

Diabetes Mellituslu Hastalarda Hastalık Süresinin Eritrosit Membranı Na⁺/K⁺-ATPaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve DHEA(S), Glukoz, Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi

[The Effect of Disease Duration on Erythrocyte Membrane Na⁺-K⁺/ATPase Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and DHEA(S), Glucose and Lipid Levels in the Diabetes Mellitus Patients]

Mehmet Gürbilek
Cemalettin Dağlar
Mehmet Aköz
Cemile Topçu

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Mehmet Gürbilek
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Konya
Tel: +90-332-323 26 00/1790
e-mail: gurbil@yahoo.com

Kayıt tarihi 10.11.2003; kabul tarihi 20.10.2004
[Received 10.11.2003; accepted 20.10.2004]

ÖZET

Diabetes mellitus'un lipid peroksidasyonu, hücre yaşlanma ve eritrosit membranı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla Konya ve çevresinde yaşayan diabetes mellitus tanısı almış hastalarda ve kontrol grubunda, plazma glukoz, malondialdehid (MDA), dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEA(S)), trigliserid, total kolesterol düzeyleri ve eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesini ölçtük. Çalışmada yer alan denek grupları şu şekildeydi: 1. grup, 5 yıldır diyabeti olan 38 hasta (19 E, 19 K), 2. grup; 6-10 yıldır diyabeti olan 40 hasta (18 E, 22 K), 3. grup, 11 ve daha uzun yıldır diyabeti olan 27 hasta (12 E, 15 K), kontrol grubu 54 (20 E, 34 K) sağlıklı birey olarak belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diyabeti olan hastalarda glukoz, MDA, trigliserid ve total kolesterol düzeyleri anlamlı şekilde yüksek, Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ise düşük bulundu. DHEA(S) açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sonuç olarak diyabet süresinin azalması ve iyi regüle edilememesi eritrosit zarı Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivite kaybı hücre içi iyonik dengenin bozulmasına yol açarak hücre yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Ayrıca yaşla azalan DHEA(S) düzeyleri de yaşlanma sürecinde önemli olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Malondialdehid, Na⁺/K⁺-ATPaz, Dehidroepiandrosteron-sülfat.

ABSTRACT

To see the effect of Diabetes Mellitus (DM) on lipid peroxidation, cellular ageing and erythrocyte membrane, we measured plasma glucose, MDA, DHEA(S), triglycerides, total cholesterol and erythrocyte membrane's Na-K-ATPase enzyme activity in patients with diabetes mellitus and healthy controls living in the city center and around Konya/ Turkey. The characteristics of study subjects were as follows: Group 1: 38 patients (19 M, 19 F) with DM for 0-5 y; Group 2: 40 patients (18 M, 22 F) with DM for 6-10 y; Group3: 27 patients (12 M, 15 F) with DM for 11>y; and Group 0: 54 healthy control (20 M, 34 F). As compared with controls, fasting plasma glucose (p=0.000), MDA level (p=0.000), triglycerides (p=0.000) and the total cholesterol (p=0.002) levels were found significantly increased but Na⁺/K⁺ATPase levels (p=0.000) were significantly decreased in patients with DM. DHEA(S) levels were not significantly different from those of control subjects (p>0.05). As a result, duration and underregulation of diabetes cause a reduction of Na⁺/K⁺ATPase activity of erythrocyte membrane. Reduction of Na⁺/K⁺ATPase activity may cause disturbance of intracellular ion balance and so acceleration of cellular ageing. Additionally, reduced DHEA(S) levels with age may be important in ageing process.

Key Words: Diabetes Mellitus, Malondialdehyde, Na⁺/K⁺-ATPaz, Dehidroepiandrosterone-sulfate.

GİRİŞ

Diyabetin kronik komplikasyonlarının fizyopatolojisinin de oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Metabolizmadaki bozuklukların süresi ve şiddetine göre de hastalığın komplikasyonları meydana gelmektedir. Diyabette, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, oksidatif stresi artırmakta ve sonuçta hücresel yaşlanma hızlanmaktadır. Serbest radikaller ve yaşlanma üzerine çok çeşitli çalışmalar yapılmış ve teoriler ileri sürülmüştür, ancak tek başına kabul edilmiş ve ispatlanmış bir teori yoktur. Aksine yaşlanmanın iç ve dış pek çok faktörün ortak etkisinin bir sonucu olduğu kanaatine varılmıştır.

Diyabette oksidatif stresin eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açtığı, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma olduğu ileri sürülmüştür (1). Bu olaylar ise yaşlanmayı hızlandırabilmektedir. Ancak yaşlanma ile azalan dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEA(S)) düzeyleri ile Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda araştırılmamıştır.

Son yıllarda Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesinin, DHEA(S)'ın ve serbest radikallerin yaşlanmayla ilişkisi üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada diyabet süresinin, eritrosit membranı Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi, malondialdehit (MDA), DHEA(S) ve lipidler üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma S.Ü.T.F. Endokrinoloji polikliniğinde, diyabet tanısı konmuş vakalarda yapıldı. Vakalar diyabet yılına göre gruplandırıldı ve 1. grup, 0-5 yıldır diyabeti olan 38 hastadan (19 E, 19 K); 2. grup, 6-10 yıldır diyabeti olan 40 hastadan (18 E, 22 K); 3. grup, 11 ve daha fazla yıldır diyabeti olan 27 hastadan (12 E, 15 K) oluşturuldu. Kontrol grubu 54 (20 E, 34 K) sağlıklı bireyden oluşturuldu. Hasta grubu, diyabet dışında herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan, antidiyabetik ilaç dışında ilaç kullanmayan vakalardan seçildi. Kontrol grubu olarak da, hiçbir sistemik rahatsızlığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan sağlıklı bireyler alındı. Çalışmaya alınan vakaların yaş ortalamaları ve standart sapmaları tablo 1'de verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu olarak alınan vakalar çalışma hakkında bilgilendirilmiştir.

Sabah 08:00-08:30 arasında hasta grubundan (antidiyabetik ilaçlarını kullanmadan önce) ve kontrol grubundan, açlık kanları antikoagülanlı (heparinli) ve antikoagülanlı olarak "vacutainer" tüplere alındı. Heparinli kanlar oda sıcaklığında 1000 xg de 4 dakika santrifüj edilerek, şekilli elemanlar ve plazması ayrıldı. Plazma, MDA tayini için kullanılırken, altta kalan hücresel kısımda eritrositler izole edilerek, eritrosit membranı

Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi tayin edildi. MDA tayini ve enzim aktivitesi ölçümü, bekleme etkisiyle aktivite kaybına neden olmamak için hemen yapıldı. Serumda ise DHEA(S), glukoz, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ölçüldü.

Plazma örneklerinde MDA tayini, Draper ve Hardley (2) yöntemi ile Shimadzu UV-1600 spektrofotometre kullanılarak yapıldı. Kontrol ve örnek olmak üzere iki deney tüpü hazırlandı. Her iki tüpe 2.5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) konuldu. Örnek tüpüne 0.5 ml plazma, kontrol tüpüne ise 0.5 ml distile su eklendi. Her iki tüpün ağızları sıkıca kapatılarak önceden 90°C'ye kadar ısıtılmış su banyosu içinde 15 dak bekletildi. Bekleme süresi sonunda her iki tüp su banyosundan çıkartılarak hızla soğutuldu. 1000 xg'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatandan ikişer ml alınarak üzerlerine 1 ml %0.675'lik tiyobarbitürik asit (TBA) eklendi ve aynı şekilde ağızları sıkıca kapatılarak 90°C'lik su banyosu içinde 15 dak bekletildi. Bu sürenin sonunda, su banyosundan çıkarılan tüpler soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü. MDA-TBA kompleksinin bu dalga boyundaki molar ekstinksiyon katsayısından ($1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) faydalanılarak, nmol/ml cinsinden MDA konsantrasyonları hesaplandı.

Eritrosit membranı Na^+/K^+ -ATPaz ölçümü modifiye edilmiş Kitao-Hattori (3) metodu ile yapıldı. Heparinli kan örneklerinin, oda sıcaklığında 1000 xg de 4 dak santrifüjü sonucu elde edilen eritrosit pelleti, aynı miktarda yıkama çözeltisi (5 mM Tris tamponu, pH 7.4, 156 mM NaCl çözeltisi) ile muamele edildi. Hafifçe alt üst edildikten sonra 3000 rpm' de 10 dak santrifüj edildi. süpernatant atıldı. Alttaki eritrosit pelleti, tekrar aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra eritrosit pelleti, 10 mM Tris tamponuyla (pH 7.4) %40 hemotokrite getirildi ve 0-4°C'de 15 dak bekletildi.

Tablo 1: Tüm gruplardaki çalışılan parametrelerin ortalama \pm SD değerleri (Kontrol, grup 1=0-5yıllık, grup 2=6-10yıllık, grup 3=11+yıllık hasta).

	Kontrol n=54	Grup 1 n=38	Grup 2 n=40	Grup 3 n=27
Yaş	53,48 \pm 9,79	48,82 \pm 11,82	55,30 \pm 10,44	58,96 \pm 8,89
MDA nmol/ml	5,69 \pm 0,62	6,13 \pm 0,16	6,38 \pm 0,36	6,76 \pm 0,47
Na^+/K^+ -ATPaz μmol Pi/mgpr/ 10dk ⁻¹	4,15 \pm 0,28	3,93 \pm 0,38	3,82 \pm 0,32	3,83 \pm 0,33
DHEA(S) Erkek $\mu\text{g}/\text{ml}$	196,64 \pm 173,65	157,58 \pm 95,38	168,39 \pm 86,16	143,85 \pm 55,57
DHEA(S) Kadın $\mu\text{g}/\text{ml}$	163,71 \pm 118,76	124,29 \pm 71,66	140,88 \pm 91,77	107,20 \pm 87,60
Trigliserid mg/dl	126,29 \pm 48,87	204,07 \pm 87,66	196,13 \pm 124,38	209,96 \pm 94,18
Kolesterol mg/dl	186,88 \pm 44,29	208,00 \pm 44,39	203,12 \pm 32,91	215,25 \pm 38,59
Glukoz mg/dl	97,53 \pm 9,09	197,26 \pm 75,23	198,50 \pm 59,12	212,44 \pm 56,13

Hemoliz olan numune 10 mM Tris tamponu (pH 7,4) ile 1:1 oranında karıştırılarak, 28000 xg'de 9-10°C'de 45 dak santrifüj edildi. Elde edilen eritrosit zarı, 1:1 oranında 10 mM Tris tamponu (pH 7,4) içine alındı. Bu numuneden 200 µl temiz bir deney tüpüne alınarak, üzerine 800 µl reaktif karışımı (30 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 3 mM ATP) ilave edildi, vorteks ile iyice karıştırıldı. Su banyosunda 37°C'de 10 dak inkübe edildi. Daha sonra su banyosundan çıkarılarak, hiç bekletilmeden, reaksiyonu durdurmak için, 50 µl %10'luk SDS ilave edildi. Olympus AU5200 otoanalizörde, Olympus kitleri kullanılarak, inorganik fosfor ve mikroprotein tayini yapıldı. Sonuçlar µmol Pi-mg protein⁻¹.10 dak⁻¹ olarak hesaplandı.

DHEA(S) tayini, "radioimmunoassay" (RIA) prensibine göre çalışan bir kit (DSL-3500) kullanılarak yapıldı. Glukoz, trigliserid ve total kolesterol tayinleri enzimatik-kolorimetrik yöntemlerle, Olympus AU5200 otoanalizörde, Olympus kitleri kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel analiz, SPSS for Windows 8.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Parametrik koşulların sağlandığı ikili karşılaştırmalar için Student's t testi, bunun sağlanmadığı durumlar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Bu test ile fark bulunan gruplarda, farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için, Post-hoc Tukey HSD testi yapıldı. Parametrik koşulların sağlanmadığı veriler için ise, Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Bunun sonunda ikili karşılaştırmalar, Banforoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Orjinal veriler ise Chisquare testi ile değerlendirildi. Parametreler arası ilişki, Pearson korelasyon testi ile yapıldı. P<0,05 olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışılan parametrelerin tüm gruplardaki ortalama ± SD değerleri tablo 1'de verilmiştir. Grupların yaş ortalamaları sırasıyla; kontrol grubu 53,48 ± 9,79; grup1 48,82 ± 11,82; grup 2 55,30 ± 10,44; grup 3 58,96 ± 8,89 olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (t=0,23; p=0,820). Glukoz açısından ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardı (t=16,24; p=0,000). Hasta grubunda kontrol grubuna göre MDA değerleri yüksek (t=7,40; p=0,000), Na⁺/K⁺-ATPaz değerleri ise düşük bulundu (t=5,15; p=0,000). Kolesterol ve trigliserid değerlerinde de hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla; p=0,002, p=0,000). DHEA(S) değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). (Tablo 2). Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldığında, MDA açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yine anlamlı fark vardı (p=0,000). Hasta

Tablo 2: Hasta ve kontrol gruplarının çalışılan parametreler açısından ortalama±SD değerlerinin karşılaştırılması.

	Diyabetliler n=105	Kontrol n=54		p
Yaş	53,90 ± 11,28	53,48 ± 9,79	t=0,23	0,820
Glukoz mg/dl	201,64 ± 64,44	97,53 ± 9,09	t=16,24	0,000
MDA nmol/ml	6,38 ± 0,42	5,69 ± 0,62	t=7,40	0,000
Na-K -ATPaz µmolPi/mgprt/10dk ⁻¹	3,86 ± 0,35	4,15 ± 0,28	t= -5,15	0,000
Total Kolesterol mg/dl	208,01 ± 38,76	186,88 ± 44,29	t=3,10	0,002
DHEA(S) µg/ml	156,60 ± 79,03	196,64 ± 173,65	Z=-1,26	>0,05
Trigliserid mg/dl	203,38 ± 102,07	126,29 ± 48,87	Z=-5,35	0,000

grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 1. ve 2. grup hastalar arasında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0,005). 1. ve 3. gruplar arasında ise anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,000). 2. ve 3. gruplar arasında da anlamlı bir fark vardı (p=0,004). Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi açısından tüm gruplar değerlendirildiğinde, kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı oldukları görüldü (p=0,001). Hasta grupları arasında ise bir farklılık bulunamadı (p>0,05).

Sadece diyabetli vakalar dikkate alındığı zaman, yaş ile hastalık süresi arasında (r=0,339) ve yaş ile DHEA(S) düzeyi arasında (r=-0,297) zayıf bir korelasyon olduğu görüldü. Yaş ile DHEA(S) düzeyi arasındaki korelasyon, negatif bir korelasyondur. Yaş ile MDA arasında çok zayıf (r=0,213) pozitif bir korelasyon bulundu. MDA ile glukoz arasında pozitif ve zayıf (r=0,057), MDA ile Na⁺/K⁺-ATPaz arasında ise negatif ve zayıf (r=-0,039) bir korelasyon vardı. Hastalık süresi ile MDA arasında orta derece (r=0,609) anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görüldü. Diyabetli vakalarda glukoz ile kolesterol düzeyleri arasında çok zayıf (r=0,242) bir korelasyon bulundu (Tablo 3).

Tablo 4'de görüldüğü gibi insülin veya oral antidiyabetik kullanan hastalar arasında yaş açısından anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Glukoz açısından bakıldığında, iki hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu (p>0,05). MDA açısından incelendiğinde ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık vardı (p<0,05) fakat Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi açısından, anlamlı bir farklılık yoktu (p>0,05).

TARTIŞMA

Yaşlanmanın, iki önemli biyolojik olayın uzun süreli toksik yan etkilerinin bir sonucu olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar, gelişme ve farklılaşma olayları ile

Tablo 3: Sadece diyabet vakalarında, çalışılan tüm parametreler arası korelasyon

Hastalık süresi	- MDA	r= 0,609
	- Na-K -ATPaz	r=-0,130
	- DHEA(S)	r=-0,078
	- Trigliserid	r=0,072
	- Kolesterol	r=0,105
Yaş	- MDA	r= 0,213
	- Na-K -ATPaz	r= -0,025
	- DHEA(S)	r= -0,297
	- Trigliserid	r=0,036
	- Kolesterol	r=0,094
Glukoz	- MDA	r= 0,057
	- Na-K -ATPaz	r= -0,039
	- DHEA(S)	r= -0,078
	- Trigliserid	r= 0,124
	- Kolesterol	r= 0,242

enerji üreten metabolik olaylardır. Dolayısı ile gelişme hızı yavaşlatıldığında, yaşlanmanın da yavaşlayacağına inanılmaktadır. Yine, yaşlanmanın metabolizma hızı ile ters orantılı olduğu kaydedilmiştir. Hızlı metabolizmada oksijen tüketimi ve bunun neticesinde serbest radikal üretimi artar. Bu radikaller de yaşlanmayı hızlandırır. Buna göre, metabolizması hızlı, fazla oksijen tüketen ve böylece serbest radikal üretimi fazla olan canlılar daha kısa ömürlü olacaklardır. Şüphesiz bunda antioksidan savunma sistemlerinin önemi büyüktür (4).

Serbest radikallerin, yaşlanmanın sebebi mi yoksa sonucu mu olduğunu söylemek çok zor olmakla birlikte, radikallerin en azından başlamış olan yaşlanma olayını hızlandırdıkları ve yaşlanma ile beraber ortaya çıkan bir çok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Jain ve ark.'nın streptozotosin vererek, deneysel diyabet oluşturdukları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, lipid peroksidasyon ürünleri araştırılmış ve diyabetik ratların eritrositlerinde, kontrollerine göre lipid peroksidasyon ürünlerinde, anlamlı bir yükseklik bulunmuştur (5). İnsülin tedavisi ile glisemi kontrol edildiğinde, lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışın bloke olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da hasta grubunda, kontrol grubuna göre MDA değerleri yüksek bulundu. Yaş ile MDA arasında r=0,213 düzeyinde zayıf, pozitif bir korelasyon bulundu. Hastalık süresi ile MDA arasında ise orta düzeyde (r=0.609) anlamlı pozitif bir korelasyon görüldü. En yüksek MDA düzeyi, glukoz düzeyinin yüksek olduğu 3. grupta görüldü (Tablo 1). MDA ile glukoz arasında pozitif ve zayıf (r=0,057) bir korelasyon vardı. Bu bulgu genel bilgileriyle uyumludur.

Yaşlanmayla birlikte eritrosit membranında bazı deği-

şiklikler meydana gelmektedir. Bunlar, membran lipidlerinin peroksidatif hasara uğraması, insülin reseptör sayısının azalması, glikolitik enzim aktivitesinin azalması, intraselüler K⁺ miktarının azalması gibi değişikliklerdir. Diyabetli kişilerde de benzer bulgulara rastlanmaktadır (6).

Yaşlanma sürecinde lipid peroksidasyonunun ve membran akışkanlığının artmasıyla enzim aktivitesinde değişikliklerin meydana geldiği ileri sürülmektedir. Rabini ve ark. (7) yaptıkları çalışmada, diyabetli vakalarda Na⁺/K⁺-ATPaz enziminin eritrosit membranında yarışmasız inhibisyona uğradığını ve membran lipid içeriğinin değişmesinin enzim aktivitesini etkilediğini ileri sürmüşlerdir.

Raccach ve ark. (8) yaptıkları çalışmada, diyabetik komplikasyonların gelişiminin, tamamen diyabetin süresine ve kontrolüne bağlı olmayıp, bunda predispozan ve agreve edici faktörlerin de önemli rol oynadığını ileri sürülmektedir. Diyabetin kontrolü, süresi ve cinsiyet dağılımı Avrupalı ve Kuzey Afrikalı insüline bağımlı diabetes mellitus (IDDM) vakalarında karşılaştırılmış, Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinde cinsiyete ve etnik gruplara bağlı farklılıklar olduğu ileri sürülmüştür. Kuzey Afrikalı IDDM hastalarındaki nöropatiye yatkınlık, enzim aktivitesindeki düşüklüğe bağlanmıştı. Bu enzimin yüksek değerlerinin nöropatiden koruduğu ve diyabetik nöropati riski açısından enzimatik bir belirteç olabileceği iddia edilmiştir. Vague ve ark. (9) tarafından yapılan çalışmada da hasta grubunda, kontrol grubuna göre eritrosit Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi daha düşük bulunmuş ve nöropatisi olan hastalarda olmayanlara göre enzim aktivitesinin yine daha düşük olduğu gösterilmiştir

Raccach ve ark. (10) tip 1 diyabet vakası üzerinde yaptıkları çalışmada, eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki düşüşü, periferik nöropatinin oluşması ile ilişkilendirmişlerdir. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki yaşa bağlı farklılık kadın ve erkeklerde ancak 60 yaş üzerinde belirtilmiştir. Bu yüzden yaşa bağlı gerçek bir etki tam olarak açıklanamamıştır. Na⁺/K⁺-ATPaz'ın disfonksiyonu sonucu, sinir iletimindeki azalmanın, zar depolarizasyonunun bozulmasına ve akson içi Na⁺ konsantrasyonunun artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda diyabet süresi uzadıkça Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi azalmaktadır. Bu bulgu diyabetin iyi regüle edilemediğinin bir göstergesi olmaktadır.

Mazzanti ve ark. (11) yaptıkları çalışmada, Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinin yaşlanma ile azaldığını göstermişlerdir ve yine kontrol grubunda diyabetlilere oranla enzim aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda, Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, diyabet süresi uzadıkça azalmakta ve insülin tedavisine geçilince, yeniden aktivite artışı gözlenmekteydi; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Glukoz ile Na⁺/K⁺-ATPaz arasındaki korelasyon negatif fakat zayıf (r=-0,039) bir korelasyondur. Na⁺/K⁺-ATPaz enzim

aktivitesi açısından tüm gruplar değerlendirildiğinde, kontrol grubu diğer gruplardan anlamlı şekilde farklı idi ($p=0.001$). Hasta grupları arasında ise bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 3). Ayrıca hasta gruplarını kullandıkları ilaçlara göre iki gruba ayırdığımızda, insülin kullanan hastalarda Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi, oral antidiyabetik kullanan hastalara göre biraz daha yüksekti fakat aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($t=-1,145$; $p>0,05$)(tablo 4).

Tilvis ve ark. (12) yaptıkları çalışmada, değişik yaş gruplarındaki hastalarda DHEA(S) düzeylerini ölçmüşler ve ileri yaşlarda anlamlı bir azalma bulmuşlardır. Sağlıklı erkeklerle kıyaslandığında, yaygın damar hastalığı olan, demans belirtileri gösteren, diyabeti olan, malignite hikayesi olan erkeklerde düşük değerler elde edilmiş, kadınlarda ise farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Mazza ve ark. ise (13) yaptıkları çalışmada, serum DHEA(S) seviyesini belirleyen en önemli komponentlerin yaş ve cinsiyet olduğunu ifade etmişlerdir. DHEA(S)'ın beta hücrelerine doğrudan etkisiyle glukoz ile uyarılmış insülin sekresyonunun arttığı ve beta hücrelerinde lipid metabolizması ile ilgili mitokondriyal ve peroksizomal enzimlerin mRNA ekspresyonunu artırarak hipergliseminin düzeltilmesinde etkili olduğu Dillon ve arkadaşları (14) tarafından gösterilmiştir. İnsüline hassas dokularda DHEA(S)'ın doğrudan etkisini destekleyecek bir bilgi yoktur. DHEA(S), lipid metabolizması ile ilgili enzimlerin ekspresyonuna ve peroksizomların sayısında artmaya neden olur. Bu enzimler açıl KoA sentaz ve peroksizomal açıl KoA-oksidad'dır. Böylece DHEA(S), plazma trigliserid ve serbest yağ asidi seviyelerini düşürür. Ayrıca, insülin direncini ve insülin salgılanma bozukluğunu düzeltmeye yardımcı olur. Son çalışmalarda TNF-a ve obez ratlarda insülin direncini azalttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda DHEA(S)'ın immünoregülatör etkisi olduğu ve infeksiyonlara karşı savunma direncini koruduğu bilinmektedir. Son çalışmalarda DHEA(S)'ın, Th2 aracılı immün yanıtın "down"-regülasyonunda ve Th1 immün reaksiyonların artırılmasında düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir (15).

Diğer taraftan, ilgi çekici bir şekilde yaşlanmayla birlikte DHEA(S) plazma düzeyleri azalmaktadır. DHEA(S) önemli miktarda adrenal bez ve gonadlarda sentezlenmektedir. DHEA(S)'ın bu bezlerden bağımsız olarak

beyin dokusunda da sentezlendiği gösterilmiştir. Bu bulgu ile, DHEA(S)'ın hafıza, öğrenme ve yaşlanma ile ortaya çıkan bozukluklardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (16). DHEA(S)'ın nörokimyasal fonksiyonundaki bozukluklarda, patolojik yaşlanmada (ör. Alzheimer hastalığı) olduğu gibi iyi regüle edilememiş diyabet hastalarında biyolojik yaşlanmayı hızlandırdığı düşünülebilir.

DHEA(S) seviyelerinin, yaşla dramatik olarak azalması, bu hormonun gençlik hormonu olarak anılmasına neden olmuştur. Bu düşünceyi sürdürecekteliller çok açık olmamakla birlikte, bizim bulgularımız da bu görüşü desteklemektedir. Bizim çalışmamızda tüm gruplar değerlendirmeye alındığında, kontrol grubu DHEA(S) değerleri diğer üç grubun değerlerine göre daha yüksekti. Yaşın da etkisi ile üçüncü gruptaki DHEA(S) düzeylerinde belirgin bir azalma görülmesine karşın, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 2). DHEA(S)'ın normal düzeyinin çok geniş bir aralıkta olması ve grup içi dağılımında da çok büyük farklılıklar görülebilmesi istatistik anlamlılığı etkileyebilmektedir. En düşük DHEA(S) düzeyi, glukoz düzeyi en yüksek grupta görüldü. Glukoz ve DHEA(S) arasında, zayıf ve negatif bir korelasyon vardı.

Yüksek glukoz, MDA düzeylerini artırmakta, hipoglisemik tedavi lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Hiperglisemi, hidroksil radikallerini artırmaktadır. Yaşa bağlı olarak yükselen trigliserid ve kolesterol düzeyleri de hücrel otooksidasyonu artırmaktadır. Otooksidasyon sonucu lipid peroksidasyon ürünlerinin ve özellikle hidroksil radikallerinin oluşumu hızlanmaktadır. Sonuçta, DNA hasarı oluşmakta ve yaşlanma hızı artmaktadır. Ayrıca hiperglisemi, adezyon moleküllerin salınımını artırmakta, vasküler mikropati gelişimi hızlanmakta ve muhtemelen sitokin kaskadı uyarılarak apoptozise doğru gidiş hızlanmaktadır. Diğer taraftan enzimatik, nonenzimatik antioksidan savunma sistemi zayıflamakta, vitamin C ve E düzeyleri azalmakta ve patolojik hücre değişiklikleri olabilmektedir. Bu değişiklik Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini düşürmekte ve hücrel yaşlanma hızlanmaktadır Na^+/K^+ -ATPaz aktivite düşüklüğü, fizyo-biyolojik yaşlanmanın bir göstergesi olabilir. Yaşlı eritrosit membran fosfolipid içeriğinin azalması sonucu eritrosit membranı akışkanlığı azalmakta, yaşlanma hızlanmaktadır. Ancak, cinsiyet ve etnik gruba bağlı olarak eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde genetik varyasyonlar mevcuttur (17-19).

Sonuç olarak diyabet süresinin uzaması ve iyi regüle edilememesi, eritrosit zarı Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. Na^+/K^+ -ATPaz aktivite kaybı, hücre içi iyonik dengenin bozulmasına neden olmakta ve bu da hücrel yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Yaşla azalan DHEA(S) düzeyleri de benzer bir etki göstermektedir.

Tablo 4. İnsülin ve oral antidiyabetik (OAD) kullanan vakaların parametreler açısından karşılaştırılması.

İlaç	n	Ort ±SS	t	p	
Yaş	OAD insülin	81 24	54,77 ± 10,12 50,96 ± 14,39	1,210	0,236
Glukoz (mg/dl)	OAD insülin	81 24	199,47 ± 66,09 208,96 ± 59,27	- 0,632	0,529
MDA (nmol/ml)	OAD insülin	81 24	6,34 ± 0,37 6,56 ± 0,52	- 2,322	0,022
-ATPaz (μ mol/mgprt/10dk)	OAD insülin	81 24	3,84 ± 0,36 3,94 ± 0,32	- 1,145	0,255
T.Kolesterol (mg/dl)	OAD insülin	81 24	209,05 ± 37,68 204,50 ± 42,87	0,503	0,616

Kaynaklar

1. Rabini, R.A., Petruzzi, E., Staffolani, R., Tesei M., Fumelli P., Pazzagli M. (1997) Diabetes mellitus and subjects' ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 327-332.
2. Draper, H.H., Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-430.
3. Kitao, T., Hattori, K. (1983) Inhibition of erythrocyte ATPase activity by a clacynomycin and reverse effect of ascorbate on ATPase activity. *Experientia.* 39, 1362-1364.
4. Dedov, I.I., Gorelsheva, V.A., Romanovskaia, G.A., Smirnova, O.M., Filippov, I.K., Sanfirova V.M. (1992) Lipid peroxidation and antioxidant enzymic defense in patients with newly detected insulin-dependent diabetes mellitus. *Probl Endokrinol.* 38 32-33.
5. Jain, S.K., Levine, S.N., Duett, J., Hallier, B. (1990) Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin treated diabetic rats. *Metabolism.* 39, 971-975.
6. Mazzanti, L., Faloia, E., Rabini, R.A., Staffolani, R., et al. (1992) Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin. Biochem.*, 25, 41-46.
7. Rabini, R.A., Fumelli, P., Staffolani, R., Mazzanti, L., Pugnali, A., Biagini, G., Faloia, E., De Pirro, R. (1993) Effect of diabetes mellitus on structural and functional properties of erythrocyte membranes. *Membr Biochem.* 10, 71-79.
8. Raccach, D., Gallice, P., Pouget, J., Vague, P. (1992) Hypothesis: low Na/K ATPase activity in the red cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy. *Diabetes Metab.* 18, 236-241.
9. Vague, P., Dufayet, D., Lamotte, M. F., Mouchot, C., Raccach, D., (1997) Genetic factors, Na/K ATPase activity and neuropathy in diabetics. *Bull Acad Natl Med.* 181, 1811-1821.
10. Raccach, D., Fabreguetts, C., Azulay, J.P., Vague, P. (1996) Erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase activity, metabolic control and neuropathy in IDDM patients. *Diabetes Care.* 19, 564-568.
11. 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.* 25, 41-46.
12. Tilvis, R.S., Kahönen, M., Harkönen, M. (1999) Dehydroepiandrosterone sulfate, diseases and mortality in general aged population. *Aging.* 11, 30-34.
13. Mazza, E., Maccario, M., Ramunni, J., Gauna, C., Bertagna, A., Barberis, A.M., Patroncini, S., Messina, M., Ghigo, E. (1999) Dehydroepiandrosterone sulfate levels in women. Relationships with age, body mass index and insulin levels. *J Endocrinol Invest.* 22, 681-687.
14. Dillon, J.S., Yaney, G.C., Zhou, Y., Voilley, N., Bowen, S., Chipkin, S., Bliss, C.R. et al. (2000). Dehydroepiandrosterone sulfate and b-cell function: enhanced glucose-induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic b-cells. *Diabetes* 49, 2012-2020.
15. Tagava, N., Ohta, M., Nakamura, N., Nakano, K., Obayashi, H., Kobayashi, Y. (2002). Serum concentrations of Δ^3 - 3β -hydroxysteroids in type 2 diabetes mellitus. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1634-1638.
16. Racci, M., Malduzzi, C. Corsini E. (2003) DHEAS and aging brain: Flipping a coin in the 'Fountain of Youth'. *CNS Drug Rev.* 9, 21, 40.
17. Hunt, J.V., Dean, R.T., Wolff, S.P. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 256, 205-212.
18. Ceriello, A., Falletti, E., Motz, E., Taboga, C., Tonutti, L., Ezzol, Z., Gonano, F., Bartoli, E. (1988) Hyperglycemia-induced circulating ICAM-1 increase in diabetes mellitus; the possible role of oxidative stress. *Horm Metab Res.* 30, 146-149.
19. Ceriello, A., Bortolotti, N., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio, S., Russo, A., Ezzol, Z., Tonutti, L., Taboga, C. (1998) Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest.* 28, 329-333.