

Tip 2 Diyabetik Nöropatili Hastalarda Eritrosit Zarı Na^+/K^+ ATPaz Enzim Aktivitesi, ATP1A1 Gen Polimorfizmi ile C-peptid Arasındaki İlişkinin Araştırılması

[The Investigation of Relationship Between Na^+/K^+ ATPase Enzyme Activity, ATP1A1 Gene Polymorphism and C-Peptide in Type 2 Diabetic Patients with Neuropathy]

¹Cemile Topcu,
¹Mehmet Gürbilek,
¹Mehmet Aköz,
²Tülin Çora

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi,
¹Biyokimya, ²Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı,
Konya

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Cemile Topcu

Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Biyokimya, KONYA
Tel: 505 468 27 83 - 332-223 63 26
e-mail: topcu_cemile@yahoo.com.tr.

Kayıt tarihi 3 Haziran 2009; Kabul tarihi: 13 Temmuz 2009

[Registered: 3 June 2009; Accepted: 13 July 2009]

ÖZET

Amaç: Na^+/K^+ -ATPaz çeşitli genler tarafından kodlanır, bunlardan ATP1A1 geni periferik sinirlerde ve eritrositlerde baskın olarak ifade edilir. Bu çalışmada Tip 2 diyabetik polinöropatili hastalarda ve sağlıklı bireylerde ATP1A1 gen polimorfizminin, Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesindeki modifikasyonlarla ilişkisi olup olmadığı araştırıldı. Aynı zamanda C-peptid seviyelerinin ATP1A1 gen polimorfizmi ve Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi arasındaki ilişkiye etkisi araştırıldı.

Metot: Na^+/K^+ -ATPaz gen polimorfizmi, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi yöntemleriyle belirlendi. Eritrosit membranı Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi modifiye edilmiş Kitao-Hattori metodu ile C-peptid düzeyleri kemiluminesans enzim immunoassay metodu ile ölçüldü.

Bulgular: Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi diyabetik nöropatili hastalarda sağlıklı kontrollere göre düşük bulundu. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve C-peptid seviyesi arasında bir korelasyon bulunamadı. Tüm diyabetik polinöropatili hastalar ve sağlıklı kontrol grubu, kesilmemiş allel için homozigot olarak bulundu. Bu hastalarda ATP1A1 gen polimorfizminin bulunmaması nöropatiye yatkınlığın olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç: Diyabette oksidatif stres membranda lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve bunun sonucunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi düşmektedir. Düşük enzimatik aktivite sinir iletim hızının azalmasına neden olmaktadır. Diyabetin iyi regüle edilmesi, komplikasyonları ortadan kaldıracağından nöropati gelişimine engel olunacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Na^+/K^+ -ATPaz , Polimorfizm, C-peptid.

ABSTRACT

Objectives: Na^+/K^+ -ATPase is encoded by various genes, of which the ATP1A1 gene is expressed predominantly in peripheral nerves and in erythrocytes. We investigated whether the ATP1A1 polymorphism is associated with Na^+/K^+ -ATPase activity modifications in healthy subjects and in type 2 diabetic patients with polyneuropathy. We also tested whether C-peptide level could influence the relationship between ATP1A1 polymorphism and Na^+/K^+ -ATPase activity.

Methods: Na^+/K^+ -ATPase polymorphism has been determined by using polymerase-chain reactions and restriction fragment length polymorphism methods. The erythrocyte membrane Na^+/K^+ -ATPase activity measurement was performed with modified Kitao-Hattori method. C-peptide measurements were performed using competitive chemiluminescence enzyme immunoassay method.

Results: Na^+/K^+ -ATPase activity was significantly lower in diabetic polyneuropathic patients than in healthy subjects. Correlation between C-peptide levels and Na^+/K^+ -ATPase activity was not detected. All diabetic patients with polyneuropathy and healthy controls were homozygous for the unrestricted allele.

Conclusion: Oxidative stress which develops in diabetes causes lipid peroxidation in the membrane and consequently Na^+/K^+ -ATPase activity decreases. Low enzymatic activity leads to decrease in nerve conduction velocity. Therefore, we believe that better regulation of diabetes can abrogate complications and prevent the development of neuropathy.

Keywords: Na^+/K^+ -ATPase, Polymorphism, C-peptide.

Giriş

Na⁺/K⁺-ATPaz enzimi hücrelerde membran potansiyeli ve ozmotik dengenin korunmasına yardım eden, hücre sel fonksiyonlar için gerekli bir enzimdir (1). Diyabetik nöropatide bu enzimin fonksiyonunda bozulma meydana geldiği gösterilmiştir. Diyabetik nöropati gelişiminde sinir dokusunda, NCV (Sinir iletim hızı) ve Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde azalmaya işaret eden çalışmalar vardır. Enzimin hücre metabolizması ve sinir uyarılabilirliği fonksiyonları için gerekli olan iyonik gradient korunmasında temel bir görevi vardır. Enzim aktivitesinde meydana gelecek bir azalma, intra-aksonal sodyum konsantrasyonunun artmasına ve buna mukabil olarak sinir hücresi membranı depolarizasyonun bloke olmasına neden olur. Bu da sinir hücrelerinde iletim hızının azalması ile sonuçlanır (2). Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki azalmayla birlikte C-peptid eksikliği de diyabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynar.

Na⁺/K⁺-ATPaz, alfa katalitik subünitesi ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen beta subünitesinden meydana gelir. Alfa subünitesi farklı genler tarafından kodlanan üç izoforma sahiptir ($\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$). Bu genlerin herbiri için DNA RFLP (Restriksiyon fragmenti, uzunluk polimorfizmi) polimorfizmleri tanımlanmıştır. $\alpha 1$ izoformu genellikle perifer sinirlerde ve eritrositlerde ekspres edilir. α genleri üzerinde; özellikle ATP1A1 üzerinde Bgl II enzimi ile gösterilen bazı polimorfizmler tespit edilmiştir (3).

Polimorfik bölgeler ile bazı hastalıklar arasında bir bağlantının olabileceği son çalışmalar ile ortaya konmuştur. Çalışmamızda Na⁺/K⁺-ATPaz enzimini kodlayan gendeki polimorfik değişikliklerin, PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)-RFLP tekniği kullanılarak hasta-kontrol karşılaştırmaları ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Konya bölgesinde yaşayan Diyabetes Mellituslu hastalarda, düşük Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi ile gelişen polinöropatinin Na⁺/K⁺-ATPaz-ATP1A1 gen polimorfizmi ile ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Hastalar, Tıp Fakültesi Endokrinoloji polikliniklerinde diyabetik polinöropati tanısı almış, Konya ili ve çevresinde yaşayan Tip 2 Diyabetes Mellituslu

hastalardan seçildi. Hastaların seçimi endokrinoloji kliniğinde yapılan muayene ve takip sonuçlarına göre yapıldı. 11 ve daha fazla yıldır diyabeti olan 60 hasta (30E/30K) ve 28 kontrol (18E,10K) çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunda diyabetik nöropati tanısı olmayan sağlıklı bireylerin kan örnekleri kullanıldı. DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve restriksiyon enzim kesimi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi araştırma laboratuvarında yapıldı.

Uygulama için heparinli, EDTA'lı kan ve serum örnekleri alındı. Heparinli kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Alttaki şekilli elemanlar yıkılarak santrifüj edildi. Süpernatant olarak yıkama ve santrifüj işlemi üç kez tekrarlandı. Sonuçta elde edilen eritrosit membranında Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi ölçüldü. EDTA'lı kandan DNA'lar izole edildi. Serumda C-peptid düzeyleri ölçüldü. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Na⁺-K⁺ ATPaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Eritrosit membran Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ölçümü, modifiye edilmiş Kitao-Hattori metodu ile yapıldı (4). Alınan antikoagülanlı 10 ml kan, 1,000 x g de 4 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen eritrosit pelleti aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Hafifçe alt üst edildikten sonra 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 – HCl pH 7,4 tamponuyla %40 hemotokrite getirildi. 0–4 °C de 15 dk. bekletildi. Hemolize numune 11,000 rpm'de 45 dk. santrifüj edildi. Süpernatant olarak eşit hacimde tris tamponu ile karıştırılarak 11,000 rpm'de 45 dk. santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Elde edilen eritrosit ghostu, 10 mM Tris – HCl pH 7,4 tamponu içine alındı. Numuneden 200 µl. temiz bir deney tüpüne alınarak üzerine 800 µl. medium ilave edilerek iyice karıştırıldı. Su banyosunda 37°C de 10 dk. inkübe edildi. Daha sonra su banyosundan çıkartılarak hiç bekletilmeden reaksiyonu durdurmak için 50 µl. %10'luk SDS ilave edildi. Alt üst edildi ve bulanıklık varsa 5,500 x g'de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan Boehringer-Mainkeimin photometer 5010 marka spektrofotometrede, Diasis Diagnostic

Tablo 1. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

	Kontrol	Diyabet	P
n	28	60	
kadın/erkek	(10/18)	(30/30)	a.d
yaş	34,13 ± 4,09	59,77 ± 8,46	p<0.001
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz(µmolP _i .mg.prt ⁻¹ .10 min ⁻¹)	2,47 ± 1.30	1,13 ± 0,45	p<0.0001*
C-Peptid (ng/ml)	1,51 ± 0,44	2,11 ± 1,19	p<0.002**

* Mann-Whitney U testi

** T-testi

a.d: Anlamlı değil

Systems marka inorganik fosfor ve Spinreact marka mikroprotein ticari kitleri kullanılarak inorganik fosfor ve mikroprotein tayini yapıldı. Sonuç $\mu\text{molP}_i \cdot \text{mg.prt}^{-1} \cdot 10\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı.

C-peptid Tayini

İmmuno Assay metodu ile serumda ölçüm yapıldı. C-peptid ölçümleri, Immülite 1000 cihazı kullanılarak C-peptid için kompetitif kemiluminesans enzim immunaassay yöntem ile yapıldı (DPC Diagnostic Products Corporation USA)

DNA İzolasyonu

Kan örnekleri 2 ml'lik EDTA'lı tüplerde toplandı çalışılınca kadar -20°C de bekletildi. Çalışma anında kanın plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanları yıkandı. Eritrositler hemoliz edilerek saf lökosit elde edildi. Invisorb marka Spin Blood kiti kullanılarak DNA'lar izole edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk intronda Bgl II enzim kesimi ile bir restriksiyon polimorfizmi tanımlanmıştır. PCR işlemi için ATP1A1 geninin intron 1'i

F: 5'-CAG TCC CTG GCT AGA CAA TTC CTT-3'
(Tm=58.3)

R: 5'-CCA AAT GCA GCC CAT TTC GGA GTT-3'
(Tm=60.2)

primerleri kullanılarak çoğaltıldı (5). 1,6 μl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)

2 μl 10x PCR tamponu

1 μl MgCl_2

1,2 μl 10 pmol primer (LIG1; DNA ligaz 1)

11,8 μl dH_2O

0,4 μl DNA Taq polimeraz enzimi

2 μl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da

94°C'de 3 dakika bir döngü

94°C'de 0,15 dakika,

60°C'de 0,15 dakika, 10 döngü

72°C'de 0,15 dakika,

94°C'de 0,15 dakika,

58°C'de 0,15 dakika, 25 döngü

72°C'de 0,15 dakika,

72°C'de 3 dakika ve

4°C'de bir döngü şeklinde programlandı.

Jel Elektrofrezisi

%2'lik agaroz jel hazırlandı ve EtBr ilave edildi.

Meydana gelen PCR ürününden 5 μl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Jel, 1000 bç'lik(baz çifti) ladder kullanılarak UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 505 bç büyüklüğünde bantlar görüldü.

Restriksiyon Enzim Kesimi

Restriksiyon enzim kesimi için 2 μL buffer, 1 μL Bgl II enzim ve 3 μL dH_2O karışımı hazırlandı ve 15 μL PCR ürününe eklendi ve 37°C 'de overnight beklendi. Enzim kesimi ürünü yine %1'lük agaroz jele yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu Tüm değerlendirmelerde 1kb'lık marker kullanıldı. UV ışık kullanılarak jel görüntüleme sistemiyle genotipler değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

İstatistiksel Analiz

Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak, istatistiki analiz SPSS for Windows 10.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Parametrik koşulların sağlandığı ikili karşılaştırmalar için Student's t-testi, bunun sağlanmadığı durumlar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arası ilişki Pearson korelasyon testi ile yapıldı.

$P < 0,05$ olması anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve C-peptid düzeyleri Tablo 1'de verildi. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi diyabetik hastalarda sağlıklı bireylere göre düşük bulundu ($p < 0.05$). Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ile yaş arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($r = -0.15$, $p > 0.05$). Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ile diyabet süresi arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($r = -1.62$ $p > 0.05$). Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi değerleri ortalama \pm standart sapma olarak; erkeklerde 1.149 ± 0.44 kadınlarda 1.128 ± 0.474 olarak bulundu ($p = 0.873$). Parametreler arasındaki korelasyon değerleri Tablo 2 de verildi. C-peptid düzeyleri ile Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi arasında bir korelasyon yoktu ($r = 0.157$, $p > 0.05$). Şekil 1'de ATP1A1 gen polimorfizmine ait genotip örnekleri görülmektedir. Değerlendirme sonucunda 505 bç büyüklüğünde bant görüldü. Kesim sonucunda 310 ve 195 bç'lik bantları göremediğimiz için ATP1A1 geni için genotipler; AA homozigot, şeklinde değerlendirildi.

Tartışma

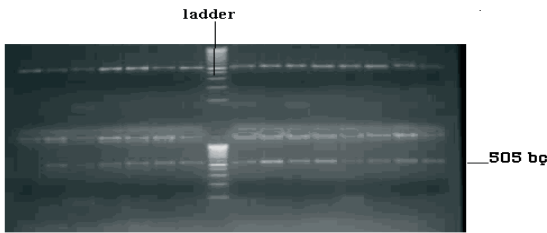
Diyabet çeşitli dokuların metabolizması üzerinde belirgin etkilere sahiptir ve membran potansiyeli ve birçok transport için kritik bir öneme sahip olan Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde meydana gelen bir değişiklik diyabette bu dokularda derin etkilerle sonuçlanabilir (6). Diyabette eritrosit membranında Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalma meydana gelir (7). Raccach ve ark. (8) diyabetik sıçanlarda siyatik sinir ve eritrosit

Tablo 2. Parametreler arası korelasyon değerleri

	C-Peptid	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Yaş	DS
C-Peptid	r	1,000	0,157	-0,084
	p		0,292	0,544
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	r	0,157	1,000	-0,152
	p	0,292		0,291
Yaş	r	-0,084	-0,152	1,000
	p	0,544	0,291	0,228
DS	r	-0,341*	-0,162	1,000
	p	0,024	0,131	0,131

*P< 0,05

DS: Diyabet süresi

**Şekil 1.** ATP1A1 gen polimorfizmine ait genotip örnekleri

Not :Restriksiyon enzim kesimi her iki allel için de yoktur (genotip AA). 1000 bp marker (DNA Ladder MBI, Fermentas)

bp: baz çifti

membranında Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinin korele olduğunu göstermişlerdir. Hem hayvan hem de insan çalışmalarında siyatik sinir ve eritrosit Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (9). Bu enzim aktivitesindeki azalmanın Diyabetes Mellitus komplikasyonları ile ilişkili olduğu düşünülür. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin bozulması muhtemelen kompleks ve yalnızca hiperglisemi ile bağlantılı değildir. Son yıllarda, serbest radikallerin enzim üzerindeki olumsuz etkileri en çok üzerinde durulan mekanizmalardan biridir (10). Transport proteinlerinin ROS (Reaktif Oksijen Türleri) değişimlerine karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Diyabette oksidatif stres eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olur ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açar, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma meydana gelir. Diyabetli vakalarda Na⁺/K⁺-ATPaz enzimi eritrosit membranında yarışmaz inhibisyona uğramaktadır (7, 11). 2004 yılında Tip 2 Diyabetes Mellituslu hastalarda, hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmamızda da, literatürlerle uyumlu olarak hastalık süresi uzadıkça Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinin azaldığı bulunmuştur (12).

Diyabetik hastalarda, GSH düzeylerinin (indirgenmiş glutatyon) azalmasının, Na⁺/K⁺-ATPaz fonksiyonunu bozabileceği gösterilmiştir. GSH'ın galaktozemik sıçanlarda Na⁺/K⁺-ATPaz inhibisyonunu engellemek suretiyle koruyucu bir rol oynadığı da gösterilmiştir. Diyabetik subjelerde mikroanjyopati varlığında enzim aktivitesi azalmakta ve ileri glikasyon ürünleri (AGES) artmaktadır (13).

Bu enzimin yüksek değerlerinin nöropatiden koruduğu ve diyabetik nöropati riski açısından enzimatik bir belirteç olabileceği ileri sürülmektedir. Tip 2 diyabetli hastalarda bu ilişkiyi araştırmak için yapılan bir çalışmada, nöropati ve retinopati mevcut olan diyabet hastalarında, kontrol grubuna ve nöropati ve retinopati mevcut olmayan diyabet hastalarına göre eritrosit Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi daha düşük bulunmuştur (14).

Enzim aktivitesi aynı zamanda diyabetik komplikasyonlara yatkın olan siyatik sinir, retina, kalp gibi dokularda da azalmaktadır. Na⁺/K⁺-ATPaz 'ın disfonksiyonu sonucu, sinir iletimindeki azalma, zar depolarizasyonunun bozulmasına ve akson içi Na⁺ konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır (15, 5) Diyabetik sıçanların siyatik sinirlerinde çeşitli terapötik müdahalelerden (gamma linoleik asit veya balık yağı desteği vb.) sonra kondüsyon hızının hem kısmi, hem de total restorasyonunun Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki kısmi restorasyonla birlikte olduğu gözlenmiştir (6). Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki azalmanın periferik sinirlerde hipergliseminin direkt bir sonucu olabileceği ileri sürülmektedir. Yüksek kan şekeri, aldoz redüktaz yoluyla sorbitole dönüşür, sorbitolün artması miyoinozitolün azalmasına ve PKC (Protein kinaz C) aktivitesinin azalmasına neden olur. PKC'nin, Na⁺/K⁺-ATPaz üzerinde sitümülatör bir etkisi vardır ve bu etki diyabette azalmaktadır (16). Bizim çalışmamızda nöropati tanısı almış tip 2 diyabetik hastalarda Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi kantitatif olarak ölçüldü. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı idi. Çalışmamızda yukarıdaki bilgilerle uyumlu olarak Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini düşük olarak saptadık. Bu bulgu diyabetin iyi regüle edilemediğinin bir sonucu olabilir.

Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi insülin hormonu tarafından regüle edilir. İnsülinin periferik sinirlerde Na⁺/K⁺-ATPaz'ın doğal aktivatörü olması nedeniyle, insülinin Na⁺/K⁺-ATPaz'ı sitümüle etmesindeki muhtemel bir problemin, nöropati sendromunun gelişmesine yol açabileceği ileri sürülmüştür. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesindeki azalmanın, insülin direncinin oluşmasına ek olarak, poliol yolu aracılıklı hiperglisemiyle de ilişkili olduğu ifade edilmiştir (17).

İnsülin gibi C-peptid de dolaşıma birlikte sekrete edilir. Diyabette insülin eksikliği C-peptid eksikliği ile birliktedir. Tip 1 diyabetli hastalarda C-peptid replasmanının sinir fonksiyonlarını iyileştirdiği kaydedilmiştir. İnsüline bağımlı hastalarda, glomerüler hiperfiltrasyonun azalması, glukoz kullanımının artışı, otonom sinir fonksiyonlarının iyileşmesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Uzun süreli replasman otonom sinir fonksiyonları ile birlikte renal fonksiyonları da iyileştirmiştir (18, 19). Proinsülin C-peptid, sıçan renal tübüllerinde Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini sitümüle etmektedir (20). İnsülinopenik diyabetik sıçanlara C-peptid verilmesi Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini düzeltmekte, nodal ve paranodal değişiklikleri önlemektedir (21).

C-peptid infüzyonu süresince eritrosit Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ve plazma C-peptid düzeyleri arasında önemli, lineer bir ilişki tesbit edilmiştir. C-peptidin mikrovasküler kan akışı üzerindeki etkileri, nitrik oksit üretiminde ve Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi üzerinde artışı aracılığıyla meydana geldiği gösterilmiştir (22).

Çalışmamızda C-peptid düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen değerler referans aralıklarının içinde idi. Yaş ile C-peptid değerleri arasında ise bir ilişki bulunamadı. Diyabet süresi ile C-peptid düzeyleri arasında negatif bir ilişki bulundu. C-peptid düzeyleri ile Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi arasında bir korelasyon yoktu. Diyabetli hastalarda dokulara göre enzim aktivitesi değişmektedir. Örneğin barsak dokusunda enzim aktivitesi artışı ile $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlarının mRNA seviyelerindeki artış ile ilişkilidir. Böbreklerde $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlarının mRNA seviyeleri medullada artar, kortekste artmaz bununla birlikte tüm nefron segmentlerinde enzim aktivitesi ile $\alpha 1$ izoformunun mRNA seviyelerindeki artış önemli korelasyon gösterir (6). Bizim çalışmamızda ise eritrosit zarı Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi çalışıldı, farklı bulgular, araştırmalarda kullanılan dokuların farklı olmasından ileri gelebilir.

Cinsiyet ve etnik orjine göre de enzim aktivitesinde varyasyonlar tespit edilmiştir. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi; erkeklerde kadınlardan, siyahlarda beyazlardan, Asyalılarda İskandinavyalılardan, Yahudi toplumunda beyaz ırktan daha düşük bulunmuştur (23, 24).

Diyabette eritrosit Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin azalma sebebinin araştırıldığı bir çalışmada eritrosit membranındaki enzimatik ünitelerin sayısı ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiş ve Kuzey Afrikalı sağlıklı bireylerin beyaz ırka mensup sağlıklı bireylere

göre eritrosit membranlarında daha az sayıda enzim ünitesi bulunmuştur. Tip 1 diyabetli hastalarda, lipid membranda yapısal olarak enzimin lokasyonunun anormal olması, enzim ünitesi sayısının belirlenmesini önlemiştir (25). Diyabette Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin azalmasının diğer bir nedeni olarak ATP1A1 genindeki mutasyonlar gösterilmiştir. Eritrositlerde tek ve sinir dokusunda ise baskın olan izoform olan $\alpha 1$ izoformu bu gen tarafından kodlanmaktadır ve bu gende meydana gelen bir polimorfizmin enzim aktivitesini etkilediği bulunmuştur (3).

Tip1 diyabetli hastaların eritrositlerinde düşük Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ile birlikte Na⁺/K⁺-ATPaz'ın $\alpha 1$ izoformunu kodlayan ATP1-A1 geninin restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada Avrupalı Tip1 ve Tip2 diyabetlilerde bu varyant alelini taşıyan hastalarda, taşımayanlara göre enzim aktivitesi düşük bulunmuştur ATP1A1 geninin varyantının varlığının %6.5 lik relatif riskle diyabetik nöropatiye yatkınlık faktörü olduğu ileri sürülmüştür, ancak sağlıklı bireylerde enzim aktivitesinin ATP1A1 polimorfizminin varlığından etkilenmediği rapor edilmiştir (15).

Konya bölgesinde yaşayan Diyabetes Mellituslu hastalarda düşük Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi ile gelişen polinöropatinin gen polimorfizmi ile ilişkisinin olup olmadığını araştırdık. Çalışmamızda 60 hasta ve 28 kontrol vakasında ATP1A1 geni Bgl II ile kesilerek polimorfizm açısından incelendi ve gen bölgesindeki her iki allel için de restriksiyon enzim kesimi gözlenmedi. Bölgesel değerlendirmemizde ATP1A1 polimorfizmi ve polinöropatiye yatkınlık görülmedi. Bu hastalarda ATP1A1 gen polimorfizminin bulunmaması nöropatiye yatkınlığın olmadığını, gelişen nöropatinin diyabetin iyi regüle edilememesi veya diyet düzensizlikleri sonucu oluştuğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, diyabette gelişen oksidatif stres, membranda lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve bunun sonucunda Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi düşmektedir. Düşük enzimatik aktivite sinir iletim hızının azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, diyabetin iyi regüle edilmesi komplikasyonları ortadan kaldıracığından nöropati gelişimine engel olunacağı kanaatindeyiz.

TEŞEKKÜR

Prof. Dr. Hasan Acar ve Prof. Dr. Said Bodur'a çalışmadaki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- [1] Skou JC, Esman M. (1992) The Na,K-ATPase. J Bioenerg Bio-membr. 24:249-261.
- [2] Gerbi A, Maixent JM, Barbey O, Jamme I, Pierlovisi M, Coste T, Pieroni G, Nouvelot A, Vague P and Raccach D. (1998) Alteration of Na,K-ATPase Isoenzymes in the Rat Diabetic Neuropathy: Protective Effect of Dietary Supplementation with n-3 Fatty Acids. J Neurochem. 71:732-74

- [3] Shull MM, Pugh DG, Lingrel JB. (1990) The human Na,K-ATPase alpha 1 gene: characterization of the 5'-flanking region and identification of a restriction fragment length polymorphism. *Genomics*. 6:451-460.
- [4] Kitao T, Hattori K. (1983) Inhibition of erythrocyte ATPase activity by a calyculin and reverse effect of ascorbate on ATPase activity. *Experientia*. 39:1362-1364
- [5] Vague P, Dufayet D, Coste T, Moriscot C, Jannot MF, Raccach D. (1997) Association of diabetic neuropathy with Na/K ATPase gene polymorphism. *Diabetologia*. 40(5):506-11.
- [6] Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, Tsimaratos M. (2004) C-peptide, Na⁺,K⁺-ATPase and Diabetes. *Experimental Diab Res*. 5:37,20.
- [7] Rabini RA, Petrucci 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.
- [8] Raccach D, Fabreguets C, Azulay JP, Vague P. (1996) Erythrocytes Na⁺,K⁺-ATPase activity, metabolic control and neuropathy in IDDM patients. *Diabetes Care*. 19:564-568.
- [9] Coste TC, Gerbi A, Vague P, Pieroni G, Raccach D. (2003) Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 52:2578-2585.
- [10] Konukoglu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi H. (2003) Relation of erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase activity and cholesterol and oxidative stress in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Invest Med*. 26:279-84.
- [11] Rabini RA, 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.
- [12] Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. (2004) Diabetes Mellituslu Hastalarda Hastalık Süresinin Eritrosit Membranı Na⁺/K⁺-ATPaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve DHEA(S), Glukoz, Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Turk J Biochem*. 29(3): 237-242.
- [13] Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Tara C, Rema M, Mohan V. (2005) Association of hypoglutathionemia with reduced Na⁺/K⁺-ATPase activity in type 2 diabetes and microangiopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 282:169-176.
- [14] Koç B, Erten V, Yılmaz MI, Sönmez A, Koçar IH. (2003) The relationship between red blood cell Na/K-ATPase activities and diabetic complications in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine*. 21(3):273-8.
- [15] Jannot MF, Raccach D, De La Tour DD, Coste T, Vague P. (2002) Genetic and environmental regulation of Na/K adenosine triphosphatase activity in diabetic patients. *Metabolism*. 51(3):284-91.
- [16] Grene DA, Chakrabarti S, Lattimer SA, and Sima AA. (1987) Role of sorbitol accumulation and myo-inositol depletion in paranodal swelling of large myelinated nerve fibers in the insulin-deficient spontaneously diabetic bio-breeding rat. Reversal by insulin replacement, an aldose reductase inhibitor, and myo-inositol. *Clin Invest*. 79(5):1479-1485.
- [17] Sweeney G, Klip A. (1998) Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how. *Mol Cell Biochem*. 82:121-33.
- [18] Ekberg K, Brismar T, Johansson BL, Jonsson BJ, Lindstrom P, Wahren J. (2003) Amelioration of Sensory Nerve Dysfunction by C-Peptide in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 52:537-541.
- [19] Wahren J, Johansson BL, Wallberg-Henriksson H, Linde B, Fernqvist-Forbes E, Zierath JR. (1996) C-peptide revisited--new physiological effects and therapeutic implication. *J Intern Med*. 240:115-24.
- [20] Ohtomo T, Bergman T, Johansson BL, Jornvall H, Wahren J. (1998) Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na⁺,K⁺-ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia*. 41: 287-291.
- [21] Sima AA, Grunberger G, Jornvall H, Wahren J. (2001) Proinsulin C-peptide--a consensus statement. *Int J Exp Diabetes Res*. 2(2): 145-51.
- [22] Forst T, Dufayet D, Kunt T, Pfützner A, Goitom K, Pohlmann T, Schneider S, Johansson BL, Wahren J, Löbig M, Engelbach M, Beyer J, Vague P. (2000) Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺,K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type I. *Clinical Science*. 98(3):283-90.
- [23] Beutler E, Kuhl W, Sacks P. (1983) Sodium-potassium ATPase activity is influenced by ethnic origin and not by obesity. *N Engl J Med*. 309:756-760.
- [24] Lasker N, Hopp L, Grossmann S, Bamforth R, Aviv A. (1985) Race and sex differences in erythrocytes Na⁺/K⁺ and (Na⁺/K⁺)-adenosine triphosphate. *J Clin Invest*. 75:1813-1820
- [25] Raccach D, Dadaun F, Coste C, Vague P. (1996) Decreased Na/K ATPase ouabain binding sites in red blood cells of patients with insulin-dependent diabetes and healthy north African control subjects: relationship with diabetic neuropathy. *Horm Metab Res*. 28(3):128-32.