

Tip 2 Diyabetes Mellitus Hastalarında Retinopati Trombosit Membranı Anyonik Yükü ile İlişkilimidir?

Is Platelet Membrane Anionic Charge Related to Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients?

Yasemin ÜSTÜNDAĞ¹, Müberra AKDOĞAN², Hakan DEMİRCİ³, Serap İbiş ŞENEL¹, Dilek YAVUZ⁴

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada nefropatisi olmayan tip 2 diyabet hastalarında değişik evrelerdeki diyabetik retinopatinin (DR) kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak trombosit anyonik yükü ile ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya dahil edilen 49 tip 2 diyabet hastası aile hekimliğine başvurularında tespit edilen kontrolsüz olgular. Çalışmada ilk muayene bulgularına dayanarak retinopati derecesine göre 3 gruba ayrıldı: Grup A (n=23) retinopatisi olmayan, grup B (n=13) preproliferatif DR, grup C (n=13) proliferatif DR. 38 diyabetik olmayan vaka kontrol grubu olarak seçildi (grup D). Trombosit anyonik yükü (TAY) trombositlerin alcian blue bağlamasına göre ölçüldü.

Bulgular: Tip 2 diyabet hastaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük TAY'e sahipti ($p<0.05$). Proliferatif DR hasta grubunda ölçülen TAY değerleri ne preproliferatif DR grubu ne de retinopati olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı değildi.

Sonuç: Bizim çalışmamızda TAY düzeyleri diyabetik hastalarda normal kontrol göre düşük tespit edilmiştir. TAY düzeyi ile retinopati derecesi arasında anlamlı bir ilişki yoktur.

Anahtar Kelimeler: Trombosit anyonik yükü, diyabetes mellitus, retinopati.

SUMMARY

Purpose: Our purpose is to evaluate the relationship between the platelet membrane anionic charge (PAC) and different stages of diabetic retinopathy (DR) in nephropathy-free patients with type 2 diabetes mellitus with the PAC in non-diabetic control subjects.

Materials and Methods: Forty-nine patients with type 2 diabetes attended to the family physician for the first time were included in this study. Depending on the first ophthalmic examination they were divided by the stage of DR into 3 groups: Group A (n=23), those without DR; group B (n=13), those with pre-proliferative DR; and group C (n=13), those with proliferative DR. 38 nondiabetic subjects made up the control group (group D). Platelet anionic charge (PAC) was measured as alcian blue binding to platelets.

Results: The patients with type 2 diabetes had significantly lower levels of platelet anionic charges than the non-diabetic controls ($p<0.05$). PAC in the patients with proliferative DR were not significantly different from neither that in non-proliferative nor in no DR group.

Conclusion: Our study demonstrated decreased levels of PAC in diabetic patients as compared with non-diabetic controls. There is no relationship between PAC and DR severity.

Key Words: Platelet anionic charge, diabetes mellitus, retinopathy.

Ret - Vit 2004; 12 :103-107

1- SSK Şevket Yılmaz Hastanesi Biyokimya Lab. Uzm. Dr., Bursa.

2- SSK Şevket Yılmaz Hastanesi Göz Hast. Kliniği Uzm. Dr., Bursa.

3- SSK Şevket Yılmaz Hastanesi Aile Hekimliği Uzm. Dr., Bursa.

4- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji AD., İstanbul, Uzm. Dr.

Geliş Tarih : 17/02/2004

Kabul Tarihi : 30/04/2004

	N	Yaş (yıl)	Cins (K/E)	Diabet süresi (yıl)	Sigara içen	VKİ (kg/m ²)	Mikroalbuminuri (mg/24saat)
Grup A	23	59+/-8	16/7	10+/-5	6	27.8+/-6	73+/-40
Grup B	13	56+/-5	7/6	11+/-5	1	29.6+/-5	45+/-21
Grup C	13	57+/-5	7/6	12+/-8	1	28.5+/-8	85+/-45
Grup D	38	57+/-5	19/19	-	-	28.0+/-5	10+/-6

* Ortalama +/- SD

Tablo 1: Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve mikroalbuminuri atımı

GİRİŞ

Diyabetik retinopati (DR) görme kaybı ve körlüğün en önemli sebeplerindendir¹⁻³. Hastalığın ilk 20 yılında Tip 1 diyabet hastalarının hemen hepsinde ve Tip 2 diyabet hastalarının % 60'ında retinopati tespit edilmiştir⁴.

Diyabetik retinopatide hiperglisemi ve bununla ilişkili olan metabolik değişikliklerin aracılık ettiği damar zedelenmesi mikrovasküler lezyonların oluşumunu başlatan en önemli etken olarak kabul edilmektedir⁵.

Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda diyabetik hastaların retinalarında trombosit ve fibrin trombüsü oluşumunun arttığı gösterilmiştir⁶. Oluşan bu trombüsün kapiller obliterasyon ve retinal iskemiye yol açtığına inanılmaktadır. Diyabete bağlı oluşan iskemik retinopati sonrasında perfüzyonu bozulan dokuya kan desteği sağlamak üzere retinal neovaskülarizasyon meydana geldiği ve bunun proliferatif retinopati gelişimine neden olduğu düşünülmektedir.

Hücre yüzeyi negatif yükünü esas olarak siyalik asit ve çok daha az oranda negatif yüklü aminoasitler olan glutamat ve aspartat oluşturmaktadır. Hücre yüzeyi negatif yükü itme gücünü kullanarak hücrelerin birbirinden uzaklaşmasını sağlar⁷. Trombosit yüzey yükündeki herhangi bir değişiklik trombositlerin adhezyon ve agregasyonunda önemli rol oynar⁸. Tip 2 diyabetik hastaların trombositlerinin sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında damar endotel yüzeyine yapışarak daha kolay pıhtı oluşturduğu bilinmektedir⁹. Bu çalışmanın amacı diyabetik retinopati hastalarında trombosit adhezyon ve agregasyonunda rolü olan hücre yüzeyi negatif yükünde değişikliğin olduğuna dair hipotezi araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma aile hekimliği polikliniğine ilk kez başvurarak tip 2 diyabet tanısı alan ve oral antidiyabetik ilaçlarla tedavi edilen 49 hastada gerçekleştirildi. Hastalar rutin fundoskopik muayene ile retinopati açısından değerlendirilmek üzere oftalmoloji uzmanına gönderildi. DR derecesine göre hastalar üç grupta incelendiler: grup A (DR yok), grup B (preproliferatif DR) ve grup C (Proliferatif DR). Diyabet hastası olmayan 38 vaka kontrol grubu olarak seçildi (grup D).

Hastaların kısa tıbbi özgeçmişleri sorgulandı. Boy ve vücut ağırlığı ölçülerek, vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplandı (VKİ=Vücut ağırlığı (kg) / [boy (m)]²). Diyabetik grupta mikroalbuminüri (>300 mg/24saat) tespit edilen vakalar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubunda ise aterosklerotik kalp hastalığı, inflamasyon, böbrek hastalığı, romatizmal hastalık ve herhangi bir ilaç kullanan vakalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastalar bilgilendirildikten ve rızaları alındıktan sonra 12 saat açlığı takiben serum örnekleri alındı. Serum örnekleri değerlendirme yapılıncaya kadar -20 derecede muhafaza edildi. Örneklerden açlık kan şekeri ve HbA1c değerleri ölçüldü. 24 saatlik idrarda günlük albumin atılımı hesaplandı. Aynı işlemler kontrol grubu için de uygulandı.

Trombosit anyonik yük ölçümü için 18 ml venöz kan 2 ml % 3.8'lik trisodyum sitrat üzerine alındı. Trombositler Schwinger (10) ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde ayrıldı. Trombositler ayrıldıktan sonra PBS (fosfat tamponu) içinde 3 kez yıkandı. Trombositlerin konsantrasyon ayarı yapıldıktan sonra 250 mg/L Alcian blue 8GX (Sigma katalog no: A 5268) içeren PBS'de suspansiyon haline getirildi. 37 °C'de 30 dakikalık inkübasyon periyodundan sonra trombositler santrifüjle ayrıldı ve alcian blue konsantrasyonu 650 nm dalga boyunda Shimadzu UV 1202 V spektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile değerlendirildi. Trombositlere bağlı alcian blue miktarı 10 8 trombositte nanogram olarak ifade edildi. Bizim deney şartlarımız için değişkenin intraassay ve interassay sabitleri trombositler için sırasıyla % 6.2 ve % 9.6 idi.

Bilgilerin istatistik değerlendirmesi Instant-II programında gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta (R0+R1+R2) verilerinin ortalaması 'student-t testi' uygulanarak kıyaslandı. R0, R1, R2 ve kontrol gruplarına ilişkin sürekli değişkenler tek yönlü ANOVA testi ile kıyaslandı. İki grup arasındaki olasılık p<0.05 ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tüm gruplar yaş ve cinsiyet açısından benzerdi. Hesaplanan ortalama yaş DR tespit edilmeyen hastalarda (grup A) 59+/-8 idi, preproliferatif DR hastalarında (grup B) 56+/-5, proliferatif DR hasta-

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
TAY (ng alcian blue/1000x10 ⁸ PLT)	156+/-44**	159+/-28**	136+/-20**	201+/-41
HbA1c (%)	7.65+/-0.7	8.05+/-0.73	8.57+/-1.86	-
Açlık kan şekeri (mg/dl)	229+/-70	234+/-89	236+/-120	100+/-16

* Ortalama +/- SD

** Kontrol grubuna göre p<0.05

Tablo 2: Diyabet ve kontrol grubunun laboratuvar bulguları

larında (grup C) 57+/-5 idi. Kontrol grubu yaş ortalaması (grup D) 57+/-5 tespit edildi.

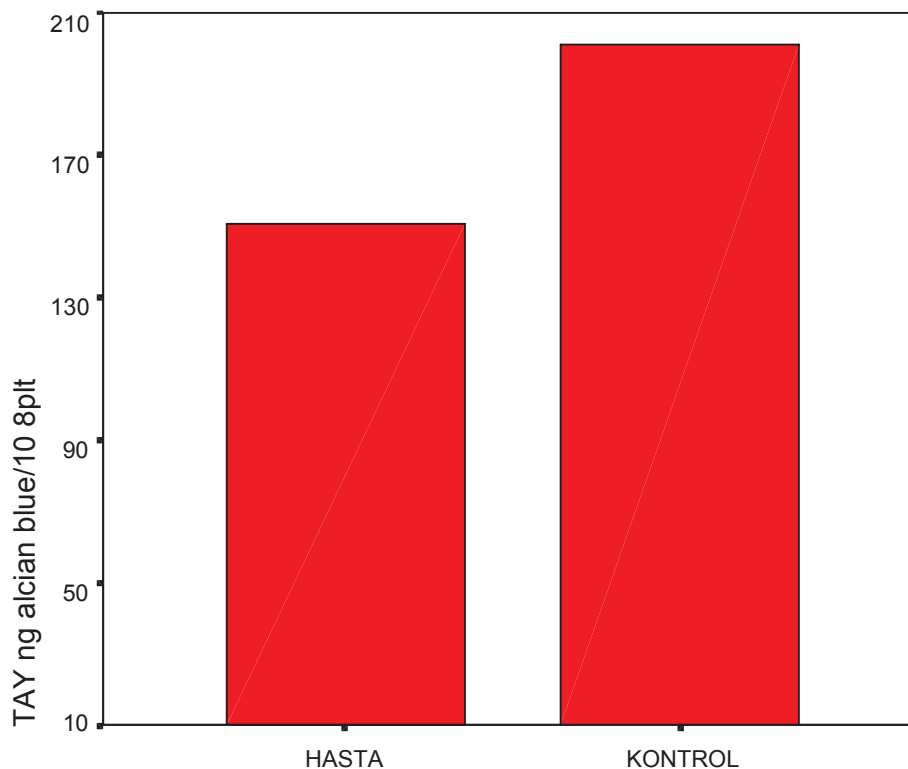
VKİ değerleri gruplar arasında benzerdi. Diyabet süresi C grubunda daha uzundu (12+/-8 yıl) ancak bu değer diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi.

24 saatlik idrarda atılan mikroalbümin tüm gruplarda normal sınırlar içinde idi.

Tüm diyabetik hastaları bir grup olarak kabul ettiğimizde TAY değeri 151+/-33 nanogram alcian blue/10⁸ trombosit olarak bulundu (Şekil 1). Kontrol grubu ile karşılaştığımızda diyabet hastalarından oluşan grupların TAY değerleri anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0.05). Hesaplanan ortalama TAY değeri retinopati olmayan diyabet hastalarında (grup A) 156+/-44 nanogram alcian blue/10⁸ trombosit, preproliferatif DR hastalarında (grup B) 159+/-28

nanogram alcian blue/10⁸ trombosit ve proliferatif DR hastalarında (grup C) 136+/-20 nanogram alcian blue/10⁸ trombosit olarak bulundu. Kontrol grubunda, ortalama TAY değeri 201+/-41 nanogram alcian blue/10⁸ trombosit idi (Tablo 2). Değişik diyabetik retinopati grupları arasında TAY değerleri karşılaştırıldığında retinopati olmayan grup (grup A) ile preproliferatif DR grubu (grup B) arasında anlamlı fark izlenmedi. Diyabetik retinopati olmayan grup (grup A) ve PDR grubu (grup C) arasındaki fark da anlamlı değildi. Benzer şekilde preproliferatif DR grubu (grup B) ve PDR grubu (grup C) arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Açlık kan şekeri seviyeleri grup A, B ve C de benzerdi. Ortalama HbA1c değerleri de grup A,B ve C de farklı değildi (Tablo 2).



Şekil 1: Tüm diyabetik hastaların ve kontrol grubunun trombosit anyonik yükü (Ortalama değerler kullanılmıştır).

TARTIŞMA

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, Tip 2 diyabet hastalarında trombositlere alcian blue bağlanmasında azalma olduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda diyabet hastalarında eritrositlere alcian blue bağlanmasında azalma olduğu bulunmuştur^{11,12}. Eritrositlere alcian blue bağlanmasındaki azalmanın diyabetik sıçanlarda ve diyabet hastalarında bazal membran anyonik yükünde azalma ile ilgili olduğu gösterilmiştir¹³. Alcian blue bağlanması hücre yüzeyi anyonik yükünün bir göstergesi olduğundan, bizim çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlar diyabet hastalarında trombosit anyonik yükünün azaldığını gösterir. Bu veriler diyabetikler üzerinde yapılan klinik ve deneysel çalışmalar ile uyumludur¹⁴.

Bazal membran anyonik yük kaybı tip 2 diyabet hastalarında retinopati patojenezinde rol oynayabilir. Diyabetik retinopati vasküler geçirgenlikte artış, kapiller okülüzyon ve ileri derecede neovaskülarizasyona neden olan retinal mikrodamarlarda zamanla ilerleyen değişikliklerle karakterizedir. Chakrabarti ve ark. BB sıçanlarının retina bazal membranlarında anyonik bölge yoğunluğunun azaldığını bulmuşlardır¹⁵. Retinadaki mikrodamarların anyonik yük kaybı diyabetik retinopatide ortaya konmuş morfolojik değişikliklerdir¹⁶. Bu yük kaybı kan-retina bariyerinin bozulmasına neden olarak kapiller hiperpermeabilite ve proteinlerin derin ve yüzeysel retinal tabakalara sızmasına yol açabilir; bunlar da yumuşak ve sert eksüdalara sebep olabilir^{17,18}.

Tip 2 diyabetik hastaların trombositleri sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında damar endotel yüzeyine yapışarak daha kolay pıhtı oluşturduğu bilinmektedir. Diyabetik hastaların damar dışına alınmış kan örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar bu hastalarda in-vitro trombosit fonksiyonlarının uyarılmış olduğuna işaret etmektedir^{19,20}. Bu durum mikroagregat oluşumunda damar duvarı zedelenmesinden bağımsız olarak trombositlerin de rolü olabileceğini düşündürmektedir^{19,21}. Azalan anyonik yüzey yükü trombositlerin birbirini daha az itmesine ve sonuçta daha kolay agregasyona yol açmaktadır. Bu agregasyon artışı özellikle damarların daraldığı ve akımın yavaşladığı yerlerde kan dolaşımını bozabilir. Trombositlerin daha kolay agregasyonu diyabetik damarlarda tıkanmalara buna bağlı iskemi ve reperfüzyona yol açabilir. İskemi-reperfüzyon diyabetik kapillerlerde inflamatuvar yanıtı artırır²². Hiperglisemiye maruz kalmış olan damar endoteli bu ilave stres karşısında hasara²³ ve replikasyon siklusuna girer²⁴.

Biriken veriler mikroanjiyopati ile seyreden diyabetik komplikasyonların engellenmesinde antitrombotik tedavinin yararlı olabileceğini düşündürmektedir²⁵. Örneğin insüline dirençli diyabette antitrombotik ilaçlar olan tiklopidin ve aspirin ile yapılan tedavilerin mikro- ve makrovasküler lezyonların aracılık ettiği komplikasyonların gelişimini önlemede faydalı olabildiği bildirilmektedir²⁵.

Aspirin tedavisinin proliferatif diyabetik retino-

patinin tedavisinde etkisiz olduğu²⁶ fakat erken retinopati gelişimini önlediği gösterilmiştir²⁷. Köpeklerde yapılan bir çalışmada diyabetin başlangıcı ile birlikte aspirin tedavisinin başlamasının kapillerlerdeki değişiklikleri tamamı ile önlediği gösterilmiştir²⁸. Bu bulgular diyabetin erken aşamasında trombositte bağlı olayların önemli olduğunu düşündürmektedir.

Biz çalışmamıza aile hekimliği polikliniğine ilk defa başvuran hastaları dahil ettik. Çalışma sonucunda hastaların ortalama açlık kan şekeri değerlerinin ve HbA1c düzeylerinin beklenenden yüksek olduğunu gözlemledik. Bu hastalarda metabolik kontrol sağlanmamış olduğundan nefropati henüz gelişmemiş hastalarda %26 oranında retinopati tespit edildi. İleri çalışmalarda diyabeti kontrol altındaki grupla tedavisiz bir grubu karşılaştırmak yoluyla metabolik kontrolün TAY üzerindeki etkisi ortaya konabilir.

Sonuç olarak, tip 2 diyabetik hastalarda TAY kontrol grubuna kıyasla düşüktür. Bu hastalarda tespit edilen retinopati derecesi ile TAY arasında herhangi bir ilişki yoktur.

KAYNAKLAR

1. Porta M, Bandello F: Diabetic retinopathy: A clinical update. *Diabetologia* 2002, 45: 1617-1634.
2. Lightman S, Towler HM: Diabetic retinopathy. *Clin Cornerstone* 2003, 5: 12-21.
3. Fukuda M: Classification and treatment of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 1994, 24: 171-176.
4. Ford DS, Aiello L, Gardner TW, et al.: Diabetic retinopathy. *Diabetes* 2003, 26: 99-102
5. Mc Call AL, Gould JB, Ruderman NB: Diabetes-induced alterations of glucose metabolism in rat cerebral microvessels. *Am.J.Physiol* 1984, 462-467.
6. Bori D, Maiello M, Lorenzi M: Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals. *Diabetes* 2000, 50: 1432-1439.
7. Makovitzky J, Bozsoky Jun S, Laszlo E: Topo-optical reactions of the human blood platelet membrane. *Histochemistry.* 1983, 79: 281-287.
8. Nester L, Szabados L, Born GVR, et al.: Changes in aggregation of platelets enriched in sialic acid. *Nature* 1972; 213: 236-240.
9. Vinik AI, Erbas T, Park TS, et al.: Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001, 24: 1476-1485.
10. Schwinger R, Antoni DH, Guder WG: Simultaneous determination of magnesium and potassium in lymphocytes, erythrocytes and thrombocytes. *J.Trace Elem.Electrolytes Health Dis* 1987; 1: 89-98.
11. Yavuz D, Ersöz Ö, Küçükkaya B, et al.: The effect of losartan and captopril on glomerular basement membrane anionic charge in a diabetic rat model. *J.Hyper* 1999, 17: 1217-1223.
12. Bernard A, Amor AO, Goemare-Vanneste J, et al.: Urinary proteins and red blood cell membrane negative charges in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 1990, 190: 249-262.
13. Estivi P, Cavallo-Perin P, Pagano G: Electrical anionic charges on red blood cells are reduced in insulin-

- dependent diabetic patients. *J Diabet Complications*. 1989; 3: 45-48.
14. Mathiesen ER, Smith C, Lauritzen M, et al.: Surface charge of red blood cells in insulin-dependent diabetic patients with incipient and overt nephropathy. *Diabet Med*. 1987; 4: 431-433.
 15. Chakrabarti S, Ma N, Sima AA: Anionic sites in diabetic basement membranes and their possible role in diffusion barrier abnormalities in the BB-rat. *Diabetologia*. 1991, 34: 301-306.
 16. Carlson EC, Audette JL, Veitheimer NJ, et al.: Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat Rec* 2003; 271: 332-341.
 17. Merimee TJ: Diabetic retinopathy: A synthesis of perspectives. *N Eng J Med* 1990; 322: 978-983.
 18. D' Amico DJ: Diseases of retina. *N Eng J Med* 1994; 331: 95-106.
 19. Chitre AP, Velaskar DS: Role of platelets in diabetic microangiopathy an additional factor. *Angiology* 1988; 458-465.
 20. Çomoğlu S, Yardımcı S, Okçu Z: Duysal polinöropatisi olan diyabetik hastalarda trombosit fonksiyon değişiklikleri. *THOD* 2001; 11: 62-66.
 21. Colwell JA: Pharmacological strategies to prevent macrovascular disease in NIDDM. *Diabetes* 1997; 46: 131-134,.
 22. Panes J, Kurose I, Rodriguez-Vaca MD, et al.: Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996, 93: 161-167.
 23. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M: Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J.Clin Invest* 97; 2883-2890.
 24. Sharma NK, Gardiner TA, Archer DB: A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats. *Am J Ophthalmol* 1985; 100: 51-80.
 25. Hoogwerf BJ, Waness A, Cressman M: Effects of aggressive cholesterol lowering and low-dose anticoagulation on clinical and angiographic outcomes in patients with diabetes. *Diabetes*. 1999; 48: 1289-1294.
 26. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Effects of aspirin treatment on diabetic retinopathy: ETDRS report number 8. *Ophthalmology* 1991; 98: 757-765.
 27. The DAMAD Study Group: Effect of aspirin alone and aspirin plus dipyridamole in early diabetic retinopathy: a multicenter randomized controlled clinical trial. *Diabetes* 1989; 38: 491-498.
 28. Kern TS, Engerman RL: Pharmacologic inhibition of diabetic retinopathy: comparison of aminoguanidine and aspirin. *Invest Ophthal Vis Sci* 2000; 41: S114,.