

İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus'da Eritrosit Antioksidan Enzimleri ve Vitaminler

ERYTHROCYTE ANTIOXIDANT ENZYMES AND VITAMINS IN INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Gürsel BİBEROĞLIT. Alev HASANOĞLU**, Peyami CİNAZ***, Aysun BİDECI****

Yrd.Doç.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,

** Prof.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,

*** Doç.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,

**** Uz.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, ANKARA

ÖZET

Diabette serbest oksijen radikallerinin arttığı ve komplikasyonların gelişiminden bu radikallerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Ayrıca hipergliseminin eritrositlerde membran lipid peroksidasyonuna, membran osmotik fragilitesinde artışa ve vitamin E düzeylerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada insüline bağımlı diabetes mellituslu (IDDM) 25 hasta ve 10 sağlıklı çocuk da eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitesi, vitamin E düzeyleri ve plazma vitamin A ve E düzeyleri ölçüldü. Eritrosit GSH-Px, vitamin E ($p<0.05$) ve CAT ($p<0.001$) aktivitesi kontrole göre önemli derecede düşük bulundu. Plazma vitamin E düzeyleri normal, vitamin A ise ($p<0.05$) kontrolden anlamlı derecede düşüktü.

Sonuç olarak IDDM da artmış olan oksidatif stresin, eritrositler üzerinde etkili olduğu ve eritrosit antioksidan mekanizmasında azalmaya yol açtığı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: insüline bağımlı diabetes mellitus,
Glutatyon peroksidaz, Katalaz,
Vitamin E, Vitamin A

T Klin Pediatr 1997, 6:5-8

Son yıllarda yapılan çalışmalarda diabetik hastalarda ve deneysel olarak diabet oluşturulan ratlarda serbest oksijen radikallerinin ve eritrosit membran lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı gösterilmiştir (1-4),

Diabette oksidatif stresin artması eritrosit ömrünün kısalmasına, agregasyonun artmasına, membran lipid yapısında değişikliklere ve endotelial hücrelere yapışkanlığın artmasına neden olmaktadır (2,5).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) redükte glutatyonu okside forma dönüştürerek suretiyle

Geliş Tarihi: 28.03.1996

Yazışma Adresi: Dr.Gürsel BİBEROĞLU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Metabolizma Bölümü
Beşevler, ANKARA

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

T Klin J Pediatr 1997, 6

SUMMARY

It is known that free oxygen radicals increases in diabetes and these radicals are responsible from development of complications. Also hyperglycemia causes membran lipid peroxidation, increase of membran osmotic fragility and decrease in levels of vitamin E in erythrocytes. In this study erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities and vitamin E levels and plasma vitamin A and E levels were determined in 25 children with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) and 10 healthy children. Erythrocyte GSH-Px, vitamin E levels ($p<0.05$) and CAT ($p<0.001$) activities were found significantly lower than control. Plasma vitamin E levels were normal but vitamin A levels ($p<0.05$) were lower than control.

As a result it is thought that increased oxidative stress in IDDM is effective on erythrocytes and causes to a decrease of erythrocytes antioxidant mechanism.

Key Words: Insulin dependent diabetes mellitus,
Glutathione peroxidase, Catalase,
Vitamin E, Vitamin A

T Klin J Pediatr 1997, 6:5-8

H₂O₂ in indirgenmesinde rol alan, hücre proteinlerini ve hücre membranlarını oksidatif hasara karşı koruyan önemli antioksidanlardır (6).

Vitamin E de hücre membranlarının stabilizasyonunda rol alan fizyolojik bir antioksidandır. Vitamin E yetersizliğinde eritrosit ömrünün azaldığı ve oksidan bileşiklere karşı duyarlılığın arttığı bilinmektedir (7,8).

Literatürde diabette antioksidan enzimler ve vitamin E düzeyleri ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte hepsinin birlikte yer aldığı bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ayrıca insüline bağımlı diabetes mellitus da (IDDM) eritrosit vitamin E düzeyi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda IDDM da eritrosit GSH-Px, CAT ve vitamin E ve plazma vitamin E ve A düzeyleri ölçülerek antioksidan mekanizmadaki değişiklikler incelendi.

GEREÇ-YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları bölümünde tanı konan 25 IDDM lu ve 10

sağlıklı çocuk çalışma kapsamına alındı . Hasta grubu 7-16 (12.29±3.24), kontrol grubu ise 8-16 yaşları (11.34±2.44) arasındaydı. Hasta grubunun ortalama diabet süresi 3.45±2.91 yıldır. Hasta ve kontrol grubundan 12 saat açlıktan sonra heparinli kan örnekleri alındı ve 3500 x g de 10 dakika santrüflenerek üstten plazma kısmı ayırt edildi. Eritrositler üç defa serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra 0.5 ml eritrosit üzerine 2 ml serum fizyolojik eklenerek eritrosit paketi hazırlandı.

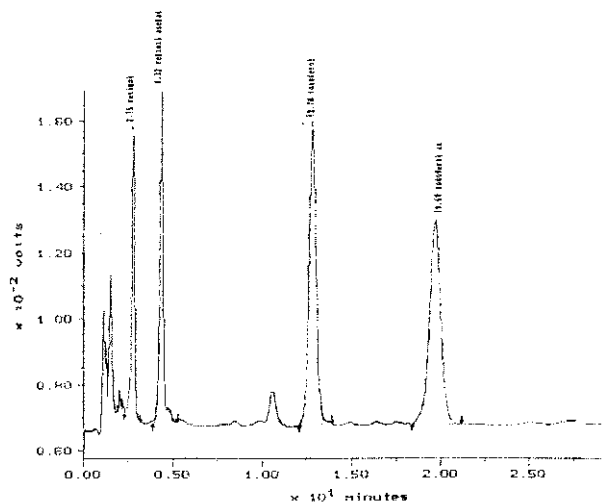
GSH-Px aktivitesi: GSH-Px aktivitesi Paglia ve Vallentinanın yöntemine göre ölçüldü (9), GSH-Px aktivitesi, dakikada bir umol NADPH m kullanımını sağlayan miktar olarak tanımlandı. NADPH m molar absorpsiyon katsayısı 6.22 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ olarak alındı ve sonuçlar Ü/g Hb olarak değerlendirildi.

CAT aktivitesi: Katalaz aktivitesi Aibe'i nin önerdiği yöntemle göre ölçüldü (10). H₂O₂'in molar absorpsiyon katsayısı 43.6 M⁻¹ cm⁻¹ olarak alındı ve enzim aktivitesi dakikada bir mol H₂O₂'in yıkımını sağlayan miktar olarak tanımlandı. Sonuçlar Ü / g Hb olarak değerlendirildi.

Hemoglobin ölçümü Drabkins yöntemine göre, HbA1c ölçümü ise mikrokolon kromatografisi (Biorad) ile yapıldı.

Vitamin E ve A Ölçümü

Eritrosit vitamin E ve Plazma vitamin E ve A miktarları High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile ölçüldü (11). Eritrosit süspansiyonu pyrogallol ile muamele edildikten sonra -70 °C de donduruldu ve bir ay içerisinde analiz edildi. Kromatografik analizlerde Waters marka HPLC kullanıldı . Kromatografik ayırıştırıcılar 300 x 3.9 mm İD C₁₈ kolon ve % 95 metanol kullanılarak 290 nm dalga boyunda ve 25 °C de gerçekleştirildi. Standart olarak a-tokoferol ve retinol, internal standart olarak ise a-tokoferil asetat ve retinil asetat kullanılarak vitamin E ve A düzeyleri standart eğriden hesaplandı. HPLC ile ayırıştırılan a-tokoferol , retinol ve internal standartlara ait kromatogram Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Retinol, α-tokoferol, α-tokoferil asetat ve retinil asetatı ait kromatogram

Tablo 1. IDDM ve kontrol grubuna ait eritrosit antioksidan enzimleri ve vitamin E düzeyleri

Parametreler	Kontrol	IDDM	p
GSH-Px (U/gHb)	13.82±3.68*	11.15±2.52*	<0,05
CAT (Ü/gHb)	0.269±0.113*	0.137±0.037*	<0.001
Vitamin E (ng/dl)	246.9±68.24*1	83.52±62.58*	<0.05

*SD

Tablo 2. IDDM ve kontrol grubuna ait plazma vitamin A, E ve HbA1c düzeyleri

Parametreler	Kontrol	IDDM	p
Vitamin E (ug/dl)	891.1±221.2*	870.8±220.5*	>0.05
Vitamin A (ug/dl)	35.46±11.50*	26.83 ±7.16*	<0.05
HbA1c(%)	5.51±1.2*	9.28±2.69*	<0.001

*SD

BULGULAR

IDDM da eritrosit GSH-Px aktivitesi (11.15±2.52) kontrole göre (13.82±3.68) anlamlı derecede düşük bulundu (p<0.05). Hasta grubunun CAT aktivitesi de (0.137±0.037) kontrol (0.269±0.113) grubuna göre önemli ölçüde düşüktü (p<0.001). Eritrosit vitamin E konsantrasyonu IDDM da (83.52±62.58) kontrol (246.9±68.24) grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı (p<0.05) (Tablo 1).

Plazma vitamin E düzeyleri IDDM'da normal, vitamin A düzeyleri (26.83±7.16) ise kontrole (35.46±11.50) göre anlamlı derecede düşük bulundu (p<0.05) .IDDM lu çocukların HbA1c düzeyleri (9.28±2.69) kontrole (5.51 ±1.2) göre önemli ölçüde yüksekti (p<0.001) (Tablo 2).

IDDM da eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri arasında regresyon analizi yapılarak, bu enzimler arasında pozitif bir ilişkinin olduğu saptandı (r: 0.530, p<0.01). Eritrosit vitamin E ile GSH-Px ve CAT aktiviteleri arasında önemli bir ilişki bulunamadı. Ayrıca plazma vitamin E ve A düzeyleri ile eritrosit GSH-Px ve CAT aktiviteleri arasında da herhangi bir korelasyon saptanamadı.

TARTIŞMA

Diabette nonenzimatik glikozillenme ve otooksidatif glikozillenmenin arttığı ve bunun da serbest oksijen radikallerinin üretiminde artışa neden olduğu bilinmektedir. Bununla beraber diabette, enerji mekanizmasındaki ve sorbitol yolu aktivitesindeki değişikliklerden, antioksi-

dan savunma sistemindeki ve inflammatuar ajanların düzeylerindeki değişikliklerden ve hipoksi ve iskemik reperfüzyona bağlı lokal doku harabiyetlerinden oluşan metabolik stres de oksidatif stresin artışına yol açan mekanizmalar arasındadır(1,5,12,13).

Diabette artmış olan serbest oksijen radikalleri uzun ömürlü ekstrasellüler proteinlerin (kristallin, kollajen, elastin, laminin ve myelin kılıfı gibi) yapısında modifikasyonlara neden olmakta ve bu proteinlerce zengin olan lens, vasküler duvar, baza! membran gibi dokularda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Dokularda oluşan bu yapısal değişiklikler diabette görülen katarakt, mikroanjinopati, ateroskleroz ve nefropati gibi komplikasyonların gelişiminden sorumludurlar (12).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda diabette eritrosit GSH-Px aktivitesi ile ilgili farklı bulgular yer almaktadır (4,6,14-16).Gupta ve arkadaşları alloxan-diabetik raflarda GSH-Px aktivitesini düşük, glutatyon redüktaz aktivitesini ise yüksek bulmuşlar (6), Uzel ve arkadaşları da diabetik hastalarda lipid peroksidasyonunun arttığını, GSH-Px aktivitesinin ise azaldığını belirtmişlerdir (4).

Streptozotosin-diabetik raflarda yapılan bir çalışmada eritrosit CAT aktivitesinde artış, süperoksit dismutaz aktivitelerinde ise azalma olduğu gözlenmiş, ayrıca karaciğer ve böbrek CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli derecede azalma olduğu bildirilmiştir (17). Hagglof ve arkadaşları ise insüline bağımlı diabetik çocuklarda eritrosit süperoksit dismutaz ve GSH-Px aktivitesini düşük bulurken, eritrosit katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde değişiklik saptamamışlardır(15).

Biz de IDDM da eritrosit GSH-Px ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğunu saptadık. Bu bulgularımız serbest oksijen radikallerinin, antioksidan sistemde rol alan bu enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğunu veya artmış olan serbest oksijen radikallerine karşı savunmada bu enzimlerin daha fazla kullanıldığını düşündürmektedir.

Diabette vitamin E ve A ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Vatassery ve arkadaşları IDDM ve insüline bağımlı olmayan diabetes mellitusta (NIDDM) plazma ve platelet vitamin E düzeylerini kontrole göre yüksek bulmuşlar, ancak diabette vitamin E nin artışına neden olan temel mekanizmayı açıklayamamışlardır (18). Jain ve arkadaşları da diabetik raflarda eritrosit vitamin E düzeylerinin düşük, plazma vitamin E düzeylerinin ise kontrole göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermişlerdir (7).

Diğer bir çalışmada ise streptozotosin-diabetik raflarda kalp ventrikülünde lipid peroksidasyonunun ve vitamin E-kinon düzeylerinin arttığını, vitamin E düzeylerinin ise azaldığını saptamışlar ve insülin tedavisi ile lipid peroksidasyonunun ve vitamin E-kinon oluşumunun önlenebileceğini vitamin E düzeylerinde ise değişiklik olmadığını ileri sürmüşlerdir (19).

Biz de çalışmamızda IDDM da eritrosit vitamin E düzeylerini kontrole göre anlamlı derecede düşük bulduk.

Önemli bir membran stabilizatörü ve antioksidan olan vitamin E düzeylerindeki bu düşüş, artmış olan serbest oksijen radikallerine karşı daha fazla miktarda vitamin E kullanıldığını düşündürmektedir. Hasta grubunda plazma vitamin E düzeyi normal, vitamin A ise düşük bulundu. Plazmada vitamin E ve A nin haricinde seruioplazmin, glutatyon, sistein ve askorbik asit gibi birçok antioksidan bileşik bulunmaktadır. Hasta grubunda eritrosit vitamin E düzeyinin düşük olmasına karşın plazma vitamin E düzeyinin normal olması, plazmada diğer antioksidanların daha fazla kullanıldığının bir göstergesi olabilir. Nitekim plazma vitamin A düzeylerindeki azalmada bunu açıklamaktadır.

Sonuç olarak IDDM da eritrosit antioksidan enzimlerinde ve vitamin E düzeylerinde düşüş olduğu ve bu azalmadan artmış olan serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, et al. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992 ; 50: 335-339.
2. Jain SK, McVie R, Duett J, et al. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989 ; 38:1539-43.
3. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 173: 932-939.
4. Uzel N, Sivas A, Uysal M, et al. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 1987 ; 19: 89-90.
5. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility In human red blood cells. *J Biol Chem* 1989 ; 21340-21345.
6. Gupta BL, Azam M, Baquer Z. Changes in erythrocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase in alloxan diabetes. *Biochem Int* 1990; 21: 725-731.
7. Jain SK, Levine SN, Duett J, et al. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 1991; 40:1241-44.
8. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441-45.
9. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
10. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol* 1984; 105:121-126.
11. Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of a-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 1979 ; 32: 2143-49.
12. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.

13. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK. et al. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 1993;45(3): 539-42.
14. Stahlberg MR, Hietanen E. Glutathione and glutathione metabolizing enzymes in the erythrocytes of healthy children and in children with insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis, coeliac disease and acute lymphoblastic leukaemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 125-130.
15. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G. CuZn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin dependent diabetic children. *Acta Endocrinol* 1983;102: 235-39.
16. Bono A, Calmi G, Catania A, et al. Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 1987; 19: 264-66.
17. Sekar N, Anumanthan K, William S, et al. Antioxidant effect of vanadate on experimental diabetic rats. *Acta Diabetol Lat* 1990; 27: 285-93.
18. Vatassery GT, Morley JE, Kuskowski MA. Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am J Clin Nutr* 1983; 37:641-44.
19. Jain SK, Levine SN. Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels In heart ventricles of streptozotocin treated diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:337-41.