

ПАРАМЕТРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА И АНТИОКСИДАЦИОНЕ ЗАШТИТЕ У ОЧНОЈ ВОДИЦИ ПАЦИЈЕНАТА СА СЕНИЛНОМ КАТАРАКТОМ И ДИЈАБЕТЕСОМ

Ђокић О.¹, Мирић Д.², Јакшић В.¹, Мирковић М.¹, Вукша Д.¹, Стаменковић Д.¹

¹Очна клиника, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDATIVE POWER IN THE AQUEOUS IN PATIENTS WITH DIABETES AND AGE- RELATED CATARACT

Ђокић О.¹, Мирић Д.², Јакшић В.¹, Мирковић М.¹, Вукша Д.¹, Стаменковић Д.¹

¹Clinic of Eye Disease, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of biochemistry, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Any kind of ocular lens opacification is well known as cataract. Most cataracts are age-related, so called senile cataract. Cataractogenesis as process involves either pathological and natural aging processes. Chronical oxidative stress is considered as primary factor in age-related cataractogenesis. In this study we measured concentration of lipid hydroperoxides, sulfhydryl groups (SH) and entire antioxidative capacity, as well as ocular superoxide dismutase and catalase activity in 11 subjects with diabetes mellitus (DM) type 2 and cataract and in 39 nondiabetic subjects with senile cataract. All patients underwent complete ophthalmological examination before they were surgically treated by phacoemulsifications. During the intervention, aqueous sample in volume 0,2 was aspirated and refrigerated in -20°C and prepared for further biochemical analysis. Parameters of antioxidative power in diabetic subjects with cataract have decreased values (sulfhydryl groups and antioxidative potential - FRAP test) in aqueous while one of lipid peroxidation product has increased value (lipid hydroperoxide). Aqueous catalase activity in subjects with diabetes and senile cataract is remarkably higher compared with nondiabetic subjects ($p < 0.05$). Oxidative stress and antioxidative capacity are well known risk factor in cataractogenesis but in DM 2 patients, oxidative stress is more intensive than in control group.

Key words: senile cataract; aqueous; oxidative stress; diabetes mellitus

САЖЕТАК

Свако замућење, иначе провидног, очног сочива назива се катаракта. Највећи проценат катаракти је резултат старења, тзв. старачка или сенилна катаракта. Фактори који доприносе катарактогенези код старијих особа су комбинација патолошких и нормалних процеса старења. Хронични оксидациони стрес се сматра главним фактором у патогенези катаракте која је последица старења. У раду је одређивана концентрација липидних хидропероксида, укупних сулфхидрилних група (СХ) и укупан антиоксидациони капацитет, као и активност ензима супероксид димутазе и каталазе у очној водици код 11 пацијената са катарактом и дијабетес мелитусом (ДМ) тип 2 и 39 пацијената са сенилном катарактом, без дијабетеса. Сви пацијенти су комплетно офталмолошки обрађени непосредно пре хируршке интервенције-факоемулзификације. У току операције, узиман је узорак очне водике у количини од 0.2 мл који је одмах залеђен на -20°C а потом вршена биохемијска анализа. Пацијенти са катарактом и дијабетесом имају снижене вредности параметара антиоксидационе заштите (укупне сулфхидрилне групе и укупан антиоксидациони капацитет - ФРАП тест) у очној водици и виши ниво једног од продуката липидне пероксидације (липидни хидропероксиди). Активност каталазе је у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом значајно већа у односу на групу пацијената без дијабетеса ($p < 0.05$). Оксидациони стрес и антиоксидациона заштита имају несумњиву улогу у катарактогенези али код пацијената са ДМ тип 2 постоји интензивнији оксидациони стрес него у контролној групи.

Кључне речи: сенилна катаракта; очна водица; оксидациони стрес; дијабетес мелитус

УВОД

Катаракта се дефинише као свако замућење интраокуларног сочива независно од тога да ли је визуелно сигнификантно или не. Убедљиво најчешћи облик катаракте је сенилна катаракта, која је са морфолошког становишта нејединствен конгломерат карактеристич-

них кортикалних, нуклеарних и субкапсуларних замућења сочива која се могу јавити независно или заједно (1). Сенилна катаракта је најчешћи узрок излечивог слепила код људи у читавом свету. То је прогресивно замућење сочива без познатог узрока код људи старијих од 45 година (2).

Фактори ризика за појаву катаракте су бројни: старост и пол, малнутриција, пушење, дијабетес мелитус, хипертензија, хронична опструктивна болест плућа, псеудоексфолијациони синдром, УВ зраци сунчеве светлости и други. Оксидациони стрес и слободни радикали кисеоника сматрају се значајним фактором који доприноси појави сенилне или age-related катаракте (3).

Оксидациони стрес је резултат дисбаланса прооксиданаса и антиоксиданаса. Пошто су токсични слободни радикали резултат нормалног метаболизма, њихова деструкција је императив. Са изузетком анаеробних микроорганизама, сви живи организми имају есенцијалну потребу за слободним кисеоником, као ефикасним рецептором електрона у процесу продукције енергије неопходне за живот (4). Пошто је кисеоник јак оксиданс, није могуће избећи секундарну оксидацију која је део уобичајеног метаболизма. Ова теоријска основа је база за концепт " оксидационог стреса" који описује шта се догађа када деривати секундарне оксидације, која је индукована кисеоником, нису неутралисани.

Слободни радикали су атоми, молекули или јони са једним или више неспарених електрона у својој структури. Већина слободних радикала је врло реактивна и живи врло кратко. Количина слободних радикала у организму је мала (32- 320 фемтограма по граму ткива супероксид ањон радикала) али су ефекти разорни (5).

Због токсичног дејства слободних радикала, упоредо са адаптацијом на аеробне услове живота, током еволуције су се развили и заштитни, антиоксидациони механизми. У нормалним условима равнотежа између оксидационих процеса и антиоксидационе способности одржава стабилност грађе и функције живих ћелија.

Протеини сочива су веома осетљиви на деловање слободних радикала који мењају њихову структуру и функционалне активности. У току оксидационе модификације протеини мењају примарну структуру као последицу модификације појединих аминокиселина или комплетног губитка неке аминокиселине. Последица ових промена је и губитак секундарне и терцијарне структуре, праћен агрегацијом или фрагментацијом протеина. Промене физичко-хемијских својстава доводе до промене њихове растворљивости, промене наелектрисања, смањења стабилности, промене вискозности и промене флуоресценције (6). За процес катарактогенезе је поред оксидације протеина сочива, одговорна и пероксидација липида. Липиди ћелијских мембрана као што су фосфолипиди и холестерол су најчешћи супстрат овог оксидационог напада. Путем општења липида ћелијских мембрана нарушава се један од услова ћелијског интегритета.

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је утврдити да ли су оксидациони стрес и елементи антиоксидационе заштите интензивнији код пацијената са сенилном катарактом уколико они имају ДМ тип 2 у односу на оне који немају удружено системско обољење од значаја

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Клиничко испитивање извршено је код 50 болесника са дијагнозом сенилне катаракте, који су хос-

питализовани на Клиници за очне болести КБЦ Звезда у Београду. Болесници са дијагнозом сенилне катаракте, након извршеног клиничког офталмолошког прегледа, су подвргнути хируршкој интервенцији екстракције замућеног очног сочива методом факоемулзификације. Узорак очне водиче је узиман на почетку операције. Аспирирано је 0.2 мл очне водиче из предње очне коморе. Узорци очне водиче су одмах након узимања, замрзавани и чувани на -200 Ц до испитивања.

Болесници су подељени на основу матуриитета катаракте у две групе. Прву групу су чинили пацијенти са почетном сенилном катарактом (N=40), а другу групу су чинили пацијенти на дијагнозом тоталне катаракте (N=10). Од укупног броја испитаника њих 11 је имало дијабетес мелитус као придружено обољење.

Биохемијско испитивање очне водиче обављено је на Институту за биохемију Медицинског факултета Приштина са седиштем у Косовској Митровици.

Концентрација липидних хидропероксида је одређивана ФОХ тестом (7). Концентрација укупних сулфхидрилних група одређивана је спектрофотометријски уз примену 5.5'-дитиобис (2-нитро-бензоева киселина) (ДТНБ или Ellman-ов тест) (8). Активност супероксид дизмутазе одређивана је спектрофотометријски, по методи Misra и Fridovich-a (9). Каталитичка активност каталазе одређивана је спектрофотометријски, УВ методом по Aebi-у, помоћу H₂O₂ као супстрата (10).

Одређивање укупног антиоксидационог капацитета очне водиче (ФРАП тест) је колориметријска метода и базира се на способности антиоксиданаса да редукују Fe³⁺ из комплекса 2,4,6-фери-трипиридил-Ц-триазин (ТПТЗ) у Fe²⁺ (11).

Добијени подаци представљени су табеларно а значајност је тестирана т тестом. Као статистички значајни тумачени су резултати за п мање од 0.05

РЕЗУЛТАТИ

У групи пацијената са почетном катарактом од укупног броја испитаника (N=40), ДМ тип 2 је имало 7 пацијената, а у групи са тоталном катарактом од укупног броја испитаника (N=10), ДМ тип 2 су имала 4 пацијента. (Табела 1).

Табела 1. Учесталост дијабетес мелитуса код болесника са сенилном катарактом.

Тип катаракте	Diabetes mellitus тип 2					
	ДА		НЕ		Укупно	
	Број	%	Број	%	Број	%
- Почетна	7	17.5	33	82.5	40	100.0
- Тотална	4	40.0	6	60.0	10	100.0
Свега	11	22.0	39	78.0	50	100.0

Просечна концентрација липидних хидропероксида у очној водичи пацијената са катарактом и дијабетесом била је већа (0.81±0.19 vs. 0.69±0.37 nmol/mL)

у односу на групу испитаника без дијабетеса као придруженог обољења, али без статистичке значајности.

Укупне сулфхидрилне групе које штите сочиво од оксидационог стреса као и укупан антиоксидациони капацитет очне водиче (ФРАП анализа) у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом нису значајне, али показују ниже вредности у односу на групу испитаника са катарактом без дијабетеса. (SH групе = 16.70 ± 4.78 вс. 18.47 ± 5.22 nmol/mL и ФРАП = 443 ± 111.66 вс. 495.21 ± 209.89 nmol/mL).

Упоредивањем активности ензима супероксид димутаза у ($t=0.723$, $DF=21$, $p>0.05$) очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетес мелитусом у односу на пацијенте без дијабетеса није утврђена значајна разлика), док је активност каталазе значајно већа у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом у односу на групу пацијената без дијабетеса ($t=2.076$, $DF=15$, $p<0.05$) (Табела 2).

Табела 2. Просечна концентрација параметара липидне пероксидације и антиоксидационе заштите у групи испитаника са дијабетес мелитусом.

Параметар	Diabetes mellitus тип 2		
	не	х-бар	SD
- Хидропероксид	не	0.69	0.37
	да	0.81	0.19
- FRAP	не	495.21	209.89
	да	443.00	111.66
- Укупне SH групе	не	18.47	5.22
	да	16.70	4.78
- Супероксид димутаза	не	29.37	10.89
	да	32.79	10.55
- Каталаза	не	31.29	13.32
	да	44.08*	11.18

* $p<0.05$

ДИСКУСИЈА

Дијабетес мелитус се одавно повезује са катарактом. Директна, ин виво и ин витро експериментална истраживања указују да је дијабетес фактор ризика за настанак катаракте. Подаци из Edinburgh Study показују да пацијенти са катарактом имају виши ниво глукозе у крви у односу на контролну групу, без обзира што немају ДМ тип 2 (12). Код катаракте која настаје као последица дијабетеса постоје три патолошка механизма која објашњавају њено настајање. Метаболизам алдозо-редуктазе који повећава концентрацију сорбитола у сочиву, гликација протеина када се шећери и протеини везују ковалентним везама што резултује губитком структуре и функције ових протеина и као трећи, процес липидне пероксидације. Сви ови механизми су међусобно повезани и сви започињу у митохондријама са продукцијом високих концентрација супероксида. Супероксид димутаза (CuZnSOD и MnSOD) је ензим који штити сочиво и епителне ћелије сочива од оксидационих опште-

ћења. Спречавањем продукције супероксида у митохондријама супероксид димутаза (СОД) спречава многе патолошке ефекте високе концентрације глукозе (13).

У раду су просечне концентрације параметара липидне пероксидације и антиоксидационе заштите одређиване у очној водици пацијената са сенилном катарактом у односу на постојање ДМ тип 2. Обзиром на то да је сочиво аваскуларни орган, очна водича је од есенцијалне важности за његов метаболизам. Путем очне водиче сочиво добија неопходне метаболичке и антиоксидационе елементе, али се, са друге стране, метаболизам и оксидациони процеси у сочиву одражавају на састав очне водиче (14, 15).

Активност ензима каталазе у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом је била значајно већа у поређењу са групом испитаника без дијабетеса ($p<0.05$). Могуће је да у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом активност ензима каталазе расте одупирући се појачаном оксидационом стресом.

Анализом података није утврђена значајна разлика у концентрацији укупних сулфхидрилних група, укупног антиоксидационог капацитета очне водиче, као ни у активности ензима супероксид димутаза у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом у односу на групу испитаника без дијабетеса.

У циљу испитивања утицаја процеса липидне пероксидације на појаву и развој сенилне катаракте, одређивана је у очној водици концентрација липидних хидропероксида.

Измерена концентрација липидних хидропероксида у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом је повишена у односу на пацијенте без дијабетеса, али без статистичке значајности, обзиром на то да су пацијенти са дијабетесом у нашем раду без одмаклих манифестација, односно компликација шећерне болести. Пероксидација мембранских липида сматра се иницијалним догађајем у катарактогенези уопште (16). Објављени су резултати аутора који су измерили значајно већу концентрацију примарних продуката ЛПО (коњуговани диени, липидни хидропероксиди), као и концентрацију малондиалдехида (МДА) у очној водици и сочивима пацијената са сенилном (мешовитом и брунесцентном) и компликованом катарактом у односу на контролну групу (17, 18, 19), као и резултати који су добили значајно већу концентрацију МДА као једног од крајњих продуката липидне пероксидације у катарактним сочивима дијабетичара (20).

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата, мерења продуката липидне пероксидације с једне, и параметара антиоксидационе заштите с друге стране, у очној водици пацијената са сенилном катарактом и дијабетесом може се закључити да оксидациони стрес уз присуство и других фактора ризика, утиче на почетак односно развој сенилне катаракте, при чему постојање дијабетеса делује као додатни стрес интензивирајући процес развоја катаракте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kivela T. Lens and cataract. U:Tarkkanen A ed. Principles of Ophthalmology. Helsinki:Recallimed 1998:185-198
2. Hankinson SE. The epidemiology of age related cataract. In:Albert & Jakobiec. Principles and practice of ophthalmology. Basic sciences. WB Saunders Comp. Philadelphia 1994: 1255-66
3. 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(2):87-99
4. Vinson A. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006; 13:151-62
5. Chomezynsky P and Sachi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:1556-59
6. Well-Kneechi MC, Hugginsi TG, Dyer GD, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidized Amino Acids in Lens Protein with Age. *The Jour of Biol Chem* 1993;268(17):12348-352
7. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with tri-phenylphosphine. *Anal Biochem* 1994;220:403-9
8. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994;233:380-5
9. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170-5
10. Aebi EH. Catalase, In: Bergmayer Methods of Enzymatic Analysis, Vol III, Verlag Chemie, Weinheim 1983;273-86
11. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-76
12. Clayton RM, Cuthbert J, Phillips CI, et al. Analysis of individual cataract patients and their lenses: a progress report. *Exp Eye Res* 1980(31):553-66
13. Reddy VN, Kasahara E, Hiraoka M, Lin RL, Ho YS. Effects of variation in superoxide dismutases on oxidative stress and apoptosis in lens epithelium. *Exp. Eye Res.* 2004(79):859-868
14. Varma SD, Chand D, Sharma YR, Kuck JF Jr, Ricards RD. Oxidative stress on lens and cataract formation. Role of light and oxygen. *Curr Eye Res* 1984;3(1):35-57
15. Rathbun WB. Lenticular glutathione synthesis: rate limiting factors in its regulation and decline. *Curr Eye Res* 1984;3: 101-8
16. Spector A. Oxidation and cataract. *Ciba Found Symp* 1984; 106:48
17. Jain RM, Bulakh PM. Effect of ketoacids on H₂O₂ induced cataract. *Indian Jour of Clinical Biochem* 2003;18(1):91-5
18. Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Varma SD. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutrition* 2003;19(9):794-9
19. Zoric L, Elek-Vlajic S, Jovanovic M, Kusic B, Djokic O, Canadanovic V, Cosic V, Jaksic V. Oxidative stress intensity in lens and aqueous depending on age-related cataract type and brunescence. *Eur J Ophthalmol* 2008;18(5):669-74
20. Donma O, Yorulmaz E, Pekel H, Suyugul N. Blood and lens lipid peroxidation and antioxidant status in normal individuals, senile and diabetic cataractous patients. *Curr Eye Res* 2002; 25(1):9-16