



Tip 2 Diabetes Mellitusta Barsak Geçirgenliği Biyobelirteci Zonulin ile Diyabetik Retinopati Gelişimi Arasındaki İlişki

An Association Between the Intestinal Permeability Biomarker Zonulin and the Development of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus

© Burak Erdem*, © Yasemin Kaya**, © Tuğba Raika Kıran***, © Saadet Yılmaz****

*Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

**Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

***İskenderun Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Hatay, Türkiye

****Gerze Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Sinop, Türkiye

Öz

Amaç: Artmış barsak geçirgenliği (BG) ve barsak mikrobiyota disbiyozu, düşük dereceli kronik enflamasyondan sorumlu tutulmuştur. Düşük dereceli kronik enflamasyon, diyabetik retinopati (DR) patogenezinin altında yatan önemli bir nedendir. Bu çalışma, tip 2 diabetes mellituslu (T2DM) hastalarda BG biyobelirteci zonulin ile DR arasındaki ilişkiyi göstermeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, 33 DR olmayan, 28 proliferatif olmayan DR (NPDR), 28 proliferatif DR (PDR) olmak üzere toplam 89 T2DM hastası ve 32 sağlıklı kontrol ile yürütülmüştür. Zonulin seviyeleri, kan örneği alınarak ELISA kiti ile belirlendi.

Bulgular: Katılımcılar için yaş ($p=0,236$), cinsiyet ($p=0,952$) ve vücut kitle indeksi ($p=0,134$) açısından dört grup arasında fark yoktu. Zonulin seviyeleri, PDR grubunda diğer üç gruba göre anlamlı derecede yüksekti. Ayrıca zonulin, DR olmayan T2DM ve NPDR'si olan T2DM hastalarında da kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Çok değişkenli lojistik regresyon analizinden sonra zonulin, DR'nin bağımsız bir öngörü unsuru olarak bulundu (olasılık oranı: 1.781, %95 güven aralığı: 1.122-2.829, $p=0,014$).

Sonuç: Araştırmamız, yüksek zonulin seviyelerinin DR gelişiminde, özellikle de proliferatif evreye geçiş de önemli bir rolü olabileceğini göstermiştir. Bu, BG'nin düzenlenmesinin DR tedavisinde hedeflerden biri olabileceğini düşündürmektedir. Öbiyotik barsak mikrobiyotası ve BG'nin DR ile doğrudan bir ilişkisi olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik retinopati, enflamasyon, barsak geçirgenliği, barsak mikrobiyotası, zonulin

Abstract

Objectives: Increased intestinal permeability (IP) and gut microbiota dysbiosis have been implicated in low-grade chronic inflammation, which is an important factor in the pathogenesis of diabetic retinopathy (DR). This study aims to demonstrate the relationship between the IP biomarker zonulin and DR in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Materials and Methods: This study was conducted with a total of 89 T2DM patients, including 33 non-DR, 28 with nonproliferative DR (NPDR), and 28 with proliferative DR (PDR), and 32 healthy controls. Zonulin levels were determined from blood samples using an enzyme-linked immunosorbent assay kit.

Results: There was no difference between the four groups in terms of age ($p=0.236$), gender ($p=0.952$), and body mass index ($p=0.134$) of the participants. Zonulin levels were significantly higher in the PDR group compared to the other three groups, as well as in the non-DR and NPDR groups compared to the control group. In multivariate logistic regression analysis, zonulin was found to be an independent predictor of DR (odds ratio: 1,781, 95% confidence interval: 1,122-2,829, $p=0.014$).

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Burak Erdem, Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

E-posta: burakerdem89@gmail.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-8889-6096

Geliş Tarihi/Received: 15.04.2022 **Kabul Tarihi/Accepted:** 29.04.2022

Cite this article as: Erdem B, Kaya Y, Raika Kıran T, Yılmaz S. An Association Between the Intestinal Permeability Biomarker Zonulin and the Development of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. Turk J Ophthalmol 2023;53:91-96

Conclusion: Our study showed that elevated zonulin levels may play a significant role in the development of DR, particularly during the transition to the proliferative stage. This suggests that regulation of IP could be one of the targets of DR treatment. More studies are needed to determine whether a eubiotic gut microbiota and IP have a direct relationship with DR.

Keywords: Diabetic retinopathy, inflammation, intestinal permeability, gut microbiota, zonulin

Giriş

Diyabetik retinopati (DR) multifaktöriyel bir hastalıktır ve altında yatan patolojik mekanizmalar bazı açılardan belirsizliğini korumaktadır. İmmünolojik, vasküler, nöronal ve düşük dereceli kronik enflamasyon (DDKE) ile ilişkili yolların karmaşık etkileşimi, DR gelişimi ve progresyonunda rol oynamaktadır.^{1,2} Bu değişkenlerden biri olan DDKE'ye olan bilimsel ilgi son zamanlarda giderek artmaktadır. DDKE'de yer alan patojenik süreçlerin hipertansiyon ve hiperglisemi kadar DR gelişiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir.^{3,4}

Son zamanlarda yapılan çalışmalar obezite, enflamatuvar barsak sendromu, karaciğer sirozu, depresyon, tip 1 diabetes mellitus (T1DM) ve tip 2 diabetes mellitus (T2DM) gibi DDKE ile ilişkili hastalıkların barsak bariyer disfonksiyonu, barsak geçirgenliğinde (BG) artış (sızdıran barsak) ve barsak mikrobiyota disbiyozu (BMD) ile ilişkili olduğunu göstermiştir.^{5,6,7} DDKE yanıtının, BMD ve artmış BG sonucu barsak bariyerini geçen antijenlerin tetiklediği enflamatuvar bir immün reaksiyona bağlı olduğu ileri sürülmüştür.⁸ Bu nedenle, barsak kaynaklı endotoksinler (metabolik endotoksemi) aracılığıyla DDKE'ye yol açan BG artışı ve BMD'nin DR patofizyolojisinin önemli bir bileşeni olduğu düşünülmektedir.^{9,10}

Vibrio cholerae için aşılama çalışmaları sırasında keşfedilen zonula okludens toksininin ökaryotik karşılığı olan insan zonulini, 47 kDa ağırlığında bir proteindir ve BG'yi regüle ettiği bilinen tek fizyolojik medyatördür. Bu regülasyon, barsak sıkı bağlantılarını (SB) geri dönüşümlü şekilde açılmasıyla ortaya çıkar.¹¹ Serum zonulin düzeyleri, BG ile lineer korelasyon gösterir ve barsak bariyer fonksiyonu için bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.¹² Barsak mikrobiyotasının (BM) gastrointestinal sistemin geçirgenliğini düzenleyen barsak mukozası bariyer fonksiyonunu etkilediğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır.¹³ Sonuç olarak serum zonulin düzeyleri de BMD'nin önemli bir göstergesidir.^{8,13}

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda zonulinin kronik enflamasyon ve oksidatif stres ile karakterize birçok hastalıklarla ilişkili olduğu da gösterilmiştir.^{14,15,16} Bu çalışmanın amacı, BG'nin biyobelirteci olan zonulinin serum seviyeleri ile DR arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Bu araştırma Kasım 2019-Mayıs 2020 tarihleri arasında Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Dahiliye kliniğine başvuran ve T2DM tanısı alan hastalar göz ve görme muayenesi için göz hastalıkları kliniğine yönlendirilmiş ve uygun hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu ise dahiliye kliniğinde muayene sonrası rutin göz kontrolüne yönlendirilen sağlıklı katılımcılardan oluşturulmuştur. T2DM tanısı için Amerikan

Diyabet Derneği Kılavuzu'nda yer alan kriterler kullanıldı.¹⁷ Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara tam oftalmolojik muayene ve fundus görüntüleme, floresein anjiyografi ve optik koherens tomografi ile retinopati değerlendirilmesi yapıldı. DR tanı kriterleri ve derecelendirmesi Diyabetik Göz Bakımı Kılavuzu kullanılarak yapıldı.¹⁸ Mikroanevrizma, hemoraji, sert eksüda, atılmış pamuk lekeleri, intraretinal mikrovasküler bozukluklar ve ven boncuklaşması gibi herhangi bir karakteristik lezyonun görülmesi durumunda proliferatif olmayan DR ("non-proliferative DR", NPDR) olarak sınıflandırıldı. Neovaskülarizasyon, vitreus kanaması veya traksiyonel retina dekolmanı olması durumunda proliferatif DR (PDR) olarak sınıflandırıldı.

T1DM, gebelik, akut veya kronik enfeksiyöz hastalık, şiddetli hipertansiyon, kalp yetmezliği, karaciğer veya böbrek hastalığı, kanser, vücut kitle indeksi (VKİ) değerinin 95 persentilin üzerinde olması ve diyabetin diğer uzun vadeli komplikasyonlarının görülmesi dışlanma kriterleri olarak belirlendi. Çalışma süresinde Helsinki Bildirgesi'nin ilkelerine uyuldu. Çalışma için Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay (karar no: 2019-160) ve tüm hastalardan bilgilendirilmiş yazılı onam alındı.

Çalışmaya 89 T2DM'li (32 erkek, 57 kadın) hasta ve yaş, cinsiyet ve VKİ açısından uyumlu 32 (11 erkek, 21 kadın; grup 1) oküler hastalığı olmayan yetişkin sağlıklı kontrol dahil edildi. T2DM'li hastalar klinik oküler muayene bulgularına göre üç gruba ayrıldı. DR olmayan grupta 33 (grup 2), proliferatif olmayan DR (NPDR) grubunda 28 (grup 3) ve PDR grubunda 28 (grup 4) hasta yer aldı. Klinik ve demografik bilgiler kaydedildi ve tüm katılımcıların VKİ değeri hesaplandı.

Kan örnekleri, hastalar gece boyunca aç kaldıktan sonra alındı. Kan örnekleri 3.000 dev/dk'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edildikten sonra serum ayrıldı ve test zamanına kadar -80 °C'de saklandı. Glikolize hemoglobin (HbA1c), trigliserid (TG), total kolesterol (TK), yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL) ve kreatinin düzeyleri ölçüldü. Zonulin düzeyleri, insan zonulin ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") kiti (201-12-5578, Sunred®, Çin Halk Cumhuriyeti) kullanılarak ölçüldü. Tüm örnekler, klinik araştırmaya kör olan aynı araştırmacı tarafından çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için IBM Windows için SPSS (23,0, IBM Corp, Armonk, NY, ABD) paket programı kullanıldı. Parametrik ve parametrik olmayan testler için güç analizi G*power yazılımı kullanılarak yapıldı (d=0,5, α=0,05, güç=%80). Çalışma yeterli örneklem büyüklüğü ile gerçekleştirildi. Verilerin dağılım özelliklerini belirlemek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Sayısal değişkenler ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenler sayı olarak ifade edildi. Sürekli değişkenlerin çok

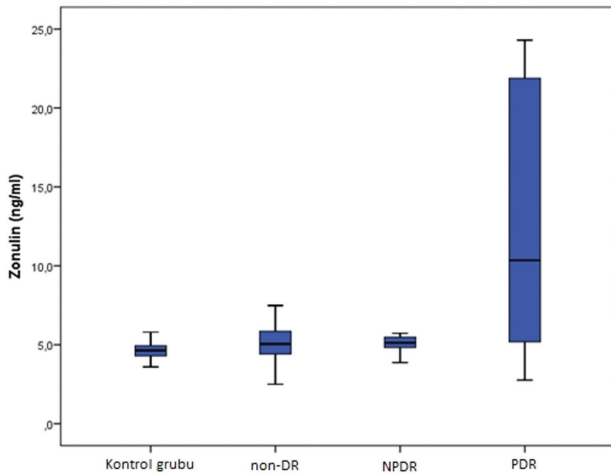
gruplu karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Post-hoc analizde gruplar arasında karşılaştırma yapmak için Tukey testi tercih edildi. DR'nin öngördürücülerini hesaplamak için lojistik regresyon analizi kullanıldı. DR için zonulinin duyarlılık ve özgüllüğü işletim karakteristiği analizi ("receiver operating characteristic", ROC) ile belirlendi.

Bulgular

Yaş ortalaması grup 1'de $62,10 \pm 10,0$ yıl, grup 2'de $60,24 \pm 8,72$ yıl, grup 3'te $62,77 \pm 5,88$ yıl ve grup 4'te $64,42 \pm 9,51$ yıldır. Yaş ($p=0,236$), cinsiyet ($p=0,952$) ve VKİ ($p=0,134$) açısından dört grup arasında fark yoktu. Gruplar arasında TG, TK, HDL, LDL ve kreatinin değerleri açısından da anlamlı fark saptanmadı. T2DM gruplarında (grup 2, grup 3 ve grup 4) metformin kullanımı veya HbA1c düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Katılımcıların demografik ve klinik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Gruplar arasında T2DM süresi ve serum zonulin düzeyleri açısından anlamlı fark vardı. Ortalama T2DM süresi grup 2'de $7,58 \pm 2,75$ yıl, grup 3'te $9,94 \pm 4,77$ yıl ve grup 4'te $11,85 \pm 8,87$ yıldır. Ortalama zonulin düzeyi grup 1'de $4,65 \pm 0,85$ ng/mL, grup 2'de $5,33 \pm 1,58$ ng/mL, grup 3'te $5,26 \pm 0,67$ ng/mL, grup 4'te ise $11,85 \pm 6,87$ ng/mL idi (Tablo 2). Post-hoc analizde hastalık süresi grup 4'te grup 2 ve 3'ten anlamlı olarak daha uzundu ancak grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark izlenmedi. Serum zonulin düzeyi grup 4'te diğer gruplara göre, grup 2 ve grup 3'te ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Yine grup 2 ve 3 arasında zonulin düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Şekil 1'de grupların serum zonulin konsantrasyonlarının dağılımı gösterilmektedir.

Çok değişkenli lojistik regresyon analizinde zonulinin DR için bağımsız bir öngörü unsuru olduğu bulundu (olasılık oranı: 1,781, %95 güven aralığı: 1.122-2.829, $p=0,014$) (Tablo 3).



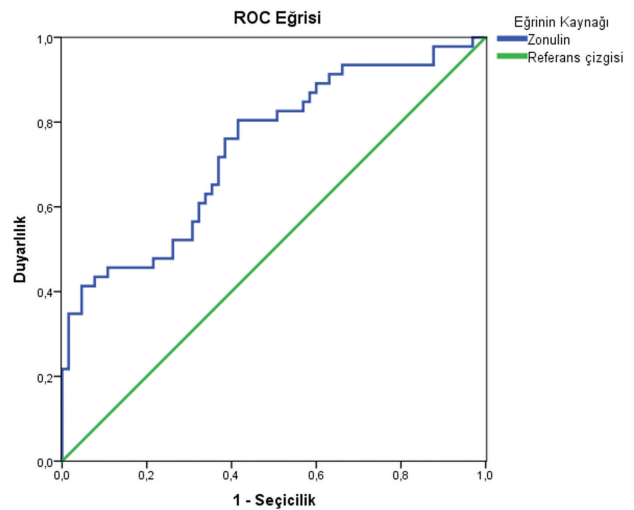
Şekil 1. Çalışma gruplarında serum zonulin konsantrasyonlarının dağılımı
Non-DR: Diyabetik retinopati olmayan Tip 2 diabetes mellitus grubu, NPDR: Proliferatif olmayan diyabetik retinopati grubu, PDR: Proliferatif diyabetik retinopati grubu

Zonulin için ROC eğrisi analizi Şekil 2'de gösterilmiştir. DR'yi ayırt etmede zonulin ROC eğrisi altında kalan alan $0,657$ idi ($p=0,003$). Optimal sınır değeri $10,27$ olup sensitivitesinin %65,2 ve spesifitesinin %58,3 olduğu bulundu.

Tartışma

Haptoglobulin (HP) 2'nin öncüsü olan zonulin, PAR2 (proteazla aktive olan reseptör 2) aracılığıyla epidermal büyüme faktörü reseptörünü aktive eder. Epidermal büyüme faktörünün barsaklardaki aktin hücrelerinde modüle edici etkisine benzer şekilde zonulin, SB'ler üzerinde regülatuar bir etkiye sahiptir. Böylece SB'lerin açılmasını sağlar ve BG'yi artırır.¹⁹ Dolaşımdaki zonulin, BG ve BM için biyobelirteç olarak kabul edilmektedir.⁸ Yakın zamanda BG ve BMD artışının T2DM'nin dahil olduğu birçok hastalığın gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir.^{5,6,7} Jayashree ve ark.¹⁶ artmış serum lipopolisakkarit (LPS) ve zonulin düzeylerinin T2DM ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Barsak bakterileri tarafından üretilen LPS'ler BG'nin artmasıyla birlikte sistemik dolaşıma geçer. LPS'nin DDKE'ye önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.¹⁶ DDKE ve eşlik eden dokuda kan hücresi agregasyonunun DR'de nörodejenerasyona ve mikrovasküler hasara katkıda bulunduğu düşünülmektedir, ancak süreç kesinlik kazanmış değildir.²⁰ Simonsen ve ark.²¹ T1DM hastalarında serum LPS düzeyinin şiddetli DR ile ilişkili olduğunu ve bakteriyel endotokseminin DR için bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Son yıllarda insan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, BM'deki değişikliklerin ve BG artışının DR gelişimi için yeni bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür.^{9,10}

Bu çalışmanın temel bulguları, PDR ile serum zonulin düzeyi artışı arasında güçlü bir ilişki olduğunu izlenmesi ve NPDR olan ve olmayan T2DM hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre serum zonulin seviyelerinde anlamlı artış saptanmış olmasıdır. DR olmayan T2DM grubu (grup 2) ile kontrol grubu (grup 1) arasında önceki çalışmalarla uyumlu olarak



Şekil 2. Diyabetik retinopatiyi öngörmeye zonulinin alıcı işletim karakteristiği eğrisi analizi

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen bireylerin klinik özellikleri ve demografik verileri

	Kontrol grubu N=32	Non-DR grup N=33	NPDR grubu N=28	PDR grubu N=28	p değeri
Yaş (yıl)	62±10,0	60,2±8,7	62,7±5,8	64,4±9,5	0,236
Cinsiyet (kadın/erkek)	21/11	20/13	17/11	17/11	0,952
VKİ (kg/m ²)	29,8±6,3	32,7±4,1	31,8±4,3	30,6±3,4	0,134
DM süresi (yıl)	-	7,58±2,75 ^a	9,94±4,77 ^a	11,85±8,87 ^b	0,002*
Metformin kullanımı (kullanan/kullanmayan)	-	9/24	2/16	7/21	0,401
HbA1c [mmol/mol (%)]	-	59,0±30,1 (7,58±2,75)	64,0±13,6 (8,02±1,24)	66,0±18,1 (8,22±1,66)	0,189
Trigliserid (mg/dL)	144,8±79,3	167,7±67,9	159,8±61,5	168,7±86,0	0,313
HDL (mg/dL)	51,5±15,4	45,7±10,7	44,5±14,4	47,6±12,5	0,284
LDL (mg/dL)	129,5±32,8	122,7±39,6	110,5±27,3	127,0±35,4	0,425
Kreatinin (mg/dL)	0,82±0,19	0,79±0,14	0,96±0,42	0,91±0,34	0,365

Veriler ortalama ± standart sapma veya sayı olarak sunuldu. VKİ: Vücut kitle indeksi, DM: Diabetes mellitus, HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein, LDL: Düşük dansiteli lipoprotein, Non-DR: Diyabetik retinopati olmayan, NPDR: Proliferatif olmayan diyabetik retinopati, PDR: Proliferatif diyabetik retinopati
*Harfler aynı olması anlamlı fark olmadığını, farklı harfler gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir

Tablo 2. Gruplar arasında serum zonulin düzeylerinin karşılaştırılması

	Kontrol grubu N=32	Non-DR grup N=33	NPDR grubu N=28	PDR grubu N=28	p değeri
Zonulin (ng/mL)	4,65±0,85	5,33±1,58 ^a	5,26±0,67 ^a	11,85±8,87 ^b	0,001*

Non-DR: Diyabetik retinopati olmayan, NPDR: Proliferatif olmayan diyabetik retinopati, PDR: Proliferatif diyabetik retinopati
*Tek yönlü ANOVA'da gruplar arasında anlamlı farklılık. ^aZonulin düzeyi post-hoc analizde grup 2 ve 3'te kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0,05). Grup 2 ve 3 arasında fark yoktu (p>0,05). ^bZonulin düzeyi post-hoc analizde grup 4'te diğer üç gruptan anlamlı olarak yüksekti (p<0,05)

Tablo 3. Diyabetik retinopati ile ilişkili olası faktörleri belirlemek için yapılan lojistik regresyon analizi

	Olasılık oranı	%95 GA	p
Yaş (yıl)	0,924	0,887-1,016	0,813
VKİ (kg/m ²)	0,948	0,911-1,128	0,902
HDL (mg/dL)	0,968	0,933-1,005	0,092
Zonulin (ng/mL)	1,781	1,122-2,829	0,014

VKİ: Vücut kitle indeksi, HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein, GA: Güven aralığı

anlamlı bir fark vardı.²² Zonulin düzeylerinin de NPDR ile bağlantılı olduğu görüldü, ancak DR olmayan T2DM grubunda da benzer bir ilişki izlendi. Çalışmamızda çok değişkenli lojistik regresyon analizi ile yüksek zonulin düzeylerinin DR için bağımsız bir öngörü unsuru olduğu bulundu. Bununla birlikte, ROC eğrisi analizine göre duyarlılığı ve özgüllüğü nispeten düşüktü ve rutin kullanımda DR'nin öngörülmesinde faydalı olup olmayacağını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu bulgular, zonulin düzeyi yüksek olan T2DM

hastalarının, proliferatif DR'ye progresyon gösterme olasılığı güçlü adaylar olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca BG artışının DR patogenezinde göz önünde bulundurulması gerektiğine işaret etmektedir. Literatürde bizim çalışmamıza benzer sadece bir çalışma olduğunu gördük. Şirin ve ark.²³ zonulin ve DR ilişkisini incelemiş ancak bizim sonuçlarımızın aksine ilişki saptanmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, çalışmamızda DM tanısından sonra geçen zaman açısından DR olmayan ve NPDR grupları arasında anlamlı bir fark yokken, bu süre PDR gelişimi için anlamlıydı. Bu da uzun diyabet süresi ile yüksek zonulin düzeyleri arasında ilişkili olduğunu göstermektedir. Uzun süreli diyabetin BM üzerinde geri dönüşü zor etkilere sahip olması muhtemeldir.

Önceki araştırmalara göre, yaş, obezite ve dislipidemi gibi çeşitli değişkenlerin serum zonulin düzeyleri üzerine etkisi vardır.^{24,25} Çalışmamızda tüm grupların VKİ ortalamaları hastaların kilolu ve obez olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, kontrol grubu da dahil olmak üzere gruplar arasında VKİ açısından anlamlı bir fark olmadığı için, bu faktörün çalışma sonuçlarını etkilemesi beklenmemektedir.

Rahman ve ark.²⁶ barsakta olduğu gibi kan-beyin bariyeri (KBB) ile zonulin arasında SB'ler üzerinden bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bunun ardından zonulin, çeşitli santral sinir sistemi hastalıkları ve psikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. KBB'de olduğu gibi retina-kan bariyerinin (RKB) temel yapısında da SB'ler bulunmaktadır ve vasküler endotelial büyüme faktörü aracılı patolojik süreçlerin SB'lerin yapısını bozarak DR gelişimine katkıda bulunduğuna dair kanıtlar vardır.^{27,28} Buna göre, dolaşımdaki zonulinin, RKB yapısındaki SB'lere etki ederek, NPDR'den PDR'ye progresyonda retina üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olması da mümkündür. Ancak, bu ilişkinin kontrollü çalışmalara dayanan kanıtlarla desteklenmesi gerekmektedir.

En son çalışmalarda zonulin hala BG için bir ölçüt olarak kabul edilmesine rağmen, bazı araştırmacılar zonulin ile ilgili çelişkili bilgiler rapor etmişlerdir.^{29,30} Scheffler ve ark.³¹ obez bireyler ile yaptıkları çalışmalarında grupları HP'yi kodlayan genlere göre oluşturmuşlardır. Normalde, homozigot HP1 alleli taşıyan bireylerde zonulin tespit etmeyi beklemiyorlardı. Bu hastaların kanında zonulin tespit edilince araştırmacılar çalışmalarını derinleştirdiler. Sonuçta ticari ELISA kitlerinin zonulini ölçmediğini, daha çok yapısal olarak özdeş bir protein ailesini ölçtüğünü buldular. Ancak Scheffler ve ark.³¹ daha önceki çalışmalarda olduğu gibi zonulinin diyabetik ve obez hastalarda arttığını saptamışlardır. Başka çalışmalarda da ticari zonulin ELISA kitleri ile ölçülen maddenin zonulin olmadığı konusunda araştırmacılar uyarılmıştır.^{32,33} Zonulinin BG'yi doğru yansıtmadığı da iddia edilmiştir.³⁴ Power ve ark.³⁵ BG'nin arttığı bilinen Crohn hastalarının birinci derece akrabalarında laktuloz/mannitol oranı ile zonulin arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. BG'nin iyi bir göstergesi olan laktuloz/mannitol oranı ile zonulin arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Sonuçta, çelişkili bulgular olsa da zonulinin DDKE ile ilişkili hastalıklarda hedef molekül olduğu bir gerçektir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Birincisi, çalışma küçük bir grupta gerçekleştirildi. Ayrıca, BMD ve artmış BG'ye sebep olabilen çok fazla ilaç grubu veya hastalık bulunduğundan, bunların hepsini dışlama kriterleri içine almak mümkün olmadı. Buna ek olarak çalışmamızda bireylerin yeme alışkanlıkları kaydedilmemiştir. Beslenme kayıtlarının tutulması gelecekte yapılacak BMD ve BG çalışmalarında yeni bilgiler sunabilir. Ayrıca, tüm katılımcılar tek bir etnik gruptandı ve sonuçlar diğer etnik gruplar için geçerli olmayabilir. HP genotipleme, zonulin kitleri hakkındaki tartışmalar nedeniyle çalışmamızda yararlı olabilirdi, ancak genotipleme yapamadık. Zonulinin BG indikatörü olarak kullanımı tartışmalı olsa da birçok araştırmacı zonulinin hala BG'nin en önemli indikatörü olduğunu düşünmektedir.

Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları, T2DM hastalarında serum zonulin düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca serum zonulin

düzeyleri PDR'li hastalarda NPDR'li ve DR olmayan hastalara göre çok daha yüksekti. Bu nedenle, BG düzenlemesi ve BM'nin yeniden modellenmesi, DR tedavisinde ana hedeflerden biri olabilir. Ayrıca, bazı çalışmalarda iddia edildiği gibi zonulin veya yapısal olarak benzer bir protein ailesi, DR tedavisinde hedef molekül olabilir. Öbiyotik BM ile BG arasında veya zonulin ile DR arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (karar no: 2019-160).

Hasta Onayı: Katılımcıların tamamından yazılı olarak çalışmaya katılım onamı alınmıştır.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: B.E., S.Y., Y.K., **Konsept:** B.E., **Dizayn:** B.E., Y.K., **Veri Toplama veya İşleme:** T.R.K., S.Y., **Analiz veya Yorumlama:** B.E., Y.K., **Literatür Arama:** B.E., **Yazan:** B.E., Y.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Abcouwer SF. Neural inflammation and the microglial response in diabetic retinopathy. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2012;4:25-33.
2. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol.* 2008;30:65-84.
3. El-Asrar AM. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2012;19:70-74.
4. Tomić M, Ljubić S, Kaštelan S, Gverović Antunica A, Jazbec A, Poljičanin T. Inflammation, haemostatic disturbance, and obesity: possible link to pathogenesis of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:818671.
5. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57:1470-1481.
6. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* 2006;55:1443-1449.
7. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes. Gut Microbes.* 2012;3:279-288.
8. Zak-Golař A, Kocelak P, Aptekorz M, Zientara M, Juszczyk L, Martirosian G, Chudek J, Olszanecka-Glinianowicz M. Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile, and zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:674106.
9. Floyd JL, Grant MB. The Gut-Eye Axis: Lessons Learned From Murine Models. *Ophthalmol Ther.* 2020;9:499-513.
10. Rowan S, Taylor A. The Role of Microbiota in Retinal Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1074:429-435.
11. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalıs TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, Arrietta MC, Meddings JB, Fasano A. Identification of human zonulin, a physiological

- modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16799-16804.
12. Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:1096-1100.
 13. Morkkala K, R yti  H, Munukka E, Pietil  S, Ekblad U, R nnemaa T, Erola E, Laiho A, Laitinen K. Gut Microbiota Richness and Composition and Dietary Intake of Overweight Pregnant Women Are Related to Serum Zonulin Concentration, a Marker for Intestinal Permeability. *J Nutr*. 2016;146:1694-1700.
 14. Barbaro MR, Cremon C, Morselli-Labate AM, Di Sabatino A, Giuffrida P, Corazza GR, Di Stefano M, Caio G, Latella G, Ciacci C, Fuschi D, Mastroberroto M, Bellacosa L, Stanghellini V, Volta U, Barbara G. Serum zonulin and its diagnostic performance in non-coeliac gluten sensitivity. *Gut*. 2020;69:1966-1974.
 15. Li C, Gao M, Zhang W, Chen C, Zhou F, Hu Z, Zeng C. Zonulin Regulates Intestinal Permeability and Facilitates Enteric Bacteria Permeation in Coronary Artery Disease. *Sci Rep*. 2016;6:29142.
 16. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, Mohan V, Balasubramanyam M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2014;388:203-210.
 17. American Diabetes Association. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(Suppl):8-16.
 18. Wong TY, Sun J, Kawasaki R, Ruamviboonsuk P, Gupta N, Lansingh VC, Maia M, Mathenge W, Moreker S, Muqit MMK, Resnikoff S, Verdaguer J, Zhao P, Ferris F, Aiello LP, Taylor HR. Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. *Ophthalmology*. 2018;125:1608-1622.
 19. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. 2016;21:4:e1251384.
 20. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, Allen DM, Cardona AE. The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*. 2014;2014:705783.
 21. Simonsen JR, J rvinen A, Hietala K, Harjutsalo V, Forsblom C, Groop PH, Lehto M. Bacterial infections as novel risk factors of severe diabetic retinopathy in individuals with type 1 diabetes. *Br J Ophthalmol*. 2021;105:1104-1110.
 22. Zhang D, Zhang L, Zheng Y, Yue F, Russell RD, Zeng Y. Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106:312-318.
 23. Sirin FB, Korkmaz H, Torus B, Bozkurt M, Doguc DK. The role of zonulin in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Turk J Biochem*. 2021;46:317-322.
 24. Qi Y, Goel R, Kim S, Richards EM, Carter CS, Pepine CJ, Raizada MK, Buford TW. Intestinal Permeability Biomarker Zonulin is Elevated in Healthy Aging. *J Am Med Dir Assoc*. 2017;18:810.
 25. Ohlsson B, Orho-Melander M, Nilsson PM. Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease Manifestations. *Int J Mol Sci*. 2017;18:582.
 26. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, Marchi N, van Boxel-Dezaire AHH. IFN- γ , IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;507:274-279.
 27. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003;36:147-156.
 28. Wang W, Dentler WL, Borchardt RT. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:434-440.
 29. Hoshiko H, Feskens EJM, Oosterink E, Arians RMC, Mes JJ, de Wit NJW. Identification of leaky gut-related markers as indicators of metabolic health in Dutch adults: The Nutrition Questionnaires plus (NQplus) study. *PLoS One*. 2021;16:e0252936.
 30. Yonker LM, Gilboa T, Ogata AE, Senussi Y, Lazarovits R, Boribong BP, Bartsch YC, Loiselle M, Rivas MN, Porritt RA, Lima R, Davis JP, Farkas EJ, Burns MD, Young N, Mahajan VS, Hajizadeh S, Lopez XIH, Kreuzer J, Morris R, Martinez EE, Han I, Griswold K Jr, Barry NC, Thompson DB, Church G, Edlow AG, Haas W, Pillai S, Ardit M, Alter G, Walt DR, Fasano A. Multisystem inflammatory syndrome in children is driven by zonulin-dependent loss of gut mucosal barrier. *J Clin Invest*. 2021;131:e149633.
 31. Scheffler L, Crane A, Heyne H, T njes A, Schleinitz D, Ihling CH, Stumvoll M, Freire R, Fiorentino M, Fasano A, Kovacs P, Heiker JT. Widely Used Commercial ELISA Does Not Detect Precursor of Haptoglobin2, but Recognizes Properdin as a Potential Second Member of the Zonulin Family. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:22.
 32. Ajamian M, Steer D, Rosella G, Gibson PR. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS One*. 2019;14:e0210728.
 33. Vojdani A, Vojdani E, Kharrazian D. Fluctuation of zonulin levels in blood vs stability of antibodies. *World J Gastroenterol*. 2017;23:5669-5679.
 34. Massier L, Chakaroun R, Kovacs P, Heiker JT. Blurring the picture in leaky gut research: how shortcomings of zonulin as a biomarker mislead the field of intestinal permeability. *Gut*. 2020;70:1801-1802.
 35. Power N, Turpin W, Espin-Garcia O, Smith MI; CCC GEM Project Research Consortium; Croitoru K. Serum Zonulin Measured by Commercial Kit Fails to Correlate With Physiologic Measures of Altered Gut Permeability in First Degree Relatives of Crohn's Disease Patients. *Front Physiol*. 2021;12:645303.