

Diabetik Retinopati ve Oksidatif Stres

Diabetic Retinopathy and Oxidative Stress

Nil İrem UÇGUN¹, Alev YARIŞAN², Övünç DÜZGÜNÇİNAR³, Emin GÜRSEL⁴

ÖZ

Amaç: Diabetik retinopati ilerlemesinde oksidatif stresin etkisini incelemek.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 25 proliferatif diabetik retinopatili hasta (PDR grubu), 25 nonproliferatif diabetik retinopatili hasta (NPDR grubu) ve 25 diabetik olmayan sağlıklı birey (kontrol grubu) olmak üzere toplam 75 kişi dahil edildi. Tüm bireylerden ven kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinde trigliserit, total kolesterol, HDL, LDL ve VLDL kolesterolleri, lipid peroksitleri (tiyobarbitürik asit türevleri= TBARS) eritrosit glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ve HbA1C çalışıldı. Ayrıca PDR grubu ve NPDR grubu hastalarında total antioksidan status çalışıldı.

Bulgular: Serum total kolesterol, LDL ve HDL kolesterol seviyelerinde her 3 grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$). Serum VLDL kolesterol ve trigliserit seviyeleri PDR grubunda kontrol grubundan yüksekti ($p=0,001$). Serum TBARS seviyeleri PDR ve NPDR gruplarında kontrol grubundan yüksekti ($p<0,05$). Grupların hiçbirinde plazma TBARS seviyeleri ile serum lipidleri arasında ilinti saptanmadı. Eritrosit katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyeleri açısından her 3 grup arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Total antioksidan durum düzeyleri PDR grubunda NPDR grubuna göre yüksekti. HbA1C düzeyleri PDR ve NPDR gruplarında kontrol grubundan yüksekti ($p<0,001$).

Sonuç: Diabetik hastalarda serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunması arasında oluşan dengesizliğin diabetik retinopatinin ilerlemesinde rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Diabetik retinopati, oksidatif stres, total antioksidan durum, lipid peroksidasyonu.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate efficiency of oxidative stress in the progression of diabetic retinopathy.

Materials and Methods: Twentyfive patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR group), 25 patients with nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR group) and 25 nondiabetic healthy subjects (control group) were included in the study. Fasting venous blood samples were collected from all subjects. Serum samples were analyzed for triglycerid, total cholesterol, HDL, LDL and VLDL cholesterol, lipid peroxides (thiobarbituric acid substances=TBARS), erythrocyte glutathione peroxidase and catalase activities and HbA1C. However Total antioxidant status was also studied in patients with PDR and NPDR.

Results: There was no statistically difference significant between 3 groups for total cholesterol, LDL and HDL cholesterol levels ($p>0,05$). Serum VLDL cholesterol and triglycerid levels were elevated in PDR group compared with control group ($p=0,001$). Serum TBARS level were higher in PDR and NPDR groups than control group ($p<0,05$). There was no correlation between TBARS and lipid levels in all groups ($p>0,05$). Total antioxidant status levels were higher in PDR group than NPDR group ($p<0,05$). HbA1C levels were elevated in diabetic patients compared with control subjects ($p<0,001$).

Conclusion: Free radical generation and antioxidant defense imbalance may play a role in the progression of diabetic retinopathy.

Key Words: Diabetic retinopathy, oxidative stress, total antioxidant status, lipid peroxidation.

Ret-Vit 2005;13: 299-302

Geliş Tarihi : 14/06/2005

Kabul Tarihi : 22/08/2005

Received : June 14, 2005

Accepted: August 22, 2005

- 1- ANEAH 2. Göz Kliniği, Başasistanı, Ankara, Op. Dr.
- 2- ANEAH 2. Göz Kliniği, Ankara, Asist. Dr.
- 3- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D., Ankara, Asist. Dr.
- 4- ANEAH 2. Göz Kliniği, Ankara, Doç. Dr.

- 1- M.D. Ankara Numune Education and Research Hospital Sıhhiye Ankara/TURKEY UÇGUN N.İ., nilirem@superonline.com
- 2- M.D. Ankara Numune Education and Research Hospital Sıhhiye Ankara/TURKEY YARIŞAN A., alev977@yahoo.com
- 3- M.D. Hacettepe University Medical Faculty Biochemistry Department Sıhhiye Ankara/TURKEY DÜZGÜNÇİNAR Ö., drodc@yahoo.com
- 4- M.D. Associate Proffessor, Ankara Numune Education and Research Hospital Sıhhiye Ankara/TURKEY GÜRSEL E.,

Correspondence: M.D. Nil İrem UÇGUN

Ankara Numune Education and Research Hospital Sıhhiye Ankara/TURKEY

GİRİŞ

Oksidatif doku ve organ hasarı diabette ve komplikasyonlarında rol oynar. Diabetik retinopati oluşumunda ve proliferatif evreye geçişte artmış oksidatif alanlar (oksidatif stres) veya iskemi ve reperfüzyon hasarı etkilidir. Ayrıca diabetik hastalarda antioksidan koruyucu sistemde de kusur vardır^{1,2}.

Serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu hücre hasarının en önemli sebeplerinden biridir. Serbest oksijen radikalleri (öncelikle süperoksit (O_2^-), hidroksil radikal (OH) ve nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi) reaktif oksijen alanlarında aerobik metabolizma sırasında fizyolojik şartlar altında oluşur. Oksijen radikallerinin üretimi artmışsa veya hücrel antioksidan savunma sisteminde kusur varsa proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile tepkiye girerek hücrede işlev bozukluğuna sebep olurlar^{3,4}.

Diabetes mellitusta serbest radikal aktivitesinde artış olduğunda ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların sıklığında artış gözlenmektedir. Lipid peroksitler (TBARS) serbest radikaller ile oluşur ve aterosklerotik damar hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynarlar. Diabetik hastalarda hiperglisemi ve hiperlipidemi ile TBARS seviyeleri arasında ilişki vardır^{5,6}.

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehid (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır³.

Çalışmamızda diabetik retinopati üzerine lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin etkili olup olmadığını incelemeyi dolayısıyla antioksidan replasman tedavilerinin gerekip gerekmediğini saptamayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza kliniğimiz retina biriminde takip edilen 25 proliferatif diabetik retinopatili hasta (PDR grubu), 25 nonproliferatif diabetik retinopatili hasta (NPDR grubu) ve polikliğimize refraksiyon muayenesi için başvuran diabetik olmayan sağlıklı 25 birey (kontrol grubu) dahil edildi. Koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalıklar gibi diabetes mellitusun makrovasküler komplikasyonlarına sahip olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Antioksidan vitamin ve mineral takviyesi alanlar, lipid düşürücü ilaçlar kullananlar çalışmamıza alınmadı.

Diabetik retinopatili hasta grubunun evrelendirilmesinde diabetik retinopati erken tedavi çalışma grubunun (ETDRS) kriterleri kullanıldı⁷.

Çalışmaya dahil edilen tüm kişilere Snellen eşeli ile görme keskinliği muayenesi, biyomikroskop ile ön segment ve 90 diyoptrilik lensle genişletilmiş pupil ile fundus muayenesi, applanasyon tonometresiyle göziçi basınç ölçümü yapıldı. Gerekğinde bazı hastalara fundus flöresein anjiyografi uygulandı. Her 3 gruptan oniki saatlik açlığı takiben antekubital venöz kan örnekleri alındı. Ör-

nekler çalışılana dek $-70^{\circ}C$ deki dondurucuda muhafaza edildi.

Serbest radikallerin, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu arttırması sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbitürik asit yöntemi ile ölçülerek lipid peroksidasyonu tayin edildi. Metod, yağ asitlerinin peroksidasyonunda bir son ürün olan MDA in tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümde maksimum absorbans vermesi ilkesine dayanır.

Glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik ölçüm ile tesbit edildi (UV 1601-Shimadzu).

Total antioksidan status tayini otoanalizatörde (Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA) total antioksidan status kiti (Bioxytech AOP-490) ile tayin edildi. Kit teminindeki sıkıntılar nedeniyle bu ölçüm yalnız NPDR ve PDR gruplarında yapıldı.

Trigliserit düzeyleri kolorimetrik enzimatik test ile otoanalizatörde (Hitachi 902) lipoprotein lipaz enziminin katalize ettiği reaksiyon ile ölçüldü. Kolesterol düzeyleri ise aynı yöntemle kolesterol esteraz enziminin katalize ettiği reaksiyon ile ölçüldü.

HbA1C düzeyleri, otoanalizatörde (Hitachi 902), HbA1C kiti (Roche) kullanılarak tesbit edildi.

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma tek yönlü varyans analizi testi (ANOVA) ile yapıldı. Varyans homojenliği sağlanmadığı için ANOVA testi yapılamayan HbA1C ve total kolesterol parametreleri için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Ayrıca T-test ve Ki-kare testlerinden de yararlanıldı.

BULGULAR

Proliferatif diabetik retinopati (PDR) grubunun yaşları 40-72 (ortalama $57,32 \pm 8,6$), nonproliferatif diabetik retinopati (NPDR) grubunun yaşları 40-80 (ortalama $60,16 \pm 9,5$) ve kontrol grubunun yaşları 40-77 (ortalama $62,8 \pm 12,5$) arasında değişmekte idi. 3 grup arasında yaş açısından istatistiksel farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

PDR grubunda 16 erkek (%64), 9 kadın (%36) NPDR grubunda 8 erkek (%32), 17 erkek (%68) hasta kontrol grubunda 12 erkek (%48), 13 kadın (%52) mevcuttu. Gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Hipertansiyon, PDR grubunda 11 hastada (%44) varken NPDR grubunda 13 hastada (%52) mevcuttu ($p > 0,05$). Başka sistemik hastalık saptanmadı.

PDR grubunda 13 hasta (%52) insülin, 12 hasta oral antidiabetik (%48) kullanıyordu. NPDR grubunda ise 6 hastada (%24) insülin, 19 hastada (%76) oral antidiabetik kullanımı vardı. Bu iki grup arasında ilaç kullanımı açısından fark yoktu ($p > 0,05$).

Her üç grup için kan HbA_{1c}, Trigliserid, HDL, LDL, VLDL, total kolesterol, TBARS, GPx, katalaz ve total antioksidan status ortalama seviyeleri tablo 1'de gösterilmiştir. HbA_{1c} seviyeleri PDR ve NPDR gruplarında kontrol grubundan yüksekti ($p < 0,001$).

Trigliserit ve VLDL düzeyleri PDR ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmada farklıydı ($p = 0,001$). Total kolesterol HDL ve LDL seviyeleri her 3 grupta birbirinden

	PDR grubu (n=25)	NPDR grubu (n=25)	Kontrol grubu (n=25)	P
Total Antioksidan Status (mMÜrik Asit)	0,41 ± 0,1	0,36 ± 0,7	-	P<0,05
GPX (U/mgHb)	0,050 ± 0,02	0,061 ± 0,02	0,063 ± 0,03	P> 0,05
Katalaz (U/mgHb)	0,160 ± 0,06	0,164 ± 0,07	0,194 ± 0,07	P> 0,05
TBARS (mmol/grHb)	1,78 ± 0,3	1,34 ± 0,5	0,05 ± 0,5	P< 0,05
Trigliserid (mg/dl)	2,28 ± 0,2	2,17 ± 0,2	2,06 ± 0,1	P=0,001
Total kolesterol (mg/dl)	202,8 ± 48,3	200,48 ± 46,8	180 ± 80 ± 17,14	P> 0,05
HDL (mg/dl)	40,44 ± 8,5	45,2 ± 9,6	41,6 ± 8	P>0,05
LDL (mg/dl)	113,52 ± 34,7	122 ± 38,3	120,76 ± 20,6	P>0,05
VLDL (mg/dl)	1,61 ± 0,2	1,47 ± 0,2	1,3 ± 0,2	P=0,001
HbAlc (gr/dl)	8,11 ± 1,9	8,84 ± 2,2	6,0 ± 0,3	P<0,001

Tablo 1: Çalışılan verilerin ortalama serum seviyeleri.

farklı değildi ($p>0,05$). TBARS seviyeleri incelendiğinde NPDR grubunda kontrol grubundan yüksekti ($p<0,05$). PDR grubuna ait plazma TBARS seviyeleri hem NPDR hem de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0,05$). Grupların hiçbirinde plazma TBARS seviyeleri ile serum lipidleri arasında ilişki saptanmadı. Eritrosit GPx katalaz aktiviteyi her 3 grupta farklı değildi ($p>0,05$). Total antioksidan status PDR grubunda NPDR grubundan istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0,05$, $p=0,041$). Ayrıca istatistiksel incelemede glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri arasında pozitif yönde %45'lik bir ilişki saptandı ($p=0,023$).

TARTIŞMA

Doku hasarının miktarı oluşan serbest radikaller ile antioksidan koruyucu sistem arasındaki dengeye bağlıdır. Serbest radikal hasarından koruyucu savunma vitamin E, vitamin C, beta-karoten, glutatyon, ürik asit, bilirubin ve çeşitli metaloenzimler; glutatyon peroksidaz (selenyum), katalaz (demir) ve superoksit dismutaz (bakır, çinko, manganez) ve örneğin seruloplazmin (bakır) gibi bazı proteinleri içerir^{8,9}. Bu savunma sistemi yeterli olmadığına lipid peroksidasyonu başlaması halinde, düşük molekül ağırlıklı serbest radikal temizleyiciler, yağ asitleri yerine kendileri yükseltgenerek, reaksiyonların oluşmasını önlerler⁴. Vitamin E ve beta-karoten lipofilik moleküller olup radikallerle reaksiyona girerek biyolojik membranları lipid peroksidasyonundan korurlar. Vitamin C, glutatyon, ürik asit ve bilirubin gibi non-enzimatik antioksidanlar ise sitoplazmik yerleşimlidir^{8,10}.

Bazı çalışmalarda bizimkinde olduğu gibi diabetik hastalarda eritrosit GPx aktivitesiyle diabetik retinopatinin evresi arasında ilişki saptanmamıştır¹¹⁻¹³. Kesavulu ve ark.⁵ GPx aktivitesini mikrovasküler komplikasyonu olan diabetiklerde daha düşük bulmuşlardır.

Eritrosit katalaz aktivitesinde diabetik hasta ve kontrol gruplarında farklı olmadığını bildirenler vardır¹⁴. Bununla birlikte eritrosit katalaz aktivitesinde azalmanın olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur^{3,5}. Biz gruplar arasında katalaz açısından fark saptamadık.

Diabette artmış lipid peroksidasyonunun nedenleri glukoz ve glikolize proteinlerin ootoksidasyonu sonucu artmış reaktif oksijen ürünleri ve enzimatik olmayan an-

tioksidanların azalmasıdır. Ek olarak hiperglisemi trioz-fosfat oluşumunu arttırmaktadır. Trioz-fosfat oksidasyonu ile alfa oxoaldehid ve hidroksiperoksit gibi iki serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri kan hücrelerine, membran lipid ve proteinlerinin çapraz bağlarına oksidatif hasar verir ve bu da hücre yaşlanmasına yol açar¹⁵. Hücresel yapıların serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşen lipid peroksidasyonu yaşlanmada, aterosklerozda ve diabetin geç komplikasyonlarında rol oynar¹⁴. Lipid peroksidasyon ürünleri tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) olarak ölçülmektedir¹⁶.

Çalışmamızda bu bilgilerle uyumlu olarak TBARS seviyesi en yüksek PDRP grubunda bulundu. Kontrol grubunda ise en düşük seviyeyeydi. NPDR grubunun diğer iki gruba arasındaki fark da anlamlıydı.

Bazı araştırmacılar kolesterol, trigliserid ve TBARS arasında ilişki bildirirken⁴, bazıları bu ilişkiyi reddetmektedirler¹⁷. Bizim sonuçlarımıza göre serum lipidleri ile TBARS seviyeleri arasında ilişki yoktu. Ancak serum VLDL kolesterol ve trigliserit seviyelerinin PDR grubunda kontrol grubundan yüksek olduğu saptandı.

Bizim çalışmamızı diğerlerinden ayıran önemli bir fark da NPDR ve PDRP gruplarını total antioksidan status açısından karşılaştırmamızdır. Çalışmamızda total antioksidan status PDR grubunda NPDR grubundan anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. Literatürde bazı çalışmalar diabetik hastaların antioksidanlara ihtiyaçlarının arttığını göstermektedir^{10,12}. Artan ihtiyacı karşılamak için bazı antioksidan ajanlar azalırken diğerleri bu olayı telafi etmek için artmaktadır. Sonuçlarımızda GPx ve katalaz aktivitelerinin farklı olmamasını ve total antioksidan durumunun PDRP grubunda yüksek olmasını bu mekanizmaya bağlayabiliriz.

Diabetin komplikasyonları metabolik stresin bir sonucu gerçekleşmektedir. Metabolik stres de oksidatif stresin artmasına neden olur. Bu diabetik komplikasyonlarına sebep olan yapısal ve işlevsel hasarı oluşturmaktadır¹⁸. Diabetik retinopati gelişme riski ayrıca kötü glisemik kontrol ve diabetin süresi ile de artmaktadır¹⁹. Organizmada proteinler uzun süre yüksek yoğunlukta glukozla maruz kalırlarsa glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına non-enzimatik yolla bağlanır. Glikozillenmiş proteinler ootoksidasyona uğrar ve bu sırada serbest ra-

dikaller üretilir^{18,20}. Bu sebeple biz de çalışmamızda serum HbA_{1c} değerlerini inceledik ve NPDR ve PDR gruplarında kontrol grubundan yüksek bulduk.

Diabetik hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında oluşan dengesizlik diabetin mikrovasküler komplikasyonlarında rol alabilmektedir. Son yıllarda diabetik retinopati tedavisinde önerilen medikal tedavi seçenekleri ile umut verici gelişmeler bildirilmektedir. Diabetik hastalarda iyi kan şekeri ve lipid regülasyonunun yanısıra antioksidan vitamin ve mineral tedavisiyle diabetik retinopati gelişiminin geciktirilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Hartnett M.E., Stratton R.D, Browne R.W. et al.: Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000;23:234-240.
- Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F. et al.: Oxidative retinal products and ocular damages in diabetes patients. *Free Radical & Medicine*. 1998;25:369-372.
- Türk HM, Sevinç A, Camcı C et al.: Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2002;39:117-122.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57:715S-725S.
- Kesavulu M.M., Giri R, Kameswara B.: Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes and Metabolism* 2000;26:387-392.
- Altomare E, Veldemiale D, Chicco D. et al.: Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab*. 1992;18:264-271.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. ETDRS Report Number 12; Fundus photographic BK factors for progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1991;42:387-405.
- Machlin LJ, Bendich A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. 1987;1:441-445.
- Brown N.A.P., Bron A.J., Harding J.J. et al.: Nutrition supplements and the eye. *Eye* 1998;12:127-133.
- Battioni J, Fontecave M, Jaouen M et al.: Vitamin E derivatives as new patent inhibitors of microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991;174:1103-1108.
- Kowluru R.A., Kern T.S., Engerman RL.: Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;22:587-592.
- Walter R.M., Uriu-Hare J.Y. Olin K.L. et al.: Copper, Zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991;14:1050-1056.
- Gürler H, Vural H, Yılmaz N et al.: The role of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Eye* 2000;14:730-735.
- Peuchant E, Delmas-Beauvieux M.C, Couchhouran A et al.: Short-term insulin therapy and normoglycemia; Effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes care*. 1993;20:202-207.
- Jain S.K. McVie R., Jaramillo J.J et al.: The effect of vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetes patients. *Lipids* 1996;31:87-90.
- Akkuş I, Kalak S, Vural H et al.: Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum leukocyte vitamin C levels of patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 1996;244:221-227.
- Nacitarhan S, Özben T, Tuncer N.: Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. *Free Radical Biol Med*. 1995;19:893-896.
- Hunt J.V, Bottoms M.A, Mitchinson M.J.: Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. *Biochem J*. 1993;291:529-535.
- Diabetes control and complications trial research group: The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin dependent diabetes mellitus. *Arch.Ophthalmol*. 1995;113:36-51.
- Wolff S.P., Dean R.T.: Glucose autooxidation and protein modification: The potential role of autooxidative glycosilation in diabetes. *Biochem. J*. 1987;245:243-250.