

## Yaşa Bağlı Makula Dejenerasanslı Olgularda Antioksidan Aktivite

Yavuz Bardak (\*), Yusuf Özertürk (\*\*), Namık Delibaş (\*\*\*)

### ÖZET

**Amaç:** Yaşa bağlı makula dejenerasansı (YBMD) gelişimi ile serbest radikal hasarı ve antioksidan savunma sistemlerinin ilişkisini araştırmak.

**Yöntem:** Anjiyografik ve oftalmoskopik olarak YBMD tanısı konan 38 olgu (YBMD grubu) ile yaş ve cinsiyet olarak YBMD grubu ile eşleştirilmiş 38 olgudan oluşan kontrol grubu çalışma kapsamına alındı. Olgulardaki kan glutasyon peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz, malondialdehid, glutathion aktiviteleri saptandı ve her iki grup karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Glutasyon peroksidaz aktivitesi dışındaki parametrelerde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Glutasyon peroksidaz aktivitesi YBMD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti.

**Sonuç:** YBMD olgularında oksidatif stresin arttığı ve bu durumun daha belirgin olarak artmış glutasyon peroksidaz aktivitesi olarak saptandığı sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Glutathion, glutasyon peroksidaz, katalaz, malondialdehid, superoksit dismutaz, yaşa bağlı makula dejenerasansı.

### SUMMARY

#### Antioxidant Activity in Age Related Macular Degeneration

**Purpose:** To study the effect of free radical damage and anti oxidant defence systems in Age Related Macular Degeneration (ARMD).

**Material and Method:** Thirty-eight patients with the angiographic and ophthalmoscopic findings of ARMD were included in this study and also; age and sex matched 38 patients were accepted as the control group. Blood glutation peroxidase, superoxide dismutase, catalase, malondialdehid, glutathion activities were determined for each group and compared.

**Results:** There was not significant difference between the groups except glutation peroxidase activity. Glutation peroxidase activity was significantly higher in ARMD group with respect to the control group.

**Conclusion:** The presence of increased oxidative stress in ARMD was shown and it can be seen as increased glutation peroxidase activity.

**Key Words:** Age related macular degeneration, catalase, glutathion, glutation peroxidase, malondialdehid, superoxide dismutase.

(\*) S. Demirel Üni. Tıp Fak. Göz Hast. AD., Yard. Doç. Dr.

(\*\*) S. Demirel Üni. Tıp Fak. Göz Hast. AD., Prof. Dr.

(\*\*\*) S. Demirel Üni. Tıp Fak. Biyokimya. AD. Isparta, Doç. Dr.

Mecmuaya Geliş Tarihi: 09.09.1999

Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 03.03.2000

Kabul Tarihi: 12.04.2000

## GİRİŞ

Yaşa bağlı makula dejenerasansı (YBMD), ileri yaşdöneminde sık karşılaşılan körlük nedenlerinden biridir (1). Günümüzde YBMD'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedir ve etkin bir tıbbi tedavisi de bulunamamıştır (2,3). Artmış oksidatif stresin neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasansı (YBMD) riskini belirgin olarak arttırdığı bilinmektedir (4-8). Laser fotokoagülasyon tedavisi bu olguların sadece belli bir kısmına sınırlı ölçüde faydalı olabilmektedir (9).

Hücreler oksidatif stress gibi patolojik durumlarda fazla miktarda serbest radikal (O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üretirler. Serbest radikaller (SR) protein, lipid, nükleik asid gibi moleküllere bağlanarak onların yapılarını ve dolayısı ile fonksiyonlarını bozup hücre ölümüne neden olurlar. Organizma SR'lerin zararlı etkilerinden antioksidan enzimler ve radikal toplayıcılar vasıtasıyla korunur (10-12). Glutasyon peroksidaz (GPx), superoksit dismutaz (SOD), Katalaz (Kat) antioksidatif enzimlerdir (13,14). Malondialdehid lipid peroksidasyon ürünüdür (15). Glutathion (GSH) en önemli antioksidanlardandır (16).

Bu çalışmada eritrosit SOD, GPx aktiviteleri, kan MDA ve GSH düzeylerini ölçmek suretiyle YBMD gelişimi ile serbest radikal hasarı ve antioksidan savunma sistemlerinin ilişkisini araştırdık.

## MATERYAL ve METOD

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı retina biriminde YBMD ve refraksiyon dışında oküler patolojisi olmayan olgular ile genel poliklinikden seçilen 60 yaş ve üzerinde olan, refraksiyon kusuru dışında oküler patolojisi bulunmayan, olgular kontrol grubu olarak alındı. Bütün olgular sistemik dahili muayeneden geçirildi, hipertansiyon, diabetes v.d. sistemik hastalıkları bulunan olgular çalışmadan dışlandı. Son 3 ay içerisinde kan antioksidan seviyesini etkileyebilecek sigara alışkanlığı, ilaç kullanma öyküsü bulunanlar v.b. durumlardaki olgular da çalışmaya alınmadı. YBMD grubunda 38 olgu ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet olarak YBMD grubu ile eşleştirilmiş 38 olgu çalışma kapsamına alındı.

Bütün olgularda görme keskinliği, göziçi basıncı (GİB) ölçümleri, biomikroskopi, indirekt oftalmaskopi ile fundus muayeneleri yapıldı. YBMD grubundaki olgulara fundus floresein anjiografi tetkiki yapıldı. YBMD tanısı; retina pigment epiteli ve/veya retina duyu tabakası seröz veya hemorajik dekolmanı veya diskiform skar varlığında veya keskin sınırlı, depigmente, 175 µm'den

daha geniş, altta koroid damarlarının izlendiği jeografik atrofi varlığında veya 3 veya daha fazla drusenin varlığında konuldu (17).

Biyokimyasal ölçümler; Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında yapıldı. Biyokimyasal ölçümler için venöz kan örnekleri sabah aç karnına (en az 10 saat açlık sonrasında), heparinli tüplere alındı. Hızlı bir şekilde hemolizat hazırlandı. Örnekler çalışma yapılına kadar -20°'de saklandı.

MDA düzeyleri TBARS (Tiyobarbitürik asit reaktif substans) olarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asid tepkimesinde, lipid içeriği, düşük pH'da, TBA varlığında ısıtılarak 532 nm'de maksimum absorbans veren stabil kırmızı-pembe bir renk elde edildi. Oluşan rengin şiddeki plazma MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (18).

SOD ölçümü Flohe ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (19). Bu metodda ksantin ve ksantin oksidaz süperoksit radikali üretir. Süperoksit radikalleri tarafından sitokrom c'nin redüksiyonu 550 nm'de takip edilir. SOD süperoksit için yarışarak sitokrom c'nin redüksiyon hızını azaltır. Numune ve standartların absorbans değişimi ölçüldükten sonra aşağıdaki formüle göre % inhibisyonlar hesaplandı (19).

% inhibisyon = 100 - (ΔA numune (standart) / ΔA kör). 100

GSH-Px ölçümü Paglia ve Valentine yöntemine göre yapıldı (20). GSH-Px glutasyonun kümen hidroperoksitle oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktaz ve NADPH varlığında okside glutasyon redükte forma çevrilirken NADPH ile NADP'e dönüşür. 340 nm'de NADPH'in absorbansındaki düşme okunarak GSH-Px aktivitesi hesaplandı.

Katalaz aktivitesinin ölçüm prensibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in dekompozisyon hız sabitinin (S<sup>-1</sup>, I<sub>c</sub>), belirlenmesine dayanır.

Hız sabiti,  $k = (1/\Delta t) \times \ln (A_1/A_2)$

A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub>, t<sub>1</sub> ve t<sub>2</sub> zamanlarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ni absorbans değeridir. Katalaz aktivitesi k/mlt eritrosit sedimenti olarak ifade edildi (21).

Glutasyon tayinin prensibi; eritrositlerin nonprotein sülfidril grupları redükte GSH formundadır. Disülfid kromojen bir bileşik olan 5,5'- Dithiobis (2-Nitrobenzoik asid) (DTNB) sülfidril grupların sarı renkli bileşiğe indirgemesiyle oluşan kromojenin absorbansının 412 nm'de ölçülmesiyle saptanmaktadır (22).

Sonuçlar ortalama ± sem (standart hata ortalaması) olarak verildi.

**Tablo 1.** Yaşa Bağlı Makula Dejenerasansı ve kontrol gruplarında cins, yaş, eritrosit Gluthation düzeyi, GPx aktivitesi, SOD aktivitesi, katalaz aktivitesi ile MDA düzeyi değerleri (ortalama  $\pm$  standart hata ortalaması)

	YBMD (n:38)	Kontrol (n:38)	t	p
Kadın/Erkek	22/16	22/16	-	-
Yaş (Yıl)	65.42 $\pm$ 1.12	64.57 $\pm$ 0.90	0.582	0.562
GSH ( $\mu$ g/ml)	52.97 $\pm$ 0.52	58.09 $\pm$ 0.29	1.872	0.065
GPx (U/l)	49.80 $\pm$ 1.36	40.57 $\pm$ 1.10	5.246	0.001
Kat (k/ml)	3.14 $\pm$ 1.73	3.26 $\pm$ 1.60	0.546	0.587
SOD (U/ml)	2512.57 $\pm$ 5.35	2585.73 $\pm$ 5.37	0.416	0.679
MDA (nmol/ml)	10.43 $\pm$ 3.17	9.82 $\pm$ 2.94	0.456	0.650

İstatistiksel analizler için 'independent student t' testi (2-tailed) uygulandı. Anlamlılık sınırı 0.05 olarak alındı. İstatistikler SPSS (Sürüm 7.5) programıyla yapıldı.

## BULGULAR

YBMD grubundaki 38 olgunun; 33'ünde drusen saptandı. 25 olguda keskin sınırlı, depigmente, 175  $\mu$ m'den daha geniş, altta koroid damarlarının izlendiği jeografik atrofi saptandı. 18 olguda retina pigment epiteli ve/veya retina duyu tabakası seröz veya hemorajik dekolmanı gözlemlendi. 13 olguda disiform nedbe izlendi.

YBMD ve kontrol gruplarında cins, yaş, plazma Gluthation düzeyi, GPx aktivitesi, SOD aktivitesi, katalaz aktivitesi ile MDA düzeyi değerleri toplu olarak Tablo 1'de sunulmuştur.

YBMD ve kontrol grupları cins, yaş, eritrosit GPx, SOD, katalaz aktivitesi ile MDA ve Gluthation düzeyleri yönlerinden karşılaştırıldı.

GPx aktivitesi dışındaki parametrelerde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. GPx aktivitesi YBMD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti.

## TARTIŞMA

Serum antioksidanlarından vitamin-E'nin yaşlanma ile azaldığı gösterilmiştir (23). YBMD olgularında da vitamin E, C ve beta-karoten azaldığı bildirilmiştir (24). Bulgular antioksidan savunma mekanizmalarındaki azalmanın YBMD patogenezinde rol aldığı görüşünü desteklemektedir.

GPx yüksek seviyede silier epitelde ve daha düşük seviyede retinada üretilmektedir (25), aköz humörde de varlığı gösterilmiştir (26). Chu ve arkadaşları (27) GPx'in çeşitli organlarda lokal ve plazmada sistemik olarak antioksidan etkinliğini göstermişlerdir. Biz öl-

çümlerimizi eritrositlerde yaptık. Eritrosit içi ölçümler plazmaya göre daha az faktörden etkilenmekte ve daha iyi fikir vermektedir.

Çalışmamızda YBMD grubunda GSH seviyesi kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu. Antioksidan olarak GSH aktivitesi, GSH konsantrasyonu veya GSH/GSSG fonksiyonu olarak açıklanabilir. GSH'u substrat olarak kullanan enzimlerin miktarı redükte GSH'a bağımlı olabilir.

GSH'ın redükte veya okside olması hücre fonksiyonlarını çok yakından etkilemektedir. Örneğin; hücredeki gen ekspresyonu (28), hücre proliferasyon hızı (29) ve apoptosis (30) hücre redoks potansiyeli ile bağlantılıdır.

Delcourt ve arkadaşları YBMD olan olgularda yaptıkları çalışmada plazma GPx seviyesini kontrol grubuna göre yüksek olarak buldular (31). Bu sonuç çalışmamızda elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda bulunan GSH düzeylerindeki düşüklük artmış GPx aktivitesine bağlı tükenmeye bağlandı. Sonuç GSH düzeylerindeki düşüklüğün antioksidan kapasitede azalmaya yol açması beklenebilir.

Çalışmada YBMD grubundaki olgularda oksidatif stresin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu saptandı. Bu kanıyı istatistiksel olmamakla birlikte yüksek bulunan MDA düzeyleri de destekledi. Kontrol grubu ile YBMD grubu arasında anlamlı yaş ve cinsiyet farkı yokken elde edilen bu sonuç YBMD grubunun daha farklı etyolojik faktörlere sahip olduğunu gösterir.

Çalışmada ölçülen diğer antioksidan enzimlerden SOD ve kat aktivitesinde her ne kadar bir azalma görülse de anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Aslında serbest radikal üretiminde bir artışa bağlı enzim değişiklikleri olduğu düşünülürse GPx'le birlikte diğer enzimlerde de benzer değişiklikler beklenirdi fakat sadece GPx'de görülen değişiklik sadece GPx'i etkileyen bir faktörün

YBMD patogenezinde rol olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular YBMD olgularında artmış oksidatif stresin varlığını göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

1. National Society to Prevent Blindness. Vision problems in the US data analysis: definitions, data sources, detailed data tables, analysis, interpretation. New York: National Society to Prevent Blindness. 1980;pp:1-46
2. Young RW: Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1987; 31:291-306
3. Ferris FL: Senile macular degeneration: review of epidemiological features. *Am J Epidemiol* 1983;118:132-151
4. Snodderly DM: Evidence for protection against age related macular degeneration (AMD) by caretenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutrition* 1995; 62:14485-14615
5. Klein R, Klein BEK, Linton KLP, DeMets DL: The Beaver Dam eye study. The relation of age related maculopathy to smoking. *Am J Epidemiol* 1993;137:190-200
6. Babizhayev MA: Failure to withstand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1996;1315:87-99
7. Bunce GE, Hess JL: Biochemical changes associated with selenite-induced cataract in the rat. *Exp Eye Res* 1981;33:505-514
8. Gerster H. Review: Antioxidant protection of the ageing macula. *Age Ageing* 1991;20:60-69
9. Macular Photocoagulation Study Group. Laser photocoagulation for juxtafoveal choroidal neovascularization. Five-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol* 1994;112:500-509
10. Bast A, Goris RJA: Oxidative stress. *Biochemistry and human disease. Pharm Wekbl Sci* 1989;11:199-206
11. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-493
12. Hatemi H, Taşan E: Serbest radikaller ve diabet. *Endokrinolojide Yönelişler* 1995; 2:33-44
13. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwel VW. (Çev. Menteş G, Ersöz B) Harper'in Biyokimyası. Barış Kitabevi İstanbul, 1993;pp:143, 853
14. McCord JM: Human disease, free radicals and oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26:351-357
15. Sevanian A, Hochstein P: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985;5:365-390
16. Winkler BS, Orselli SM, Rex TS: The redox couple between glutathion and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 1994;17:333-349
17. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB: An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The international ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 1995;39:367-374
18. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-1543
19. Flohe L, Otting F: Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104
20. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169
21. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-127
22. Beutler E, Duron O, Kelly BM: Improved method for in vitro determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61:882-888
23. Vandewoude MFJ, Vandewoude MG: Vitamin E status in normal population. The influence of age. *J Am Coll Nutr* 1987;6:307-311
24. Bono A, Caimi G, Catania A, Sorna A, Pandolfo L: Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1987;19:264-266
25. Martin-Alonso JM, Ghosh S, Coca-Prados M: Cloning of the bovine plasma selenium-dependent glutathione peroxidase (GP) cDNA from the ocular ciliary epithelium: expression of the plasma and cellular forms within the mammalian eye. *J Biochem (Tokyo)* 1993;114:284-291
26. Haung W, Koralewska-Makar A, Bauer B, Akesson B: Extracellular glutathione peroxidase and ascorbic acid in aqueous humor and serum of patients operated on for cataract. *Clin Chim Acta* 1997; 28; 261:117-130
27. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH, Doan K, Liu XF: Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood* 1992 15;79:3233-3238
28. Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3d, Curran T: Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 1990 7;249:1157-1161
29. Hwang C, Sinsky AJ: The role of oxidation reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In: Spier RE, Griffiths JB, Meignier B eds. *Production of biologicals from animal cells in culture*. Oxford Halley Court, 1991:548-567
30. Malorni W, Rivabene R, Santini MT, Donelli G: N-acetylcysteine inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett*. 1993 19;327:75-78
31. Delcourt C, ristol JP, Leger CL, Descomps, B, Papoz L: Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1999;106:215-222