

DİABETES MELLİTUSTA ERİTROSİT MEMBRAN KOLİNESTERAZININ DÜZENLENMESİ

Osman EVLİYAĞLU¹, Nuriye UZUNCAN¹, Baysal KARACA¹,
Nazife KILIÇASLAN², Ruhan KOCAÇELEBİ², Sevinç İNCİ³

REGULATION OF ERYTHROCYTE MEMBRANE CHOLINESTERASE IN DIABETES MELLITUS

Summary: We determined the cholinesterase activities in erythrocyte membranes and sera of patients with Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM), and Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) and investigated the possible relationships with blood HbA1C%, serum glucose, cholesterol, triglyceride levels. Groups were evaluated as; 21 healthy persons, 26 NIDDM patients with body mass index (BMI)<25, 28 NIDDM patients with BMI>30 and 18 IDDM patients. While the activity decrease of erythrocyte membrane cholinesterase was significant in IDDM patients ($p<0,001$), there was no statistical significance in other groups ($p>0,05$). In obese NIDDM patients, serum cholinesterase activity was increased ($p<0,05$) and slightly correlated with serum cholesterol ($r=0,5$, $p<0,05$).

Key Words: Cholinesterase, Diabetes Mellitus, Erythrocyte Membran.

Özet: Çalışmamızda, İnsülin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)'lu ve Non İnsülin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM)'lu hastaların, serum ve eritrosit membranlarında kolinesteraz düzeyleri ölçüldü. Ölçülen değerlerin kan HbA1C, serum glukoz, kolesterol, trigliserid ile ilişkileri incelendi. Çalışma grubumuz, sağlıklı kişiler (21), vücut kitle indeksi 25'ten küçük NIDDM'lu hasta (26), vücut kitle indeksi 30'dan büyük NIDDM'lu hasta (28) ve IDDM'lu hastadan (18) oluştu. Eritrosit membran kolinesteraz aktivitesi, IDDM'lu hastalarda anlamlı bir azalma ($p<0,001$) gösterirken, diğer gruplardaki değişiklik anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Obez NIDDM'lu hastalarda; serum kolinesteraz seviyesi artmıştı ($p<0,05$), bununla birlikte serum kolesterolü ile korelasyonu anlamlı ($r=0,5$ ve $p<0,05$) olarak tespit edildi. Sonuç olarak, eritrosit membran kolinesteraz aktivitesinin düzenlenmesi, membran dinamik özelliklerine bağlı ve serum kolinesteraz regülasyonundan farklı bir mekanizmaya sahip olduğu düşünüldü. Bu mekanizmanın aydınlatılmasında membran üzerindeki insülinin etkilerinin daha detaylı araştırılması gerektiğine karar verildi.

Anahtar Kelimeler: Kolinesteraz, Diyabetes Mellitus, Eritrosit membran

GİRİŞ

Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolini hidrolize eden iki farklı enzimi ifade eder. Pseudokolinesteraz da denilen kolinesteraz 2, başlıca plazma ve karaciğer, pankreas da bulunurken, gerçek kolinesteraz denilen kolinesteraz 1, başlıca eritrosit, dalak, akciğer ve sinir sonlarında bulunur(1).

Serum kolinesteraz seviyeleri karaciğerin sentez kapasitesini ölçmede duyarlı bir test olmasıyla birlikte hiperlipoproteinemilerde(2), obez diabet, nefrotik sendrom tirotozikoz ve psikiyatrik bozukluklarda(1) artar. Alloksanla oluşturulmuş diyabetik ratlarda(3), NIDDM ve IDDM'lu hastalarda hipertrigliseridemi ile birlikte serum kolinesteraz seviyeleri de artmıştır(4).



Eritrosit kolinesterazı paroksizmal noktürnal hemoglobüride azalır, enzim aktivitesinin lipid-protein etkileşimiyle düzenlendiği savunulmuştur(5). IDDM da eritrosit membran kolinesterazı azaldığı saptanmış ve açlık glukoz seviyesiyle negatif korelasyon bulmuştur(6). Membran akışkanlığının değişmesine sekonder olarak değişen kolinesteraz aktivitesi, eritrosit membran bütünlüğünün markırı olarak değerlendirilmiştir(7).

Bu çalışmada IDDM ve NIDDM lu hastalarda serum ve membran kolinesteraz seviyelerindeki değişim ve HbA1C, kolesterol, trigliserid seviyeleri ile ilişkileri incelendi.

MATERYAL VE METOD

Çalışma dört grup olarak planlandı. Grup 1, sağlıklı kontrol grubu olarak, 25-57 yaşları arasında (ort.49), herhangi bir klinik şikayeti ve belirgin bir laboratuvar bulgusu olmayan 21 kişiden (12 erkek-9 kadın) oluşturuldu. Grup 2'de, vücut kitle indeksi 25'in altında olan Tip II DM'lu, 28-76 yaşları arasındaki (ort.55,6), 26 hasta (13erkek-13 kadın) incelendi. Grup 3'e, vücut kitle indeksi 30'un üstünde olan Tip II DM'lu, 38-70 yaşları arasında(ort.53,9), 28 hasta (11erkek- 17kadın) kabul edildi. Grup 4 ise Tip I DM'lu, yaşları 14-36 arasında (ort.21) olan, 18 hastadan (7erkek- 11kadın) oluşturuldu. Bütün gruplarda pankreatit klinik ve biyokimyasal olarak dışlandı. Bir gece açlığı takiben bir bölümü düz jelli tüplere alınan kanlar santrifüjlenerek serumları ayrıldı, diğer kısmı ise plazma ve eritrosit membranında çalışılacak parametreler için EDTA'lı tüplere alındı, +4C0 saklandı ve 4 gün içinde bütün testler çalışıldı.

Serum glikoz, kolestrol, trigliserid, HDL tayinleri enzimatik kolorimetrik yöntemle, Olympus marka Au-5100 model analizörde çalışıldı. Eritrosit kolinesteraz tayini, propioniltiokolinin hidrolizi sonucu tiokolinin Ellman reaktifi ile oluşan renkli bileşiğin 405 nm'de , Boehringer Mannheim'ın fotometrik 4010 cihazında ölçülerek yapıldı. Serum kolinesteraz tayininde ise aynı yöntemde substrat olarak bütirilkolün kullanıldı. HbA1C yüzdesi, glikolize hemoglobinin

polianyon afinitesi olan reaktifle oluşturduğu kompleksin Abbot firmasının IMx cihazında MEIA yöntemiyle belirlendi.

Eritrosit membranı hazırlanması: EDTA'lı tüplere alınan kan santrifüj edilerek (4,500 x g) plazma ayrıldı. 150 mmol/L NaCl ile üç kere yıkandı. 0,1mM EDTA içeren 5mM Tris-HCl (pH=7,6) tamponu ile hemolize edildi(20). Hemolizat, 20,000 x g de, 20dk., +4C0'de santrifüj edildi. Elde edilen çökelti, hemoglobinden tamamen arındırmak için tamponla yıkandı. (21)

İstatiksel değerlendirmeler SPSS 10,0 bilgisayar programında, Mann-Whitney U testi ve Spearman korelasyon testi kullanıldı.

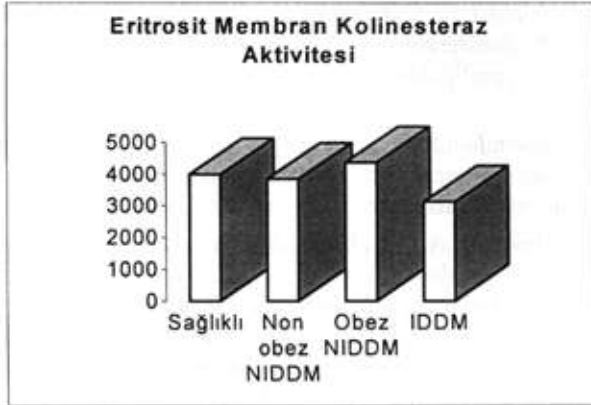
Tablo1.

	Grup1* (n=21)	Grup2 (n=26)	Grup3 (n=28)	Grup4 (n=18)
Serum AchE (U/L)	6573,8±1322	6858±1565	7732,5±2026**	6969,7±1804
Membran AchE (U/L)	3989±705	3842±988	4361±1074	3122±728***
Trigliserid (mg/dL)	116,2±82	175±107***	178,9±141***	170±121***
Kolesterol (mg/dL)	167,7±24,7	199±46***	209±27,4***	175±42***
% HbA _{1c}	4,99±0,6	10,4±2,6***	9,1±2***	9,8±2,4***

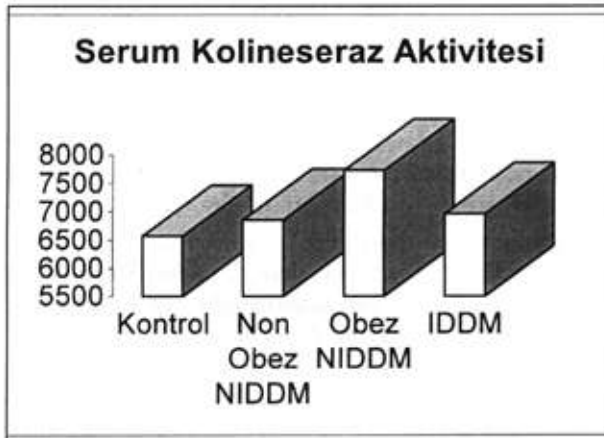
*Grup 1 referans alınarak istatistiksel analiz yapıldı. **p<0,05
***p<0,001

BULGULAR

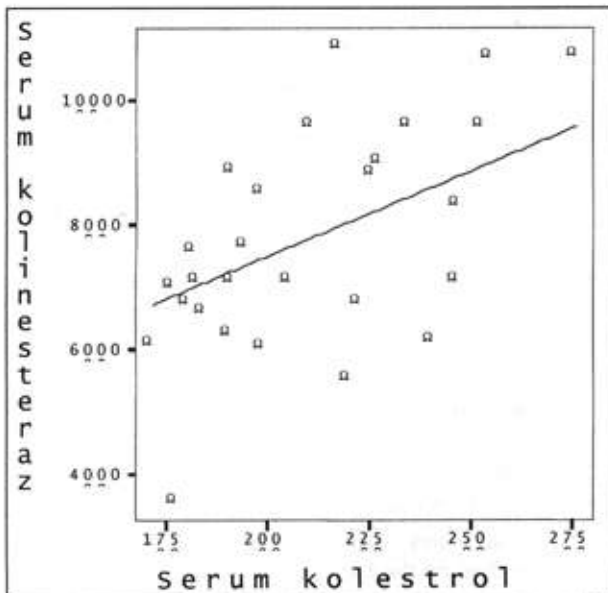
Dört grubun da istatistik tanımları Tablo 1'de verildi. Eritrosit membran kolinesteraz aktivitesi, Grup 4'te belirgin azalmasına rağmen (p<0,001), diğer gruplarda bu fark anlamlı bulunmadı (Grafik1). Serum kolinesteraz aktivitesinin yalnız grup 3'teki artışı anlamlı (p<0,05) bulundu (Grafik 2). Hasta gruplarının her üçünde de Grup 1'e göre glukoz, HbA1C ve kolestrol seviyelerinde belirgin artış (p<0,001) gözlemlendi. Grup 3'te serum kolinesterazı ile ve serum kolestrolü arasında korelasyon saptandı (r=0,5, p<0,05). Grafik 3'de aradaki ilişki gösterildi. Üç hasta grubunda da kolinesteraz aktiviteleri ile HbA1C, trigliserid düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.



Grafik I: $p < 0,001$



Grafik II: $p < 0,05$



Grafik III: Serum kolinesterazı ile serum kolesterolu arasındaki korelasyon ($r=0,5$, $p < 0,05$).

TARTIŞMA

Eritrosit membranındaki AchE aktivitesi, integral proteindir ve membran bütünlüğünü gösterir (14). DM'lu hastalarda enzim aktivitesinin değişikliği ve değişikliğin mekanizması tartışmalıdır. Testa ve arkadaşları (5) aktiviteyi artmış bulurken, biz Tip I DM'lu hastalarda, membran AchE aktivitesinin azaldığını saptadık (1,6,7,8,13).

Bazı çalışmalarda mikroçevredeki değişime bağlı olarak enzim aktivitesindeki azalmadan ziyade, aktif enzim sayısında bir azalma olduğunun vurgulanması (8) dikkatleri membranın dinamik yapısına çekmiştir. Bu azalma membran kompozisyonunda rol oynayan (fosfolipid, kolesterol, siyalik asit) maddelerin oranındaki değişikliğe bağlanmıştır (17). Enzim aktivitesinin değişikliği membran protein oranını belirtmeyeceği (8), fakat membran protein bütünlüğünün göstergesi olacağını (7) belirten çalışmalar membranın dinamik özellik değişimini destekler.

Tip I DM'lu hastalarda, eritrositlerin yaşam süresi kısalmış, membran akışkanlığı ise artmış olarak bulunmuştur (5,13,16). Çalışmamızda Tip I DM'lu hastalardaki membran AchE aktivite düşüklüğü membran akışkanlığının artmış olduğunu düşündürdü. Tip II DM'lu hastalarda ise eritrosit membran AchE aktivitesindeki, (obez ve nonobez gruplarda) fark anlamlı değildi ($p > 0,05$), bu da membran akışkanlığının ve bütünlüğünün normal olduğunun göstergesi olarak kabul edildi. Bu verilere dayanarak membran oksidasyonunun, dinamik değişikliğe etkisinin fazla olmadığı düşünüldü. Çünkü DM'lu hastalarda eritrosit membranı lipid peroksidasyonu artar (13), oksidatif strese daha yatkın olan bu hücrelerin (9) membranlarında kompozisyon değişikliği olur. Böylece artmış lipid/protein oranı, membran akışkanlığının artmasına katkıda bulunmaktadır. Fakat çalışmamızda Tip I ve Tip II DM'lu hastalardaki membran AchE aktivitesindeki fark bu katkının çok az olduğunu düşündürdü.

İnsülinin membrana bağlanarak akışkanlığını değiştirdiğinin savunulması (8) dikkatleri bu yöne çek-



miştir. Hasta gruplarımızda açlık kan şekeri ve HbA1C seviyelerinin yüksekliği, grupların regüle diyabet karakterinde olmadığını göstermektedir. Tip II DM'daki insülin rezistansı ve Tip I DM'daki insülin eksikliğinin, eritrosit membran AchE aktivitesinin düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmüştür. Çalışmanın ikinci aşaması olarak; insülinin, membran dinamiği üzerindeki rolünün araştırılması planlanmıştır.

Obez Tip II DM'daki hastalarda serum kolinesteraz ile membran AchE arasındaki korelasyonun anlamlı bulunmaması; bu grupta AchE aktivitesinin gerek serumda gerek eritrosit membranında farklı mekanizmalarla düzenlendiğini göstermektedir.

Serum kolinesteraz aktivitesinin Tip I DM'da anlamlı bir farklılık göstermemesi, membran AchE aktivitesinin serumla korelasyonu yerine dinamik bir etkiyle düzenlendiği görüşünü desteklemektedir

Serum kolinesteraz aktivitesi, obez Tip II DM'da artmış bulundu, serum kolesterol düzeyleri ile korelasyonu anlamlı saptandı. Yaptığımız çalışmayla aynı sonuçları elde eden (10,15), bazı araştırmacılar serum trigliserid düzeylerinin logaritmik değerleri ile serum AchE arasında da korelasyon varlığını ve AchE'in lipoprotein metabolizmasında rolü olduğunu savunmuşlardır (8), hatta lipoprotein lipaz gibi trigliserid hidrolizinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (11). Biz serum trigliserid düzeyleri ile serum kolinesteraz aktivitesi arasında anlamlı bir korelasyona rastlamadık. Serum lipidleriyle serum kolinesteraz arasındaki ilişki, membran AchE arasında görülmedi.

Sonuç olarak, DM'lu hastalarda eritrosit membran AchE aktivitesinin düzenlenmesinin, membrandaki dinamik değişikliğe bağlı ve serum AchE regülasyonundan ve oksidatif stresten farklı bir mekanizmaya sahip olduğu düşünüldü. Bu mekanizmanın aydınlatılmasında membran üzerindeki insülinin etkilerinin daha detaylı araştırılması gerektiğine karar verildi.

KAYNAKLAR

1. Burtis, C.A., Ashwood, E.R.(1999) Tietz Textbook of Clinical Chemistry, s.708, W.B.Saunders Company Philadelphia.
2. Chu, M.I., Fontaine, P., Kutty, K.M., (1978) Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidaemic patients. *Clin Chim Acta.* 85:55-59
3. Deshmukh, M.B. (1986) Changes in serum cholinesterase activity and lipoprotein cholesterol levels in rats during diabetes. *IRCS Med Sci.* 14:234
4. Abbott, C.A., Mackness, M.I., Kumar, S., Olukoga, A.O., Gordon, C., Arrol, S., Bhatnagar, D., Boulton, A.J., Durrington, P.N.(1993) Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clin Sci (Colch).* Jul;85(1):77-81
5. Testa, I., Rabini, R.A., Fumelli, P., Bertoli, E., Mazzanti, L.(1988) Abnormal membrane fluidity and acetylcholinesterase activity in erythrocytes from insulin-dependent diabetic patients. *J Clin End Met.* 67(6):1129-32
6. Suhail, M., Rizvi, S.I. (1989) Erythrocyte membrane acetylcholinesterase in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Biochem J.* May 1;259(3):897-9
7. Sargento, L., Zabala, L., Saldanha, C., Souza-Ramalho, P., Martins e Silva, J. (1998) The effect of sodium fluorescein angiography on erythrocyte properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* Jul;18(2-3):135-9
8. Shuaib, M., Rizvi, S.I., (1990) Regulation of red cell acetylcholinesterase activity in diabetes mellitus. *Indian J Exp Biol.* Mar;28(3):234-6
9. Krajewska, E., Zavodnik, I., Kluska, B., Szosland, K., Bryszewska, M.(1997) Acetylcholinesterase activity of normal and diabetic human erythrocyte membranes: the effect of oxidative agents. *Biochem Mol Biol Int.* Jun;42(1):203-10
10. Pavkovic, E., Simeon, V., Reiner, E., Sucic, M., Lipovac, V. (1993) Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chem Biol Interact.* Jun;87(1-3):179-82
11. Rustemeijer, C., Schouten, J.A., Voerman, H.J., Beynen, A.C., Donker, A.J., Heine, R.J. (2001) Is pseudocholesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin Sci (Lond).* Jul;101(1):29-35
12. Matsui, T., Kimura, I., Kimura, M.(1990) Increase in the activities of plasma pseudocholesterase dependent on the blood glucose level and its relation to the hypersensitivity to acetylcholine in striated muscles of KK-CAY mice with diabetes. *Jpn J Pharmacol.* Oct;54(2):97-103

13. Mazzanti, L., Faloia, E., Rabini, R.A., Staffolani, R., Kantar, A., Fiorini, R., Swoboda, B., De Pirro, R., Bertoli, E. (1992) Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin Biochem.* Feb;25:41-6
14. Igisu, H., Matsumura, H., Matsuoka, M. (1994) Acetylcholinesterase in the erythrocyte membrane. *UOEH Sep 1;16(3):253-62*
15. Ragoobirsingh, D., Bharaj, B.S., Morrison, E.Y. (1992) Change in serum cholinesterase activity in Jamaican diabetics. *J Natl Med Assoc.* Oct; 84:853-5
16. Henschel, S., Henschel, L., Lober, M., Krantz, S., Henschel, S., Henschel, L., Lober, M., Krantz, S. (1988) ATPase and acetylcholinesterase activities in erythrocyte membranes after incubation with glucose and in streptozotocin diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol.* Mar;91(1):20-6
17. Makar, T.K., Hungund, B.L., Cook, G.A., Kashfi, K., Cooper A.J. (1995) Lipid Metabolism and membrane composition are altered in the brains of type II diabetic mice. *J Neurochem* May;64(5):2159-68