

Tip II Diabetes Mellitus Hastalarında Eritrosit Katalaz Aktivitesi

ERYTHROCYTE CATALASE ACTIVITY IN TYPE II DIABETES MELLITUS PATIENTS

Sadinaz KALAK*, İdris AKKUŞ**, Osman ÇAĞLAYAN***, N. Hayat AKSOY****, Ü. Gülsüm CAN*****, Elif MENEKŞE ZEREN*, Mahmut AY*****

* Uzm.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
** Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
*** Yard.Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
**** Bil.Uzm. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
***** Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, KONYA

ÖZET

Bu çalışmada, yaşları 36-70 arasında olan 39 (20 erkek 19 kadın) tip II diabetes mellituslu hasta ile yaşları 35-66 arasında olan 40 (18 erkek, 22 kadın) sağlıklı kişide eritrosit katalaz aktivitesi araştırıldı.

Hasta grubunda eritrosit katalaz aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($p<0.05$). Katalaz aktivitesindeki bu düşüklüğün, diyabetlilerde eritrositlerin oksidatif hasara karşı hassas olmalarının nedenlerinden biri olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, eritrosit, katalaz

Türkiye Klinikleri J Med Sci 1996, 16:212-215

SUMMARY

In the present study, erythrocyte catalase activity of patients with type II diabetes mellitus and healthy controls were investigated. Patients consisted of 39 subjects (20 male, 19 female) aged between 36 and 70 years and controls consisted of 40 subjects (18 male, 22 female) aged between 35 and 66 years.

Erythrocyte catalase activity of the patients was significantly decreased compared to that of healthy controls ($p<0.05$). This significant alteration was thought to be one of the reasons of the erythrocyte susceptibility to oxidative damage.

Key Words: Diabetes mellitus, erythrocyte, catalase

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu olan atom veya moleküllerdir. Bu tür maddeler reaksiyona son derece yatkın olup lipid, protein, nükleik asit ve karbonhidratlar gibi biyomolekülleri etkileyerek birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynarlar (1-3). Serbest radikallerin düzeylerini ve bunların meydana getirdikleri hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler. Katalaz ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalayarak aerobik hücreleri toksik oksijen metabolitlerine karşı koruyan antioksidan bir enzimdir. Katalaz aktivitesi çeşitli dokularda büyük farklılıklar göstermekle beraber en fazla miktarda eritrositlerde bulunur (4-9).

Geliş Tarihi: 11.09.1995

Yazışma Adresi: Dr. İdris AKKUŞ
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ABD, KONYA

Serbest radikaller diyabetin oluşumunda ve uzun dönem komplikasyonlarında önemli rol oynarlar. Oksidatif aktivitenin (serbest radikal üretiminin) artışı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve proteinlerin glikozilasyonu özellikle zayıf kontrollü diyabetiklerde ateroskleroz, retinopati, nefropati, mikroanjyopati gibi diyabet komplikasyonlarına yol açar (10-12).

Diyabetik hastalarda eritrosit membranı lipid peroksidasyonunun artması sonucu membran fosfolipid asimetrisi değişir, eritrosit ömrü ve hücre flexibilitesi azalır, membran rijiditesi, pıhtılaşma eğilimi ve endotel hücrelerine yapışma eğilimi artar. Oksidatif ajanlar SH gruplarının oksidasyonu da eritrosit membranına zarar verirler. Eritrositlerde hemoglobinin oksidatif hasarından da serbest radikaller sorumludurlar (13-16).

Bu çalışmada tip II Diabetes mellitus (DM)'lu hastaların eritrositlerinde görülen serbest radikal kaynaklı hasarların gelişiminde antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olan ve eritrositlerde yoğun olarak bulunan katalaz aktivite değişikliğinin rolü araştırıldı. Diyabetik ve sağlıklı kişilerde eritrosit katalaz düzeyleri karşılaştırıldı.

MATERYEL VE METOD

Çalışma Konya ve çevresinde yaşayan 36-70 yaşları arasında ($\bar{x}\pm SD:53.59\pm 8.31$) klinik ve laboratuvar teşhis metodlarıyla Tip II DM tanısı konmuş 39 hasta (19 kadın, 20 erkek) ile 35-66 yaşları arasında ($\bar{x}\pm SD:49.25\pm 9.01$) 40 sağlıklı kişi (22 kadın, 18 erkek) üzerinde gerçekleştirildi. Hastaların bir kısmı insülin, bir kısmı oral antidiyabetik ile tedavi edilmekte bir kısmı ise yalnız diyet uygulamaktaydı.

Çalışmaya alınan kişilerden 10-14 saatlik açlığı takiben 10 mL venöz kan alındı. Bunun 7 mL'si, içinde 14 mg EDTA bulunan tüpe aktarılıp alt üst edilerek karıştırıldı ve eritrosit paketi elde etmek için kullanıldı. Geri kalan 3 mL kan pıhtılaştıktan sonra serumu ayrılıp AKŞ tayini için kullanıldı.

Eritrosit paketi hazırlamak için ayrılan 7 mL EDTA'lı kan enjektöre çekildi, üzerine 3.5 mL Dekstran 70 solüsyonu eklenip alt üst edildi. Enjektör dik pozisyonda iğne ucu yukarı gelecek şekilde oda ısısında 60 dk. bekletildi. Bu sürenin sonunda iğnenin ucu eğilerek üst faz atıldı. Altta kalan faz bir tüpe aktarıldı. 3500 devir/dak.'da $+4^{\circ}C$ 'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan süpernatant ayrılıp atıldı. Altta kalan kısım üzerine aynı miktarda soğuk serum fizyolojik eklenip 3000 devir/dak.'da $+4^{\circ}C$ 'da 7 dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Yıkamadan sonra hematokrit tayini yapıldı ve eritrosit paketleri katalaz ölçümü yapılmaya kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

Katalaz tayininde, H_2O_2 ile eritrosit hemolizatının inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan hidrojen peroksidin amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik olarak ölçümü temeline dayanan bir metod kullanıldı (4).

Deneyin yapılışı: Fosfat tamponu ile 2000 kez dilüe edilmiş eritrosit hemolizatının 0.2 mL'si, 1 mL substrat (60 μ mol/L, pH: 7.4 sodyum potasyum fosfat tamponu içinde 65 mmol/mL H_2O_2) ile $37^{\circ}C$ 'de 60 sn inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 1 mL amonyum molibdat (32.4 mmol/L) eklenerek durduruldu ve hidrojen peroksidin molibdatla oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de distile suya karşı spektrofotometrede ölçüldü. Aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplandı ve dilüsyon faktörü olan 2000 ile çarpıldı.

$$\text{Katalaz aktivitesi (kÜ/L)} = \frac{A_{\text{kör1}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{kör2}} - A_{\text{kör3}}} \times 271$$

1kÜ, 1 mmol hidrojen peroksidi 1 dk. parçalayan katalaz aktivitesidir.

1 mmol/dak/L=2 mEq/L=2.6 mEq/10 sn/L

Kör₁ tüpü, 1 mL substrat, 1 mL molibdat ve 0.2 mL eritrosit hemolizatı, kör₂ tüpü, 1 mL substrat, 1 mL bolibdat ve 0.2 mL fosfat tampon, kör₃ tüpü 1 mL fosfat tampon, 1 mL molibdat ve 0.2 mL fosfat tampon eklenerek hazırlandı.

271 rakamı enzimatik okuma için hesaplanan çarpım faktörüdür (4).

Sonuçlar her numune için eritrosit paketinin hematokrit değerine bölünerek mEq/10 sn/mL eritrositten bulundu.

Bulgular "student t-testi" kullanılarak karşılaştırıldı.

BULGULAR

Diyabet ve kontrol grubuna ait bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi DM grubunda eritrosit katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde ($p<0.05$) düşük bulunmuştur.

TARTIŞMA

Serbest radikaller çok reaktif ve toksik bileşiklerdir. Lipid, protein, nükleik asit ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllere zarar vererek birçok hastalığın patogenezlerinde önemli rol oynarlar. Diyabetin etiolojisinde ve uzun dönem komplikasyonlarında da artmış oksidatif stresin etkisinin olduğu kaydedilmiştir (10,11,17). Diyabetik kişilerde plazma ve doku lipid peroksidasyon ürünlerinin aynı yaştaki sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (10,13,15,18,19).

Diyabette antioksidan savunma mekanizmalarında da yetersizlik vardır. Diyabetik eritrositlerde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin düşük olduğu, E vitamini, C vitamini glutatyon gibi doğal koruyucu antioksidanların da yetersiz olduğu bildirilmiştir (15,20-22). Gupta ve ark. ratlarda yaptıkları çalışmada antioksidan sistemdeki bu etkilenmenin genç eritrositlerde daha belirgin olduğu bulmuşlardır (23).

Tablo 1. Kontrol ve tip II diyabetlere ait eritrosit katalaz aktivitesi bulgularının karşılaştırılması.

Parametre	Olgu Sayısı	Grup	X ± SD	t	p
AKŞ (mg/dL)	40	Kontrol	97.93±7.77	10.2	p<0.001
	39	Diyabet	207.62±67.89		
Katalaz (mEq/10 sn/mL erit)	40	Kontrol	34.67±12.95	1.97	p<0.05
	39	Diyabet	28.76±13.38		

Diyabetik hastaların karşılaştıkları önemli problemlerden biri de trombotik bozuklukların sık meydana gelmesidir. Diyabetik hastaların eritrositlerinin fizikokimyasal özelliklerindeki anormallikler bu bozukluklara yol açan faktörlerden biridir. Membran özelliklerini etkileyen poliansatüre yağ asitleri biyolojik membranlarda bol miktarda bulunurlar ve bunların peroksidasyonu membran bütünlüğüne karşı ciddi bir tehlike oluşturur. Peroksidlerin oluşumuyla membranların fizikokimyasal özellikleri etkilenir ve membran fonksiyonunda değişiklikler olur.

Çalışmamızda hidrojen peroksidi parçalayarak hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyan önemli bir antioksidan enzim olan katalaz aktivitesini diyabetiklerin eritrositlerinde kontrollere göre önemli derecede düşük bulduk. Bu düşüklüğün diyabetli kişilerin eritrositlerinde oksidatif hasar sonucu meydana gelen değişikliklerden sorumlu faktörlerden biri olabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda bulduğumuz sağlıklı kişilere ait eritrosit katalaz aktivitesi değerleri literatür bulgularıyla uyum halindedir (4,24). Ancak hasta kişilere ait bulgular arasında önemli farklılıklar mevcuttur. Hagglöf ve ark. (21), 9 olgudan oluşan IDDM'li çocuklarda eritrosit katalaz ativitesinin kontrollere göre daha düşük olduğunu ancak aradaki farkın istatistikî açıdan önemli olmadığını bulmuşlardır. Bu araştırmacıların çalıştıkları olgu sayısı az olduğu gibi diyabetin tipi de bizim hastalarımızınkinden farklıdır. Öte yandan Kaji ve ark. (25) sadece diyabetik kadınlarda, Carone ve ark. (26) ise diyabetik gebelerde eritrosit katalaz aktivitesinin kontrollerden pek farklı olmadığını bulmuşlardır. Yine Godin ve ark. (17) ile Bono ve ark. (27) gerek tip I ve gerekse tip II diyabetiklerle sağlıklı kişilere ait katalaz aktivitesi arasında önemli bir fark bulmazken, Selvam ve Anuradha (15) yeni teşhis edilmiş ve hiçbir tedavi almamış tip II diyabetiklere ait katalaz aktivitesinin kontrollerine göre önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Gupta diyabetik ratlarda kontrolden düşük eritrosit katalaz düzeyi tespit etmiştir (23). Görüldüğü gibi çeşitli araştırmacılara ait bulgular arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bu farkın gerek seçilen olgular ile bu olguların gördükleri tedaviden gerekse diğer çevresel faktörlerden kaynaklanabileceği kanaatindeyiz.

Balashova ve ark.nın çalışmasında tip I DM'li hastalarda insülin tedavisinin katalaz aktivitesini %41 arttırdığı gözlenmiştir (28). Litvinenko'nun çalışmasında da kan glukoz düzeyinin eritrosit antioksidan enzim düzeylerini etkilediği, invitro 20 mmol/L glukoz konsantrasyonunda 37°C'de 2 saat inkübasyonun eritrosit katalaz ve SOD aktivitelerini yarıya indirdiği tespit edilmiştir (29). Moser ve ark.nın medikal tedavi yanı sıra balneoterapi uygulamaları DM'li hastalarda plazma katalaz aktivitesinde nonspesifik olarak değerlendirdikleri bir artış görülmüştür (30).

Çalışmamızda dahil ettiğimiz olgu sayısı istatistikî açıdan yeterli olup diğer araştırmacıların olgu sayılarından (Hagglöf 9, Bono 19) daha fazladır. Bu da bulgularımızı oldukça güvenilir kılmaktadır. Ancak, tip II diyabetli kişilere ait eritrosit katalaz aktivitesindeki bu düşüklüğün diyabetik eritrositlerde artan oksidatif stresin bir sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu bilinmemektedir. Konunun bu yönü ile araştırılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):479-80.
2. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 1994;344:721-4.
3. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes. In: Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease*. London: Balliere Tindall, 1990. p.189-212.
4. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991;196:143-52.
5. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989;73(1):334-9.
6. Gonzales R, Christian A, Voisin E, Gautero H, Dhermy D, Boivin P. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1984;44:4137-9.
7. Tudhope GR. Red cell catalase in health and in disease with reference to the enzyme activity in anemia. *Clin Sci* 1967;33:165-82.
8. Deby C, Pincemail J. Oxygen toxicity, free radicals, and defense mechanisms. In: Fünfgeld EW, Rökan (ginko Bitoba), eds. *Recent results in pharmacology and clinic*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988;56-70.
9. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
10. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 1993;49(3):642-52.
11. Shoff SM, Mares-Perlman JA, Cadckshanks KJ, Klein R, Klein BEK, Ritter LL. Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C, and β -carotene intake in diabetic and nondiabetic older adults. *Am J Clin Nutr* 1993;58:412-6.
12. Walter RM, Uriu-Hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, Keen CL. Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991;14(11):1050-6.
13. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membran lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-43.
14. Urano S, Hoshi-Hashizumea M, Tochigi N, Matsua M, Shiraki M. Vitamin E and susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 1991;26(1):58-61.

15. Selvam R, Anuradha CV. Lipid peroxidation and antiperoxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *Indian J Biochem Biophys* 1988;25:268-72.
16. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990;39(9):971-5.
17. Godin DV, Wohaiab SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988;84:223-31.
18. Cother A, Rumley A, Rumley AG. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 1992;41:909-13.
19. Gallau G, Ruelland A, Legras B, Maugendre D, Allannic H, Cloarec L. Plasma malondialdehyde in type I and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1993;214:227-34.
20. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993;36:1212-3.
21. Hagglöf B, Marklund SL, Holmgren G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinol* 1983;102:235-9.
22. Matsubara LS, Ferreira AL, Tornero MT, Machado PE. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1992;25(4):331-5.
23. Gupta BL, Ansari MA, Srivastava P, Baquer NZ. Ageing erythrocytes and alloxan diabetes: I. A possible role of catalase, GSH, GSSG, and GSH-enzymes in decreasing defence system. *Biochem Mol Biol Int* 1993;31(4):669-76.
24. Tietz NW, Finley PR, Pruden EL. Section I. In: *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 2nd ed. USA: WB Saunders Co; 1990. p.110-1.
25. Kaji H, Kurasaki M, Ito K, Saito T, Saito K, Niioka T, Kojima Y, Ohsaki Y, Ide H, Tsuji M, Kondo T, Kawakami Y. Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type 2 diabetic women. *Klin Wochenschr* 1985;63:765-8.
26. Carone D, Loverro G, Greco P, Capuano F, Selvaggi L. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;51(2):103-9.
27. Bono A, Caimi G, Catania A, Sarno A, Pandolfo L. Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 1987;19:264-6.
28. Balashova TS, Glega EN, Rud'ko IA, Balabolkin MI, Kubatiev AA. Lipid peroxidation and the antioxidant protection of the erythrocytes in diabetes mellitus patients. *Ter Arkh* 1993;65(10):23-7.
29. Litvinenko LA. Effect of hyperglycemia on the status of antioxidant protection of erythrocytes in children with diabetes mellitus and invitro. *Probl Endokrinol* 1991;37(3):6-8.
30. Moser M, Buchberger W, Mayer H, Winkler R. Influence of an iodine-drinking cure on the antioxidative status of diabetic patients. *Wien Klin Wochenschr* 1991;103(6):183-6.