

İNSÜLİNE BAĞIMLI DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA PLAZMA LİPİD PEROKSİT SEVİYELERİ VE ERİTROSİT GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ AKTİVİTESİ

Plasma lipid peroxidation levels and erythrocyte glucose-6- phosphate dehydrogenase activity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus

Seval YILMAZ¹, Bilal ÜSTÜNDAĞ²

Özet

Amaç: Bu çalışmada, insüline bağımlı diabetes mellituslu hastalarda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ile ve eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) aktivitesi ölçülerek hastalıkla olan ilişkileri araştırıldı.

Gereç ve yöntem: Çalışmada 30 insüline bağımlı diabetes mellituslu hasta ile 20 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunda kan glukozu, MDA düzeyleri ile eritrosit G-6-PD aktivitesi ölçüldü. Plazma MDA tayini, Satoh ve Yagi'den modifiye edilen bir yöntemle, spektrofotometrik olarak yapıldı. Eritrosit G-6-PD aktivitesi Beutler'in NADP'nin NADPH'a indirgenmesi esasına dayanan kinetik yöntemiyle tayin edildi.

Bulgular: Sağlıklı kontrol grubunda plazma MDA düzeyleri (ortalama \pm SD) 1.92 ± 0.33 nmol/ml bulunurken, komplikasyonsuz diabette 2.39 ± 0.32 nmol/ml, nöropati+retinopati diabette 2.97 ± 0.47 nmol/ml bulundu. Eritrosit G-6-PD aktiviteleri kontrol grubunda 4.72 ± 1.47 U/gHb, komplikasyonsuz diabetik grupta 3.04 ± 2.49 U/gHb, nöropati+retinopati diabetik grupta ise 2.98 ± 1.59 U/gHb olarak belirlendi.

Serum glukoz düzeylerinde diabetik gruplarda anlamlı bir artış tespit edildi. Diabetik grupların plazma MDA düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek, eritrosit G-6-PD aktiviteleri ise düşük olarak saptandı ($p < 0.05$).

Sonuç: Sonuç olarak; Tip II diabetes mellitusda yüksek MDA seviyeleri ile gösterildiği gibi, lipid peroksidasyonuna yol açan serbest oksijen radikallerinin artmasına bağlı olarak, eritrositlerde G-6-PD gibi eritrosit antioksidan enzim aktivitelerinin azalabileceği görüşüne varıldı.

Anahtar Kelimeler: Diabet, Glukoz, Glukoz fosfat dehidrogenaz, Lipid peroksidasyonu

Abstract

Purpose: In this study, plasma malondialdehyde (MDA, an index of lipid peroxidation) and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) activity were investigated in 30 patients with insulin-dependent diabetes mellitus and in 20 healthy controls in order to determine whether there is any relation between these parameters and the disease.

Material and methods: Blood glucose, plasma MDA levels and G-6-PD activities were measured in 30 patients with insulin dependent diabetes mellitus and in 20 healthy controls. Plasma MDA levels were determined spectrophotometrically according to a method modified from Satoh and Yagi. G-6-PD activities were measured by the method of Beutler which is based on reduction of NADP to NADPH.

Results: In the control group, the plasma MDA level (mean \pm SD) was found to be 1.92 ± 0.33 nmol/ml, whereas in diabetic patients with neuropathy and retinopathy and in those without any complications, it was 2.97 ± 0.47 nmol/ml and 2.39 ± 0.32 nmol/ml, respectively. Erythrocyte G-6-PD level in the control group was 4.72 ± 1.47 U/gHb, while in the diabetic group with neuropathy and retinopathy and in the diabetic group without any complications it was 2.98 ± 1.59 U/gHb and 3.04 ± 2.49 U/gHb, respectively. Serum glucose level and plasma MDA level in the diabetic group were significantly higher than those of the control group. Erythrocyte G-6-PD levels were found to be significantly lower when compared with the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: As a result, we observed that G-6-PD activity was decreased in insulin-dependent diabetes mellitus due to increased free oxygen radicals which leads to lipid peroxidation, as indicated by high MDA levels.

Key Words: Diabetes, Glucose, Glucose phosphate dehydrogenase, Lipid peroxidation

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi ELAZIĞ
Biyokimya. Araş.Gör.Dr.¹, Y.Doç.Dr.²

Geliş tarihi: 9 Şubat 1998

Diabetes mellitus, şiddetli insülin disfonksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile karakterize, kompleks ve oldukça sık rastlanan metabolik bir

hastalıktır (1,2). Hiperglisemiye bağlı olarak, belirli bir zaman sonunda ortaya çıkan retinopati, nefropati ve nöropati, diabetes mellitusta görülen en önemli komplikasyonlardır (1,3).

Son zamanlarda, diabette görülen bu komplikasyonların oluşmasında serbest oksijen radikallerinin artması ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz oluşu sorumlu tutulmaktadır (4). Özellikle iyi kontrol edilmeyen diabette oksidatif aktivitenin artması serbest radikal oluşumunu artırmaktadır (2,5,6).

Oluşan lipid peroksidleri, kolaylıkla yıkılarak en önemlisi malondialdehit (MDA) olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler. Bu nedenle, tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile MDA miktarının ölçümü dokulardaki lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtmaktadır (7-9). Organizmalar, serbest oksijen radikallerinin hasarından biyolojik bütünlüklerini korumak için endojen antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) (E.C.1.1.1.49), oksijen sitotoksitesine karşı, hücrel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir antioksidan enzimdir.

G-6-PD'nin eritrositlerde bulunuşu, bilhassa klinik açıdan önemli olup G-6-PD aktivitesi çeşitli hastalık durumlarında normalden sapsmalar gösterebilmektedir (10). G-6-PD eksikliğinde, detoksifikasyon sırasında kullanılan redükte glutasyon (GSH), yeterli NADPH oluşturulamadığı için, tekrar eski etkinliğini kazanmadığından, eritrosit membranının ve intrasellüler ortamın oksidan etkisinde kalmasına ve akışkanlığın değişmesine de neden olmaktadır (11,12). Enzim eksikliğinde membranın doymuş yağ asitleri olan palmitik ve stearik asitlerin azaldığı, poliansatüre yağ asitlerinden özellikle araşidonik asitin arttığı bildirilmiştir. Ortamda aşırı oksidan madde bulunduğunda, G-6-PD eksikliği olan eritrositlerin membranlarında peroksidasyon hızının arttığı gösterilmiştir (13).

Çalışmamızda plazma MDA düzeyleri, eritrosit G-6-PD aktiviteleri araştırılarak diabetin komplikasyonlarının patogeneğinde oksidan ve antioksidan sistemlerin etkinliği incelenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji servisinde yatan, yıllar önce tanıları konulmuş, yaş ortalaması 47.24 ± 9.29 yıl olan, ve nöropati+retinopati komplikasyonlu (n=18) ve komplikasyonsuz (n=12) insülin bağımlı diabetes mellituslu toplam 30 hasta (19 K, 11 E) ile yaş ortalaması 41.88 ± 10.82 yıl olan 20 sağlıklı kişi (12 K, 7 E) çalışma kapsamına alındı.

Bir gece açlıktan sonra EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri derhal santrifüj edilerek MDA tayini için plazma elde edildi. Eritrosit peletleri üç kez serum fizyolojik (% 0,9'luk NaCl) ile yıkanarak eritrosit süspansyonları hazırlandı ve G-6-PD analizi için örnekler çalışmadan hemen önce 1:10 hemolizat solüsyonu (2,7 mmol Na₂EDTA, 0,7 mol 2-merkaptöethanol, pH 7) ile hemolize edildi (14).

Plazma MDA tayini, Satoh (15) ve Yagi (16)'den modifiye edilen bir yöntemle, spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu metot lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile TBA'nın reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbanısı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

Eritrosit G-6-PD aktivitesi Beutler (17)'in NADP'nin NADPH'a indirgenmesi esasına dayanan kinetik yöntem ile saptandı. Enzim aktivitesi 37° C'de bir dakikada 340 nm'de oluşan 1 mmol NADPH olarak saptandı. Spesifik aktivite ise U/gHb olarak verildi. Eritrosit hemoglobin tayini için siyanmethemoglobin oluşumuna dayanan Drabkin (18) yöntemi kullanıldı. Serum glukoz düzeyleri

Technicon RA-XT otoanalizörde yapıldı.

Gruplarda elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası anlamlılık düzeylerinin değerlendirmesinde ise (Post Anova) Tukey B ve Scheffe testleri kullanıldı. Kontrol, komplikasyonsuz diabetik ve nöropati+retinopatili diabetik gruplar kendi içlerinde glukoz, MDA ve G-6-PD parametreleri arasında Pearson ve Spearman korelasyon testleri uygulandı.

BULGULAR

Tablo I'de kontrol, komplikasyonsuz diabetik ve nöropati+retinopatili diabetiklerde ortalama serum glukoz, plazma MDA seviyeleri ile eritrosit G-6-PD aktiviteleri gösterildi.

Serum glukoz düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, komplikasyonsuz diabetik grupta ($p<0.001$) ve nöropati+retinopatili diabetik grupta ($p<0.001$) anlamlı derecede artış bulundu. Nöropati+retinopatili diabetik gruptaki serum

glukoz düzeyinin komplikasyonsuz diabetik gruba göre anlamlı bir artış göstermediği saptandı ($p>0.05$).

Komplikasyonsuz diabetik ve nöropati+retinopatili diabetik grupların plazma MDA düzeyleri kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Nöropati+retinopatili diabetik grup ile komplikasyonsuz diabetik grubun plazma MDA düzeyleri arasında da anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$).

Eritrosit G-6-PD aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, komplikasyonsuz diabetik ve nöropati+retinopatili diabetik gruplarda anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$). Diabetik gruplar arasında ise istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Korelasyon testleri kontrol grubu, nöropati+retinopatili diabetik grup ve komplikasyonsuz diabetik gruplarda; glukoz, MDA ve G-6-PD arasında yapıldı. Nöropati+retinopatili diabetik grupta plazma MDA düzeyi ile eritrosit G-6-PD arasında bir korelasyon olduğu gözlemlendi ($r: 0.513$, $p<0.05$).

Tablo I. Sağlıklı kişilerde ve Diabetes Mellituslu hastalarda serum glukoz, plazma MDA seviyeleri ile eritrosit G-6-PD aktivite düzeyleri (ANOVA testi, post ANOVA testleri Tukey B ve Scheffe testleri)

Parametreler	Gruplar Diabetes Mellitus			P
	Kontrol I (n=20)	Nöropati+Retinopatili DM II (n=18)	Komplikasyonsuz DM III (n=12)	
Glukoz (mg/dL)	87.44±16.79	209.90±18.56	189.58±41.99	$P<0.05$
Plazma MDA (nmol/ml)	1.92±0.33	2.97±0.47	2.39±0.32	$P<0.05$
EritrositG-6-DH (U/g Hb)	4.72±1.47	2.98±1.59	3.04±2.49	$P<0.05$

TARTIŞMA VE SONUÇ

Plazma lipid peroksitlerinin artması, sağlam doku ve organlarda hasara yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu, diabetik hastalarda, uzun sürede ortaya çıkan komplikasyonlar için hazırlayıcı bir faktör olabilmektedir. Diabetiklerde plazma lipid peroksitlerinin artışı bu bireylerde gözlenen retinopatinin nedeni olabilir. Şu söylenebilir ki; plazma lipid peroksit düzeyi, diabetin prognozunu değerlendirmede faydalı olabilmektedir (19). Diabetes mellitusta antioksidan savunma sistemleri ve antioksidan maddelerin varlığı oldukça önemlidir. G-6-PD de önemli bir antioksidan enzim olarak kabul edilmektedir (20).

Bu çalışmamızda plazma MDA düzeyleri ve eritrosit G-6-PD aktiviteleri ve dolayısıyla diabetik komplikasyonların gelişimindeki rolü incelendi. Çalışmamızda kontrol grubu plazma MDA düzeyleri, diabetik grubun plazma MDA düzeyleri ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu tesbit edildi. Ayrıca diabetik grubun eritrosit G-6-PD düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Blackman ve arkadaşları (21) plazma MDA düzeylerinin diabetik hastalarda kontrol grubuna göre belirgin derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

İnsülin eksikliğinde artan serbest yağ asitlerinin yüksek plazma MDA düzeylerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İnsülin hepatosit MDA üretimini azaltmaktadır. Diabetik ve sigara içenlerde normal bireylere göre daha yüksek MDA değerine sahip olduğu bildirilmiştir. İnsan plazmasındaki MDA düzeylerinin diabetik metabolizmasından daha çok hipertrigliseridemi ve vasküler hastalığa bağlı olduğu rapor edilmiştir (21,22). Diabetiklerde plazma MDA düzeyi yükselmekte ve artmış lipid peroksidasyonu diğer doku ve organlarda hasar oluşturarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilmektedir. Diabetik ve anjiopatisi olan hastalarda TBA reaktivitesinde önemli derecede artma, komplikasyonları olmayanlarda ise normal plazma TBA düzeyleri bildirilmiştir. Bu artışın serbest radikal aşırı üretimi

ve hücre içi antioksidan sistemin bozulmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (23).

Retinopatili diabetik hastalarda da TBA reaktivitesinde artış görülmüştür. Diabet komplikasyonlarında lipidlere ilaveten protein komplikasyonu da artar. Özellikle, ekstraselüler proteinlerden kollajen, elastin, laminin, kristalin ve miyelin kılıfındaki proteinlerde meydana gelen değişiklikler önemlidir. Sonuçta bu proteinlerce zengin olan dokularda (lens, damar, basal membranlar vb) meydana gelen yapısal değişiklikler katarakt, mikroanjiopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diabet komplikasyonlarında önemli rol oynar.

Artmış lipid peroksidasyonunun, diabet komplikasyonlarının bir sonucu ya da sebebi olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Ancak, lipid peroksidasyonunun, devamlı bir siklus olan oksidatif stres ve hasarın bir parçası olduğuna inanılmaktadır. Yani, lipid peroksidasyonu doku hasarını, doku hasarı da lipid peroksidasyonunu artırır (24).

Nehal ve arkadaşları (25), Costagliola ve arkadaşları (26) diabetik bireylerde eritrosit ve doku G-6-PD düzeylerini karşılaştırmışlar ve diabetiklerde, sağlıklı bireylere göre G-6-PD enzim aktivitesini belirgin derecede düşük, insülinin neden olduğu hipoglisemide ise G-6-PD aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Bizim bulgularımız Costagliola ve arkadaşlarının bulguları ile uyum içindedir.

Diabetik hastaların lökositlerinde, insülin eksikliği sonucu glikolitik yol bozulur, enerji kaynağı olan ATP'nin azalması pentoz fosfat yolu vasıtasıyla oksidatif glikolizinin artmasına ve böylece süperoksit ve benzeri moleküllerin daha fazla üretilmesine sebep olur. Pentoz fosfat yoluyla oluşan bu oksidanlar fagositik, kemotaktik ve diğer muhtemel defektlere yol açarak hücreye zarar verirler (27).

Bu çalışmada elde edilen veriler, diabetik hastalarda anjiopati patogenezinde oksidan sistemin (MDA) aşırı üretimi ve antioksidan savunma sistem enzimlerinden biri olan G-6-PD enzim etkilenmesinin önemli etken faktörlerden biri olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her yönü ile diabetes mellitus. Ed. Yenigün M. Haseki Hastanesi Vakfı. İstanbul 1995, ss 3-45; 547-737.
2. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radicals. In: Cheeseman KH, Slater TF. (eds), *Free Radicals in Medicine*. British Medical Bulletin. London. 1993, pp 643-649.
3. Kahn CR. Joslin's diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GC. (Eds) *A Warely Company*. London, 1994, pp 631-737.
4. Brownlee M, Cerami A. The Biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann Rev Biochem* 1981; 50:385-432.
5. Wolff SP. and Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-250.
6. Pekcan M, Aydın R, Alpaslan F. Oksijen serbest radikalleri hastalıklarda yeni bir dönem noktası mı? *GATA Bülteni* 1987; 29:869-880.
7. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1984; 94: 407-411.
8. Draper HH and Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymol* 1990; 186:421-427
9. Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymol* 1984; 105:299-305.
10. Gözükara EM. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin özellikleri, metabolik ve klinik açıdan önemi. *Biyokimya Dergisi* 1978; 3: 2-17.
11. Schaeffer F, Stainer RY. Glukoz-6-phosphate dehydrogenase, kinetics and molecular properties. *Arch Microbiol* 1978; 116-119.
12. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: CR Scriver (ed), *The metabolic basis of the inherited disease* Mc Graw Hill, New York 1983, pp 1629-1653.
13. Clemens MR, Einsele H and Waller HD. The fatty acid composition of red cells deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase and their susceptibility to lipid peroxidation. *Klin Wochenschr* 1985; 63:578-582.
14. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. International committee for standardization in haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 1977;35:331-340.
15. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90:37-43.
16. Yagi K. Dedection lipid peroxidation assay of blood plasma or serum. *Methods in Enzymology* 1984; 105:328-331.
17. Beutler E. Red cell metabolism. *A Manual of Biochemical Methods*. (3rd ed.) Grune-Stratton, Orlando 1984, pp 68-70.
18. Fairbank VF and Klee GG. Biochemical aspects of hematology (2 nd ed) In: Tietz NW (ed) *Textbook of Clinical Chemistry* WB Saunders Company. Philadelphia, U.S.A. 1986, pp1506-1507.
19. Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. *Academic Press*. New York 1982, pp 224-241.
20. Costagliola C. Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8:204.
21. Blackman BC, White P, Tsou W and Finkel D. Peroxidation of plasma and platelet lipids in chronic cigarette smokers and insulin dependent diabetics. *Ann NY Acad Sci* 1989; 435:385-386.
22. Nishigaki I, Hotta N, Sakamoto N, et al. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med* 1978; 25:373-378.
23. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988; 5:113-124.
24. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, et al. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1991; 50: 335-339.
25. Nehal M, Baquer NZ. Effect of diabetes and insulin-induced hypoglycemia on hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in red blood cells. *Biochem Int* 1989; 19 1:185-191.
26. Costagliola C, Iuliano G, Menzione M, Nesti A, Simonelli F, Rinaldi E. Systemic human diseases as oxidative risk factors in cataractogenesis. *Diabetes. Ophthalmic Res* 1988; 20:308-313.
27. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974; 23:9-15.