

## Proliferatif Diabetik Retinopatili Olgularda Vitreusdaki Oksidatif Stress

Yavuz Bardak (\*), İrfan Altuntaş (\*\*), Namık Delibaş (\*\*\*),

### ÖZET

**Amaç:** Proliferatif diabetik retinopate (PDR), vitreustaki oksidatif stressin araştırılması.

**Yöntem:** PDR tanısı alan 38 olgu "PDR" gurubunu oluştururken, idiopatik epiretinal membran tanısı ile opere edilen 6 olgu, regmatojen retina dekolmanı tanısı ile opere edilen 11 olgu ve maküla deliği tanısı ile opere edilen 5 olgu olmak üzere toplam 22 olgu "kontrol" grubunu oluşturdu. Olguların vitreusunda katalaz (KAT), süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri ve Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüldü.

**Bulgular:** "Kontrol" grubuna nazaran "PDR" grubunda KAT ( $p<0.001$ ), SOD ( $p<0.001$ ) aktiviteleri düşük; MDA ( $p<0.001$ ) düzeyleri yüksek bulundu.

**Sonuç:** PDR'li olgularda, vitreusta lipid peroksidasyonu oluşumu ve antioksidan enzim düzeylerinde anlamlı değişimler olduğu saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Proliferatif diabetik retinopati, vitreus, katalaz, süperoksid dismutaz, malondialdehit.

### SUMMARY

#### Oxidative Stress in Vitreus of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients

**Purpose:** To investigate the oxidative stress in vitreus of proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients.

**Material and Method:** Thirty-eight patients with PDR included in the "PDR" group, 6 patients with idiopathic epiretinal membrane, 11 patients with regmatogenous retinal detachment, 5 patients with macular hole included in the "control group". Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) levels of the vitreus of the all patients were measured.

**Results:** CAT ( $p<0.001$ ), SOD ( $p<0.001$ ) levels were higher and MDA ( $p<0.001$ ) level was lower in PDR group than control group.

**Conclusion:** In the vitreus of PDR patients, increased lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity is present.

**Key Words:** Proliferative diabetic retinopathy, vitreus, catalase, superoxide dismutase, malondialdehyde.

(\*) Doç. Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Göz Hast. A.D. Isparta

(\*\*) Yard. Doç. Dr. İrfan Altuntaş, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya A.D. Isparta

(\*\*\*) Prof. Dr., Namık Delibaş, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya A.D. Isparta

Mecmuaya Geliş Tarihi: 26.08.2002

Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 18.03.2003

Kabul Tarihi: 09.08.2003

## GİRİŞ

Diabetli olgularda artmış nonenzimatik glikozilasyon, hipergliseminin komplikasyonlarını oluşturmada etkin bir faktördür. Glikoz bağlanmış proteinlerin serbest radikal (SR) kaynağı oluşturdukları bilinmektedir. Bu nedenle oksidatif stressin diabet komplikasyonlarını oluşturmada rol oynayabileceği öne sürülmüştür (1). Oksidatif stress SR oluşumunu hızlandırır. SR'ler son derece reaktif elamanlar olup protein, lipid, nükleik asid gibi önemli moleküllere bağlanmak suretiyle hücrelerin yapılarını, fonksiyonlarını bozar ve hücre ölümüne yol açabilirler. Organizma SR'lerin zararlı etkilerinden antioksidan enzimler ve radikal toplayıcılar vasıtasıyla korunur (2-4).

Oksidatif stressin ve antioksidan enzimlerin proliferatif diabetik retinopatideki (PDR) rolü tam olarak bilinmemektedir. PDR oluşumunda oksidatif stressin durumu hakkında; Katalaz (KAT), Süper Oksid Dismutaz (SOD) enzim aktivitelerine ve Malondialdahit (MDA) düzeylerine bakarak fikir edinilebilir.

SOD süperoksit radikallerini temizleyerek hidrojen peroksit oluşumuna yol açar, güçlü antioksidan enzimlerdendir. Ancak antioksidan etkisinin tam oluşabilmesi için hidrojen peroksitin de parçalanması gerekir, çünkü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir SR olmamasına rağmen SR üretimine yol açabilir. Bu aşamada devreye giren diğer bir antioksidan enzim KAT'dır. KAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya çevirerek hücreyi oksidatif stressten kurtarır. SR aracılı hasarın önüne geçilmiş olur. SR aracılı doku hasarının göstergelerinden birisi lipid peroksidasyonu ürünlerinden olan MDA'nın ölçülmesidir. MDA artışı hücre zarlarındaki yağ asitlerine SR atağı ile peroksidatif hücre duvarı yıkımı olduğunu gösterir (5).

Bu çalışmada amaç; PDR'li olguların vitreusunda SOD, KAT aktiviteleri ve MDA düzeylerini ölçerek bu maddelerin PDR patogenezindeki rolünü incelemektir.

## MATERYAL VE METOD

Bu prospektif çalışmaya "PDR" ve "kontrol" grubu olmak üzere iki grupta toplam 60 olgunun 60 gözü dahil edildi. PDR tanısı alan 38 olgu "PDR" grubunu oluştururken idiopatik epiretinal membran tanısı ile opere edilen 6 olgu, regmatojen retina dekolmanı tanısı ile opere edilen 11 olgu ve maküla deliği tanısı ile opere edilen 5 olgu olmak üzere toplam 22 olgu "kontrol" grubunu oluşturdu. Diabetli olguların tümü tip II Diabetes Mellitus tanısı ile endokrinoloji bölümünce takip ve tedavisi yapılmakta olan olgulardı. Operasyon öncesinde PDR grubundaki tüm olgularda kan şekeri düzeyi mümkün olduğunca regüle edilmeye çalışıldı. Kontrol

grubundaki olguların tümünde arteriyal hipertansiyon, aterosklerotik kalp hastalığı, vb. herhangi bir sistemik hastalığın olmadığı dahiliye bölümünce ameliyat öncesi yapılan incelemelerle teyit edildi. Olguların tümüne lokal anestezi ile pars plana vitrektomi (PPV) ameliyatı uygulandı. Olguların tümünden PPV operasyonu başlangıcında, infüzyon sıvısı açılmadan önce, "ocutome probe"un aspirasyon çıkışına takılan enjektör ile 0.2 ml vitreus örnekleri alındı. Vitreus örnekleri derin dondurucuda -70° C'de korundu. Vitreus örnekleri herhangi bir dilüsyon yapılmadan homojenize edildi. MDA düzeyi (6), KAT(7) ve SOD (8) aktiviteleri, protein miktarı (9) daha önce tanımlanan metodlarla ölçümler gerçekleştirildi.

**TBARS (Tiobarbitürik asit reaktifleri) Ölçümü:** TBARS için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı. Bunun için, 0,5 ml homojenat 2,5 ml %10'luk TCA (Trikarboksilik asit) ile karıştırılarak 15 dakika süreyle kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra çeşme suyunda soğutulmuş 1000 g'de 10 dak. santrifüj edildi. Bu işlemden sonra, süpernatandan 2 ml alınarak 1 ml %0,67'lik TBA (Tiobarbitürik asit) ile karıştırıldı ve karışım kaynar su banyosunda 15 dak süreyle bekletildi. Kaynar sudan çıkarılan tüpler çeşme suyunda soğutulmuş 532 nm'de absorbansları okutuldu. MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki 'ekstinksiyon' katsayısından (1,56x10<sup>5</sup> cm-1 M-1) yararlanarak nmol/ml cinsinden MDA değeri bulundu. Daha sonra, sonuçlar ml deki protein miktarına bölünerek nmol/mg protein cinsinden TBARS değeri bulundu (6).

**KAT Ölçümü:** KAT aktivite ölçümü için için Aebi yöntemi kullanıldı. Bunun için doku homojenatının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren fosfat tampon çözeltisine eklenmesiyle, KAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> den H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub> oluşum reaksiyonunu katalizler. 240 nm'de absorbansın azalması izlenir ve lineer regresyonlara göre her bir analiz için en uygun absorbanslar bulunarak, yöntemdeki formüle göre hesaplandı. KAT aktivitesi katal olarak ifade edildi. Sonuçlar ml deki protein miktarına bölünerek k/mg protein cinsinden KAT değeri bulundu (7).

**SOD Ölçümü:** Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT ( 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçüldü. U/ ml olarak ölçülen enzim aktiviteleri ml deki protein miktarına bölünerek U/mg protein cinsinden SOD değeri bulundu (8).

**Doku Homojenatı mikroprotein Ölçümü:** Protein içerikleri ticari kit kullanılarak turbidimetrik metotla

(Abbott Aeroset, Texas, USA) ölçüldü. Bu metod ile protein konsantrasyonları miligram/dl olarak ölçülür (9).

Her iki grupta elde edilen değerler SPSS istatistik programı (sürüm 7.5) kullanılarak karşılaştırıldı.

## BULGULAR

Diabet grubunda ortalama yaş  $63,2 \pm 14,6$  yıl, kadın/erkek oranı 17/21 iken; Kontrol grubunda, ortalama yaş  $57,7 \pm 15,8$  yıl; kadın/erkek oranı 10/12 idi. Yaş ve cinsiyet açısından her iki grup arasında anlamlı fark yoktu ( $p>0,05$ ).

Her iki grupta elde edilen KAT, SOD aktiviteleri, ve MDA düzeyi tabloda gösterilmiştir.

**Tablo. Diabet ve kontrol gruplarında haftanın Katalaz, Superoksit dismutaz, aktiviteleri ve Malondialdehit düzeyi**

	PDR	Kontrol	P
MDA (nmol/mg prot)	79±15	54±13	0.001
KAT (kU/mg prot)	1.6±0.4	3.6±0.6	0.001
SOD (U/mg prot)	34±11	63±17	0.01

PDR: Proliferatif diabetik retinopati

KAT: Katalaz

SOD: Superoksit dismutaz

MDA: Malondialdehit

## TARTIŞMA

Diabete bağlı oküler komplikasyonların gelişmesinde oksidatif stersin önemli bir faktör olabileceği görüşünü destekleyen çalışmalar mevcuttur. Retinopatisi olan ve olmayan tip I diabetikler ve sağlıklı kontrol grubunda yapılan bir çalışmada; "total dien konjüгатları", eritrosit SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında; diabetik retinopatili olgularda lipid peroksidlerini önemli ölçüde yüksek, eritrosit SOD aktivitesini ise önemli oranda düşük bulunmuştur. Diabetik olguların, özellikle de retinopatisi olanların oksidatif stress altında olduğu gösterilmiştir (10). Diabetik ratlarda, iskemi ve hiperglisemi kombinasyonunda retinal harabiyetin iskemi ve normoglisemi kombinasyonundan daha fazla olduğu bulunmuştur (11). Yine diabetik ratlarda; oksidatif stressin iç ve dış retinal tabakalarda hücre azalması, dezorganizasyon, fotoreseptör kaybı, pigment epiteli bazal membranında kalınlaşma tarzında retinal harabiyete neden olduğu bulunmuştur; ayrıca lipid peroksidasyonu ile retinal harabiyet arasında korelasyon gösterilmiştir (12). Augustin ve arka-

daşları; proliferatif ve nonproliferatif diabetik retinopatili olguların vitrektomi materyallerinde, lipid peroksid düzeyleri ve myeloperoksidaz aktivitelerini inceleyerek; diabete bağlı fibrovasküler proliferasyon olan hastalarda, hem lipid peroksid düzeyleri hem de myeloperoksidaz aktivitesinde anlamlı şekilde yüksek bulmuşlar ve SR ile enflamatuvar reaksiyonların, diabetik retinopati patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (13).

Bizim çalışmamızda, PDR grubunda KAT, SOD aktiviteleri düşük; MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu sonuç Verdejo ve arkadaşlarının (14) elde ettiği sonuçlarla, yukarıda belirtilen bulgularla (10-13) paralellik göstermektedir.

SOD ve KAT aktivitesinin düşük bulunması, MDA yüksekliği ile uyumludur. Düşük SOD, süperoksit anyonlarının yeterince temizlenmemesine yol açarak hücrelerdeki oksidan stressi arttıracaktır. Bununla birlikte KAT aktivitesinin düşüklüğü ortamdaki  $H_2O_2$ 'lerin suya çevrilmesinde azalmaya yol açacaktır.  $H_2O_2$  suya çevrilmediği zaman organizmadaki en güçlü ve en toksik SR olan hidroksil radikali üretimi yoluna yönlenecektir. Gerek süperoksit anyonu, gerekse  $H_2O_2$  ve hidroksil radikali hücrelerdeki protein, lipid ve karbohidratlara saldırarak doku hasarına yol açarlar (15). Membran lipid peroksidasyonu zincirleme bir şekilde yayılarak membran bütünlüğünü bozar ve hücre ölümüne yol açarlar. Yağ asitlerinin yıkım ürünlerinden biri olan MDA, lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kullanılır (16).

Çalışmamızda MDA düzeyleri yüksekliği, SR aracılı doku hasarı olduğunun bir göstergesi olup kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular bize PDR'de antioksidan savunma sisteminin zayıfladığını ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunun arttığını düşündürdü.

## KAYNAKLAR

1. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D: New insights on non-enzymatic glycosylation which may lead to therapeutic approaches for prevention of diabetic complications. *Diabet Med* 1982; 9: 297-9
2. Bast A, Goris RJA: Oxidative stress. *Biochemistry and human disease. Pharm Week Sci* 1989; 11:199-206
3. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction of free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93
4. Hatemi H, Tasan E: Serbest radikaller ve diabet. *Endokrinolojide Yönelişler* 1995; 2: 33-4
5. Donald Armstrong. *Free Radical and Antioxidant Protocols*. Humana Press: Volume 108. 1998.
6. Draper HE, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31

7. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6
8. Spitz DR, Oberley LW: An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenats. *Anal Biochem* 1989; 179:8-18
9. Lowry O, Rosenbraugh N, Fan- L, et al: Protein measurement with theofillin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 183:265-75
10. Jennings PE, McLaren M, Scott NA, et al: The relationship of oxidative stress to thrombotic tendency in type I diabetic patients with retinopathy. *Diab Med* 1991; 8: 860-S
11. Zhang H, Agardh E, Agardh GD: Hydrogen Peroxide production in ischaemic retina: Influence of hyperglycemia and postischaemic oxygen tension. *Diab Research* 1991; 16:29-35
12. Armstrong D, Al Awadi F: Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:433-6
13. Augústin AI, Breipohi W, Boker T, Lutz I, Spitznas M: Increased lipid peroxide levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. *Graefe Arch for Exp Ophthalmol* 1993; 231: 647-50
14. Verdoja C, Marco P, Renau-Piqueras J, et al: Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* 1999; 13:183-8
15. Altomare E, Grattagliano I, Vendemiale G, et al: Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:141-7
16. Altomare E, Vendemiale G, Grattagliano I, et al: Human diabetic cataract: role of lipid peroxidation. *Diabetes Metab* 1995; 21:173-9