

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ANABİLİM DALI BAŞKANI  
Doç. Dr. İdris Akkuş

**TIP I DİABETES MELLİTUS'LU ÇOCUKLARDA SERUM,  
ERİTROSİT VE LÖKOSİT ZARİ LİPİD PEROKSİDASYONU İLE  
ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ü. Gülsüm CAN**

Tez Danışmanı  
**Doç.Dr. İdris AKKUŞ**

KONYA-1996

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Diabetes Mellitus	2
2.1.1. Tip I Diabet	2
2.1.1.1. Etyolojisi	2
2.1.1.2. Sıklık	3
2.1.1.3. Fیزیopatoloji	4
2.2. Serbest Radikaller	4
2.2.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri	5
2.2.2. Hücrelerde serbest radikal oluşumu	9
2.2.3. Fagositoz-respiratory burst	11
2.2.4. Antimikrobial aktivitede serbest radikaller	12
2.2.5. Serbest radikallerin etkileri	12
2.2.5.1. Membran lipidlerine etkileri	12
2.2.5.2. Proteinlere etkileri	14
2.2.5.3. Nükleik asidler ve DNA'a etkileri	14
2.2.5.4. Karbonhidratlara etkileri	14
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	15
2.3.1. Süperoksid dismutaz	18
2.3.2. Glutasyon peroksidaz	18
2.3.3. C vitamini	20
2.3.4. E vitamini	21
2.3.5. Diğer antioksidanlar	21
2.4. Diabette serbest radikallerin rolü	22
2.4.1. Diabet etyolojisinde serbest radikallerin rolü	22
2.4.2. Diabette lipid peroksidasyonu	23
2.4.3. Proteinlerin nonenzimatik glikasyonu	24
2.4.4. Diabet ve hızlanmış yaşlanma	25
2.4.5. Diabette eritrosit hassasiyeti	26
2.4.6. Diabette bozulmuş lökosit fonksiyonu ve enfeksiyon	26
2.4.7. Diabette antioksidatif tedavinin rolü	26
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Vaka seçimi	28

3.1.2. Kullanılan cihazlar	29
3.1.3. Kullanılan kimyasal madde ve reaktifler	29
3.1.4. Kullanılan çözeltiler	30
3.2. Metod	31
3.2.1. Lökosit süspansiyonunun hazırlanması	31
3.2.2. Eritrosit süspansiyonunun hazırlanması	32
3.2.3. GSH-PX tayini	32
3.2.4. SOD tayini	33
3.2.5. C vitamini tayini	34
3.2.6. Lipid peroksidasyonu tayini	34
3.2.7. Glukoz tayini	36
3.2.8. Protein tayini	36
3.2.9. Hemoglobin A1c	36
3.3. İstatistiksel analiz	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	41
5.1. Metodların tartışılması	41
5.1.1. Lipid peroksidasyonu	41
5.1.2. Süperoksid dismutaz	42
5.1.3. Glutasyon peroksidaz	42
5.1.4. C vitamini	43
5.2. Bulguların tartışılması	44
6. SONUÇ	51
7. ÖZET	52
8. KAYNAKLAR	54

## KISALTMALAR

AKŞ	: Açlık kan şekeri
Asc	: Askorbik asid
BHA	: Butylated hydroxyanisole
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CML	: Karboksimetillenmiş lizin
DHAsc	: Dehidroaskorbik asid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asid
2,3 DPG	: 2,3 Difosfogliserat
DTBA	: Dietilentriamin pentaasetik asid
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asid
GC/MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
HLA	: Histokompatibilite antijenleri
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HO <sub>2</sub> .	: Perhidroksil radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HOBr	: Hipobromit
HOCl	: Hipoklorit
HOI	: Hipoiyodit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IDDM	: İnsüline bağımlı diabetes mellitüs
İNT	: 2-(4-iodophenyl)-3-(4nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchloride
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LP	: Lipid peroksidasyonu
LOO.	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksidi
MDA	: Malondialdehid
MFA	: Metafosforik asid
NADP	: Oksidenikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	: Nitroblue tetrazolium

NIDDM	: İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitüs
nm	: nanometre
nmol	: nanomol
NO	: Nitrik oksid
$1O_2$	: Singlet oksijen
$O_2\cdot-$	: Süperoksit radikali
$\cdot OH$	: Hidroksil radikali
PLGSH-Px	: Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
R.	: Karbon merkezli radikaller
RO.	: Alkoksil radikali
ROO.	: Peroksil radikali
ROOH	: Hidroperoksit
ROM	: Reaktif oksijen molekülleri
RS.	: Thiyl radikali
SOD	: Süperoksid dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TBA	: Tiobarbitürik asid
TBARS	: Tiobarbitürik asidle reaksiyon veren maddeler

## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu olan atom veya moleküllerdir. Bu tür maddeler reaksiyona son derece yatkın olup, kanser, ateroskleroz, inflamasyon ve diabetes mellitus gibi hastalıkların patogeneğinde ve yaşlanmada önemli rol oynarlar. Serbest radikaller metabolik olaylar sonucu sentezlendikleri gibi dışardan da hava kirliliği gibi kaynaklardan alınabilirler. En önemli serbest radikaller oksijen radikalleri olup lipid peroksidasyonuna sebep olurlar. Böylece hücre zarının normal yapısı bozulur ve birçok hastalığa zemin hazırlanmış olur.

Organizmada radikallerin zararlı etkilerini engelleyen birçok madde ve enzim vardır. Bunlara antioksidanlar adı verilir. Önemli antioksidanlar E vitamini, C vitamini,  $\beta$ -karoten, glutatyon, ürat, albumin, seruloplazmin gibi maddelerle süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleridir. Sağlıklı kişilerde serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma mekanizması denge halindedir. Bu dengenin bozulması durumunda radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkar.

Serbest radikaller fagositozda mikroorganizmaların öldürülmesinde de kullanılırlar. Bu olayda kullanılan serbest radikaller daha sonra antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılırlar. Ancak savunma sistemlerindeki bir yetersizlik sonucu organizmanın lehine olan lökositteki serbest radikal üretimi başta lökositler olmak üzere organizmaya zarar vermeye başlar.

Çalışmamızda IDDM'li çocuklarda plasma, eritrosit ve lökositlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri ile antioksidan savunma sistemlerinin araştırılmasını amaçladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.DİABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus insülin salgılanmasının tam veya kısmi eksikliği veya değişik derecede insülin direnci sonucu oluşan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluğudur (1,2,3,4).

İnsan insülin geni 11. kromozomun kısa kolunun p15 bandında yerleşmiştir. İnsülin, pankreas  $\beta$  hücrelerinin kaba endoplazmik retikulumunda preproinsülin olarak sentezlenir. Preproinsülinin parçalanması sonucu tek bir polipeptid zincirinden ibaret olan proinsülin meydana gelir. Proinsülinde 33 aminoasitten ibaret olan C peptid isimli fazla bir peptid bulunur. Bu peptidin hidrolizle ayrılmasından sonra  $\alpha$ (21 aminoasit) ve  $\beta$ (30 aminoasit) zincirlerinden oluşan insülin meydana gelir. Açığa çıkan insülin sitoplazmik granüllerde depolanır. İnsülin salgılanması sırasında her molekül insülin ile birlikte bir molekül C peptid açığa çıktığından kan C peptid düzeylerinin ölçümü endojen insülin salgılanmasına ilişkin bilgi verir. Sağlıklı bir kişide pankreastan ortalama 10-15  $\mu$ U /ml 'lik kan düzeyini sağlayacak miktarda bazal insülin salgılanır. Beslenme uyarısında buna ek insülin salgılanır (1,2,3,4,5,6).

#### 2.1.1.TİP I DİABET

Tip I diabete İnsülin dependent (İnsüline bağımlı) diabetes mellitus(IDDM) adı verilir. Çocukluk çağının en sık rastlanan endokrin metabolik hastalığı olan tip I diabetes mellitus, genetik olarak yatkın kimselerde viruslar ve bazı şimik ve toksik etkenler gibi çevresel faktörlerin  $\beta$  adacık hücrelerine antijenik özellik kazandırarak otoantikolar oluşturması ve böylece adacıkların glukoz uyarısına insülin salgılama cevabının bozulması sonucu meydana gelen bir hastalıktır (2,4,7).

WHO sınıflamasında insüline bağımlı diabet A ve B tiplerine ayrılmışsa da klasik terminolojide Tip I diabet , Tip I A ile eş anlamlı kullanılır. Tip I B ise ileri yaşlarda görülmekte ve pediatri kapsamına girmemektedir (1).

Tip I diabet, tüm diabetiklerin %10-15'ini oluşturur. Her yaşta görülebilmekle birlikte daha çok çocukluk ve gençlik çağının hastalığıdır (1,4).

##### 2.1.1.1. Etyolojisi

Tip I diabetin etyolojisinde kalıtsal faktörlerin yanısıra çevresel faktörler de rol oynarlar (1,2,6) .

Diabetiklerin anne, baba ve kardeşlerinde diabet sıklığının diabetik olmayanlara oranla daha yüksek olması, biri diabetik olan tek yumurta ikizlerinden diğesinde %50'ye yakın bir ihtimalle hastalık gelişmesi, kalıtımın etkisini gösteren örneklerdir. Hastalığın, polijenik (birden fazla genle ilgili-mültifaktöryel) kalıtımla geçtiği düşünülür. Tip I diabetin kalıtımla ilgili olduğunun diğerkanıtı hastalığın 6. kromozom üzerinde yer alan histokompatibilite antijenleri(HLA) ile ilişkili olmasıdır. HLA-B8, BW15, B18, A1, CW3, DW4 ve özellikle DR3 ve DR4 antijenlerini taşıyanlarda tip I diabet sıklığı fazladır. Buna karşılık bu hastalarda DW2 ve B7 doku tipinin görülme ihtimali azdır (1,2,6).

Bazı viral infeksiyonlar ve kimyasal madde etkisi gibi edinsel çevresel faktörler otoimmün reaksiyonlara ve bunların sonucu olarak  $\beta$  hücrelerinde harabiyete sebep olurlar (1,2,4,6).

Diabetin okul çağı çocuklarında ve sonbahar ve ilkbahar aylarında ortaya çıkması viral infeksiyonlara bağlanır. Kabakulak infeksiyonundan 2-4 hafta sonra gelişen diabet bildirilmiştir. Yeni tanı konan diabetik çocukların %30'unda IgM-Coxsackie antikörlerinin artması tip I diabet gelişiminde bu infeksiyonun rol alabileceğini göstermektedir. Konjenital rubella infeksiyonu geçiren ve özellikle HLA-DR3 ve DR4'ün doku tipini taşıyan bebeklerde yüksek oranda IDDM geliştiği gözlenmiştir. Deney hayvanlarında rubella, reovirüs, coxsackie B gibi ensefalomyokardit yapan çeşitli viruslarla diabet geliştiği gösterilmiştir (1).

Kimyasal maddelerden alloxan ve streptozotosin(STZ) ile deney hayvanlarında  $\beta$  hücre hasarı ile diabet oluştuğu bildirilmiştir. Diğerbir diabet nedeni fare zehiri Vacor N'-p nitrofenilüre'dir. Pneumocystis carini tedavisinde kullanılan pentamidin ve akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan asparajinaz ile diabet geliştiği gözlenmiştir (1).

IDDM patogeneğinde tümör nekrozis faktörler, interferonlar, interlökin 1 ve 2'nin de etkileri vardır (8).

Sonuç olarak IDDM, genetik, çevresel ve otoimmün faktörler sonucu meydana gelen oldukça heterojen bir hastalıktır (1,7,8).

#### **2.1.1.2. Sıklık**

IDDM sıklığı çeşitli ülkelerde farklılık gösterir. Örneğin kuzey Avrupa'da güney Avrupa'ya göre daha siktir (1).

Süt çocukluğu döneminde nadir olan diabet 11-14 yaşlarında en siktir. Bu durum, püberteye bağlı hormonal ve ruhsal değişikliklerin etkisi ile açıklanır. Okul çağında görülen artışının sebebinin, çocuğun infeksiyon ajanlarıyla artan teması



olduğuna inanılmaktadır. Hastalık her iki cinste eşit sıklıkta görülür (1,2).

### 2.1.1.3. Fizyopatolojisi

Tip I diabet, insülin eksikliğine bağlı metabolik düzensizliğin en belirgin olarak geliştiği diabet tipidir. Diabetes mellitus'da metabolik bozukluğun primer sebebi olan insülin eksikliğine ilave olarak stres hormonları (epinefrin, kortizol, büyüme hormonu, glukagon) salgılanmasında da artış olur. Bu hormonal bozukluklar glukozun periferde kullanılmasının azalmasına , karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenez artmasına sebep olur ve sonunda hiperglisemi gelişir (1,2,9).

Karbonhidrat metabolizmasında saf insülin yetmezliğinin etkisi bellidir. Kandan insülin çekilmesinden sonra insan glukoz seviyesi hızla yükselir. Buna glukozun hepatik kullanımında da hızlı artış eşlik eder. Böylece kan glukoz düzeyi tekrar düşer. Sonra kortizolde görülen artış periferik glukoz kullanımını inhibe eder. İnsülin yokluğunda glukoneogenez ve hepatik glukoz üretimini kontrol eder.Katekolaminler ketoasidozda yükselir, glukoz üretimini artırır ve periferik kullanımını azaltırlar (8,9).

İnsülinin normal etkisi karaciğerde glikojenezi ve glukolizi artırır. İnsülin eksikliği ve glukagonun nisbi fazlalığı fosfofruktokinaz 2'nin fosforilasyon nedenidir ve fruktoz 2,6 difosfat seviyesini azaltır. Pürivattan glukoz 6 fosfata akımı artırır (3,8,10).

Glukagon glikojenolizi artırarak hepatik glikojen depolarını hızla azaltır. Extrahepatik dokuların glukoz alımı insülin eksikliği ve kortizol ve katekolamin fazlalığına bağlı olarak azalır. Glikojen sentaz ve pürivat dehidrogenazın aktivasyonu azalır. Böylece glikojen depoları ve glukoz oksidasyonu azalır (3,8,10).

İnsülin eksikliğinde lipid metabolizmasındaki defekt, artmış lipoliz ile adipoz dokudan yağ asidi salınımının artmasıdır. Major glukojenik aminoasidlerin plazma konsantrasyonları düşer. Bu erken düşüş, glukoneogenez için artmış hepatik atıma bağlıdır (3,8).

Şiddetli insülin yetmezliğinde elektrolit, su ve asid metabolizmasında karışıklık vardır. Büyük su kaybı osmotik diürece, diabetik ketoasiddeki kusmaya ve hipervantilasyona bağlıdır. Poliüri sonucu artmış sıvı ve elektrolit kaybı ağır elektrolit bozukluğuna ve dehidratasyona yol açarak susama hissi sonucu polidipsi ile kompanse edilir. Metabolik asidoz sonucu vücut hipervantilasyon ile(Kussmaul solunumu) aşırı CO<sub>2</sub> 'i atmaya çalışır, plazma bikarbonat ve pCO<sub>2</sub> düzeyleri düşer. Artmış keton cisimleri idrarla atılırken (ketonüri) katyonları da sürükler, su ve

elektrolit kaybı daha da ağırlaşır. Artmış aseton nedeniyle hastanın nefesi kokar. Asidoz başlıca organik ketoasidlerin birikimine bağlı olmakla birlikte hipoperfüzyona bağlı laktik asidoz bu durumu artıran diğer bir sebeptir. Hastada ilerleyen dehidratasyon, hiponatremi, asidoz, hiperosmolarite ve serebral oksijen kullanımında azalma ile bilinç giderek bozulur ve koma gelişir (1,2).

Diabetik ketoasidozda total vücut potasyumunda düşme en önemli elektrolit bozukluğudur. Diabetik hastada fosfat kaybı da olmaktadır. Fosfat eksikliğinde enerji için gerekli ATP yapımı azalır. Ayrıca 2,3 difosfogliserat düzeyi düşer. 2,3-DPG eksikliğinde hemoglobinin oksijene afinitesi artar. Diğer yandan asidoz daha fazla oksijenin dokulara gitmesini sağlayarak 2,3 DPG eksikliğini kısmen kompanse eder. Tedavide fosfat verilmesi 2,3 DPG oluşumunu ve daha fazla oksijenin dokulara gitmesini sağlayarak asidozun düzeltilmesini kolaylaştırır (1,2).

### **Tip IB Diabetes mellitus**

2. tip insüline bağımlı diabetes mellitus (tip IB) tüm IDDM vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturur. Bu tip diabetin patogeneğinde primer otoimmünite üzerinde durulmaktadır. Bu hastalarda diabet diğer otoimmün hastalıklarla birlikte bulunmaktadır. Bu hastalarda primer otoimmüniteyi düşündüren bulgu tipten farklı olarak pankreas adacık hücre antikörlerinin yaşam boyu devam etmesidir. Tip IB kızlarda daha fazla görülür ve semptomlar 30-50 yaşları arası geç ortaya çıkar. Ağır insülin eksikliğine karşı bu tip diabet genellikle daha hafif klinik gidiş gösterir. Bunlarda DR3 antijeni daha sıktır (1).

## **2.2.SERBEST RADİKALLER**

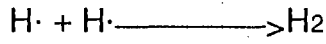
Prooksidan olarak bilinen reaktif oksijen moleküllerinin (ROM) meydana çıkması normal aerobik yaşamın bir sonucudur. Prooksidanların düzenli teşekkülü ve enzimatik veya nonenzimatik antioksidanların etkileri dengededir. Oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengesinde prooksidanların lehinde bir dengesizlik meydana getirir. Oksidatif stres, birçok hastalığın başta gelen sebebidir. Homeostaziste antioksidan kapasitenin devamlı regenerasyonuna ihtiyaç vardır. Bu olmaz ise oksidatif hasar sonucu patofizyolojik olaylar çoğalır (11,12,13).

Serbest radikal, eşlenmemiş elektronu bulunan molekül veya atomlardır (12,14,15,16,17).

Atomlarda elektronlar orbital olarak bilinen bölgelerde yer alır. Her orbital

maksimum karşı yönde dönen iki elektron taşır. Çoğu biyolojik molekül çift elektron ihtiva edip radikal değildir. Eşlenmemiş elektronlar atom veya molekülün kimyasal reaktivitesini değiştirir ve aktif yapar. Bu yüzden radikallerin kimyasal reaktivitesi aşırı derecede yüksektir (14,18).

Radikaller değişik yollarla diğer moleküller ile reaksiyona girerler. Eğer iki radikal karşılaşırlarsa tek elektronlarını birleştirebilirler ve bir kovalent bağ yaparlar. Örneğin bir hidrojen atomu tek bir elektron ile radikaldir ve iki hidrojen atomu kolaylıkla birleşerek diatomik hidrojen molekülüne dönüşebilirler (12,16,18).



Radikaller çeşitli yollarla nonradikal bileşikler ile reaksiyona girebilirler. Bir radikal çift elektronlu bir molekülden elektron alabilir veya elektron verebilir. Bir radikal bir nonradikale katılabilir. Bu üç tip reaksiyondan hangisi olursa olsun nonradikal radikale dönüşür. Böylece bir radikal bir diğerini meydana getirir (12).

Yanma, boyanın eskimesi ve kuruması bir serbest radikal reaksiyonudur (12).

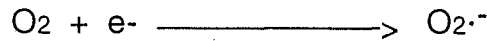
### 2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikaldir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonucusu meydana gelir .

Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir "diradikal" olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Oksijen en son suya indirgenir. Bu arada, kısmi redüksiyonla, çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler oluşabilirler (13,19).

#### Süperoksid Radikali:

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksid radikal anyonu ( $O_2^-$ ) meydana gelir. (12,15,16,17).

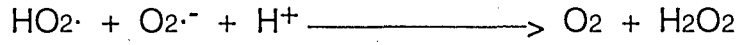


Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zararlı değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksid kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (17,19).

Süperoksid, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali ( $HO_2\cdot$ ) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'da protonlanmış formu

%1'den azdır (17,19).

Süperoksit anyonu, hem redükleyici hem de oksitleyici özelliğe sahiptir. Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur ve diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit oluşur (17,19).



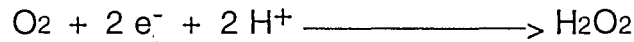
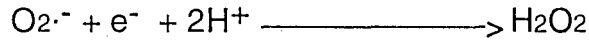
İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.  $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2\cdot^-$



Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür (20).

### **Hidrojen peroksit:**

Moleküler oksijen'in çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) meydana getirir (19,20).  $\text{H}_2\text{O}_2$  membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (21).



Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

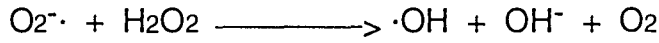
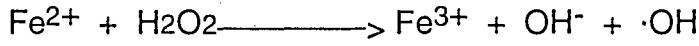
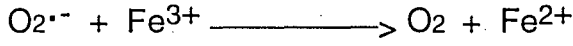


Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Süperoksitin dismutasyonu, süperoksit dismutaz tarafından geniş bir pH aralığında katalizlenir. Özellikle spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir (19,20).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



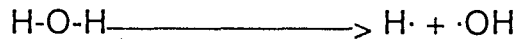
Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında veya katalizörsüz cereyan edebilir. Ancak, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyona "Fenton reaksiyonu" adı verilir. Demir bu reaksiyonu aşağıdaki şekilde katalizler (11,15,17,19,20,21,22).



Etilendiamin tetraasetik asid (EDTA) gibi bazı şelatlayıcı ajanlar hidroksil radikal oluşumunu, Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla stimüle ederken, dietilentriamin pentaasetik asid (DTBA) gibi bazıları inhibe ederler. EDTA, demir iyonlarının lipid peroksidleri ile reaksiyon hızını ise düşürür (19).

#### **Hidroksil radikali :**

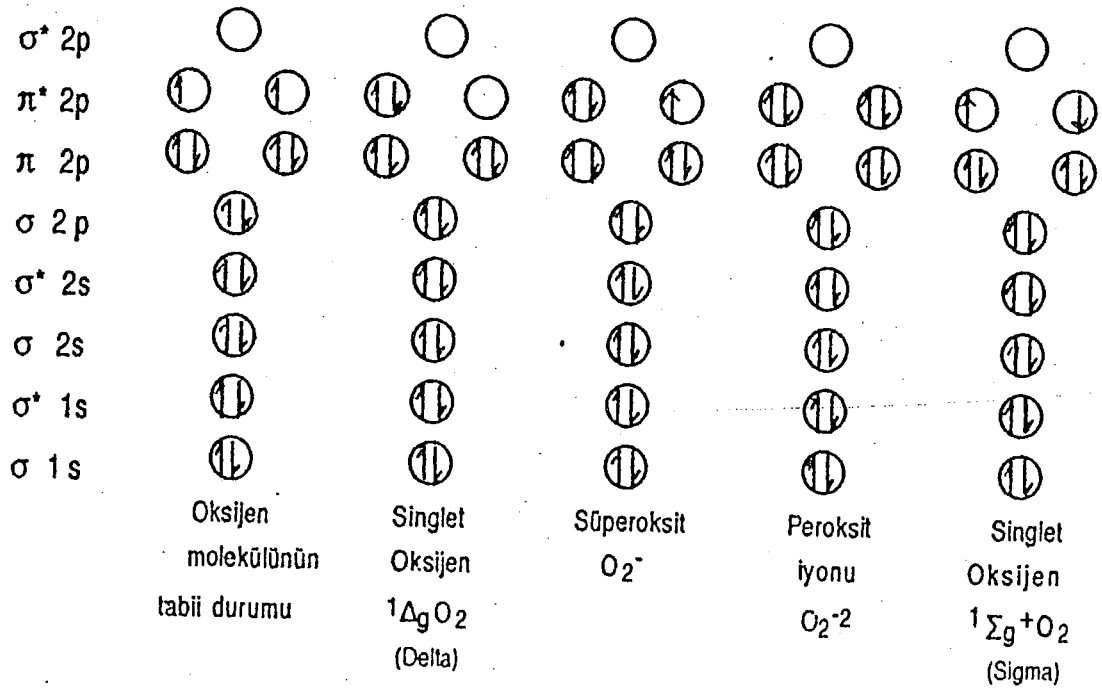
Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ), geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksidin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur.



Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur (11,16,17,20,21).

#### **Singlet Oksijen:**

Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta ve sigma olmak üzere 2 şekli vardır (Şekil 1). Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar. Singlet oksijenin kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelmesi ve bunun ölçülmesiyle reaktif oksijen türlerinin direk tayini yapılabilmektedir (11,17,19,20,21,23).



Şekil 1. Tabii oksijen ile diğer oksijen radikallerinin elektron dağılımı

Serbest oksijen radikalleri dışında karbon merkezli radikaller (R.), peroksil radikalleri (ROO.), alkoksil radikalleri (RO.), tiyl radikalleri (RS.) gibi önemli serbest radikaller de vardır (20). Peroksil radikali poliansatüre yağ asidlerinden meydana gelen yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (11).

### 2.2.2.Hücrelerde Serbest Radikal Oluşumu

#### Serbest Radikallerin Kaynakları:

#### 1. Serbest radikallerin biyolojik kaynakları

- Aktive olmuş fagositler (Respiratory Burst)
- Antineoplastik ajanlar (adriamisin, doksorubisin)
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular
- Çevresel ajanlar ( hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, hiperoksi, pestisidler, sigara dumanı, solventler , anestezipler, aromatik hidrokarbonlar )

#### 2. Serbest radikallerin intraselüler kaynakları

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu ( tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler , antibiotikler )
- Enzimler ve proteinler ( Ksantin oksidaz, triptofan dioksigenaz, Hb )
- Mitokondrial elektron transportu

- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri ( sitokrom P450, sitokrom b5 )
- Peroksizomlar ( oksidazlar, flavoproteinler )
- Plazma membranı ( lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz , lipid peroksidasyonu ) ( 18 ).

İyonize radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında serbest radikaller genellikle hücrelerde elektron transfer reaksiyonlarıyla meydana gelir. Bunlar enzimlerin etkisiyle ya da nonenzimatik geçiş metalleri iyonlarının redoks kimyası aracılığı ile cereyan ederler.

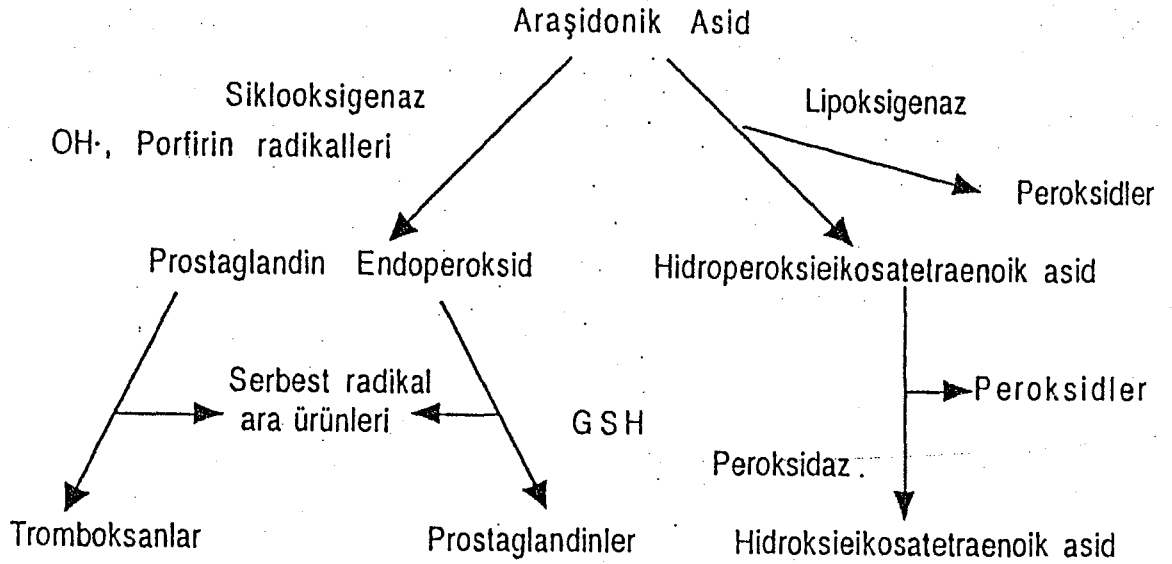
Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında serbest radikaller açığa çıkar. Bu enzimlere örnek: Ksantin oksidaz , aldehid oksidaz , dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz (18,20,24).

Aktive olmuş fagositler, bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksid üretirler (16,19,22,25 ).

Normalde , hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı , elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. İç mitokondrial membranda lokalize oksidatif fosforilasyon zinciri komponentleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikal açığa çıkışı artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikaller, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan meydana gelirler. Peroksizomlardaki flavin oksidazlar gibi diğer enzimler de süperoksid ya da hidrojen peroksid üretebilirler. Hayvan hücrelerinde süperoksidin başka bir kaynağı da, askorbik asid, tioller ( glutatyon, sistein gibi ), adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonudur (18,20,24).

Hücrelerde serbest radikal üretimi , bazı yabancı toksik maddeler tarafından büyük oranda arttırılabilir. Bunun tipik bir örneği karbontetraklorür toksisitesidir (20).

Araşidonik asid metabolizması da reaktif oksijen türlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna, plazma membranından araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu serbest radikal ara ürünleri oluşturur (Şekil-2) (21,18).



Şekil 2. Araşidonik asid metabolizmasında oksijen radikallerinin oluşumu

### 2.2.3 Fagositoz ve Respiratory Burst

Fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasına ve hasarına neden olabilen, enfeksiyona karşı vücudun hücrel cevabını başlatan hücrelerdir (21).

Fagositik lökositler çözünebilir ya da partiküler bir stimulusla ( opsonize mikroorganizmalar, kompleman fragmanı C5a, lökotrien B4, bakteriel orijinli N-formylated oligopeptidler gibi ) uyarıldıktan sonra lizozomal komponentleri dışarı vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitleri oluşumuyla birlikte, mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir patlama (respiratory burst) gösterirler. Fagosit edilmiş bakteri, respiratory burst ürünlerinin toksik etkisiyle öldürülür. Bu oksidan ürünler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit , hidroksil radikali ve halid oksidasyon ürünleridir (19,21,22,23,25,26,27,28).

### 2.2.4. Antimikrobiale Aktivitede Serbest Radikaller

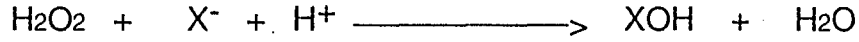
#### (Myeloperoksidaz-Hidrojen peroksit-Halid sistem)

Respiratory burst'in amacı fagositler tarafından mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılacak oksidan ajanlar sağlamaktır. Bu oksidan ajanları kullanan mikrobisidal sistemlerden biri myeloperoksidaz sistemidir. Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan myeloperoksidaz ihtiva ederler (21,22,23,28,29,30). Nötrofilde, antimikrobiale bir ajan olarak sorumlu tutulan ilk oksidatif metabolizma ürünü hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksidin myeloperoksidaz ve bir halid ile kombinasyonu güçlü antimikrobiale aktivite gösterir. Bu reaksiyonda myeloperoksidaz, halid'den hidrojen peroksitde iki elektron



transferi yapar, okside halid meydana gelir.

#### Myeloperoksidaz



(Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>)

Hypohalous asitler olan hipoklorit (HOCl), hipoyodit (HOI) ve hipobromit (HOBr), ile bunların tuzları güçlü oksidanlardır ve biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerler (22,23,25,28,30).

### 2.2.5. Serbest Radikallerin Etkileri

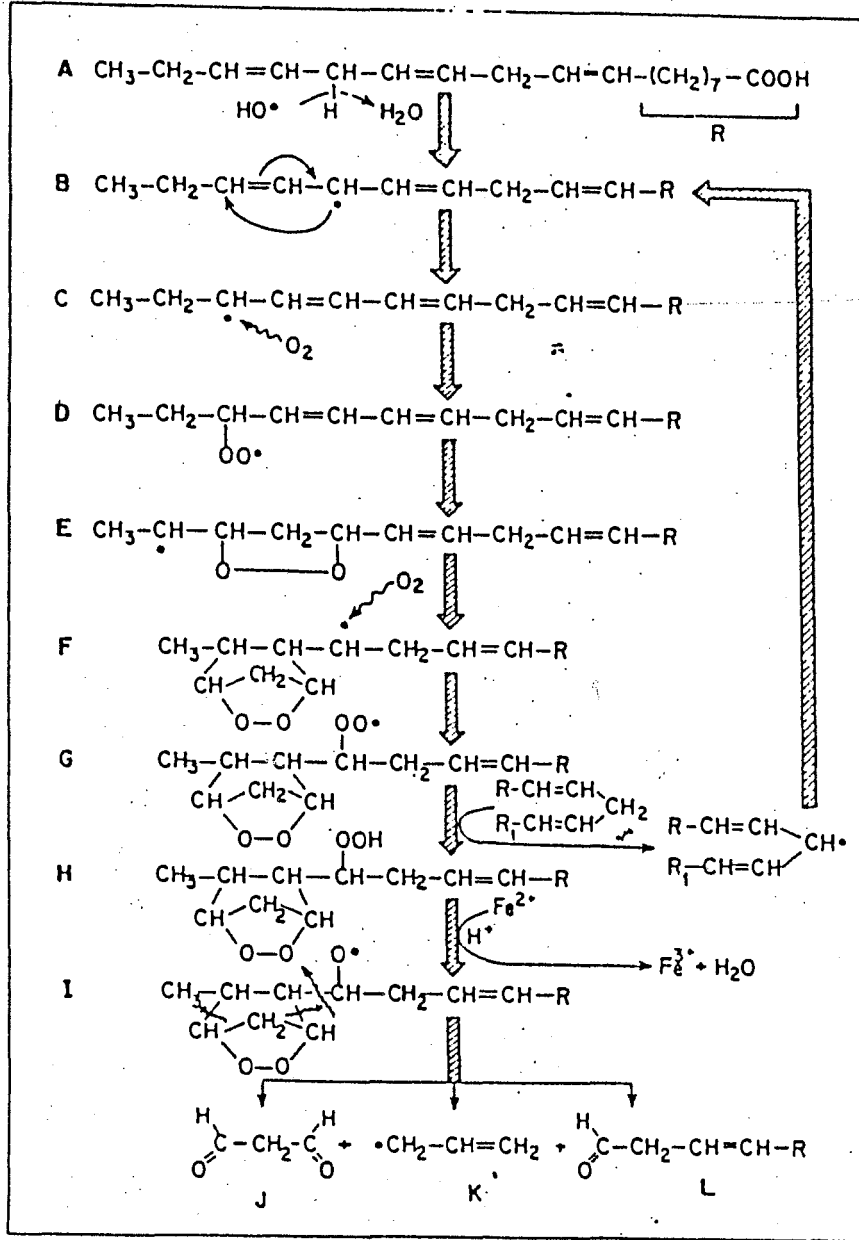
**2.2.5.1. Membran lipidlerine etkileri:** Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenir, fakat lipidler en hassas olanlarıdır (20).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (Şekil-3) (15,24,31).

Lipid peroksidasyonu toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılabilir ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam edebilir (18).

Plazma membranı ve organel lipid peroksidasyonu, daha önce bahsedilen serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar. (10,32).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksidlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksidleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayabilirler (20,24,31). Üç ya da daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) meydana getirir ki bu



Şekil 3. Linoleik asitten malondialdehid ve diğer peroksidasyon ürünlerinin oluşumu. A: Başlama. B: Dien konjugasyonu ve serbest radikal stabilizasyonu. C: Moleküler oksijen saldırısı. D:Lipid peroksil radikali. E: Lipid endoperoksi radikali. F: Molekül içi düzenleme. G: Radikal zincir reaksiyonu (ilerleme) H: Lipid hidroperoksi parçalanması. I: Lipid alkoksil radikali. J: Malondialdehid. K: Alkil radikali L: Lipid aldehid.

da tiobarbütirik asitle ölçülebilir. Bu yöntem lipid peroksid düzeylerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir ama lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon gösterir (18,24,31).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirek olarak reaktif aldehydler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir (20). Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (18).

**2.2.5.2. Proteinlere etkileri:** Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar, başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne derece etkileneceği aminoasid kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasidleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Sitoplazmik ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra dimerlere veya daha büyük agregatlara çapraz bağlanabilirler. Prolin ve lizin, süperoksid radikali, hidrojen peroksid ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (18,21,24).

**2.2.5.3. Nükleik asidler ve DNA' a etkileri :** İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda, nükleik asid baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar . Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksid membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir. (16,20,21).

**2.2.5.4. Karbonhidratlara etkileri:** Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehydler meydana gelir. Bunlar diabet ve

sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (21).

Serbest radikaller çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Diabet ve diabetin komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı , hipertansiyon, psoriasis , romatoid artrit , çeşitli deri, kas ve göz hastalıklarında, kanserde, yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (33-42). Ancak, serbest radikallerin bu hastalıkların sebebi mi olduğu yoksa hastalıkların bir sonucu olarak mı meydana geldikleri tam olarak bilinmemektedir.

### 2.3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve /veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal ( endojen kaynaklı ) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (18,20,43,44 ).

#### A-Doğal Antioksidanlar (Endojen)

1. Enzimler : Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, Süperoksid dismutaz Katalaz, Glutasyon Peroksidaz

#### 2. Enzim olmayanlar:

a - Lipid fazda bulunanlar:  $\alpha$ -tokoferol ,  $\beta$ -karoten

b -Sıvı fazda(yani hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar):

Askorbik asit, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin , laktoferrin , miyoglobin, hemoglobin, ferritin, albumin, bilirubin, glutasyon

#### B-Eksojen Antioksidanlar

-Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehid, tungsten

- Soya fasulyesi inhibitörleri (ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler).

- NADPH Oksidaz inhibitörleri : Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, Non-steroid antiinflamatuar ilaçlar, cetiedil, diphenylene iodonium

- Süperoksid dismutaz

- Katalaz

- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albumin, DMSO

- Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin

- Nötrofil adezyon inhibitörleri

C-Gıda Antioksidanları

-Butylated hydroxytoluene (BHT) , Butylated hydroxyanisole (BHA),Sodium benzoat, Ethoxyquin, Propyl galate, Fe-superoxyde dismutase

Antioksidan etki tipleri:

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki ( scavenging etki )

2. Bastırıcı etki ( quencher etki )

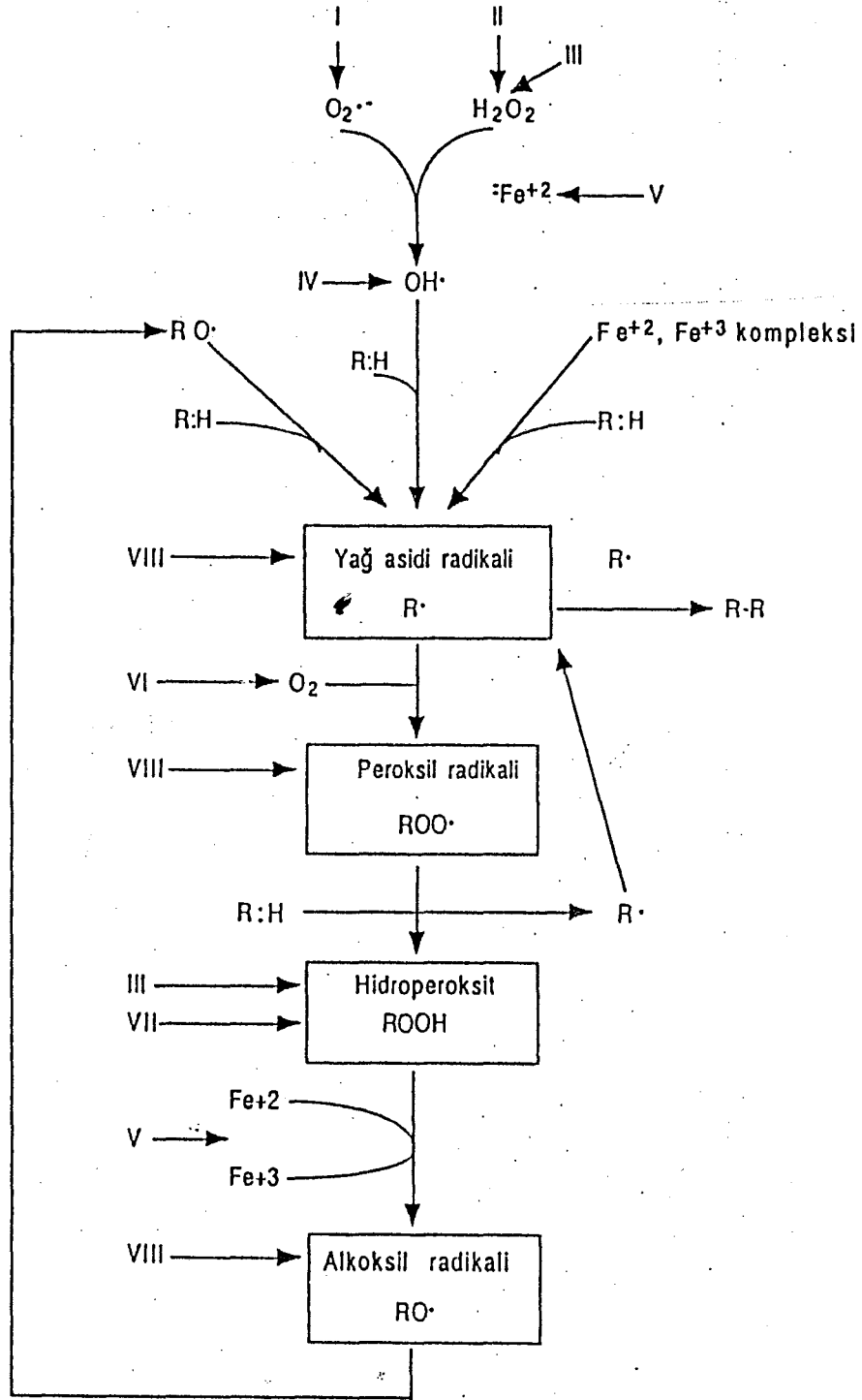
3. Onarıcı etki ( repair etki )

4. Zincir kırıcı etki ( chain breaking )

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve minareller zincir kırıcı etki gösterirler (44).

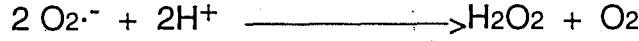
Antioksidanların lipid peroksidasyon basamaklarındaki etkileri Şekil-4 da gösterilmiştir.



Şekil 4. Poliinsatüre yağ asitlerinin oto-oksidasyon devri ve antioksidan savunma basamakları. I: Süperoksit Dismutaz. II: Katalaz. III: Glutasyon peroksidaz. IV: Ürik asid, E vitamini V: Seruloplazmin VI, VII, VIII: E vitamini.

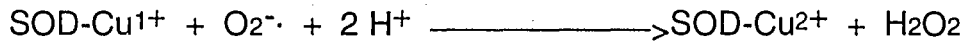
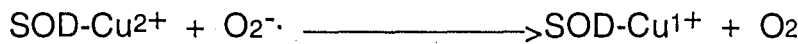
### 2.3.1. Süperoksid Dismutaz

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksid dismutaz ( EC 1.15.1.1 , EC- SOD ) enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Selüler bölmelerdeki süperoksid düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar ( 16,45,46, 47).



Bu reaksiyon spontan olarak da meydana gelebilir. Fakat SOD tarafından katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar. İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD ) ile mitokondride bulunan tetramerik, Mn ihtiva eden izomerdirler (MnSOD ). Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir. Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn-SOD 6 nolu kromozomda lokalizedir (48,49). Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'nin katalizlediği reaksiyon aynıdır (50).

Süperoksid dismutazın, süperoksid anyonuna olan etkisi şu şekildedir. Süperoksid anyonu ,  $Cu^{2+}$  ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksidden bir elektron  $Cu^{2+}$ 'a transfer olurken  $Cu^{1+}$  ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksid anyonu  $Cu^{1+}$  dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki proton alarak hidrojen peroksidi oluştururken, enzim tekrar  $Cu^{2+}$  formuna dönmüş olur (13,51).

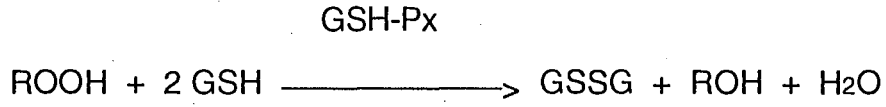
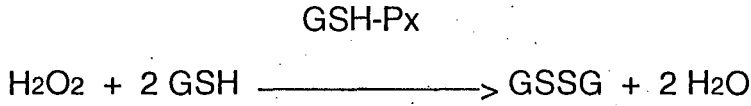


Cu-Zn SOD'nin spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek bulunmuştur (47,52). Buna karşılık Cu-Zn SOD aktivitesi prematürelerin ve yaşlıların eritrositlerinde, psoriasisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur (34,47).

### 2.3.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px ( glutasyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9 ) 'in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85.000 D.'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birçok dokuda bulunan major sitozolik selenyumlu enzimdir (14,21,53).

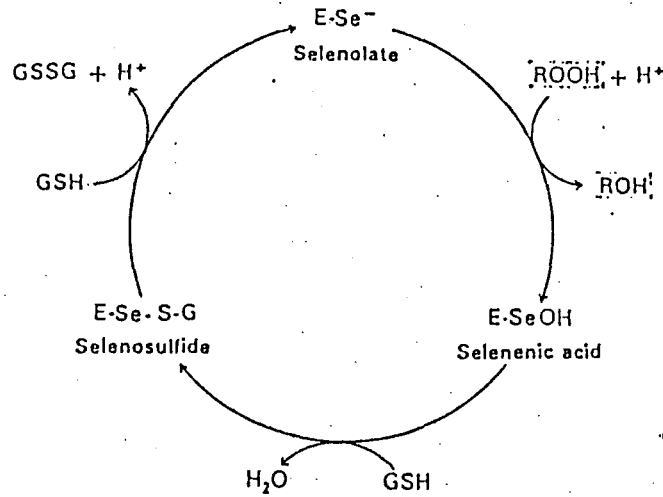
GSH-Px aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz ( PLGSHPx ) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini alkollere indirger (54).

En önemli membrana bağlı antioksidan olan vitamin E sınırlı olduğu zaman, PLGSHPx membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (54).

GSH-Px'in selenolat formu ( E-Se- ) peroksid substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür ( E-Se-OH ). Glutasyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite ( E-Se-S-G ) oluşturur. İkinci bir glutasyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutasyon okside hale dönüşür (Şekil-5).

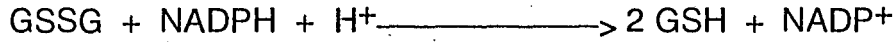


Şekil 5. Glutasyon Peroksidazın katalitik mekanizması

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.



## Glutasyon Redüktaz

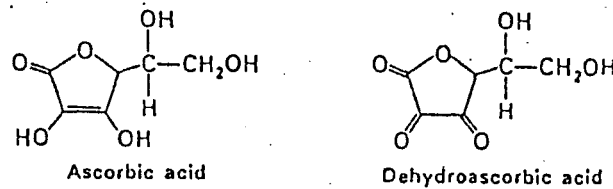


GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksid salınımının arttığı gösterilmiştir ( 54 ). Eritrositlerde de GSH-PX oksidan strese karşı en etkili antioksidandır ( 55 ). GSH-PX aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (56).

### 2.3.3. C Vitamini

C vitamini (askorbik asid), kapalı formülü C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asid, özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur (21, 57-60).

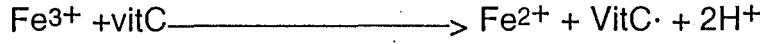
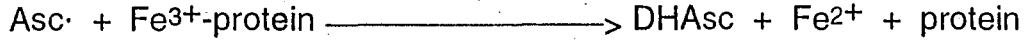
Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asid semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur (Şekil-6). Güçlü indirgeyici aktivitesi nedeniyle aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksid ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girer. C vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalinin ,  $\alpha$ -tokoferole redüklenmesini sağlar(21,59). C vitamininin bitkisel ve hayvansal yağları , balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir (60).



Şekil 6. Askorbik asid ve dehidroaskorbik asid

C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen, süperoksid

radikali dışındaki tek selüler ajandır (21).



Sağlıklı kişilerde ve topluluklarda C vitamini durumunu anlamak için plazma veya lökosit askorbat konsantrasyonları kullanılır. Plazma konsantrasyonları askorbatın metabolik turnover'nın ya da en son diyetle alımının bir göstergesi iken, lökosit konsantrasyonlarının C vitamininin doku depolarını yansıttığına inanılmaktadır. Lökosit askorbik asit (Asc) düzeyleri plazmadakinden 25-80 kat daha yüksektir (58,61,62,63,64).

Doku askorbat eksikliğinin diabetes mellitusta doku patolojisini arttırdığı ve bu yüzden fazla miktarda C vitamini alınması gerektiği kaydedilmiştir (65).

#### 2.3.4. E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısındadır. Doğal olarak husule gelen, alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoidlerin substitue edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokollerdir. D- $\alpha$ -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir (66).

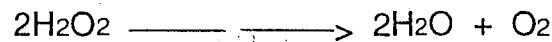
Çok güçlü bir antioksidan olan E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksid, hidroksil radikallerini, singlet oksijen, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (18,66,67).

E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidandır (14).

#### 2.3.5. Diğer antioksidanlar

**Katalaz:** Katalaz ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$  oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Peroksizomlarda lokalizedir (15,68).

Katalaz



**Karotenoidler:** A vitamininin metabolik öncülü olan  $\beta$ -karoten, bitki pigmentlerinden olan karotenoid familyasının bir üyesidir.  $\beta$ -karotenin, singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksid radikalini temizlediği ve peroksi radikalleri ile direk olarak etkileşerek antioksidan vazife gördüğü uzun zamandır bilinmektedir. (11,69,70).

**Ürat:** Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksit, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizlemektedir. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi de bulunmaktadır (11,14,15).

**Sistein:** Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (14,70).

**Albumin:** LOOH ve HOCl toplayıcısıdır (14,70).

**Bilirubin:** Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (14,70).

**Seruloplazmin:** Muhtemelen SOD'e benzer mekanizma ile etki gösterir (14). Demiri yükseltgeyip Fenton reaksiyonunu inhibe ederek koruyucu bir ajan olarak rol oynar (15).

**Transferrin ve Laktoferrin:** Dolaşımdaki demiri bağlarlar (12,14,17).

**Ferritin:** Dokudaki demiri bağlar (14).

## 2.4. DİABETES MELLİTUS VE SERBEST RADİKALLER

Diabetes mellitus'da peroksit regülasyonundaki ve geçiş metalleri metabolizmasındaki anormallikler, hastalığın oluşmasında ve uzun dönem komplikasyonlarında önemli rol oynarlar (71,72). Oksidatif aktivitenin (serbest radikal üretiminin) artışı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve proteinlerin glikozilasyonu özellikle zayıf kontrollü diabetlilerde ateroskleroz, retinopati, hipertansiyon gibi diabet komplikasyonlarına yol açar (73).

### 2.4.1. Diabet Etiyolojisinde Serbest Radikallerin Rolü

Serbest radikaller daha sonraki komplikasyonlarında olduğu kadar diabetin kendisinin oluşumunda da etkilidirler. Serbest radikallerin etkisiyle oluşan  $\beta$ -hücre hasarı IDDM'e neden olur. Diabetin başlamasında oksidasyonun rol oynadığına dair bulguların çoğu, deney hayvanlarında diabeti oluşturan 2 ilaç olan, alloksan ve streptozotosin (STZ) ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Bunlardan alloksan, intraselüler redüktanlar olan askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve böylece oksidan üretime sebep olur. Bir glukon nitrosourea olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak, STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirerek diabete sebep olduğu tahmin edilmektedir. Alloksan toksitesi in vitro ve in vivo metal şelatlayıcı ajanlar, SOD, katalaz, hidroksil radikal parçalayıcıları ve lipide çözünebilir antioksidanlarla

inhibe edilebilir. Desferroksamin, düşük dozlarda tekrarlanan streptozotosinin sebep olduğu diabeti önler. Bu da, geçiş metallerinin katalizlediği serbest radikal reaksiyonlarının STZ toksisitesine katkıda bulunduğunu gösterir (71,74,75, 76).

IDDM'un başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır. İnsülitis, serbest radikaller üreten fagositlerin infiltrasyonu ile karakterizedir. Ayrıca sitokinler de  $\beta$  hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar (77). Düşük doz STZ ile meydana getirilmiş deneysel insülitis sırasında adacıkları infiltre eden ilk inflamatuvar hücreler makrofajlardır. Aktive makrofajlar sitotoksik serbest radikaller üretirler. Özellikle hidroksil radikalleri  $\beta$  hücrelerine karşı sitotoksiktir (78). İn vitro deneylerde dihidrolipoik asid belirgin şekilde makrofajların neden olduğu adacık hücre yıkımını inhibe ederken, bu antioksidan yokluğunda uygunsuz NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının arttığı gösterilmiştir (79).

Pankreasta antioksidan enzimlerin aktivitelerinin diğer dokulardan daha düşük olması da pankreası oksijen radikallerinin etkilerine karşı hassas hale getirir (74, 76).

#### **2.4.2. Diabette Lipid Peroksidasyonu**

Diabetik kişilerle plazma ve doku lipid peroksidasyon ürünlerinin aynı yaşta sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Retinopatili ve anjiopatili NIDDM'li hastalarda TBA reaktivitesinde (lipid peroksidasyon ürünlerinde) komplikasyonu olmayan hastalardan daha fazla artış görülmüştür (71,73,77, 80, 81,82,83 ). Diabetik hayvanlarda da benzer bulgular elde edilmiştir. Streptozotosin ile diabet meydana getirilmiş ratlarda böbrek ve retinada lipid peroksidasyonu yüksek bulunmuştur (71).

Diabette, özellikle vasküler komplikasyonları olan hastalarda lipid metabolizması ve yapısında belirgin değişiklikler olur. Özellikle LDL' nin oksidasyona eğilimi artar. Bu kişilerde, plazma lipoproteinleri ile hücre membranındaki lipid oksidasyonuna yaygın vasküler hastalık eşlik eder. Bununla beraber, yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, plazmadaki lipid peroksidleri düzeyi diabetten çok doğrudan vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilgilidir.

Diabette; plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipidlerinde ve çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun arttığına dair çok sayıda çalışma bulunmakla beraber bu artışta enzimatik (araşidonik asid yolu) ve nonenzimatik (otooksidatif) lipid peroksidasyonundan hangisinin daha çok sorumlu olduğu bilinmemektedir. Ancak, hem arşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile hem de süperoksid ve

hidrojen peroksid etkisi sonucu non-enzimatik yolla diğer lipidlerden lipid peroksidlerinin meydana geldiği sanılmaktadır. Enzimatik yol, yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşir. Süperoksid, hidrojen peroksid ve metal iyonlarının etkisi sonucunda da dolaşımında, ekstrasvasküler boşlukta veya endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden non-enzimatik yolla lipid peroksidleri meydana gelebilirler. Daha sonra enzimatik yol ürünleri non-enzimatik yolu, non-enzimatik yol ürünleri de enzimatik yolu aktive ederek lipid peroksidlerinin üretimini artırır. Sonuçta, her iki yol karşılıklı olarak birbirlerini etkilemiş olurlar.

Aspirin verilmesinden sonra birkaç saat içinde tavşan plazmasında total lipid peroksidlerinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir. Aspirin insan için terapötik dozun üstünde kullanıldığında etkiliyken diğer antiinflamatuvarlar ( naproksen, indometasin) terapötik dozda etkilidirler.

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 (42,72).

#### **2.4.3. Proteinlerin Nonenzimatik Glikasyonu**

Proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu, posttranslasyonel protein modifikasyon reaksiyonudur. Diabette hemoglobin, kollagen, membran proteinleri, plazma proteinleri, tubulin ve lens kristallini gibi proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu artmıştır. Nonenzimatik glikozilasyonun ilk aşamasında proteinlerdeki serbest amino grupları (N-terminal ve  $\epsilon$ - amino grupları) ve açık zincir şeklindeki glukozun serbest aldehyd grubu arasında bir Schiff bazı oluşur, sonra daha stabil ketoamin haline gelmek üzere bir Amadori düzenlenmesine uğrar. Böylece proteinin yükü ve konformasyonu değişir. Proteinlerin artmış glikozilasyonu ve bunu izleyen reaksiyonlar normal yaşlanma sırasında meydana gelen, diabetin hızlandırdığı vücut proteinlerindeki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerden sorumludur (71, 84, 85)

Glukoz, diğer  $\alpha$ -hidroksialdehydler gibi enolize olarak geçiş metallerinin katalizörlüğünde moleküler oksijeni indirgeyerek ketoaldehyd, hidrojen peroksid ve okside edici ara ürünler oluşturur (71, 83, 79, 80 ).

Amadori ürününün kendisi de okside olarak, eritronik asid açığa çıkışına ve karboksimetillenmiş lizin kalıntılarının (CML) oluşumuna sebep olur. CML düzeyi,

diabetiklerin deri kollageninde diabetik olmayanlardan iki kat daha yüksektir ve retinopati ve nefropati varlığı ile pozitif korelasyon gösterir. CML, çok düşük konsantrasyonlarda olmasına rağmen (total lizin gruplarının %1'inden daha az) geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonların in vivo meydana geldiği hipotezinin güçlü bir göstergesidir. Bu yüzden CML birikimi, hem okside olabilen bir substratın birikimini (diabette ve yaşlanmada Amadori ürününün birikmesi gibi) hem de oksidasyonu katalizleyebilir formdaki geçiş metali düzeyindeki artışı gösterir. N6-karboksimetil lizin, N6-karboksimetilhidroksilizin ve pentozidin, indirgeyici şekerler ve proteinler arasındaki bir dizi glikasyon ve oksidasyon reaksiyonları ile meydana gelirler. Pentozidin; pentoz, arginin ve lizinden kollagen üzerinde oluşan yüksek derecede floresans , çapraz bağlı bir bileşiktir. Ribozdan başka, geçiş metalinin katalizlediği bir dizi oksidasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları sonucu, glukoz, fruktoz ve hatta askorbattan da oluşabilir. Bu bileşiklere glikoksidasyon ürünleri denir. Bunlar doku kollageninde yaşlanmayla birlikte birikirler ve diabette bu birikme daha da artar. Glikoksidasyon ürünleri diabetik kollagende bile çok düşük konsantrasyonlarda olmakla birlikte model proteinlerin oksidasyonu ve glikasyonu üzerine yapılan in vitro çalışmalar bu ürünlerin daha yoğun glikatif ve oksidatif protein hasarının biyomarkırı olduklarını göstermiştir. Diabetik hastalarda deri kollagen pentozidini retinopati ve nefropati varlığı ile pozitif korelasyon gösterir ve lensdeki nontriptofan floresansın yaklaşık %40'nı oluşturur. Sonuç olarak, diabetteki oksidatif stres ve protein hasarının kaynağı, şekerlerin otoksidasyon reaksiyonları ve plazmadaki doymamış lipidlerle membran proteinlerinin otoksidasyonu sonucu meydana gelen serbest radikallerdir (71,73,42,80,85,86 ).

#### **2.4.4. Diabet Ve Hızlanmış Yaşlanma**

Diabette oksijen radikallerinin etkisiyle kollagen yapısında meydana gelen değişiklikler sonucu kollagenden zengin dokularda morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Bazal membranlarda kırılganlaşma, damar geçirgenliğinde değişiklikler, eklem hareketliliğinde azalma ve yara iyileşmesinde bozulma görülür .Diabette arterler ve eklemler erken sertleşirler. Akciğerlerin hem vital kapasitesi hem de elastikliği erken azalır. Kollagenden kaynaklanan floresans yaşla arttığı gibi diabette daha da artar. Komplikasyonu olan hastalarda bu artış hızlanır. Bu değişikliklerin yüksek kan glukozunun in vivo kollagenle reaksiyonu sonucu olduğu ileri sürülmüştür. Çünkü in vitro, kollagen glukozla inkübe edildiğinde, rengi esmerleşir, floresans olur, yapısında çapraz bağlar meydana gelir ve gerilme özellikleri değişir. Bu olaylarda geçiş metallerinin katalizlediği

oksidatif reaksiyonlar önemli rol oynarlar (71,42).

#### **2.4.7. Diabette Eritrosit Hassasiyeti**

Diabetik hastaların karşılaştıkları önemli problemlerden biri trombotik bozuklukların sık meydana gelmesidir. Diabetik hastaların eritrositlerinin fizikokimyasal özelliklerindeki anormaliteler bu bozukluklara yol açan faktörlerden biridir. Membran özelliklerini etkileyen poliansatüre yağlar biyolojik membranlarda bol miktarda bulunurlar ve bunların peroksidasyonu membran bütünlüğüne karşı ciddi bir tehlike oluşturur. Diabetik hastalarda eritrosit membranı lipid peroksidasyonunun artması sonucu eritrosit ömrü, hücre deformabilitesi azalır, membran rijiditesi, pıhtılaşma eğilimi ve endotel hücrelerine yapışma eğilimi artar, membran fosfolipid asimetrisi değişir (80, 87, 88).

#### **2.4.8. Diabette Bozulmuş Lökosit Fonksiyonu Ve Enfeksiyon**

Diabetlilerde enfeksiyonların sık ve şiddetli olduğu genel olarak kabul edilmektedir (89,90,91). Lökositlerin mikrobisidal fonksiyonlarında bozukluk olduğu da pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (90,91,92,93,94 ).

Respiratory burst'deki bozukluk diabetik lökositlerin intraselüler öldürme yeteneklerinin azalmasına yol açar ve diabetli hastalardaki enfeksiyonla birlikte artmış mortalite ve morbiditeyi kısmen açıklar(95).Fagositozda görülen metabolik aktivite patlaması için gerekli olan enerji, glukoz metabolizmasından sağlanır. Diabet hastalarının lökositlerinde glukoz kullanımı ve enerji üretiminin bozuk olduğu ve bu yüzden fagositik fonksiyonun yetersiz olduğu kaydedilmiştir (90, 96).

#### **2.4.9. Diabette Antioksidatif Tedavinin Rolü**

Normal şartlar altında organizmanın intrinsik savunma mekanizmaları serbest radikallerin zararlarını önlemede yeterlidir. Bu serbest radikaller endojen kaynaklı ya da eksojen kaynaklı olabilirler. Serbest radikallerin oluşumu belli bir düzeyin üzerinde arttığında savunma mekanizmaları yetersiz kalır. Diabette iki mekanizma nedeniyle oksidatif stres artmıştır. Bunlardan biri, artmış glukoz otoksidasyonu sırasında serbest radikallerin üretilmesi diğeri, E vitamini, C vitamini, glutatyon gibi doğal koruyucu antioksidanların rejenerasyonlarının bozulmasıdır. Bu doğal radikal toplayıcılarının indirgenmiş şekillerinin rejenerasyonu için yeterli miktarlarda NADPH olmalıdır. Diabette NADPH glukozun yüksek olduğu durumlarda insüline bağlı olmayan dokularda glukozun sorbitole dönüşümü sırasında tüketildiğinden yeterli miktarda değildir.

Doğal antioksidanlardan olan ubikinoller, E vitamini ve karotenoidler membranları ve lipoproteinleri koruyan en önemli lipofilik ajanlardır. Sıvı fazdaki en

önemli antioksidanlar C vitamini ve glutatyondur. Alfa-lipoik asid normalde alfa-ketodehidrogenazlar gibi enzimlere bağılıdır fakat aynı zamanda bir antioksidan olarak da görev yapar.

E vitamini bir radikal ile etkileştiğinde, kendisi bir radikale dönüşür. LDL'nin dış yüzeyinde lokalize E vitamininin azalmasını önlemek için bu radikal C vitamini gibi sıvı faz redükthanlarla reaksiyona girerek rejenere olur.

Diabette glukozun hücre içine alınması bozulmuştur. Yüksek glukoz düzeyleri dehidroaskorbik asidin (C vitamininin okside şekli) uptake'ni de bozar. Dehidroaskorbik asid, glukoz tarafından kullanılan transport sistemi ile hücre içine alınır. Buna bağılı olarak diabette askorbik asid plazmada düşük, bunun primer oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbat yüksektir. Diabetik lökositlerde ve bazı dokularda da askorbik asid düzeyleri düşüktür. Eğer lipoik asid verilirse hem lipoik asid hem de dihidrolipoik asid düzeyleri yükselir. Çünkü bu antioksidan diabetteki glukoz yüksekliğinden etkilenmeyen yağ asidi transport sistemini kullanır. Böylece C vitamini ve E vitamininin etkinliği artırılabilir.

Alfa-lipoik asid, D-alfa-tokoferol, C vitamini, sodyum selenit gibi antioksidanların yukarıdaki bilgiler ışığında Tip 1 Diabetes mellitus başlangıç döneminde, Tip 2 Diabetes mellitus komplikasyonları oluşum ve ilerlemesinde faydalı olabilecekleri düşünülebilir. Bu antioksidanların diabetli hastalarda lipid peroksidasyonu, proteinüri ve albuminüriyi azalttığı, mikroanjiyopati ilerleyişini durdurduğu tesbit edilmiştir (71, 79).



### 3.MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Vaka Seçimi

Bu çalışma, Konya ve çevresinde yaşayan, 3-27 yaşları arasında (ortalama 12.82) , klinik ve laboratuvar teşhis metodlarıyla Tip1 Diabetes Mellitüs tanısı konmuş olan 34 (20 kız, 14 erkek ) hasta ve 3-18 yaşları arasında ( ortalama 10.19), hiçbir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan 29 (13 kız, 16 erkek) sağlıklı kişi üzerinde gerçekleştirildi.

Diabet grubuna alınan hastalar tedavi altında olan kişilerdi. Bunların hepsi insülin tedavisi görmekte idi.

Çalışmaya alınan kişilerin önce ayrıntılı anamnezleri kaydedilip, 10-14 saatlik açlığı takiben kan örnekleri alındı. Uygun şartlar altında, 20 ml. kadar venöz kan alındı. Bunun 10 ml. si, içinde 20 mg EDTA olan plastik tüpe aktarıldı. Bu kandan 0.5cc HA1c için geri kalanı daha sonra lökosit süspansiyonu ve eritrosit süspansiyonu elde etmek için kullanıldı. Geri kalan 10 ml. kan pıhtılaştıktan sonra, 3000 devir/dak'da 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Bu serumdan AKŞ, lipid peroksidasyonu , C vitamini tayinleri yapıldı. C vitamini tayinleri ayrılan taze serumlar kullanılarak aynı gün yapıldı.

Çalışmaya alınan vakaların yaş ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Diyabetli Hastaların ve Kontrol Vakalarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımları

	<u>n</u>	<u>Yaş ortalaması</u>	<u>Yaş aralığı</u>
Kontrol kız	13	9.85 ± 4.26	3-18
Kontrol erkek	16	10.47± 2.99	4.5-16
Diabetli kız	20	13.00 ± 3.42	4-19
Diabetli erkek	14	12.57 ± 6.81	3-27
Toplam kontrol	29	10.19 ± 3.56	3-18
Toplam diabetli	34	12.82 ± 4.93	3-27

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- 1- Soğutmalı Santrifüj : Hettich Universal 30 RF (Almanya)
- 2- Hassas Terazi : Bosch-S-2000 , D-7455 (Almanya)
- 3- Derin dondurucu : Esersan (Türkiye )
- 4- Otoanalizör : Technicon RA-XT ( A.B.D. )
- 5- Vorteks : Nüve-NM 110 ( Türkiye )
- 6- Spektrofotometre : Sequoia-Turner-Model 390, Seri no: 000035 ( A.B.D. )
- 7- Mikroskop : Olympus, Seri no: 640978 ( Japonya )

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve Reaktifler

- 1- Süperoksit Dismutaz tayini için kullanılanlar:
  - Superoxide Dismutase kiti: Randox-Ransod
- 2- Glutasyon Peroksidaz tayini için kullanılanlar:
  - Glutathione Peroxidase kiti: Randox-Ransel
  - Potasyum siyanür, KCN, Merck (Almanya)
  - Potasyum ferri siyanür,  $K_3Fe(CN)_6$ , Merck (Almanya)
  - Sodyum bikarbonat,  $NaHCO_3$ , Merck (Almanya)
- 3- Lipid peroksidasyonu tayini için kullanılanlar:
  - Sodyum klorür  $NaCl$ , Merck 508 K 49900 (Almanya)
  - Sodyum monohidrojen fosfat,  $Na_2HPO_4$ , Merck 743 K 0066662876 (Almanya)
  - Sodyum dihidrojen fosfat,  $NaH_2PO_4$ , Merck 401 K 3481045 (Almanya)
  - Butylated hydroxytoluene (BHT),  $C_5H_24O$ , B-1378 Sigma (ABD)
  - Triklorasetik asid (TCA),  $CCl_3-COOH$ , Merck 409 K-3779910 (Almanya)
  - Etilendiamin tetraasetik asid, disodyum tuzu,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , Sigma 86 F-0380 (ABD)
  - 2-Tiobarbitürik asid (TBA),  $C_4H_4N_2O_2S$ , Sigma, T-5500 (ABD)
  - Sodyum hidroksit,  $NaOH$ , Merck, 535 C 549562 (Almanya)
- 4- C vitamini için kullanılanlar:
  - Meta-Fosforik asid (MFA)  $(HPO_3)_n$ , %42 (ağırlık / ağırlık), Merck, Art. 546, 135645 (Almanya)
  - Trisodyum sitrat,  $C_5H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$ , Merck, 540 K 967432 (Almanya)
  - 2-6- Dikloroindofenol, sodium salt hydrate, Aldrich, 11, 981-4 (ABD)
  - L(+) Ascorbic asid,  $C_6H_8O_6$ , Merck, 216 F 561127 (Almanya)

5- Lökosit süspansiyonu için kullanılanlar:

- Dekstran-70, % 6 izotonik sodyum klorür solüsyonunda( Macrodex)  
Eczacıbaşı (Türkiye)

- Potasyum klorür, KCl, Merck (Almanya)

- % 0.9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonu, Haver (Türkiye)

- Triton X-100, Sigma (ABD)

6-Eritrosit süspansiyonu için kullanılanlar:

-Serum fizyolojik :%0.9 luk izotonik NaCl solüsyonu , (Haver)

7- Glukoz kiti, Biotrol (Fransa)

8- Protein Urinaires kiti , A01217-Biotrol (Fransa)

8-HbA1c kiti,HA1c micro column test,Biorad

### 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

1- GSH-PX tayini için kullanılanlar

- Drabkin çözeltisi (iki kat konsantre): 50 mg potasyum siyanür, 1 gr sodyum bikarbonat, 200 mg potasyum ferri siyanür tartılıp bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

2- Lipid peroksidasyonu tayini için kullanılanlar

- Fosfat tamponu: 8.1 gr NaCl, 2.302 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.194 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp bir miktar distile suda eritildi, son hacim bir litreye tamamlandı, pH 7.4'e ayarlandı.

- BHT çözeltisi: 88 mg BHT tartılıp, 10 ml mutlak alkol içinde eritildi.

- TCA çözeltisi (%30'luk): 30 gr TCA tartılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

- EDTA çözeltisi (0.1 M): 37.224 gr EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O tartılıp distile su ile 1litreye tamamlandı.

- TBA çözeltisi(%1'lik):1 gr TBA tartılıp, 100 ml 0.05 N NaOH'de eritildi.

- NaOH çözeltisi (0.05 N): 2 gr NaOH tartılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacmi 1 litreye tamamlandı.

3- C vitamini tayini için kullanılanlar:

- MFA çözeltisi (%10'luk): %42'lik MFA'dan 23.8 gr tartılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacmi 100 ml'e tamamlanarak, %10 'luk MFA çözeltisi hazırlandı.

- Sodyum sitrat çözeltisi (% 4.37'lik) : 4.37 gr. sodyum sitrat tartılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 ml'e tamamlandı.

- Diklorofenol-indofenol stok çözeltisi (%10 mg) : 10 mg diklorofenol-

indofenol tartılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

- Diklorofenol-indofenol çalışma solüsyonu (%1 mg): Stok çözeltiden 10 kez sulandırılarak çalışma solüsyonu elde edildi.

- Askorbik asit standartı (%1 mg) : 20 mg askorbik asit tartılıp, bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti 20 kat sulandırılarak %1 mg'lık standart elde edildi.

4- Lökosit süspansiyonu için kullanılanlar:

- KCl çözeltisi (0.6 M): 44.73 gr KCl tartılıp bir miktar distile suda çözüldü ve son hacmi 1 litreye tamamlandı.

- Lökosit sayma çözeltisi: 1 litre distile suya 20 ml asetik asid ve 5-6 damla metilen mavisi eklenerek hazırlandı.

- Triton X-100 çözeltisi %0.2'lik: 200 µl Triton X-100 üzerine distile su eklenerek son hacim 100 ml'e tamamlandı.

### 3.2. METOD

#### 3.2.1.Lökosit süspansiyonunun hazırlanması:

Bu işlem, temel olarak dekstran sedimentasyonu ve kontamine eritrositlerin parçalanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada 20 ml.lik plastik enjektöre 20 mg EDTA içeren yaklaşık 10 ml taze venöz kan çekildi. Üzerine, alınan kanın yarısı kadar (5 ml.) Dekstran 70 solüsyonu eklenip alt üst edildi. Enjektör dik pozisyonda oda ısısında 60 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda İğnenin ucu eğilerek lökositleri içeren üst faz başka bir plastik tüpe aktarıldı. 100 g'de, 4°C'de 12 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Böylece lökosit pelleti elde edildi. Bu pellet lökositlere zarar vermeden dağıtıldı. İkinci aşamada kontamine eritrositleri parçalamak için osmotik şok uygulandı. Bu amaçla, lökosit pelleti üzerine 3 ml. soğuk distile su eklendi. Çok yavaş bir şekilde karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. 30 saniye sonra 1ml. soğuk 0.6 M'lık KCl eklendi. 4°C'de, 160 g'de 4 dakika santrifüj edilerek lökosit pelleti elde edildi. Süpernatant atılıp, lökosit pelleti üzerine tekrar distile su, KCl eklenerek osmotik şok tekrarlandı. Tekrar 4°C'de 160 g'de, 4 dakika santrifüj edildi. Lökosit pelleti üzerine 1 ml. serum fizyolojik eklenip, süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyondan lökosit sayımı yapıldı. Bu işlemler sonunda elde edilen lökosit süspansiyonundaki hücrelerin % 90-92'sinin PMNL olduğu görüldü (65,97,90,100).

Lipid peroksidasyonu ve C vitamini tayini için, hazırlanan süspansiyondan 200'er µl alınıp aynı gün çalışıldı. Bu her iki çalışmada deney sırasında asid

kullanıldığından lökositleri parçalamak için başka herhangi bir işleme gerek duyulmadan lökosit süspansiyonu doğrudan kullanıldı.

Enzim tayinleri için numuneler aşağıdaki şekilde hazırlandı. 400 µl lökosit süspansiyonu alınıp üzerine 200 µl % 0.2'lik Triton X-100 çözeltisi eklendi. 6 kez dondurma çözme işlemi yapılarak lökositler parçalandı. Daha sonra santrifüj edilip enzim tayini için süpernatantlar ayrıldı. Bu süpernatantlar çalışma gününe kadar -20°C'de dondurularak saklandı (34,98,99).

Enzim tayini yapılan aynı numunelerden ticari kit (Biotrol, Protein Urinaires) kullanılarak protein tayinleri yapıldı. Enzim aktivitesi mg protein başına hesaplandı.

Nötrofiller fragil hücreler olduklarından bütün işlemlerin nazik bir şekilde yapılmasına ve kullanılan malzemenin çok temiz olmasına özen gösterildi (100).

### **3.4.2.Eritrosit süspansiyonunun hazırlanması:**

Lökositleri içeren üst faz yukarıda anlatıldığı şekilde alındıktan sonra ,altta kalan eritrosit içeren faz bir tüpe aktarıldı.2000 devir / dk'da 7 dk santrifüj edildi.Oluşan süpernatant ayrılarak atıldı.Alttaki kısma yaklaşık 1 katı kadar soğuk serum fizyolojik eklendi ve altüst edildi, yine 2000 devir / dk da 7 dk santrifüj edildikten sonra üst kısmı atıldı.Bu işlem üç kez tekrarlandı ve böylece saf eritrosit paketi elde edildi (101).

Yıkılmış eritrosit paketinden 50 µl kadar alınarak, hematoloji laboratuvarında Hb tayini yaptırıldı.Numunenin lökositlerden ne derece arındırıldığını anlayabilmek için yapılan lökosit sayımından sonra lökositlerin tamamen uzaklaştırılmış olduğu görüldü.

Numuneden 200µl alınıp aynı gün lipid peroksidasyonu çalışıldı. Geri kalan numune iki parçaya ayrılıp GSHPx ve SOD enzim aktivitesi tayinleri yapılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

### **3.4.3. Glutasyon Peroksidaz Tayini**

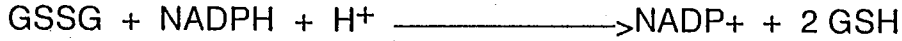
Glutasyon Peroksidaz tayini Randox marka ticari kit kullanılarak yapıldı. Deneyin prensibi Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanmaktadır (102).

Prensip: Glutasyon peroksidaz, Cumen Hidroperoksid tarafından Glutasyon'un oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon NADPH varlığında, glutasyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP'ye oksitlenir.

GPX



GR



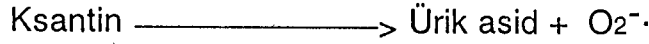
NADPH'in azalmasına bağılı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi ölçölerek enzim aktivitesi hesaplanır. Ü/L cinsinden bulunan enzim aktivitesi lökosit için litredeki protein miktarına bölünerek Ü/mg protein cinsinden eritrosit için litredeki gHb değerine bölünerek U/gHb cinsinden hesaplandı. Okumalar Technicon RA-XT marka otoanalizörde, kit prospektüsüne uygun bir şekilde yapıldı.

### 3.2.4. Süperoksid dismutaz tayini

Süperoksid dismutaz tayini, Randox marka ticari kit kullanılarak yapıldı.

Deneyin prensibi: Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asid ve süperoksid radikali oluşur. Oluşan süperoksid radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak için 2-(4-iodophenyl) -3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrozolium chloride (INT) ile reaksiyona girer. Süperoksid dismutaz aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesiyle ölçölür.

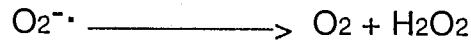
XOD



$\text{O}_2^{\cdot -}$



SOD



Çalışma kit prospektüsüne uygun bir şekilde Technicon RA-XT marka otoanalizörde yapılıp, sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$100 - \frac{\Delta A (\text{numune}) / \text{dakika} \times 100}{\Delta A \text{ kör} / \text{dakika}} = \% \text{ inhibisyon}$$

$$100 - \frac{\Delta A (\text{standart}) / \text{dakika} \times 100}{\Delta A \text{ kör} / \text{dakika}} = \% \text{ inhibisyon}$$

Her bir standartın konsantrasyonuna karşı, yüzde inhibisyonu ile çizilen eğriden enzim aktivitesi Ü/L olarak bulundu. Bu değerler lökosit için litredeki protein miktarına bölünerek, sonuçlar Ü/mg protein cinsinden, eritrosit için litredeki gHb değerine bölünerek U/gHb cinsinden hesaplandı.

### 3.2.5. C Vitamini Tayini

Deneyin Prensipleri: Metafosforik asitle deproteinize edilmiş taze serumdaki askorbik asidin 2-6-diklorofenolindofenolü indirgeyip renksizleştirmesine ve 520 nm de absorbanstaki azalmanın ölçülmesine dayanır(58,59,103).

Deneyin Yapılışı: 500 µl. serum üzerine, 750 µl. %10'luk MFA eklenip santrifüj edildi. Numune tüpüne süpernatandan 400 µl. konup üzerine 60 µl. distile su, 40 µl. sodyum sitrat eklendi. Kör tüpüne, 160 µl. distile su, 240 µl. metafosforik asit, 100 µl. sodyum sitrat eklendi. Standart tüpüne 400 µl. %1 mg'lık standart, 100 ml. sodyum sitrat eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra, 200 µl. diklorofenolindofenol eklenip, karıştırılıp, 520 nm. de distile suya karşı absorbansları okundu. Aynı numuneler üzerine birkaç askorbik asid kristali eklenerek renkli madde tamamen renksiz hale getirilerek absorbansları okundu. Bu değerler her numune için kör olarak kabul edildi. Numunedeki askorbik asid tarafından renkli maddenin indirgenmesiyle meydana gelen absorbans değişimi ( $\Delta A$ ) aşağıdaki eşitlikten hesaplandı.

$$\Delta A = (RB - RBb) - (N - Nb)$$

RB: Reaktif körünün absorbansı

RBb: Reaktifin askorbik asitle renksizleştirildikten sonraki absorbansı

N: Numune absorbansı

Nb: Numunenin askorbik asitle renksizleştirildikten sonraki absorbansı

$\Delta A$ , askorbik asid konsantrasyonuyla lineer olarak değişir. Numune  $\Delta A$ 'ı standardın  $\Delta A$ 'ı ile karşılaştırılarak numunedeki askorbik asid konsantrasyonu bulundu.

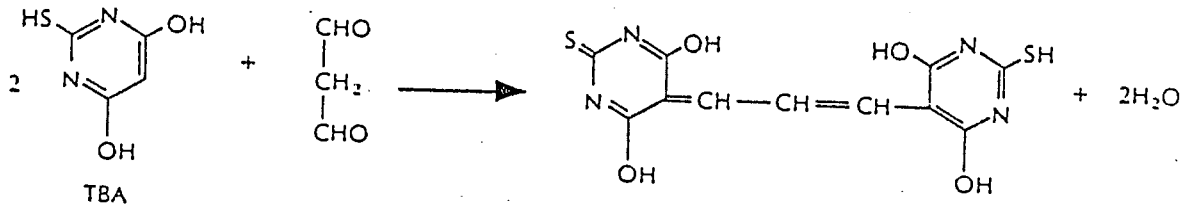
Lökosit C vitamini tayini için lökosit süspansiyonundan 200 µl alınarak üzerine 300 µl MFA çözeltisi ilave edildi. Santrifüj edildikten sonra 400 µl süpernatant alınarak C vitamini tayininde kullanıldı. Diğer işlemler serum için uygulananlara benzer şekilde uygulandı.

### 3.2.6. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, tiobarbütirik asit reaktivitesi

metodu kullanılarak ölçüldü (31,79).

Deneyin Prensipleri: Yağ asidi peroksidasyonunun bir son ürünü olan malondialdehid ( MDA ), TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm. de maksimum absorbanı veren renkli bir kompleks oluşturur.



Şekil 7. Malondialdehidin tiobarbitürik asitle reaksiyonu.

Deneyin Yapılışı: 0.2 ml. lökosit süspansiyonu, serum, eritrosit süspansiyonu üzerine 0.8 ml. fosfat tamponu, 0.025 ml. BHT ve 0.5 ml. % 30'luk TCA eklendi. Tüpler vortekste karıştırıldı ve iki saat buzda bekletildi. Daha sonra 2000 devir/dak' da 15 dakika santrifüj edildi. Her bir süpernatandan 1'er ml. başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.075 ml. 0.1M'lık EDTA ve 0.25 ml. %1'lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildi. Oda ısısına soğutulduktan sonra spektrofotometrede 532 nm.de absorbanları okundu.

MDA-TBA kompleksinin 532 nm.deki ekstinksiyon katsayısından (  $1.56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  ) yararlanarak nanomol / ml cinsinden MDA değerleri bulundu.

Bir antioksidan olan BHT, ölçüm sırasında hatalı yüksek TBA reaktivitesiyle sonuçlanabilecek MDA oluşumunu önlemek için kullanıldı.

Sonuçlar aşağıdaki şekilde hesaplanarak nmol / ml cinsinden bulundu.

1. dilüsyon:  $\frac{0.2 \text{ ml} + 0.8 \text{ ml} + 0.025 \text{ ml} + 0.5 \text{ ml}}{0.2} = 7.625$

0.2



$$2. \text{dilüsyon: } \frac{1 \text{ ml} + 0.075 \text{ ml} + 0.25 \text{ ml}}{1} = 1.325$$

$$\text{Toplam dilüsyon: } 7.625 \times 1.325 = 10.103125 = F$$

$$A = a \times b \times c$$

$$c = A / ab$$

$$c = \frac{A \text{ mol cm}}{1.56 \times 10^5 \text{ L}} \times \frac{1}{\text{cm}} \times \frac{10^9 \text{ nmol}}{\text{mol}} \times \frac{\text{L}}{10^3 \text{ ml}}$$

$$c = A \times \frac{1}{1.56} \times F \times 10$$

$$c \text{ ( nmol / ml )} = A \times 64.7636$$

A : Absorbans

a : Ekstinksiyon katsayısı

b : Işık yolu, cm

c : Konsantrasyon

Sonuçlar serum için nmol/ml olarak bulundu. Lökosit için mililitredeki protein miktarına bölünerek nmol / mg protein cinsinden MDA değerleri bulundu. Eritrosit için mililitredeki gHb miktarına bölünerek nmol / gHb cinsinden MDA değeri bulundu.

### 3.2.7. Glukoz tayini

Glukoz tayini Biotrol marka ticari kit kullanılarak, glukoz oksidaz metoduna dayanan rutin metodlarla gerçekleştirildi.

### 3.2.8. Protein tayini

Biotrol marka ticari kit (Proteines Urinaires ) kullanılarak yapıldı.

Deneyin Prensibi: Asid ortamda molibdat iyonlarının varlığında proteinler pyrogallol red ile mavi renkli bir kompleks oluştururlar. Mavi renkli kompleksin optik dansitesi 600 nm de ölçülür.

### 3.2.9. Hemoglobin A1c

Biorad marka kit kullanılarak micro column test metoduyla ölçüldü.

## 3.3. İSTATİSTİKİ ANALİZ

Bulgular, " Student's t - testi " kullanılarak değerlendirildi. Bulguların birbirleriyle olan korelasyonları " Spearman Korelasyon Testi" ile araştırıldı. Student's t - testi ve Spearman korelasyon testi, " Macintosh Classic" marka bilgisayarda "Stat Works" paket istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 4. BULGULAR

Diabetli hasta ve kontrol grubuna ait bulguların t-testi sonuçları tablo 2'de toplu halde verilmiştir.

Tablo 2'den görüldüğü gibi diabetli hasta grubunda serum , eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonu kontrol grubundan hafif yüksek, eritrosit SOD, GSHPx, lökosit SOD, GSHPx aktiviteleri ile, serum C vitamini ve lökosit C vitamini düzeyleri hafif düşük bulunmuştur. Ancak her iki gruba aid bulgular arasındaki farklar istatistiki açıdan anlamlı değildir.

Tablo 3'de görüldüğü gibi diabetli çocuklar 14 yaşdan küçük ve büyük olmak üzere ikiye ayrılarak serum lipid peroksidasyonu yeniden incelendi. 14 yaşdan küçükler ile kontrol arası fark çok aza inmekle birlikte 14 yaşdan büyüklerde istatistiki açıdan anlamlı olmamakla birlikte fark artmaktadır. Serum lipid peroksidasyonu ile yaş arasında zayıf bir korelasyonun varlığı bu fark artışını desteklemektedir.

Hastaların AKŞ, HbA<sub>1c</sub>, diabet süresi ve yaşları ile diğer parametreler arasındaki korelasyon hesaplamaları tablo 4'de, kontrol vakalarına aid korelasyon hesaplamaları tablo 5'de verilmiştir.

Bu tablolardan görüldüğü gibi hasta grubuna aid hiçbir parametre arasında önemli korelasyon bulunmazken, kontrol grubunda AKŞ-eritrosit LP, AKŞ-lökosit C vit, AKŞ-lökosit SOD ile HbA<sub>1c</sub>-eritrosit LP ve HbA<sub>1c</sub>-eritrosit GSHPx arasında istatistiki açıdan önemli negatif korelasyon, AKŞ-eritrosit SOD ve HbA<sub>1c</sub>-lökosit SOD arasında önemli pozitif korelasyon bulunmuştur.

Tablo 2. Kontrol ve diabet grubuna ait bulguların karşılaştırılması

parametre	vaka sayısı	grup	X± SD	t	p
AKŞ (mg/dl)	29	kontrol	78.07 ± 11.29	7.6	p<0.05
	34	diabet	247.97 ± 119.82		
HbA1c	29	kontrol	4.51 ± 1.66	10.11	p<0.05
	34	diabet	11.43 ± 3.28		
Serum LP (nmol / ml)	29	kontrol	2.617 ± 0.984	0.63	p>0.05
	34	diabet	2.817 ± 1.410		
Erit LP (nmol / gHb)	29	kontrol	6.225 ± 4.106	0.07	p>0.05
	32	diabet	6.300 ± 4.934		
Lök LP (nmol / mg protein)	27	kontrol	12.10 ± 5.82	0.07	p>0.05
	27	diabet	12.28 ± 13.06		
Erit GSH-PX (Ü / g Hb)	29	kontrol	27.33 ± 0.04	-0.31	p>0.05
	34	diabet	26.47 ± 10.52		
Lök GSH-PX (Ü / mg protein)	27	kontrol	4.857 ± 4.587	-0.041	p>0.05
	28	diabet	4.805 ± 4.565		
EritSOD (Ü / g Hb)	29	kontrol	1487.7 ± 355.9	-0.997	p>0.05
	34	diabet	1406.4 ± 280.4		
Lök SOD ( U / mg protein)	27	kontrol	1.437 ± 0.872	-0.991	p>0.05
	30	diabet	1.226 ± 0.704		

<u>parametre</u>	<u>vaka</u> <u>sayısı</u>	<u>grup</u>	<u>X± SD</u>	<u>t</u>	<u>p</u>
Serum C vit (mg/dl)	28	kontrol	0.925 ± 0.299	-0.483	p>0.05
	29	diabet	0.883 ± 0.347		
Lök C vit (µg /108 lök)	27	kontrol	30.76 ± 14.36	-0.102	p>0.05
	21	diabet	30.37 ± 11.05		

Tablo -3 Serum lipid peroksidasyonunun yaş dağılımına göre incelenmesi

<u>parametre</u>	<u>vaka</u> <u>sayısı</u>	<u>grup</u>	<u>X± SD</u>	<u>t</u>	<u>p</u>
Serum LP(nmol / ml) ( < 14 yaş)	26	kontrol	2.625 ± 1.049	0.037	p>0.05
	24	diabet	2.639 ± 1.514		
SerumLP (nmol /ml ) (14< yaş)	10	diabet	3.245 ±1.053	1.149	p>0.05

Tablo 4: Diabetli çocuklara ait çeşitli parametreler arasındaki korelasyon

r	AKŞ	HbA1c	Gülsüm Yaş	Süre
Serum LP	-0.08	-0.01	0.19	0.1
Erit LP	-0.27	0.05	-0.016	-0.05
Lök LP	0.17	0.244	0.012	-0.087
Erit GSHPx	-0.1	-0.172	0.25	0.098
Lök GSHPx	0.14	0.28	0.051	0.0087
Erit SOD	-0.052	-0.14	-0.08	-0.046
Lök SOD	0.14	0.28	-0.093	0.27
Serum C vit	-0.32	0.045	-0.13	-0.16
Lök C vit	-0.24	-0.016	-0.129	-0.28

Tablo 5: Kontrol grubuna ait çeşitli parametreler arasındaki korelasyon.

	AKŞ	HbA1c	Yaş	Süre
Serum LP	r=-0.22	r=-0.15	r=-0.04	
Erit LP	r=-0.52 t=3.16 p<0.005	r=-0.59 t=3.8 p<0.001	r=0.13	
Lök LP	r=-0.36 t=1.96 p<0.1	r=-0.15	r=-0.15	
Erit GSHPx	r=-0.26 t=1.4 p<0.2	r=-0.49 t=2.92 p<0.01	r=0.01	
Lök GSHPx	r=0.02	r=0.11	r=-0.17	
Erit SOD	r=0.45 t=2.62 p<0.025	r=0.31 t=1.69 p<0.2	r=0.095	
Lök SOD	r=-0.58 t=3.56 p<0.005	r=0.52 t=3.04 p<0.01	r=0.38 t=2.05 p<0.1	
Serum C vit	r=0.12	r=0.13	r=0.008	
Lök C vit	r=-0.45 t=2.55 p<0.025	r=0.02	r=0.08	

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. METODLARIN TARTIŞILMASI

#### 5.1.1. Lipid peroksidasyonu:

Serbest radikallerin etkisini araştırmada serbest radikallerin direk ölçümü, lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçümü, lipid hidroperoksitlerinin ölçümü, konjuge dienlerin ölçümü ve uçucu hidrokarbonların ölçümü gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerden herbirinin kendine göre avantajlı ve dezavantajlı tarafları vardır. Bunlardan lipid hidroperoksitlerinin ölçümü en güvenilir metod olmakla birlikte ileri düzeyde gelişmiş cihazlar gerektirmesi dezavantajlı tarafıdır. Bu ve benzeri dezavantajlarından dolayı serbest radikal etkisini araştırmada yukarıdaki metodlar yerine çoğunlukla lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ölçümü tercih edilmektedir (21,31,104,105,106 ).

MDA' nın ölçümü gayet basit ve elde edilen sonuçlar diğer metodlarla yapılan ölçüm sonuçları ile gayet iyi korelasyon göstermektedir. Bizde çalışmamızda bu metodu tercih ettik. Böylece bu metodun gerektiğinde rutin çalışmalarda da uygulanabilmesini amaçladık.

TBA testinin bazı deneysel sistemlerde esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Bazılarında ise bu test MDA için spesifik olmadığından metod Tiobarbütirik asit ile reaksiyon veren maddeler (TBARS)'in ölçümü şeklinde ifade edilir.

MDA, biyolojik materyallerde serbest ve bağılı şekillerde bulunur. Normalde serbest şekli çok azdır. Bağılı MDA sıcak asid ya da alkali ortamda serbestleştirilir. Klasik TBA prosedüründe, MDA-TBA kompleksini oluşturmak ve bağılı formdan MDA'ı serbestleştirmek için TBA ile numunenin TCA ile ısıtılması gereklidir (104).

Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehidler de TBA ile renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler. MDA, PUFA'nın oksidasyonu ile ve numunedeki okside lipidlerin dekompozisyonu ile deney sırasında da oluşabilir. İşlemden önce reaksiyon karışımına BHT eklenerek PUFA'nın oksidasyonu azaltılır (104).

Serbest MDA'nın direk tayini en güvenilir şekilde HPLC ile yapılır. Bu metod çok hassas ve hızlı bir metod olup az miktarda numune ile çalışılır. Ancak çok dikkatli numune hazırlığı gerektirdiğinden bazen hatalı sonuçlar elde edilmektedir.

### 5.1.2. Süperoksit Dismutaz:

SOD aktivitesinin direk ölçümü mümkündür fakat özel cihazlar gerektirir ve her laboratuvar için uygun değildir. Bu nedenle genellikle SOD tayini için kullanılan metodlar SOD'nin, süperoksidin başlattığı bir reaksiyonu inhibe etme yeteneğine dayanır. SOD'nin reaksiyon hızını azaltma miktarı, enzim aktivitesinin bir ölçüsü olarak alınır. Süperoksidin meydana gelmesi için enzimatik ya da enzimatik olmayan sistemler kullanılır. Daha sonra ölçüm için luminometrik, polarografik ya da kolorimetrik teknikler uygulanır (107). SOD'nin izoenzimleri de, Cu-Zn SOD'nin siyanid ile inhibe edilmesiyle ayrı ayrı ölçülebilir (108).

SOD'nin enzimatik aktivitesinin ölçümündeki asıl zorluk, SOD substratı olan süperoksit radikalinin, sadece ölçüm ortamı içinde üretilerek sağlanabilmesidir. Ayrıca süperoksit anyonu, geleneksel metodlarla kolayca ölçülemez (109). SOD aktivite ölçümlerinin çoğu, süperoksit radikali için, SOD ve indikatör bir madde arasındaki yarışma prensibine dayanır (110). Süperoksit ile reaksiyona giren ve kolaylıkla ölçülebilir bir indikatör içeren test ortamında enzimatik ya da nonenzimatik olarak süperoksit üretilir. Numunedeki SOD içeriği, indikatör reaksiyonundaki değişiklikten hesaplanır (109).

Çalışmamızda lökosit SOD ölçümü Randox marka ticari kit kullanılarak, kit prospektüsüne uygun şekilde spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Testin prensibi aşağıdaki şekildedir. Süperoksit, kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak için, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) ile reaksiyona girer. Süperoksit kaynağı olarak ksantin-ksantin oksidaz kullanılır. Süperoksit dismutaz aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesiyle ölçülür.

### 5.1.3. Glutasyon Peroksidaz :

Glutasyon peroksidaz tayini yapmak için değişik metodlar vardır. Bunlardan biri, sabit zamanda GSH tüketimini ölçen metoddur. Bu metodda, hidrojen peroksit ile GSH'ın, enzimin katalizlediği ya da spontan reaksiyonları, güçlü bir asit eklenmesi ile belli zamanda durdurulur ve polarografi ile GSH içeriği ölçülür. Hızlı ve pahalı olmayan bir metod olmakla birlikte, GSH'ın polarografik tayininde birçok inorganik ve organik bileşikler interferansa yol açabilirler.

Sabit zamanda hidrojen peroksit tüketimini ölçen metodda, sabit zaman aralıklarında glutasyon peroksidaz reaksiyonu asidifikasyon ile durdurulur, metabolize olmamış GSH, civa tuzları ile parçalanır, solüsyon nötralize edilir ve kalan hidrojen peroksit, horseradish peroksidaz varlığında floresan scopoletin

boyasıyla reaksiyona sokulur. Bu prosedür, GSH-PX tayini için başarıyla kullanılabilir. Fakat rutin ölçümler için çok komplikedir (109).

Çalışmamızda GSH-PX, Paglia ve Valentine'nin metoduna dayanan Randox marka ticari kit kullanarak tayin edildi. Yüksek spesifiteye sahip bu metotta GSH-PX, cumen hidroperoksid aracılığı ile glutatyonun oksidasyonunu katalizler. GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında indirgenerek sabit düzeyde GSH sağlanır. Buna eşlik eden NADPH'ın oksidasyonu fotometrik olarak izlenir (102,109).

#### 5.1.5. C Vitamini:

Askorbik asit tayini için çok sayıda metod vardır. Bunlar genel olarak indirgenmiş formunu tayin edenler ve okside formunu tayin edenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. İlk grup analizler genelde askorbik asidin oksidasyon-redüksiyon özelliklerine dayanır. Bunlar, C vitamini ölçümünde yaygın olarak kullanılan temel reaksiyonlardır. İkinci grup analizler askorbik asidin oksidasyonuna ve bunu takiben bir hidrazon ya da florofor oluşumuna dayanır. En iyi sonuçlar, eğer numuneler özellikle plazma ve serum, TCA ya da MFA ile hemen stabilize edilir ve hemen analizleri yapılırsa elde edilmektedir. Azalan pH'da, laktonun hidrolize eğiliminin azalması nedeniyle asid solüsyonda askorbik asidin stabilitesi daha fazladır (58).

Plazma, serum ve lökosit askorbik asit düzeyleri, askorbik asit alımının en güvenilir göstergeleridir. Plazma ve serum askorbik asit değerleri genellikle en son diyetle alınan C vitaminini yansıtır, diyete bağlı hızlı değişiklikler gösterirler. Lökosit askorbik asit konsantrasyonları ise dokulardaki vitaminin daha iyi göstergesidir. Bununla birlikte, lökosit askorbik asit tayini teknik olarak zordur, ve fazla miktarda kan gerektirir (61,63). Homojen hücre fraksiyonlarının elde edilmesindeki güçlük, lökosit askorbik asit ölçümlerinin kesinlik ve doğruluğunda azalmaya yol açar. Plazma ve serum askorbik asit tayinleri basit ve güvenilirdir. Kronik olarak askorbik asit alımı düşük olan kişilerde askorbik asid eksikliğinin olup olmadığını göstermede tercih edilirler (61). Bu nedenle çalışmamızda hem serum hem de lökositte askorbik asit tayini yapıldı.

C vitamini tayini için son zamanlarda spesifikliğı ve hassasiyeti fazla olan HPLC prosedürleri geliştirilmiştir. Fakat bunlar her laboratuvar için uygun değildir.

Çalışmamızda C vitamini tayini için, en çok kullanılan metodlardan birisi olan, 2-6 Diklorofenolindofenolün indirgenmesine dayanan metodu kullandık (58,103).



## 5.2.BULGULARIN TARTIŞILMASI

Oksidatif stres, diabet ve diabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı oksidatif stresi artıran mekanizmalardır (14,42,71).

Çalışmamızda IDDM'li çocuklara aid serum, eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonunun yüksek, buna karşılık eritrosit SOD, GSHPx, lökosit SOD, GSHPx ve serum ve lökosit C vitamini düzeyinin hafif düşük bulunması IDDM'li çocuklarda az da olsa oksidatif stres artışına doğru bir meyil olduğunu göstermektedir. Dinu ve ark. (111) IDDM'li hasta grubunda plazma lipid peroksidasyonunu kontrollere göre yüksek GSH miktarını ise düşük bulmuşlardır. Böylece IDDM patogeneğinde reaktif oksijen metabolitleri (ROM)'nin rol oynadıklarını ileri sürmüşlerdir.

Pitkanen ve ark. (76) 45-90 günlük IDDM'li ratlarda solunum havası ile atılan pentan miktarını ölçmek suretiyle kantitatif olarak lipid peroksidasyonunu ölçtükleri çalışmalarında ratlarda endojen IDDM gelişiminin artmış serbest radikal aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Yükselmiş pentan atılımının IDDM'nin başlangıç perioduna sınırlı olmayıp tüm periodlarda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Serbest radikaller, fagosit infiltrasyonu ile karakterize insülitis sonucu meydana gelirler.

Çalışmamızda her iki gruba aid bulgular arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli bulunmaması hastaların yaşı, diabet süresi ve insülin tedavisi gibi faktörlere bağlı olabilir. Nitekim, hastalarımızı 14 yaşından küçük ve 14 yaşından büyük olmak üzere ikiye ayırdığımızda, lipid peroksidasyonunun 14 yaşından büyüklerde gerek kontrollere ve gerekse 14 yaşından küçük hastalara göre daha da arttığı görüldü. Hastalarımızda lipid peroksidasyonu ile yaş arasında hafif bir pozitif korelasyon ( $r=0.19$ ) bulunmuş olması da yukarıdaki bulguyu desteklemektedir. Yaş arttıkça diabet süresi de artar ki bu da komplikasyonların gelişmesine sebep olur. Benzer bir çalışmada Richard ve ark. (112) IDDM'li hastalarda serum MDA düzeyinin kontrollere göre önemli ( $p<0.001$ ) oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacıların hastalarının yaş aralığı  $34\pm 11$  yıl ve plazma lipid peroksidasyonu  $2.96\pm 0.19\mu\text{mol/L}$ , kontrol grubunun yaş aralığı 20-40 yıl ve lipid peroksidasyonu  $2.51\pm 0.25\mu\text{mol/L}$ 'dir.

Gallou ve ark. (80) da Tip I ve Tip II' den oluşan 117 diabetik hastada lipid

2  
peroksidasyonunu kontrollere göre oldukça yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmadaki Tip I hastaların yaş aralığı 25-65'dir. Tip I ve Tip II hastalara aid bulgular arasında herhangi bir fark bulunamamıştır.

Naberasco ve ark. (113) 53±1.2 yaşları arasında 20'si tip I ve 47'si tip II'den oluşan 67 diabetik hastada lipid peroksidasyonunu kontrollere göre önemli oranda yüksek bulmuşlardır. Bütün bu bulgular diabetiklerde yaş ve dolayısı ile diabet süresi arttıkça lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir.

Öte yandan, Asayama ve ark. (114) ise 29 IDDM'li hasta ile kontrol grubuna aid serum lipid peroksidasyonu arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

Erişkin tipi olan Tip II diabetiklerde de serum MDA düzeyi kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak yetişkinlerde de olsa insülin tedavisinin oksidasyonu önleyici yönde etki ettiği kaydedilmiştir (115).

Altomare ve ark. (115) kötü kontrollü Tip II diabetik hastalarda plazma lipid peroksidasyonunu iyi kontrollü hastalara ve kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar 5 kötü kontrollü diabetiğe 7 gün uygun insülin tedavisi uygulandıktan sonra plazma lipid peroksidleri düzeyinin glisemik kontrolün düzenlenmesi ile normale döndüğünü bulmuşlardır. Öte yandan, ketotik durumdaki ratların izole hepatositlerinde artmış lipid peroksid üretiminin insülin infüzyonu ile baskılandığı da görülmüştür (116). Hem bu bulgular hem de bizim bulgularımız, insülin tedavisinin lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir.

Insülin, pentoz fosfat yolunun aktivitesini artırarak bu yolda NADPH sentezini sağlar. NADPH aşağıda gösterildiği gibi redükte glutatyon (GSH) sentezini sağlayarak antioksidan etki gösterir (115).

Glutatyon redüktaz



Portal ve ark. (117) 8-19 yaş grubu arasındaki sağlıklı çocuklarda plazma lipid peroksidasyonunu 2.41±0.3 µmol / L olarak bulmuşlardır. Bu bulgu bizim kontrol grubumuzdaki bulgularımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda hasta grubunda lipid peroksidasyonu ile AKŞ, HbA<sub>1c</sub> ve diabet süresi arasında önemli bir korelasyon bulunamadı. Bu sonuçlar, diabetiklerde lipid peroksidasyonunun diabetin kendisinden ziyade başka faktörlere bağlı olabileceğini göstermektedir. Nitekim, Gallou ve ark. (80) da diabetiklerde lipid peroksidasyonu ile glisemik kontrol (HbA<sub>1c</sub> ve AKŞ) arasında

2  
korelasyon bulamamışlardır. Lefkowitz ve ark. (118) esansiyel yağ asid eksikliğinin (özellikle omega 6 poliunsatüre yağ asidleri) ratları diabetten koruduğunu bulmuştur. Omega 6 poliunsatüre yağ asidi eksikliği araşidonat eksikliğine sebep olur. Böylece lipid mediatör ürünlerinin üretimi azalmış olur. Pltkanen ve ark. (76) lipid peroksidasyonunun hiperglisemi, ketozis , insülin yokluğu veya insülin ile tedaviye atfedilemeyeceğini bildirmişlerdir.

Öte yandan bu sonuçlara uymayan bulgular da vardır. Naberasco ve ark. (113) HbA1c ve AKŞ ile lipid peroksidasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Bu araştırmacılara göre, bozuk glukoz kontrolü artmış lipid peroksidasyonunun direk sebebidir. İnsülin eksikliği sonucu çeşitli metabolik yollardan serbest radikal salınımı artar veya hiperglisemi lipid peroksid sentezine yol açan platelet agregasyonunu stimüle eder. Dokuda antioksidatif enzimatik aktivitenin azalması da artmış lipid peroksidasyonunun diğer bir sebebidir. Kötü kontrollü diabetik hastalarda artmış lipid peroksidasyonu diabetik mikroanjyopati ve makroanjyopati gelişiminde rol oynar.

Öte yandan sağlıklı çocuklarda bulduğumuz AKŞ-eritrosit LP, AKŞ-lökosit C vit, AKŞ-lökosit SOD ile HbA1c-eritrosit LP ve HbA1c-eritrosit GSHPx istatistiki açıdan önemli negatif ilişki ile AKŞ-eritrosit SOD ve HbA1c-lökosit SOD arasındaki önemli pozitif ilişkiyi izah edemedik.

Tablo -2' den görüldüğü gibi çalışmamızda IDDM'li hastalara aid lökosit lipid peroksidasyonu hafif yüksek SOD ve GSHPx düzeyleri ise düşük bulunmuştur. Bu bulgu diabetik lökositlerin de az da olsa serbest radikallerden etkilendiğini göstermektedir.

Rister ve ark. (119) yaş aralığını belirtmedikleri sağlıklı çocuklarda PMNL SOD aktivitesini  $1.45 \pm 0.05$  U / mg protein GSHPx aktivitesini ise  $3.91 \pm 1.1$  nmol NADPH/ min/ mg protein olarak bulmuşlardır. Bu değerler bizim bulgularımızla tam bir uyum halindedir. (Tablo-2)

Hiramatsu ve ark. (86) TipI ve TipII diabetik hastalar ile sağlıklı kişilere aid PMNL süperoksid üretimi arasında anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca süperoksid üretimi ile AKŞ ve HbA1c arasında herhangi bir korelasyon bulamamışlardır. Bu bulgu bizim bulgumuzu desteklemektedir.

Nath ve ark. (120) 40-55 yaşları arasında insülin ile tedavi edilmeyen diabetik hastalarda lökosit sitoplazmik ve mitokondrial SOD aktivitesinin kontrole göre önemli oranda düşük olduğunu insülin tedavisinin ise bu düşüklüğü düzelttiğini bulmuşlardır.

2

Diabetik hastalarda eritrosit lipid peroksidasyonu ile enzim aktivitesi hakkında çeşitli çalışmalar yapılmış ve tablo 6 ve 7'de görüldüğü gibi genelde birbirine uymayan sonuçlar elde edilmiştir.

Balashova ve ark. (121) 20-43 yaşları arasındaki tipl diabetik hastaların eritrosit lipid peroksidasyonunun kontrollere göre arttığını antioksidan enzim aktivitesinin ise değişmediğini ve peroksidasyon durumunun yaş, hastalık süresi ve komplikasyon ile ilişkili olmadığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, 35 yaşın altında olup diabet süresi 10 yıldan az olan anjiopatili hastalarda 12 haftalık düzenli insülin tedavisinin lipid peroksidlerini tamamen düzelttiğini 35 yaşın üstünde ve 10 yıldan fazla diabetik olan anjiopatili hastalarda ise insülin tedavisinin lipid peroksid düzeyini azalttığı ancak yinede kontrollerden 1.5 katı fazla olduğunu göstermişlerdir. Aynı hastalarda eritrosit SOD ve GSHPx seviyesi tedavi süresince düşük bulunmuştur.

Jain ve ark. (88) 2 ve 4 aylık diabetik ratlarda eritrosit lipid peroksidasyonunu kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. İnsülin tedavisi bu artışı anlamlı olarak düşürmüştür. Bu araştırmacılar lipid peroksidasyonundaki artışı hiperglisemiye bağlamışlardır.

Jain ve ark. (79) IDMM'li hastalarda eritrosit lipid peroksidasyonunun arttığını ve HbA<sub>1c</sub> ile önemli korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır.

Matsubara ve ark. (122) genç yaştaki (14± 6.7) tipl diabette (insülin tedavili) GSHPx aktivitesini kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu ve GSHPx aktivitesinin yaşla azaldığını bulmuşlardır.

Stahlberg ve ark. (123) IDDM'li çocuklarla sağlıklı çocukların eritrosit GSHPx aktivitesi arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Ayrıca GSHPx aktivitesinin cinsiyet ile ve yaş ile değişmediğini tesbit etmişlerdir.

Yine, Bono ve ark. (124) da diabetik hasta ve kontrol grubuna aid eritrosit SOD ve GSHPx düzeylerinin hastalarda kontrollere göre biraz düşük olduğunu ancak aradaki farkın istatistiki bakımdan anlamlı olmadığını bulmuşlardır. Bu bulgular bizim bulgularımıza uymaktadır..

Watala ve ark. (125) eritrosit SOD aktivitesinin diabet süresi ile değiştiğini uzamış diabette aktivitenin arttığını tesbit etmişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin azaldığını GSHPx aktivitesinin ise arttığını bulmuşlardır. GSHPx düzeyi ile yaş ve diabetik kontrol arasında korelasyon bulamamışlardır.

Hagglöf ve ark. (75) diabetli çocuklarda eritrosit SOD aktivitesinin

Tablo-6. Eritrosit GSHP-X bulgularımızın literatür bulguları ile karşılaştırılması

Literatür	Yaş	Kontrol	Hasta
122	23.7±4.2	20.6±6	
U / gHb	14.±6.7		15.2±4.9
123	2-5	4.73±0.34	
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> Hb	6-9	4.76±0.25	
	>9	4.00±0.37	
	11.4(2-15)		4.52±0.34
133	8-14	8518.8±1887.1	
U / gHb	7-18		9259.7±1668.8
125	22-50	20.48±2.28	
U / gHb	11-50		20.21±1.52
75	8-16	20.6±6	
U / mgHb	8-16		16±4.5
132	<20	19.8-59.5	
μmol/NADPH/min/gHb			
133	1-11	6.1±2	
μmol/NADPH/min/gHb	11-25	7.7±1.6	
73		14.35±2.06	
μmol/NADPH/min/gHb			14.4±2.53
Bizim Çalışmamız	3-18	27.33±0.04	
U / gHb	3-27		26.47 ±10.52

Tablo-7. Eritrosit SOD bulgularımızın literatür bulguları ile karşılaştırılması

Literatür	Yaş	Kontrol	Hasta
132 U / mgHb	4-10	15.8-57.3	
	10-14	17.7-46	
	14-20	19.2-44.6	
125 U / gHb	8-14	2069.0±140.1	
	7-18		1845.7±154.1
124 U / gHb	22-50	3708.75±1025.31	
	11-50		3014.26±725.30
75 U / mgHb	8-16	57.6±4.1	
	8-16		51.1±2.5
126 U / mgHb	4-18	58.6±3.9	
	4-18		50.5±2.4
133 U / mgHb	1-11	1.8±0.3	
	11-25	1.6±0.2	
73 U / gHb		1591±202	
			2057±425
Bizim çalışmamız U / gHb	3-18	1487.66±355.86	
	3-27		1406.35±280.42

kontrollere göre istatistiki açıdan anlamlı oranda GSHPx aktivitesinin ise anlamsız derecede düşük olduğunu bulmuşlardır. Kawamura ve ark. (126) da diabetlilerde eritrosit SOD düzeyini kontrole göre daha düşük bulmuşlardır. Jos ve ark. (127) 2-25 yaşları arasında 214 genç IDMM'li hastada eritrosit SOD ve GSHPx aktivitesinin kontrollerden farklı olmadığını, retinopatili hastalarda ise GSHPx aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Bu araştırmacılara göre serbest radikal birikimi ile diabetin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişimi arasında bir ilişki vardır.

Strange ve ark. (82) 17-69 yaşları arasındaki 15 IDDM'li hastada eritrosit GSHPx ve SOD düzeyinin kontrollere göre değişmediğini ortaya koymuşlardır.

Araştırmacıların bulguları arasındaki bu farklılıklar hastaların yaş, diyet ve tedavi şekli arasındaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir. Dolayısı ile konunun tüm parametrelerin standardize ve iyi kontrol edildiği daha geniş bir popülasyonda araştırılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda diabetik hastalara aid serum ve lökosit Asc düzeyleri kontrollere göre hafif düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiki açıdan anlamlı değildir. Bu konuda yapılmış çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çoğunlukla gerek IDDM'li ve gerekse NIDDM'li hastalarda serum Asc düzeyi düşük bulunmuştur. Bu düşüklüğün bozuk depolama veya artmış oksidatif stres altında hızlı tüketimden kaynaklandığına inanılır. İnsülin tedavisi ise bu azalmayı düzeltir (128).

Jenings ve ark. (129) diabetik hastalarda serum Asc seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğunu ve IDDM'li ve NIDDM'li gruplar arasında önemli fark bulunmadığını tesbit etmişlerdir. Stankova ve ark. (65) diabetik çocuklarda plazma Asc seviyesini Cunningham ve ark. (62) ise IDDM'li hastalarda lökosit Asc seviyesini düşük bulmuşlardır. Bu bulgular bizim bulgularımızı destekler mahiyettedir. Öte yandan Schorah ve ark. (130) NIDDM'li ve IDDM'li hastalarda Asc düzeylerinin kontrol grubuna göre farklı olmadığını ve Asc'in plazma ve beyaz hücreler arasındaki dağılımında bir fark olmadığını bulmuşlardır. Asayama ve ark. (131) ise IDDM'li çocuklarda serum Asc düzeyini kontrollere göre daha yüksek bulmuşlardır.

Sonuç olarak, IDDM'li çocuklarda oksidatif strese bir artışla birlikte antioksidatif savunmada bir azalma meyl olduğu, eritrosit ve lökositlerin az da olsa bundan etkilendikleri, insülin tedavisinin bu bozukluğu düzeltici yönde etki ettiği ve bu bulguların doğrudan diabetin kendisinden ziyade başka faktörlere bağlı olabileceği kanaatine varıldı.

## 6.SONUÇ

Çalışmamızda IDDM'un patogenezi, gidişi ve komplikasyonlarının gelişimi açısından ROM'ların etkisini araştırmak amacıyla IDDM'li hastaların serum, eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonu ile eritrosit GSHPx, SOD ve lökosit GSHPx, SOD ve serum ve lökosit C vitamini tainleri yapıldı.

Hasta grubuna aid serum, eritrosit, lökosit lipid peroksidasyonu ile eritrosit GSHPx, SOD ve lökosit GSHPx, SOD ve serum ve lökosit C vitamini düzeyleri sırasıyla  $2.817 \pm 1.41$  nmol / ml,  $6.300 \pm 4.934$  nmol / gHb,  $12.28 \pm 13.06$  nmol / mg protein,  $26.47 \pm 10.52$  U / gHb,  $1406.4 \pm 280.4$  U / gHb,  $4.805 \pm 4.565$  U / mg protein,  $1.226 \pm 0.704$  U / mg protein,  $0.883 \pm 0.347$  mg / dl,  $30.37 \pm 11.05$   $\mu$ g /  $10^8$  lök, kontrol grubuna aid aynı değerler sırası ile  $2.617 \pm 0.984$  nmol / ml,  $6.225 \pm 4.106$  nmol / gHb,  $12.10 \pm 5.82$  nmol / mg protein,  $27.33 \pm 0.04$  U / gHb,  $1487.7 \pm 355.9$  U / gHb,  $4.857 \pm 4.587$  U / mg protein,  $1.437 \pm 0.872$  U / mg protein,  $0.925 \pm 0.299$  mg / dl,  $30.76 \pm 14.36$   $\mu$ g /  $10^8$  lök olarak bulundu.

Böylece IDDM'li hasta çocuklara aid serum, eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonunun hafif arttığı, eritrosit GSHPx, SOD ile lökosit GSHPx, SOD ve serum ve lökosit C vitamini düzeylerinin hafif azaldığı tesbit edilmiştir.

Öte yandan diabetik hasta grubunda lipid peroksidasyonu ile diğer parametrelerin hiçbiri arasında önemli bir korelasyon bulunamamıştır.

Sonuç olarak, IDDM'li çocuklarda oksidatif streste bir artışla birlikte antioksidatif savunmada bir azalma meylı olduğu, eritrosit ve lökositlerin az da olsa bundan etkilendikleri, insülin tedavisinin bu bozukluğu düzeltici yönde etki ettiği ve bu bulguların doğrudan diabetin kendisinden ziyade başka faktörlere bağlı olabileceği kanaatine varıldı.



## 7.ÖZET

Bu çalışmada diabetik hastalarda serum, eritrosit ve lökositlerin serbest radikallerden etkilenme derecelerini araştırmak amacıyla 3-18 yaşları arasında (ortalama 10.19) 29 sağlıklı çocuk (13 kız, 16 erkek) ile 3-27 yaşları arasında (ortalama 12.82) İnsülin depedent diabete mellitus (IDDM)'li 34 çocukta (20 kız, 14 erkek ) serum, eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonu ile eritrosit glutatyon peroksidaz(GSHPx), süperoksid dismutaz(SOD) ve lökosit GSHPx, SOD ile serum ve lökosit C vitaminleri tayinleri yapıldı.

Lipid peroksidasyonu, peroksidasyonun son ürünü olan MDA cinsinden ölçüldü.

Hasta grubuna aid serum, eritrosit ve lökosit lipid peroksidasyonu ile eritrosit GSHPx, SOD ve lökosit GSHPx, SOD ile serum ve lökosit C vitamini düzeyleri sırasıyla  $2.817 \pm 1.41$  nmol / ml,  $6.300 \pm 4.934$  nmol / gHb,  $12.28 \pm 13.06$  nmol / mg protein ,  $26.47 \pm 10.52$  U / gHb,  $1406.4 \pm 280.4$  U / gHb,  $4.805 \pm 4.565$  U / mg protein,  $1.226 \pm 0.704$  U / mg protein,  $0.883 \pm 0.347$  mg /dl,  $30.37 \pm 11.05$  µg / $10^8$  lök, kontrol grubuna aid aynı değerler sırası ile  $2.617 \pm 0.984$  nmol / ml,  $6.225 \pm 4.106$  nmol / gHb,  $12.10 \pm 5.82$  nmol / mg protein,  $27.33 \pm 0.04$  U / gHb,  $1487.7 \pm 355.9$  U / gHb,  $4.857 \pm 4.587$  U / mg protein,  $1.437 \pm 0.872$  U / mg protein,  $0.925 \pm 0.299$  mg / dl,  $30.76 \pm 14.36$  µg /  $10^8$  lök olarak bulundu.

Her iki gruba aid bu parametrelerden hiçbiri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulunamadı.

Öte yandan, çalışılan parametrelerin hiçbiri ile hastaların AKŞ, HbA<sub>1c</sub>, yaşı ve diabet süresi arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı görüldü.

Sonuç olarak, IDDM'li çocuklarda oksidatif strese bir artışla birlikte antioksidatif savunmada bir azalma meyli olduğu , eritrosit ve lökositlerin az da olsa bundan etkilendikleri , insülin tedavisinin bu bozukluğu düzeltici yönde etki ettiği ve bu bulguların doğrudan diabetin kendisinden ziyade başka faktörlere bağlı olabileceği kanaatine varıldı.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF SERUM ERYTHROCYTE AND LEUKOCYTE LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS (IDDM)

In the present study serum, erythrocyte and leukocyte lipid peroxidation and some antioxidant systems of 34 children (20 F, 14 M) with IDDM and 29 healthy children (13 F, 16 M) have been investigated in order to determine the effect of free radicals in these patients.

Lipid peroxidation was investigated in terms of malondialdehyde which is an end product of peroxidation.

Serum, erythrocyte and leukocyte lipid peroxidation and erythrocyte and leukocyte GSHPx and SOD activities and serum and leukocyte vitamin C levels of the patients were  $2.817 \pm 1.41$  nmol / ml,  $6.300 \pm 4.934$  nmol / gHb,  $12.28 \pm 13.06$  nmol / mg protein,  $26.47 \pm 10.52$  U / gHb,  $1406.4 \pm 280.4$  U / gHb,  $4.805 \pm 4.565$  U / mg protein,  $1.226 \pm 0.704$  U / mg protein,  $0.883 \pm 0.347$  mg / dl,  $30.37 \pm 11.05$   $\mu$ g /  $10^8$  leu, whereas those of the controls were  $2.617 \pm 0.984$  nmol / ml,  $6.225 \pm 4.106$  nmol / gHb,  $12.10 \pm 5.82$  nmol / mg protein,  $27.33 \pm 0.04$  U / gHb,  $1487.7 \pm 355.9$  U / gHb,  $4.857 \pm 4.587$  U / mg protein,  $1.437 \pm 0.872$  U / mg protein,  $0.925 \pm 0.299$  mg / dl,  $30.76 \pm 14.36$   $\mu$ g /  $10^8$  leu, respectively.

The differences between , the parameters were not statistically significant. Also, there was no correlation between fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub>, age and the duration of diabetes and any of the above parameters.

It was concluded that, there was at least, a tendency toward an increase in lipid peroxidation and a decrease in antioxidant systems in children with IDDM which is corrected by insulin treatment. Also, these disturbances were concluded to be due to some other factors rather than diabetes itself.

## 8. KAYNAKLAR

1. NEYZİ O, ERTUĞRUL T. Diabetes Mellitus. *Pediatri*. 1990; 1354-1368
2. THOMAS SKILLMAN. Diabetes Mellitus. In: Kaplan A, Pesce AJ. *Clin Chem*. 1984;527-538
3. GRANNER DK. Hormones of the Pancreas§Gastrointestinal tract. In: Muray RK, Granner DK, Mayes PA- Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 23. ed. Lange medical publication, London 1993:557-572.
4. SACKS DB. Carbonhydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2.ed WB Saunders company. 1994;936-950
5. KEHA E, KÜFREVİOĞLU İ. Hormonlar. *Biyokimya*. 1993;542-546
6. HOWANITZ PJ, HOWANITZ JH, HENRY JB. Carbonhydrates. In: Henry JB. *Clinical diagnosis management by laboratory methods*: 18 ed WB Saunders company London 1984; 527-538
7. YENİGÜN M. Diabetes Mellitus. Her yönü ile Diabetes Mellitus. 1995;143-229
8. ALBERTI KGMM, BOUCHER BJ, HITMEN GA, TAYLOR R. Diabetes Mellitus. The metabolic and molecular basis of acquired disease. 1990; 1: 781-800
9. MAYES PA. Gluconeogenesis§ Control of the blood glucose. In: Muray RK, Granner DK, Mayes PA- Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 23. ed. Lange medical publication, London 1993:190-200.
10. APPS DK, COHEN BB, STEEL CM. Carbonhydrate structure and metabolism. *Biochemistry*. 1992;73-77
11. SIES H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med*. 1991; 91:3C31S-3C38S.
12. HALLIWELL B. Reactive Oxygen Species in living systems: Source, biochemistry, and role in human. *Am. J. Med*. 1991; 91:3C14S-3C22S.
13. BAST A, HAENEN GRMM, DOELMAN CJA. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J. Med*. 1991; 91:3C2S-3C13S.
14. AKKUŞ İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995;1-132
15. DEBY C, PINCEMAIL J. Oxygen toxicity, free radicals, and defense mechanisms. In Fünfgeld EW. *Rökan (Ginkgo Biloba)*. Recent result in pharmacology and clinic. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988; 56-70.
16. HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 1994; 344:721-724.

17. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods. Enzymol.* 1990; 186:1-85.
18. FREEMAN BA, CRAPO JD. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47:412-426.
19. KLEBANOFF SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann. Int. Med.* 1980; 93:480-489.
20. CHEESEMAN KH, SLATER TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993; 49(3):479-480.
21. LUNEC J, BLAKE D. Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes. In: Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease.* Balliere Tindall, London 1990; 189-212.
22. WEISS SJ, LOBUGLIO AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest.* 1982; 47:5-18.
23. BABIOR BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298:659-668.
24. ERDEN M. Serbest radikaller. *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi* 1992; 12:201-207.
25. BABIOR BM. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood* 1984; 64:959-966.
26. CLIFFORD DP, REPINE JE. Measurement of oxidizing radicals by polymorphonuclear leukocytes. *Methods Enzymol.* 1984; 105:393-398.
27. ANDERSON R, THERON AJ, RAS GJ. Regulation by the Antioxydants Ascorbate, cysteine, and dapson of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxydants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135: 1027-1032.
28. ÜNALDI M. İnsanznötrofil granülositlerinden solübl NADH Oksidaz enzimininbizolasyonu, pürifikasyonu ve bazı özelliklerinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya ABD Doçentlik tezi Erzurum-1982.
29. KLEBANOFF SJ, WALTERSDORPH AM, ROSEN H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods. Enzymol.* 1982; 105:399-403.
30. ANDREWS PC, PARNES C, KRINSKY NI. Comparison of myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase with respect to catalysis, regulation, and bactericidal activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984; 228:439-442.

31. VALENZUELA A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Scien.* 1990; 48:301-309.
32. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; June 23:1396-1397.
33. YOUSSEF AAR, BARON DN. Leucocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1983; 42:558-562
34. DOĞAN P, SOYUER Ü, TANRIKULU G. Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leukocytes, and serum ceruloplasmin and copper levels, in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 1989; 120:239-244.
35. RAHMAN I, NATH N. Glutathione and its redox system, superoxide anion and superoxide dismutases of polymorphonuclear leukocytes in essential hypertension. *Indian Journal Med. Res.* 1988; 88:64-70.
36. NIWA Y, KANO H, SAKANE T, SOH H, KAWAI S, MIYACHI Y. The ratio of lipidperoxides to superoxide dismutase activity in the skin lesions of patients with an accurate prognostic indicator. *Life Scien.* 1986; 40: 921-927.
37. NIWA Y, ISHIMATO K, KANO H. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood* 1990; 76: 835-841.
38. FLETCHER RH, FLETCHER SW. Glutathione and ageing: Ideas and evidence . *The Lancet.* 1994; 8934:1379-1380
39. WONG GHW, GOEDDEL DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science* 1988; 242:941-943.
40. ANSARI KA, KAPLAN E, SHOEMAN D. Age-related changes in lipid peroxidation and protective enzymes in the central nervous system. *Growth, Development and Aging* 1989; 53: 117-121.
41. SOUTHORN PA, POWIS G. Free radicals in medicine.II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 1988;63:390-408
42. BAYNES JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.

43. PACKER L, LANDVIK S. Vitamin E in biological systems. *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine* 1990; 262:93-103
44. ISBIR T. Antioksidan sistemler. Endotel, İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu, İzmir Ekim 1994; 92-98.
45. BECKMAN G, PAKARINEN A. Süperoksid Dismutase. *Human heredity*. 1973; 23:346-351
46. WINTERBOURN CC, HAWKINS RE, BRAIN M. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab Clin Med.* 1975; 85(2):337-341
47. ALIAKBAR S, BROWN PR, BIDWELL D. Human erythrocyte superoxide dismutase in adults, neonates and normal, hypoxaemic, anaemic and chromosomally abnormal fetuses. *Clin. Biochem.* 1993; 26: 109-115
48. NIWA Y, IIZAWA O, ISHIMATO K, AKAMATSU H, KANO T. Age-dependent basal level and induction capacity of copper-zinc and manganese superoxide dismutase and other scavenging enzyme activities in leukocytes from young and elderly adults. *Am. J. Pathol.* 1993; 143:312-320.
49. FANTONE JC, WARD PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *AJP*. 1982; 107(3): 397-418
50. SALIN ML, MCCORD JM. Superoxide Dismutases in polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 1974; 54:1005-1009.
51. KONINGSBERGER JC, ASBECK BSV, FAASSEN EV. Copper, zinc-superoxide dismutase and hydrogen peroxide: a hydroxyl radical generating system. *Clin. Chim. Acta.* 1994; 230: 51-61
52. SUN Y, OBERLEY LW, LI Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34(3): 497-500
53. KRAUS RJ, GANTHER E. Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 1980; 96(3): 1116-1122
54. SPALLHOLZ JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; 262:145-158.
55. FORSLID J, BJÖRKSTEN B, HAGERSTEN K, HED J. Erythrocyte-mediated scavenging of reactive oxygen metabolites generated by human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Inflammation* 1989; 13: 543-551.

56. KASHIWAGI A, ASAHINA T, IKEBUCHI M, TANAKA Y, TAGAGI Y, NISHIO Y, KIKKAWA R, SHIGETA Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia* 1994; 37:264-269.
57. ÖZDENER H, ÇELİK C. Vitamin C'nin metabolik ve klinik önemi, yeni yaklaşımlar. *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi* 1993; 13:200-209.
58. OMAZE ST, TURNBULL JD, SAUBERLICH HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol.* 1979; 62:3-13.
59. LEVINE M, MORITA K. Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitamins and Hormones* 1985; 42:1-64.
60. NIKI E. Vitamin C as an antioxidant. *Selected Vitamins, Minerals, and Functional Consequences of Maternal Malnutrition* 1991; 64:1-30.
61. JACOB RA, SKALA JH, OMAZE ST. Biochemical indices of human vitamin C status. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 46:818-826.
62. CUNNINGHAM JJ, ELLIS SL, MCVEIGH KL, LEVINE RE, CALLESCANDON. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with Insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* 1991; 40:146-149.
63. MURATA A. Smoking and Vitamin C. *World Rev. Nutr Diet. Basel, Karger,* 1991; 64:31-57.
64. VANDERJAGT DJ, GARRY PJ, BHAGAVAN HN. Ascorbate and dehydroascorbate: distribution in mononuclear cells of healthy elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* 1989; 49:511-516.
65. STANKOVA L, RIDDLE M, LARNED J, BURRY K, MENASHE D, HART J, BIGLEY R. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 1984; 33:347-353.
66. MAYES PA. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA- Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* 23. ed. Lange medical publication, London 1993:588-598.
67. PACKER L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 53:1050S-1055S.

68. GAETANI GF, GALIANO S, CANEPA L, FERRARIS AM,. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 73:334-339.
69. BENDICH A. Antioxidant vitamins and their functions in immune responses. *Adv. Exp. Med. Bio.* 1990; 262:35-55.
70. NIKI E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. and Phys. of Lipids.* 1987; 44: 227-253
71. WOLFF SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br. Med. Bull.* 1993; 49(3)- 642-652.
72. WALTER RM, URIU-HARE JY, OLIN KL, OSTER MH. Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1991; 14(11): 1050-1056
73. GODIN DV, WOHAIEB SA, GARNETT ME, GOUMENIOUK AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol and Cell Biochem* 1988, 84: 223-231.
74. MARKLUND SL , HAGGLÖF B. Plasma EC-superoxide dismutase activity in insulin-dependent diabetic children. *Clin Chim Acta* 1984, 142:299-305.
75. HAGGLÖF B, MARKLUND SL, HOLMGREN G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinol* 1983, 102:235-239.
76. PITKANEN OM, MARTIN JM, HALLMAN M, AKERBLOM HK, SARIOLA H, ANDERSSON SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Scien* 1992, 50:335-339.
77. MENDOLA J, WRIGTH JR, LACY PE. Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozocin-induced insulinitis. *Diabetes* 1989, 38:379-385.
78. PACKER L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993,36:1212-1213.
79. JAIN SK, MCVIE R, DUETT J, HERBST JJ. Erythrocyte membran lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989, 38:1539-1543.
80. GALLAU G, RUELLAND A, LEGRAS B, MAUGENDRE D, ALLANNIC H, CLOAREC L. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1993, 214:227-234.



81. UZEL N, SIVAS A, UYSAL M, OZ H. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1987, 19:89-90.
82. STRANGE RC, JONES P, BICKNELL J, SCARPELLO J. Expression of CuZn superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes from diabetic and non-diabetic subjects. *Clin Chim Acta* 1992, 207:261-263.
83. ARAI K, LIZUKA S, TADA Y, OITAWA K, TANIGUCHI N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1987, 924:292-296.
84. CERIOLO A, GIUGLIANO D, QUATRARO A, DONZELLA C, DIPALOG PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 1991,14(1):68-72.
85. HUNT JV, DEAN RT, WOLFF SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem j.* 1988, 256:205-212.
86. HIRAMATASU K, ARIMORI S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. 1988, 37: 832-837.
87. SELVAM R, ANURADHA CV. Lipid peroxidation and antiperoxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *Indian J Biochem Biophys* 1988, 25:268-272.
88. JAIN SK, LEVINE SN, DUETT J, HOLLIER B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 39(9):971-975.
89. THORNTON GF. Infections and diabetes. *Med Clin N Amer.* 1971, 55:931-938.
90. BAGDADE JD, ROOT RK, BULGER RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974, 23:9-15.
91. ROSENBERG CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nursing Clin North Amer.* 1990, 25:247-261.
92. NOLAN CM, BEATY HN, BAGDADE JD. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1978, 27:889-894.
93. MARKERT M, CECH P, FREI J. Oxygen metabolism of phagocytosing human polymorphonuclear leucocytes in diabetes mellitus. *Blut* 1984, 49:447-455.

94. HILL HR, SAULS HS, DETTLOFF JL, QUIE PG. Impaired leukotactic responsiveness in patients with juvenile diabetes mellitus. Clin Immun Immunopathol. 1974, 2:395-403.
95. SHAHSV , WALLIN JD, EILEN SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 1983, 57:402-409 .
96. BAGDADE JD, NIELSON KL, BULGER RJ. Reversible abnormalities in phagocytic function in poorlycontrolled diabetic patients. Am J Med Scien. 1972, 263:451-456.
97. BAKAN E. Diabetli hasta n6trofillerinde fagositik indeks ile plazma membran proteinlerinin glikozillenmesi arasındaki ilişki. Atat6rk 6niversitesi Tıp Fak. Biyokimya ABD Doktora Tezi Erzurum-1985.
98. ROOS D, WEENING RS, VOETMAN AA, SCHAİK MLJV, BOT AAM, MEERHOF LJ, LOOS JA. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: Studies in a family with glutathione reductase deficiency. Blood 1979; 53:851-866.
99. BAKAN E, YEĞİN M, G6NDOĞDU M. N6trofil alkalen fosfatazının kolorimetrik tayini. Atat6rk 6niversitesi Tıp Fak. Tıp B6lteni 1985;17:341-345.
100. MARKERT M, ANDREWS PC, BABIOR BM. Methods Enzymol. 1984;105:358-365
101. LEWIS PJ, LOWING RK, GOMPERTZ D. Automated discrete kinetic method for erythrocytes acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. Clinical Chemistry.1975;21(13):1961-1963
102. PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 1967; 70:158-168.
103. YENSON M. Klinik Biyokimya Laboratuvar alışmaları 6.Baskı, Beta Basım Yayım, İstanbul 1986; 441.
104. DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186:421-431.
105. SLATER TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1984; 105:283-305.
106. PRYOR WA, CASTLE L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. Methods Enzymol. 1984; 105:293-299.

107. PAOLETTI F, MOCALI A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:209-220.
108. OBERLEY LW, SPITZ DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984; 105:457-464.
109. FLOHE L, ÖTTING F. Superoxide Dismutase Assays. *Methods Enzymol.* 1984; 105:93-104.
110. SPITZ DR, OBERLEY LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 1989; 179:8-18.
111. DINU V, ZAMFİR O. Redox changes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Rev. Roum. Physiol.* 1991; 28(1-2) : 69-73
112. RICHARD MJ, PORTAL B, MEO J, COUDRAY C. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with tiobarbituric acid. *Clin. Chem.* 1992;38(5): 704-709
113. NABERASCO G, ODETTI P, BOERI D, MAIELLO M, ADEZATI L. Malondialdehyde level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed §Pharmacother.* 1991; 45: 193-196
114. ASAYAMA K, MIYAO A, DOBASHI K, AMEMIYA S. Concentration of lipid peroxide in serum lipoproteins of insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr Jpn.* 1991 ;33(3) 369-374
115. ALTOMARE E, VENDEMIALE G, CHICCO D, PROCACCI V. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete§ Metabolisme.* 1992;18:264-271
116. KOSUGI K, HARANO Y, KASHIWAGI A. The effect of insulin on the synthesis and release of lipid peroxide by cultured hepatocytes isolated from normal and diabetic rats. *Experientia.* 1984; 40:394-97
117. PORTAL B, RICHARD MJ, COUDRAY C, ARNAUD J. Effect of double-blind cross-over selenium supplementation on lipid peroxidation markers in cystic fibrosis patients. *Clin. Chim. Acta.* 1995; 234: 137-146
118. LEFKOWITH J, SCHREINER G, CORMIER J, HANDLER ES. *J Exp. Med.* 1990;171:729-743
119. RISTER M, BAUERMEISTER K, GRAVERT U, GLADTKE E. Superoxide-dismutase deficiency in rheumatoid arthritis. *The Lancet* 1978; May 20:1094.

120. NATH N, CHARI SN, RATHI AB. Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes*. 1984; 33:586-589
121. BALASHOVA TS, GOLEGA EN, RUD'KO IA, BALABOLKIN MI. Effect of biosynthetic insulin on lipid peroxidation in erythrocyte membranes in patients with type I diabetes mellitus. *Probl. Endokrinol Mosk*. 1994; 40(3):12-15
122. MATSUBARA LS, FERREIRA ALA, TORNERO MTT, MACHADO PEA. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *Brazilian j. Med. Biol. Res*. 1992; 25: 331-335
123. STAHLBERG MR, HIETANEN E. Glutathione and glutathione-metabolizing enzymes in the erythrocytes of healthy children and in children with insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis, coeliac disease and acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. j. Clin. Lab. Invest*. 1990;50:125-130
124. BONO A, CAIMI G, CATANIA A, SARNO A, PANDOLFO L. Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res*. 1987; 19:264-266
125. WATALA C, BRYZSEWSKA M, STEFANIÁK B, NOWAK S. Peroxide metabolism enzymes in diabetic children: relationship to duration and control of diabetes. *Cytobios* 1986;47:101-105
126. KAWAMURA N, OOKAWARA T, SUZUKI K, KONISHI K. Increased glycosylated Cu,Zn-Superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. of Clin. Endoc. and Metab*. 1992; 74(6): 1352-1354
127. JOS J, RYBAK M, PATIN PH, ROBERT JJ, BOITTARD C, THEVENIN R. Etude des enzymes anti-oxydantes dans le diabete insulino-independant de l'enfant et de l'adolescent. *Diabete § Metabolisme*. 1990; 16: 498-503
128. YOUNG IS, TORNEY JJ, TRIMBLE ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetes rat. *Free Radic. Biol. Med*. 1992; 13:41-46
129. JENNINGS PE, CHIRICO S, JONES AF, LUNEC J. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes Res*. 1987; 6(3): 151-154
130. SCHORAH CJ, BISHOP N, WALES JK, HANSBRO PM. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. *Int. j. Vitam. Nutr. Res*. 1988; 58(3) 312-318

131. ASAYAMA K, UCHIDA N, NAKANE T, HAYASHIBE H. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Rad. Biol Med.* 1993; 15:597-602
132. GUEMOURI L, ARTUR Y, HERBETH B, JEANDEL C. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.* 1991;37(11): 1932-1937
133. PICOT IC, TRIVIER JM, NICOLE A, SINET PM, THEVENIN M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 1992; 38(1): 66-70

## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarıma, uzmanlık tezimin hazırlanmasında yardım ve katkılarını esirgemeyen başta Doç. Dr. İdris Akkuş olmak üzere Yrd. Doç. Dr. Osman Çağlayan, Prof. Dr. İbrahim Erkul, Dr. Sadinaz Kalak, Dr. Özlem Alıcı, Dr. Ali Ayçiçek ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

**Dr. Ü. Gülsüm Can**