated with increased vesicles and vacuoles in the cytoplasm, and vacuolated mitochondria. Bar=1  $\mu$ m (original magnification, A&B:  $\times$  8000)

LETO 군에 비해 기저막 두께가 전체적으로 두꺼워져 보였으며, 망막 모세혈관의 내경도 가늘어지고, 내면도 불규칙하고 거칠게 관찰되었으며 혈관내피세포와 혈관주위세포의 세포질 변성 또한 관찰되었다(Fig. 1). 각 군당 20개의 모세혈관에서 기저막 두께는 OLETF 군에서는 평균  $144.2 \pm 9.7$  nm, LETO 군에서는 평균  $122.4 \pm 10.2$  nm로, 혈관주위세포의 평균 크기는 OLETF 군의 경우  $5.53 \pm 3.31 \mu\text{m}^2$ , LETO 군은  $1.99 \pm 2.21 \mu\text{m}^2$ 로 LETO 군에 비해 OLETF 군에서 통계학적으로 의미 있는 증가를 보였다( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ , Table 2).

내과립층은 LETO 군에 비해 OLETF 군에서 1~2줄 줄어든 소견을 보였다(Fig. 2). 각 군당 20개의 조직에서 20  $\mu$ m

$\times 20 \mu\text{m}$  안에 세포수가 OLETF 군 평균  $8.5 \pm 0.40$ 개, LETO 군 평균  $12.0 \pm 0.56$ 개로 측정되어, 통계학적으로 유의한 세포 밀도의 감소를 보였다( $p = 0.008$ , Table 2). 외과립층의 시세포 역시 LETO 군에 비해 OLETF 군에서 2~4줄 감소하였다(Fig. 3). 시세포의 밀도도 20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 당 OLETF 군 평균  $36.5 \pm 0.64$ 개, LETO 군 평균  $42.0 \pm 0.55$ 개로 측정되어 OLETF 군에서 의미 있는 감소를 보였다( $p = 0.007$ , Table 2).

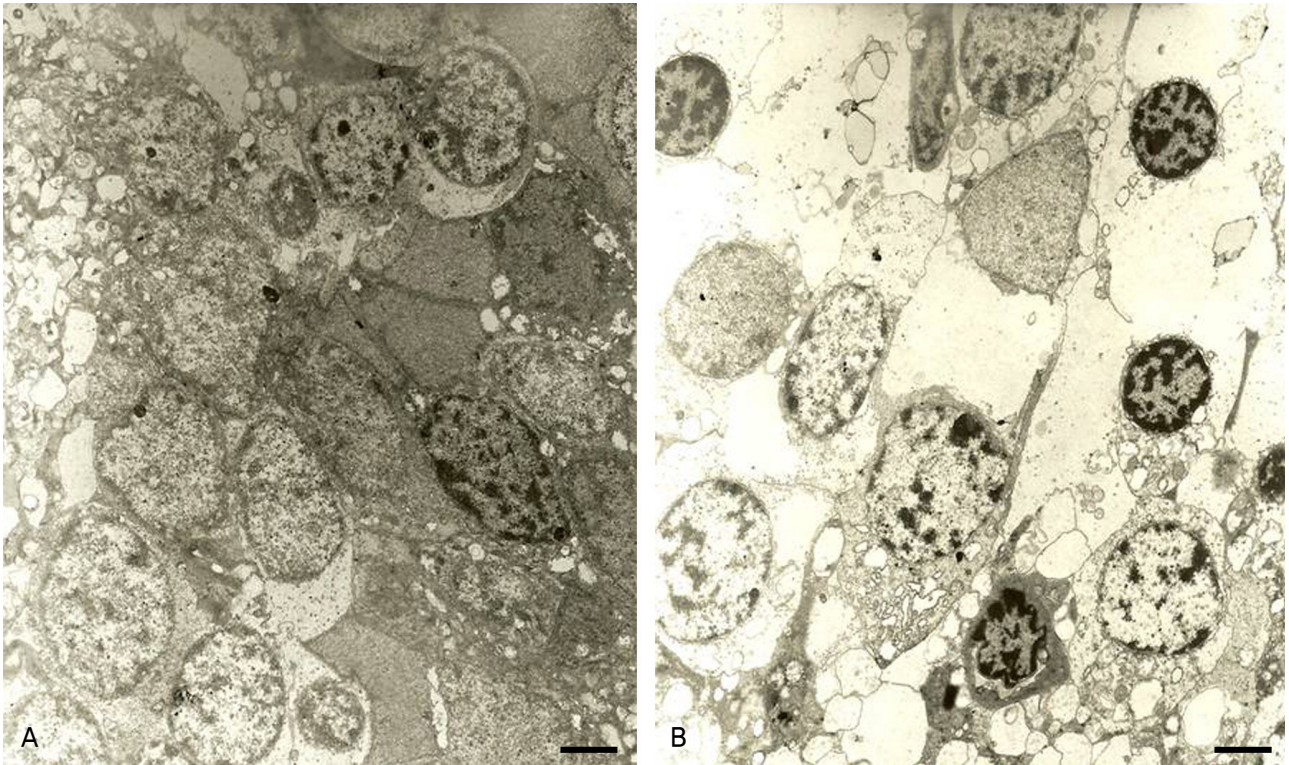
각 군당 20개의 조직을 관찰한 결과 망막색소상피의 높이는 OLETF 군에서 평균  $4.592 \pm 0.031 \mu\text{m}$ , LETO 군에서 평균  $5.121 \pm 0.056 \mu\text{m}$ 로 측정되어 통계학적으로 유의하지 않았다. 기저 주름의 높이는 OLETF 군에서  $0.527 \pm 0.035 \mu\text{m}$ , LETO

**Table 2.** Retinal structures of 50-week-old OLETF\* and LETO† rat groups (Mean $\pm$ SD)

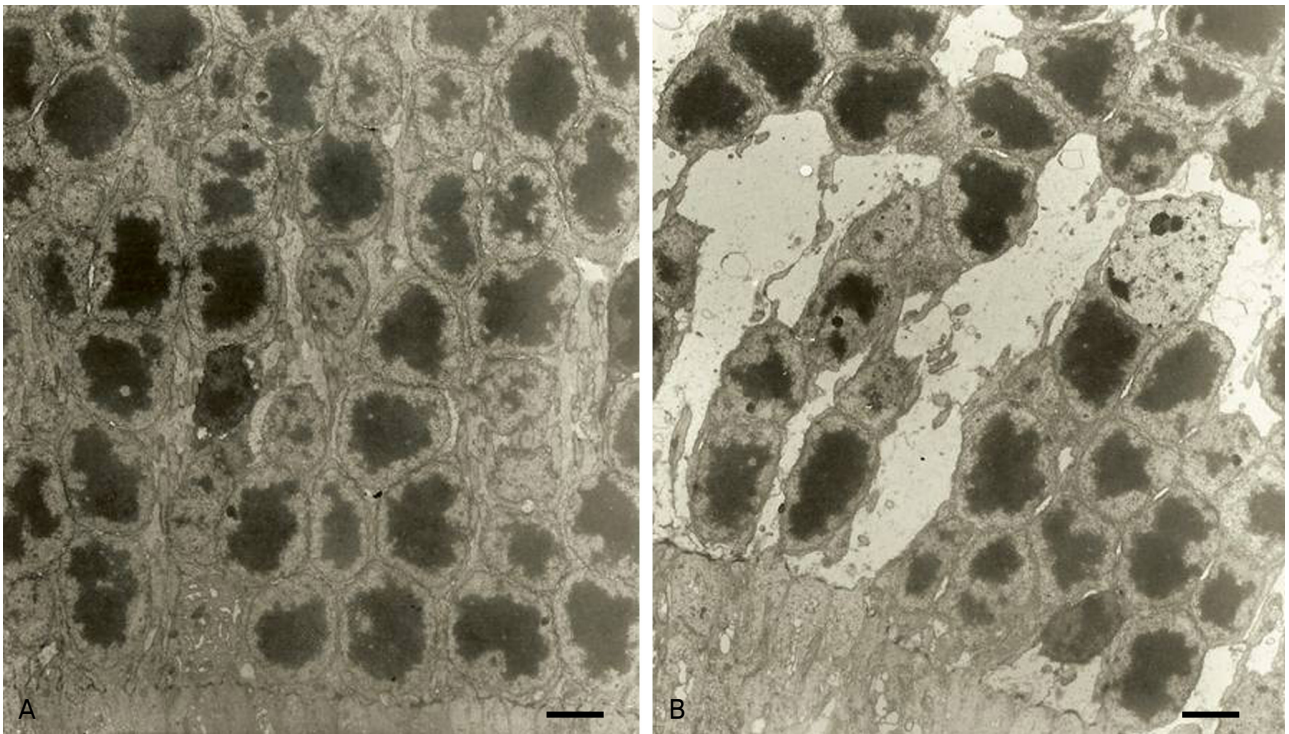
50-weeks-old rats	OLETF* (n <sup>‡</sup> =20)	LETO† (n <sup>‡</sup> =20)	p-value
The size of pericytes ( $\mu\text{m}^2$ )	$5.53 \pm 3.31$	$1.99 \pm 2.21$	<0.05
Retinal capillary BM <sup>§</sup> thickness (nm)	$144.2 \pm 9.7$	$122.4 \pm 10.2$	<0.001
Nuclei in INL <sup>  </sup> (number)	$8.5 \pm 0.40$	$12.5 \pm 0.56$	<0.01
Nuclei in ONL <sup>#</sup> (number)	$36.5 \pm 0.64$	$42.0 \pm 0.55$	<0.01
Height of RPE** Cells ( $\mu\text{m}$ )	$4.592 \pm 0.031$	$5.121 \pm 0.056$	0.16
Height of basal foldings ( $\mu\text{m}$ )	$0.527 \pm 0.035$	$0.884 \pm 0.021$	0.11

\* OLETF=Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty; † LETO=Long-Evans Tokushima Otsuka; ‡ n=examined number of specimens examined; § BM=basement membrane; || INL=inner nuclear layer; # ONL=outer nuclear layer; \*\* RPE=retinal pigment epithelium.



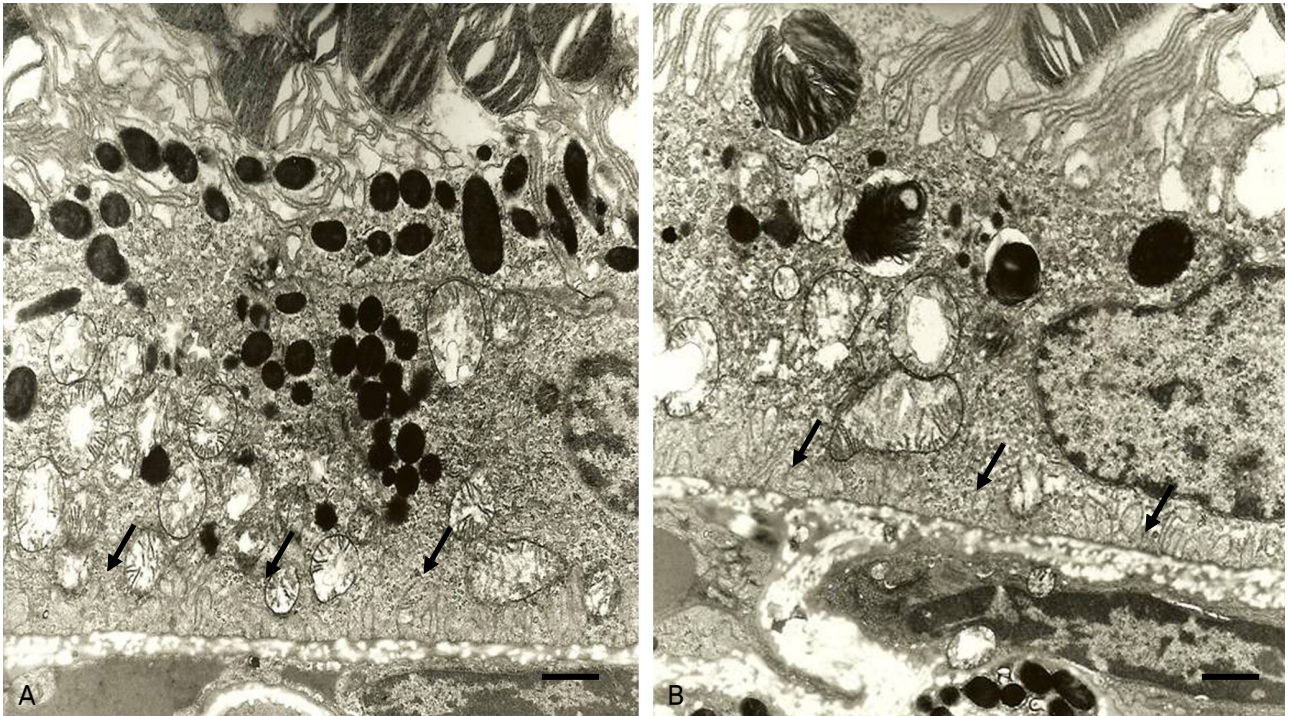


**Figure 2.** Electron micrographs of the inner nuclear layer of a 50-week-old LETO (A) and OLETF rat (B). A decrease in the cell density, degenerated cells and cell nuclei are observed in the inner nuclear layer of the OLETF rat. Bar=2  $\mu$ m (original magnification, A&B:  $\times 6000$ )



**Figure 3.** Electron micrographs of the outer nuclear layer of a 50-week-old LETO (A) and OLETF rat (B). A decrease in the cell density of the OLETF rat is observed. Bar=2  $\mu$ m (original magnification, A&B:  $\times 6000$ )





**Figure 4.** Electron micrographs of the retinal pigment epithelium containing the basal infoldings of a 50-week-old LETO (A) and OLETF rat (B). With a decrease in the height of RPE cells, basal infoldings (arrows) are poorly developed in the OLETF rat. Bar=2  $\mu$ m (original magnification, A&B:  $\times 6000$ )

군에서  $0.884 \pm 0.021 \mu\text{m}$ 로 측정되어 통계학적 의미는 없었다(Table 2, Fig. 4).

## 고 찰

당뇨망막병증 연구는 당뇨병에 이환된 사람을 대상으로 망막의 변화를 관찰하는 것이 가장 적합하나 용이하지 않아,<sup>9,10</sup> 다른 종인 개, 쥐 등의 동물을 대상으로 당뇨병을 유발시켜 망막 조직의 변화를 관찰하여 보고한 경우들이 많다.<sup>11,12</sup> 이전에 사용되던, 갈락토스로 당뇨병이 야기된 쥐,<sup>11</sup> 스트렙토조신으로 당뇨병이 야기된 쥐<sup>6,13</sup>는 당뇨병의 시작이 빠르고 생존기간이 짧아서, 인간의 당뇨병을 정확히 재생할 수 없었을 뿐 아니라 당뇨망막병증을 나타낸 경우는 드물어 고혈당의 효과 및 약의 영향 등을 정확히 알 수 없었다. 또한 쥐를 제외하고 당뇨병을 유발시킨 동물들 중 개나 고양이와 같이 큰 동물은 오랫동안 사육하기가 쉽지 않아 만성 당뇨 합병증인 당뇨망막병증의 연구에 적합치 않았다. 이와는 달리, 본 실험에서 사용된 OLETF 쥐는 일본의 Otsuka 제약회사에서 분주된 당뇨쥐로, 고혈당이 늦게 시작되고(출생 18주 이후) 비만이 경미하고, 인슐린 치료 없이 장기간 생존 가능하여 질병이 만성적인 경과를 가지며, 남성유전(male inheritance), 이자섬(pancreatic islets)의 증식성

중심(hyperplastic focus)이 있으며, 콩팥에서 결절모양(nodular lesion)을 보이는 특징들이 있으며, 이는 사람의 제 2형 당뇨병과 아주 유사하다고 알려져 있다.<sup>5</sup> 이와 같이, 만성 당뇨합병증 연구의 좋은 모델이 되는 OLETF 쥐를 이용한 당뇨망막병증에 대한 연구가 빈약하여 본 연구를 시행하게 되었다. 이번 연구에서 10주령 LETO 쥐는 혈당과 체중에서 유의한 차이를 보이지 않았으나 50주령의 경우 혈당과 체중 모두에서 유의한 차이를 나타낸 것으로 보아, OLETF 쥐가 만성적인 경과를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 이때 발생한 당뇨망막병증의 조직 변화를 관찰하였다.

모세혈관의 형태 변화가 가장 특징적인 당뇨망막병증의 초기 변화 중 하나로 알려져 있다. 모세혈관벽은 한 층의 혈관 내피세포와 그 바깥을 싸고 있는 혈관주위세포로 구성되어 있는데, 당뇨망막병증의 진행에 따라 혈관주위세포가 소실되면 모세혈관류 형성, 동정맥문합이 조장되며, 혈관내피세포의 기저막 장애가 발생하면 적절한 장벽 역할을 못하게 되어 망막 부종 및 망막 출혈이 발생하게 된다.<sup>14</sup>

Anderson et al<sup>7</sup>은 스트렙토조신으로 당뇨병을 발생시킨 지 12개월만에 관찰한 당뇨망막병증 쥐에서 모세혈관 기저막이 두꺼워졌음을 보고하였으며, Cho and Lee<sup>14</sup>는 스트렙토조신을 이용하여 고혈당 유발 3개월, 7개월에 두꺼워진 모세혈관 기저막, 내피세포 세포질의 변성 등의 관찰을, Lee

et al<sup>15</sup>은 그 보다 빠른 8주만에 이러한 초기 망막변화가 관찰되었다고 보고하였다. 또한 Fisher에 따르면 스토폴토신으로 유발시킨 당뇨쥐에서 12개월까지 관찰해본 결과, 기저막은 두꺼워졌으며 보다 큰 혈관주위세포의 수가 증가했다고 보고하였으며, 이러한 혈관주위 세포의 비대는 두꺼워진 기저막, 혈관주위세포소실 및 모세혈관벽 약화에 따른 보상작용에 의한 것이라고 주장하였다.<sup>16</sup> 이러한 제 1형 당뇨병 모델의 당뇨 망막 변화뿐 아니라, 제 2형 당뇨병 모델로 알려진 OLETF 쥐를 이용한 Miyamura et al<sup>17</sup>의 모세혈관 관찰 연구에 따르면, 14달째 관찰 결과 모세혈관의 내경이 가늘어지고 불규칙하며, 기저막이 두꺼워지고 내피세포의 세포질이 변성되었다고 보고된 바 있다. 이러한 모세혈관 변화들은, 이번 연구에서 관찰되는 모세혈관의 형태변화 즉 두꺼워진 기저막 및 혈관주위세포의 크기 증가와 유사한 결과를 보여, OLETF 쥐가 당뇨망막병증 연구에 좋은 모델이 될 수 있음을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 본 연구에서는 OLETF 쥐와 관련된 앞선 보고들과는 달리 조금 더 빠르게 50주에 유사한 형태변화가 이미 관찰되었으며, 이는 당뇨망막병증의 특징적인 초기 변화에 해당되므로, 제 2형 당뇨병의 만성당뇨합병증에 좋은 모델로 알려진 OLETF 쥐가 초기 당뇨합병증 연구에도 사용될 수 있음을 시사한다. 그러나 Matsuura et al<sup>18</sup>은 45주령의 OLETF 쥐와 LETO 쥐의 조직학적 비교 연구 결과 초기 당뇨망막병증 변화인 모세혈관과 혈관주위세포의 퇴화 등의 차이가 없음을 관찰하여 혈관병리학적(angiopathic) 당뇨망막병증 연구에는 적합하지 않은 모델이라 주장하였다. 본 연구는 50주령의 쥐를 대상으로 하였을 때 망막의 변화를 관찰하였고 혈관주위세포의 퇴화가 아니라 기저막 비대에 따른 보상작용으로서의 혈관주위세포의 비대를 확인하였으므로, 주수의 차이 및 관찰대상의 차이를 고려해 볼 때, OLETF 쥐가 당뇨망막병증의 초기 혈관변화를 연구하는 데 유용할 수 있으리라 사료된다.

이러한 모세혈관의 변화 외에도 Lu et al<sup>12</sup>에 따르면 OLETF 쥐에서 17달째에 내과립층에서 세포밀도가 감소하였고, 외과립층에서 시세포의 핵이 감소하였고, 망막색소상피의 높이와 기저 주름이 감소되었다고 보고하였으며, 이와 같은 결과가 본 연구에서는 타 연구 결과들에 비해 조금 더 빠른 50주령 OLETF 쥐에서 확인하였다. Lu et al의 연구와 달리 본 연구에서는, 망막색소상피의 높이와 기저 주름 감소가 LETO 군과 OLETF 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, 본 연구의 개체수가 부족한 점을 고려해 볼 때, 두꺼워진 기저막의 기능 저하, 혈관주위세포의 변성 및 위축, 시세포와 관련 세포들의 밀도 감소, 그리고 시세포를 지지하는 망막색소상피의 변화까지 모두 당뇨망막병증을 대변하는 일련의 의미 있는 변화라고 생각해 볼 수 있을 것이다. 또한 이전

의 보고들에 비해 빠른 시기에 이러한 변화가 나타났다는 점도 고려해 볼 때, OLETF 쥐가 초기 당뇨합병증의 변화 관찰에 유용한 종이라고 사료된다.

당뇨병 환자를 대상으로 망막에 형태학적 이상이 없는 경우에도, 망막전위도 검사와 암순응 반응의 장애를 나타낸다는 보고들이 있었으며, 이런 이상은 시세포, 두극세포, 무축삭세포 기능의 이상을 의미한다고 하였다.<sup>19,20</sup> Shirao et al<sup>21</sup>은 OLETF 쥐를 대상으로 유사한 실험을 한 결과, 50주째 형태적으로 망막의 이상을 찾을 수 없었지만, 진동소파전위(oscillatory potential)가 연장되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 광학 현미경이 아닌, 투사전자현미경을 통해 50주령의 OLETF 쥐에서 내과립층 및 외과립층의 세포 밀도 감소인 형태학적 이상을 직접 확인할 수 있었다. 하지만 신경생리검사를 동반 시행하지 못하여 이전의 연구들과 직접적인 비교가 힘들긴 하나, 이러한 초기 형태학적인 변화가 진동소파전위의 연장을 비롯한 당뇨망막병증의 기능 저하의 원인이 될 수 있을 거라 사료된다.

이전 연구들과 비교하여 개체수가 적다는 문제점, 투사전자현미경을 통해 촬영한 일부의 단면적으로 혈관주위세포의 면적을 측정하였으므로, 혈관주위세포 전체 변화를 반영하기 힘들 수도 있다는 점, 혈관 변화와 동반이 잘 되는 경성삼출물이나 출혈 등은 확인되지 않았다는 점, 신경생리검사를 같이 시행하지 못하여 형태학적 변화와 기능적 변화의 상관관계를 알아보지 못했다는 점이 본 연구의 제한점이 될 수 있다. 하지만 모세혈관, 내과립층, 외과립층, 망막색소상피까지 망막 전층의 당뇨망막변화를 확인하였으며 그 변화를 다른 보고들보다 빠른 50주령의 쥐에서 관찰했다는 점과, 저자가 아는 한 최초로 투사전자현미경을 통해 직접 혈관주위세포의 면적을 측정한 점, 또한 셀로판지 등이 아닌 Scion Image<sup>®</sup>의 디지털 영상을 이용해 보다 정확하고 쉽게 모세혈관 기저막 두께, 혈관주위세포 면적을 측정하였다는 점을 저자는 강조하고자 한다. 그리고 46~48주령으로 본 연구보다 나이가 적은 OLETF 쥐의 망막 혈관의 변화를 찾아보는 추가 연구를 통해 OLETF 쥐가 혈관관련 초기 당뇨망막병증 연구에 유용한지 확인할 필요가 있다고 생각한다.

다른 방법의 당뇨 유발쥐와 달리, OLETF 쥐는 제 2형 당뇨병의 당뇨합병증 연구의 좋은 동물모델이 될 수 있음을 확인하였으며, 나이가 비교적 빨리 50주령에 초기의 당뇨망막병증 형태변화가 이미 관찰되었으므로 초기 당뇨합병증 연구에도 유용함을 확인하였다.

## 참고문헌

- 1) Yoon YH. The mechanism of diabetic retinopathy, Retina, 2nd ed.

- Seoul: The Korean retina society, 2008;487-96.
- 2) Gardiner TA, Stitt AW, Anderson HR, Archer DB. Selective loss of vascular smooth muscle cells in the retinal microcirculation of diabetic dogs. *Br J Ophthalmol* 1994;78:54-60.
  - 3) Buchi ER, Kurosawa A, Tso MO. Retinopathy in diabetic hypertensive monkeys: a pathologic study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:388-98.
  - 4) Kern TS, Engerman RL. A mouse model of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1996;114:986-90.
  - 5) Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992;41:1422-8.
  - 6) Stitt AW, Anderson HR, Gardiner TA, Archer DB. Diabetic retinopathy: quantitative variation in capillary basement membrane thickening in arterial or venous environments. *Br J Ophthalmol* 1994;78:133-7.
  - 7) Anderson HR, Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB. Diabetic retinopathy: morphometric analysis of basement membrane thickening of capillaries in different retinal layers within arterial and venous environments. *Br J Ophthalmol* 1995;79:1120-3.
  - 8) Lee JS, Kim HK, Jung JH, Bae H. Analysis of corneal lesion using Scion Image<sup>®</sup>. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:1437-41.
  - 9) Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961;66:366-78.
  - 10) Stitt AW, Gardiner TA, Archer DB. Histological and ultrastructural investigation of retinal microaneurysm development in diabetic patterns. *Br J Ophthalmol* 1995;79:362-7.
  - 11) Engerman RL, Kern TS. Hyperglycemia as a cause of diabetic retinopathy. *Metabolism* 1986;35:S20-3.
  - 12) Lu ZY, Bhutto IA, Amemiya T. Retinal changes in Otsuka long-evans Tokushima fatty rats (spontaneously diabetic rat)-possibility of a new experimental model for diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47:28-35.
  - 13) Robison WG, Nagata M, Tillis TN, et al. Aldose reductase and pericyte-endothelial cell contacts in retina and optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2293-9.
  - 14) Cho HK, Lee DH. Ultrastructural changes of the retinal capillary basement membrane in the streptozotocin-induced diabetes rats. *J Korean Ophthalmol Soc* 1995;36:1473-80.
  - 15) Lee DC, Chang MH, Choi WS. An ultrastructural study on the early morphologic changes of the retina in the streptozotocin-induced diabetes rats. *J Korean Ophthalmol Soc* 1999;40:1884-92.
  - 16) Fisher RF. Comparison of the size of pericytes of the retinal capillaries in the normal and diabetic state. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1980; 100:90-5.
  - 17) Miyamura N, Bhutto IA, Amemiya T. Retinal capillary changes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats (spontaneous diabetic strain). Electron-microscopic study. *Ophthalmic Res* 1999;31:358-66.
  - 18) Matsuura T, Yamagishi S, Kodama Y, et al. Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat is not a suitable animal model for the study of angiopathic diabetic retinopathy. *Int J Tissue React* 2005; 27:59-62.
  - 19) Yonemura D, Aoki T, Tsuzuki K. Electroretinogram in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1962;68:19-24.
  - 20) Amemiya T. Dark adaptation in diabetes. *Ophthalmologica* 1977; 174:322-6.
  - 21) Shirao Y, Segawa Y, Higashide T, et al. Biochemical and electrophysiological alterations in the OLETF rat retina. In: Shima K, ed. Obesity and NIDDM: Lessons from the OLETF rat. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1999; v. 3. chap. 15.

=ABSTRACT=

## Ultrastructural Investigation of the Retinal Changes in Diabetic Rat (OLETF)

Jun Mo Park, MD<sup>1</sup>, Ji Eun Lee, MD, PhD<sup>2</sup>, Boo Sup Oum, MD, PhD<sup>2</sup>

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Yangsan Pusan National University<sup>1</sup>, Yangsan, Korea

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Pusan National University<sup>2</sup>, Busan, Korea

**Purpose:** To compare retinal ultra-structures of diabetic rats (OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) with those of age-matched non-diabetic rats (LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka) using transmission electron micrography (TEM).

**Methods:** The body weights and blood sugar levels of the OLETF rats and LETO rats (n=5) were measured at 10 and 50 weeks of age. Using a TEM, we compared the ultra-structural changes between the retinas of the 50-week-old OLETF and LETO rats. We analyzed the sizes of the pericytes and the thicknesses of the retinal capillary basement membranes between the two groups. Comparisons were made using a Scion Image<sup>®</sup>.

**Results:** The mean body weight and blood sugar levels of the 50-week-old OLETF rats were significantly higher than those of the LETO rats ( $p<0.05$ ). The thicknesses of the retinal capillary basement membranes in the outer plexiform layer and the size of pericytes were significantly increased in the OLETF rats at 50 weeks of age ( $p<0.05$ ). The number of nuclei in the inner nuclear layer and the outer nuclear layer (photoreceptor cell nuclei) significantly decreased ( $p<0.05$ ). However, the height of the RPE cells and basal in-foldings showed no significant differences between the OLETF and LETO rats.

**Conclusions:** The retinal changes in the OLETF rats were observed relatively early at 50 weeks of age. These changes are similar to those seen in human diabetic retinopathy. Change in the capillaries is one feature of early retinal change. OLETF rats may be a useful animal model in NIDDM to examine diabetic retinal changes.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(1):112-119

**Key Words:** Diabetic retinopathy, Electron microscopy, OLETF rat, Scion Image<sup>®</sup>, Spontaneously diabetic animal model

---

Address reprint requests to **Boo Sup Oum, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital

#10 1-ga Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea

Tel: 82-51-240-7321, Fax: 82-51-242-7341, E-mail: bsoum@pusan.ac.kr