

TIP 1 DİYABETİKLERİN ERKEN VE GEÇ DÖNEMİNDE ANTIÖKSİDAN STATÜ*

Savaş GÜZEL, Arzu SEVEN,
Sabiha CİVELEK, Serpil SALMAN,
İlhan SATMAN, Gülden BURÇAK

Background and Design.– In this study, endogenous erythrocyte antioxidant status markers – CuZn superoxide dismutase (CuZn SOD), glutathione peroxidase (GSH Px), glutathione (GSH) – and plasma levels of vitamin C and E were investigated in 15 type 1 diabetics at onset (0-2 months) and at 18 months of diabetic age and in 15 healthy controls.

Results.– In type 1 diabetics at onset significantly higher GSH ($p<0.001$), CuZn SOD ($p<0.05$), vitamin C ($p<0.001$) levels and significantly lower GSH Px ($p<0.001$) activity and at 18 months of diabetic age significantly by higher GSH Px ($p<0.05$) and significantly lower CuZn SOD ($p<0.001$) levels were observed in comparison to controls.

At 18 months of diabetic age significantly decreased GSH ($p<0.001$), CuZn SOD ($p<0.001$) and vitamin C ($p<0.01$) levels and significantly increased GSH Px ($p<0.01$) and vitamin E ($p<0.05$) levels were observed compared to diabetics at onset. NO correlation was obtained between GHb and antioxidant status parameters.

Conclusion.– Our findings reveal selective

modification of antioxidant defense system as an adaptive response to oxidative stress in type 1 diabetics at onset and at 18 months of diabetic age.

Güzel S, Seven A, Civelek S, Salman S, Satman İ, Burçak G. Antioxidant status in type1 diabetic patients at onset and 18 months of diabetic age. Cerrahpaşa J Med 2001; 32: 243-248.

Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin prooksidan ve oksidan maddeler lehine kayması diyabetes mellitusta oksidatif stresin gelişmesine yol açar¹⁻⁵

Poliyol yolu aktivasyonu, proteinlerin non-enzimatik glikasyonu, monosakkaritlerin otooksidasyonu, enerji metabolizma değişikliklerinden oluşan metabolik stres, antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik, inflamatuvar mediatör düzeyindeki değişiklikler, iskemik reperfüzyon hasarları diyabette oksidatif stresin artmasına katkıda bulunan başlıca mekanizmalardır.⁶⁻⁸

Tip 1 diyabetik hastalarda antioksidan statü parametrelerini inceleyen çalışmalarda bulgular çelişki göstermektedir. Bazı çalışmalarda antioksidan aktivitenin arttığı diğerlerinde ise azaldığı bildirilmiştir.⁶⁻⁸ Bu bilgilerin ışığı altında bu çalışma tip 1 diyabetiklerde erken (0-2 ay) ve geç (18 ay) dönem antioksidan statü göstergelerini -eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH Px), CuZn süperoksit dismutaz (CuZn SOD), glutatyon (GSH) değerleri ve plazma C ve E vitaminleri- saptamak ve sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırmak amacı ile yapıldı. Ayrıca peroksidatif hasar ile glisemik kontrol arasındaki ilişki araştırıldı.

* *Anahtar Kelimeler:* Glutatyon, Glutatyon peroksidaz, Bakır Çinko Süperoksit dismutaz, C/E vitamini, Diyabet; *Key Words:* Glutathione, Glutathione peroxidase, CuZn Superoxide dismutase, Vitamin C/E, Diabetes; *Alındığı Tarih:* 16 Mayıs 2001; *Doktora Öğr. Savaş Güzel, Prof. Dr. Arzu Seven, Uzm. Dr. Sabiha Civelek, Prof. Dr. Gülden Burçak, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biokimya Anabilim Dalı; Uzm. Dr. Serpil Salman, Prof. Dr. İlhan Satman, İÜ İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Diyabet Bilim Dalı; Yazışma Adresi (Address): Prof. Dr. Arzu Seven, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.*

E-mail: bbseven@superonline.com.tr

http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2001v32/s4/014a7.htm

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma 15 tip 1 diyabetik hasta ve 15 sağlıklı kontrol grubunda yapıldı. Hasta grubunu İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Diyabet Bilim Dalı ile Deneysel Tıp Araştırma Merkezi Diyabet Araştırma Ünitesine başvuran hastalar oluşturdu. Tip 1 diyabetik hastaların tanısında Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği teşhis kriterleri esas alındı.⁹

Diyet ve insülin tedavisinde olan erken dönem (0-2 ay) tip 1 diyabetiklerde (8 kadın ve 7 erkek) yaş: 25.13±6.77 yıl, vücut kütle indeksi (VKI): 23.50±3.37 kg/m²; sağlıklı kontrol grubunda (8 kadın ve 7 erkek) yaş: 23.33±3.94 yıl, VKI: 20.82±2.54 kg/m² idi.

Ağır hiperlipidemili (total kolesterol >300 mg/dl, trigliserid >300 mg/dl) olgular ve düzenli ilaç, E/C vitamini oral kontraseptif kullanan diyabetikler çalışma kapsamına alınmadı.

Tip 1 diyabetiklerden erken (0-2 ay) ve geç dönemde (18 ay) ve sağlıklı kontrollerden alınan açlık heparinli kan örnekleri 3000 g de +4°C de santrifuj edildi ve plazma ayrıldı. Eritrositler serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve supernatant atıldı. Eritrositler ve plazma -70°C de analiz yapıncaya kadar saklandı.

Glike hemoglobin (Ghb) boronat agaroz jel afinite kromatografi yöntemi ile analizlendi. Eritrosit GSH konsantrasyonu Beutler'in¹⁰ yöntemine göre 5'5'-dinitrobenzoik asit ile renk oluşturularak ölçüldü.

Nitroblue tetrazolyum indirgenmesinin ksantin/ksantin oksidaz ile inhibisyonu prensibine dayanan Sun yöntemi ile CuZn SOD aktivitesi ölçüldü.¹¹ GSH Px aktivitesi, H₂O₂ varlığında NADPH oksidasyonunun 340 nm de spektrofotometrik değerlendirilmesi ile saptandı.¹² Plazma C vitamin konsantrasyonu Omaye'nin 2,4 dinitro fenil hidrazin¹³ yöntemi ile; E vitamini ise Emmerie-Engel yöntemi ile ölçüldü.¹⁴

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Erken ve geç dönem tip I diyabetiklerin karşılaştırılması küçük eşlendirilmiş "t" testi ile yapıldı. Çalışma grupları ANOVA (varyans analiz) ile karşılaştırıldı. p değerleri Dunnett "t" testi ile saptandı. p<0.05 istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tip 1 diyabetik hastaların ve kontrol grubunun klinik özellikleri Tablo I'de görülmektedir. Çalışma gruplarına ait antioksidan statü parametrelerine ilişkin bulgular Tablo II'de görülmektedir.

Erken Dönem (0-2 ay) diyabetiklerde; kontrol grubuna göre GSH (p<0.001), CuZn SOD (p<0.05) ve C vitamini (p<0.001) değerleri anlamlı derecede yüksek; GSH Px aktivitesi (p<0.001) ise düşük olarak saptandı.

Geç dönem (18 ay) diyabetiklerde GSH

Tablo I. Tip 1 Diyabetik Hastaların ve Kontrol Grubunun Klinik ve Laboratuar Bulguları

	Kontrol (n=15)	Tip 1 Diyabetikler (n=15)	
Kadın/erkek (n)	8 / 7	8 / 7	
VKI (kg/m ²)	20.82 ± 2.54	23.50 ± 3.38	26.42 ± 3.80
Diyabet süresi	-	0 - 2 ay	18 ay
Glike Hb (%)	5.26 ± 1.81	8.71 ± 3.57	9.06 ± 3.32
sBP (mm Hg)*	111.42 ± 10.65	113.70 ± 12.60	120.63 ± 13.21
dBp (mm Hg)**	70.26 ± 5.85	71.60 ± 6.45	75 ± 4.63

* sBP (mm Hg): sistolik kan basıncı; ** dBp (mm Hg): diastolik kan basıncı

Tablo II. Çalışma Gruplarının Antioksidan Statü Parametre Değerleri ve İstatistiksel Karşılaştırma (Ort. ± SD)

	Kontrol (n=15)	Tip 1 Diyabetikler (n=15)	
		Diyabetik yaş	
		(0-2 ay)	(18 ay)
GSH (mg/g Hb)	2.11±0.57	3.55±0.70 ^{a***}	1.98±0.59 ^{b**}
GSH Px (U/g Hb)	13.52±4.54	7.15±3.27 ^{a***}	19.92±8.74 ^{a*b**}
CuZn SOD (mg/L)	333.60±60.51	379.20±57.51 ^{a*}	221.40±47.72 ^{a***b***}
C vitamin (% mg)	1.61±0.68	2.73±0.79 ^{a***}	1.60±0.31 ^{b**}
E vitamin (% mg)	0.84±0.25	0.75±0.13	0.91±0.15 ^{b*}

a= Kontrole göre; b= Erken dönem diyabetiklere göre

Px ($p<0.05$) aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek; CuZn SOD ($p<0.001$) ise düşük olarak saptandı.

Geç dönem diyabetiklerde erken dönem diyabetiklere göre; GSH ($p<0.001$) CuZn SOD ($p<0.001$) ve C vitamini ($p<0.001$) değerlerinin anlamlı derece düşük olduğu, GSH Px ($p<0.01$) ve E vitamini ($p<0.01$) seviyelerinin ise yüksek olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Tip 1 diyabetik olgularda erken (0-2 ay) ve geç dönemde (18 ay) antioksidan statü parametrelerini prospektif şekilde araştırmak amacı ile yapılan bu çalışmada bulgularımız geç dönem diyabetiklerde CuZn SOD, GSH ve C vitamin değerlerinin anlamlı derecede düşük olduğunu, GSH Px ve E vitamin düzeylerinin ise yüksek olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; bulgularımız erken dönemde CuZn SOD aktivitesinin yüksek, GSH Px aktivitesinin düşük; geç dönem bulguları ise bunun tam tersi olduğunu göstermektedir. Literatür araştırmamız diyabetik hastalarda antioksidan statü parametrelerine ait bulgular konusunda bir konsensus olmadığını göstermektedir.

Diyabette görülen oksidatif stresi basılabilmek amacı ile; antioksidan enzim aktivitesinin arttığı, azaldığı veya değişmediği bildirilmiştir.⁸ Bu farklılıklar; diyabetin süresinden, çalışılan enzim veya dokudan kaynaklanmaktadır. Ayrıca enzim aktivitesinde zamana bağlı geçici değişiklikler de etkileyici faktörlerdir. Oksidatif stres varlığında adaptif bir mekanizma ile; antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesinin arttığı bilinmektedir.¹⁵⁻¹⁷ Diğer yandan; enzimlerin serbest oksijen radikalleri ile inaktivasyonu sonucu aktivitesinin azaldığı da bildirilmiştir.^{5,16,17}

Non-enzimatik savunma sistemiyle ilişkili olarak; başlıca hücre içi antioksidan olan E vitamini ve membran proteinlerini oksidatif hasardan koruyan GSH değerleri diyabetiklerde azalmış olarak saptanmıştır.^{8,18,19}

Radikal hasar karşısında organizmayı daha etkili korumak amacı ile antioksidan enzimlerin kooperativate gösterdiği bilinmektedir.²⁰ SOD ve GSH Px'in sinerjistik etki gösterdikleri ve C ve E vitaminlerinin de antioksidan enzim sistemleri ile sinerjistik çalıştıkları bildirilmiştir.²¹

Tip 1 diyabetiklerde insülin yetersizliğinde β oksidasyonun artmasına bağlı olarak H_2O_2 oluşumunun arttığı bilinmekte-

dir.¹⁷ H₂O₂'in doku SOD aktivitesini indüklemesine bağlı olarak çalışmamızda erken dönem tip I diyabetiklerde kontrol gruba göre yüksek SOD aktivitesi saptadık.²²

Geç dönem diyabetiklerde gözlediğimiz SOD aktivitesindeki azalma hiperglisemiye bağlı aşırı enzim tüketiminin sonucu olabilir.

Diyabetik hastalarda poliyol yolu aktivitesindeki artış NADPH ve NAD⁺ azalması ve hücrel redoks potansiyelinde değişiklikler ile sonuçlanır.^{2,8} Bu durum hücre içi GSH eksikliğine yol açar ve serbest radikal temizleyici aktivitenin engellenmesi ile hücrelerin artmış oksidatif stres ile mücadelesini azaltır. Geç dönem diyabetiklerde saptadığımız GSH eksikliğine bağlı olarak askorbatın dehidroaskorbattan rejenere olamaması askorbat seviyesinin düşüklüğünü açıklayabilir.²

Deneyssel ve klinik diyabet çalışmalarında askorbik asidin renal atılımındaki, yarı ömründeki ve hücrel alımdaki değişikliklere bağlı olarak düşük değerleri bildirilmiştir.^{2,3,23}

α tokoferol büyük oranda lipoproteinler ile taşınır. Geç dönem diyabetiklerde bulduğumuz E vitamini yüksekliği hiperlipidemiye bağlıdır. Bulgularımızla uyumlu olmak üzere; insüline bağımlı diyabetes mellituslu (IDDM) hastalarda plazma ve doku E vitamini değerleri yüksek saptanmıştır.^{24,25}

Çalışmalarımızda metabolik kontrol göstergesi olan GHb ile antioksidan statü parametreleri arasında korelasyon saptanmadı. Bu bulgumuz Sinclar ve ark.²⁶ ve Som ve ark.²⁷ nin çalışmaları ile uyumlu olmakla birlikte; HbA_{1c} ile GSH Px ve CuZn SOD arasında ve glike Hb ile C vitamini arasında negatif bir ilişki bildiren çalışmalar ile ters düşmektedir.^{28,29}

Bulgularımız tip 1 diyabette oksidatif strese cevap olarak adaptif bir mekaniz-

ma ile erken dönemde GSH ve CuZn SOD'ın, geç dönemde ise GSH Px'in uyarıldıklarını, erken dönemde GSH Px geç dönemde ise CuZn SOD enzimlerinin aşırı tüketime uğradıklarını göstermektedir.

ÖZET

Bu çalışmada, eritrosit endojen antioksidan statü markerleri- CuZn süperoksid dismutaz (CuZn SOD), glutatyon peroksidaz (GSH Px), glutatyon (GSH) ve plazma C, E vitamini düzeyleri- 15 tip 1 diyabetik hastada erken (0-2 ay) ve geç (18 ay) dönemde ve 15 sağlıklı kontrol grubunda incelendi.

Kontrol grubuna göre: Erken dönem (0-2 ay) diyabetiklerde GSH (p<0.001), CuZn SOD (p<0.05), C vitamini (p<0.001) değerleri anlamlı derecede yüksek, GSH Px (p<0.001) aktivitesi ise anlamlı derecede düşük; geç dönem (18 ay) diyabetiklerde ise GSH Px (p<0.05) aktivitesi anlamlı derecede yüksek, CuZn SOD aktivitesi ise düşük (p<0.001) saptandı.

Erken-geç dönem diyabetikler karşılaştırıldığında; geç dönemde GSH (p<0.001), CuZn SOD (p<0.001), C vitamini (p<0.01) düzeyleri anlamlı derecede düşük, GSH Px (p<0.01), E vitamini (p<0.05) düzeyleri ise yüksek gözlemlendi. GHb ile antioksidan statü parametreleri arasında korelasyon saptanmadı.

Bulgularımız tip 1 diyabetin erken ve geç döneminde oksidatif strese adaptif cevap olarak antioksidan savunma sisteminin seçici olarak değişime uğradığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Br Med Bull 1993; 49: 642-652.
2. Sinclair AJ. Free radical mechanisms and vascular complication of diabetes mellitus. Diabetes

- Rev 1939; 2: 7-10.
3. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Helwuist S, Andersen HU, Pociot F, Reimers JI, Cuartero BG, Karlsen AE, Bjerre U, Lorenzen T. On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1994; 37: 82-89.
 4. Packer L. The role of antioxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1212-1213.
 5. Pieper GM, Jordan M, Donadlinger LA, Adams MB, Roza AM. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. *Diabetes* 1995; 44: 884-889.
 6. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Tomo C, Kroebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Scherthaner G, Mueller M. Enhanced Serum levels of thiobarbituric acid - reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98: 469-475.
 7. Salonen JT, Myyssonen K, Toumainen TP, Maenpaa PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrich SP, Salonen R. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *Br Med J* 1995; 311: 1124-1127.
 8. Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 1996; 19: 257-267.
 9. World Health Organization Study Group: Diabetes Mellitus, Technical Report Series 1985; 727.
 10. Beutler E, Durgun O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 51: 882-888.
 11. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
 12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
 13. Omaye ST, Turnbull JD, Souberlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Methods Enzymol.* 1979; 6: 3-13.
 14. Quaife ML, Scriimshahaw NS, Lowry OH. A micro-method for assay of total tocopherols in blood serum. *J Biol Chem* 1949; 180: 1220-35.
 15. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988; 44:223-231.
 16. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingom S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and complications. *Clin Sci* 1996; 9:255-260.
 17. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987; 36:1014-17.
 18. Peuchant E, Beauvieux MCD, Couchouron A, Dubougr L, Thomas MJ, Perromat A, Clerc M, Gin H. Short-term insulin therapy and normoglycemia. *Diabetes Care* 1997; 20: 202-207.
 19. Yoshida K, Hirokawa j, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995; 38: 201-210.
 20. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-419.
 21. Jacques PF, Chylack LT, McGandy RB, Hartz SC. Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch Ophthalmol* 1988;106: 337-340.
 22. Subrahmanyam V. Mantha, Marion P, Jawahar K, Kailash P. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in Rabbits. *Atherosclerosis* 1993; 101:135-144.
 23. McLennan S, Yue DK, Fisher E, Hefferan CPS, Ross GR, Turtle JR. Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. *Diabetes* 1988; 37: 359-361.
 24. Asayama K, Nakane T, Uchida N; Dobashi K, Nakazawa S. Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res* 1994; 26: 313-315.
 25. Ndahimana J, Docrhy H, Vertongen F. Erythrocyte and plasma antioxidant activity in diabetes mellitus type 1. *Presse Med* 1996; 25: 188-92.
 26. Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Le Guen C, Lunec J, Barnett AH. Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation. *Diabetologia* 1991; 34: 171-175.
 27. Som S, Basu S, Mukherjee D, Deb S, Choudary

- R, Mukherjee S, Chatterjee SM, Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism* 1981; 30: 572-577.
28. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 99-105.
29. Yue DK, McLennan S, Fisher E, Heffernan S, Copogreco C, Ross GR, Turtle JR. Ascorbic acid metabolism and the polyol pathway. *Diabetes* 1989; 38: 257-261.