

# Diyabetik Sıçanlarda İnsülinle Kombine Edilmiş A, E, ve C Vitamini Tedavisinin Antioksidan Enzimler Üzerine Etkileri

## The Effects of Vitamin A, E, and C Combined Insulin Treatments on the Antioxidant Enzymes in the Diabetic Rats

Tevfik Noyan

Ragıp Balahoroğlu

Ufuk Kömüroğlu

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van

### ÖZET

Diyabetes mellitusta oksidatif stresin arttığı ve artmış oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının oluşumuna yol açtığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda, insülinle kombine edilerek uygulanan A, E, ve C vitaminlerinin kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki oksidatif ve antioksidatif sistemlere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla deney hayvanları biri kontrol (diyabetik olmayan) grubu olmak üzere toplam 5 gruba bölünmüş ve her grup 10 rattan oluşturulmuştur. Grup 1'e 3 IU/gün s.c insülin, grup 2'ye 3 IU/gün s.c insülin + 15 mg/kg/gün oral A vitamini, grup 3'e 3 IU/gün s.c insülin + 5.25 mg/kg oral E vitamini ve grup 4'e 3 IU/gün s.c insülin + 300 mg/kg oral C vitamini tedavisi 30 gün süreyle uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda, grup 4'de, başlangıç düzeyine göre kan glukoz düzeyi azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). Böbrek dokusu tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren madde (TBARS) seviyesi, kontrol grubuna göre bütün gruplarda artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; karaciğer TBARS seviyesinin grup 2 ve 4'de, kalp TBARS seviyesinin ise grup 1 ve 3'de artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Karaciğer lipid hidroperoksit seviyesinin grup 4'de, grup 1 ve 2'ye göre düşük olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyesi grup 4'de, kontrol ve grup 1'e göre düşük ( $p<0.05$ ), karaciğer superoksit dismutaz (SOD) seviyesi ise yine grup 4'de, kontrol, grup 1 ve 2'ye göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kalp katalaz ve SOD seviyesi, kontrol grubuna göre grup 1 ve 2'de artış göstermiş ( $p<0.05$ ), grup 1'e göre kalp katalaz seviyesi grup 3 ve 4'de azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). Çalışmamızın sonuçları, insülinle kombine C vitamini uygulamasının tek başına hem insülin hem de insülinle birlikte A ve E vitamini tedavisine göre kan şeker düzeyi ve karaciğer dokusu lipid peroksidasyonunu azaltmada daha yararlı olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Diyabetes mellitus, oksidatif hasar, antioksidan, vitamin tedavisi

Bu çalışma; - Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2002-TF-071 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

- Marmariste yapılan IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

## ABSTRACT

It has been reported that oxidative stress is increased in diabetes mellitus and the increase in oxidative stress gives rise to complications of this disease. In the present study, we aimed to investigate the effects of vitamin A, E, and C treatments combined with insulin on the oxidative and antioxidative systems in the liver, kidney and heart tissues rats in diabetes induced with streptozotocin (STZ). Five experimental groups, each of 10 rats, were constructed as nondiabetic control group, group 1; treated with 3 IU/day s.c insulin, group 2; treated with 3 IU/day s.c insulin + 15 mg/kg/day p.o. vitamin A, group 3; treated with 3 IU/day s.c insulin+ 5.25 mg/kg/day p.o. vitamin E, and group 4; treated with 3 IU/day s.c insulin + 300 mg/kg/day p.o. vitamin C for 30 days. At the end of the study, the blood glucose level in the group 4 was decreased as compared to initial level ( $p<0.05$ ). The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels in the kidney tissue was increased in all groups as compared to control group ( $p<0.05$ ). As compared to control group, the TBARS level in the liver was increased in groups 2 and 4 ( $p<0.05$ ), and the heart TBARS level was increased in groups 1 and 3 ( $p<0.05$ ). The liver lipid hydroperoxide level was decreased significantly in group 4 as compared to groups 1 and 2 ( $p<0.05$ ). The liver glutathione peroxidase (GSH-Px) level was decreased in group 4 as compared to control group and group 1 ( $p<0.05$ ), and also liver superoxide dismutase (SOD) level was decreased in group 4 as compared to control group, group 1 and group 2 ( $p<0.05$ ). The heart catalase and SOD levels were increased in the groups 1 and 2 as compared to control group ( $p<0.05$ ), and also heart catalase level was decreased in the groups 3 and 4 as compared to group 1 ( $p<0.05$ ). Results of our study indicate that insulin plus vitamin C treatment may provide more benefits than use of only insulin or insulin plus vitamin A and E treatment in decreasing the blood glucose levels and the liver lipid peroxidation.

**Key Words:** Diabetes mellitus, oxidative damage, antioxidant, vitamin treatment

## GİRİŞ

Diyabetes mellitus insülin sekresyonundaki bir yetersizliğe ya da hedef organda insülinin etkisini gösterememesine bağlı olarak hiperglisemiyle ortaya çıkan, dünyada %1-5 arasında değişen prevalansa sahip bir metabolik hastalıktır. Potansiyel görme kaybıyla sonuçlanan retinopati, renal yetmezliğe yol açan nefropati, ayak ülserleri ve amputasyona yol açan periferik vasküler bozukluklar, gastrointestinal, genitouriner sistem ve kardiyovasküler sistem bozukluklarına yol açan otonomik nöropati diyabetin uzun dönemli komplikasyonlarıdır (1). Oksidatif stres; antioksidan maddelerin azalması durumunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stresin glukoz metabolizması üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır (2). Son yıllarda, diyabetes mellitusta gelişen komplikasyonların artan oksidatif strese bağlı olduğu bildirilmektedir (3,4). Oksidatif streste meydana gelen artış, serbest radikal üretimindeki bir artıştan kaynaklanabilmektedir (5,6). Serbest radikallerin biyolojik etkileri organizmadaki

çeşitli antioksidan savunma sistemleri tarafından kontrol edilmektedir. Antioksidan savunma sistemindeki bir azalma ya da serbest radikal üretimindeki bir artma, oksidatif strese artışa neden olmaktadır (7).

Yapılan çeşitli çalışmalar, diyabetik hastaların plazma ve dokularında serbest radikallerin arttığını veya antioksidan kapasitenin azaldığını göstermektedir (8-10). Diyabette serbest radikallerin oluşturduğu olaylar zincirini hiperglisemi ve glukozun oksidasyonu başlatır ve bunları proteinlerin glikozilasyonu ve oksidatif dejenerasyon takip eder. Normal koşullarda vücutta bulunan doğal antioksidan enzimler, öm; superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) vs., tarafından serbest radikaller ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Oksidatif strese karşı vücudun savunma sistemini antioksidan besinler (vitaminler ve mineraller) ve enzimler oluşturmaktadır. Vitaminler reaktif oksijen türlerinin alıcı ve vericileri olarak etki gösterirken, mineraller enzimlerin aktivitelerini düzenlenmektedirler (2). Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan diyabette, A, E,

ve C vitaminlerince zengin beslenmenin, oksidatif stres, antioksidan defans sistemi ve lipid parametreleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda ağırlıkları 70-182 gram arasında değişen, toplam 50 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deney hayvanları "Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Neuroscience Araştırma Birimi (NAB) Deney Hayvanları Ünitesi"nden temin edildi. Deney hayvanları, standart kafeslerde barındırılıp, yem ve su alımı serbest bırakıldı. Hayvanların bulunduğu oda  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 12 saat karanlık -12 saat ışık ortamında tutuldu. Çalışma başlangıcında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan çalışmanın yapılabilmesi için onay alındı (2003/01-07). Ratlar, kontrol, diyabet, diyabet + A vitamini, diyabet + E vitamini, diyabet + C vitamini grubu olmak üzere 5 gruba (n=10) ayrıldı. Diyabetik olmayan kontrol grubuna herhangi bir tedavi verilmedi. Kontrol grubu hariç diğer gruplardaki ratlara 75 mg/kg intraperitoneal (i.p) olarak streptozotosin (STZ) verildi. Bir hafta sonra bu ratların kan glukoz düzeylerine bakıldı ve açlık kan glukoz düzeyi 200 mg/kg üzerinde olan ratlar diyabet olarak kabul edildi.

1. Grup diyabetik ratlara; 3 IU/gün subcutan (s.c) insülin tedavisi 30 gün süreyle,
2. Grup diyabetik ratlara; 3 IU/gün s.c insülin + 15 mg/kg/gün oral A vitamini tedavisi 30 gün süreyle,
3. Grup diyabetik ratlara; 3 IU/gün s.c insülin + 5.25 mg/kg oral E vitamini tedavisi 30 gün süreyle,
4. Grup diyabetik ratlara 3 IU/gün s.c insülin + 300 mg/kg oral C vitamini tedavisi 30 gün süreyle uygulandı.

4. haftanın sonunda bir gecelik açlıktan sonra deney hayvanları eter anestezisi altında dekapite edildi. Ratların karaciğer, böbrek ve kalp dokuları çıkarıldı ve izotonik NaCl solüsyonu ile yıkanıp kurulandıktan sonra dokular 1:4 (ağırlık: hacim) oranında 0.1 M

fosfat 0.1 mM EDTA, pH 7.0, solüsyonu içinde homojenize edildi. Homojenize materyal daha sonra 14000 rpm (22000xg)  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant çalışılmak üzere  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Ayrıca, ratların kalbinden enjektörle kanları alındıktan sonra, bütün gruplardaki ratlardan kan glukoz, trigliserit, total kolesterol, HDL-kolesterol ve HbA1c ölçümleri Hitachi P Modüler otoanalizöründe ticari kitler kullanılarak gerçekleştirildi. VLDL-kolesterol, trigliserit/5 formülüyle hesaplandı.

Doku TBARS ölçümü (11); 347 nm eksitasyon ve 453 nm emisyon dalga boyları kullanılarak florometrik yöntemle "Luminescence Spectrometer LS50B, Perkin Elmer" marka spektrofotometrede, lipid hidroperoksit (12) ve SOD ölçümü (13); 560 nm, katalaz ölçümü (14); 405 nm ve GSH-Px ölçümü (15); 340 nm dalga boylarında kolorimetrik yöntemle "Photometer 5010 Boehringer Mannheim GmbH" marka spektrofotometrede gerçekleştirildi. Reaktiflerin hazırlanmasında kullanılan tüm kimyasallar Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edildi. Doku protein düzeyleri kolorimetrik metotla Cobas Integra 800 otoanalizöründe ticari kit kullanılarak ölçüldü (16). Tüm sonuçlar doku proteinine oranlanarak sunuldu.

## İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata ortalaması (SEM) olarak sunulmuştur. Gruplar arasındaki başlangıç ve son glukoz ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılması için paired t testi kullanılmıştır. Dağılımın normal olup olmadığı Kolmogrov-Smirnov testi kullanılarak test edilmiş ve dağılımın normal olduğu tespit edilerek gruplar arasındaki parametrelerin karşılaştırılması One-way ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arasında farklılık gösteren parametrelerin analizi için Tukey testi kullanılmıştır. İstatistiki anlamlılık derecesi  $p<0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmamızda grupların başlangıç ve son açlık glukoz düzeyi ve ağırlıkları Tablo 1'de

**Tablo 1.** Başlangıç ve bitiş kan şekeri ve ağırlıklarının karşılaştırılması (ortalama±SEM).

Parametreler	Kontrol	Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4	
		Başlangıç	Son	Başlangıç	Son	Başlangıç	Son	Başlangıç	Son
Glukoz (mg/dl)	99.1±6.2	216.4±14.3	277.5±63.9	314.2±38.1	323.5±59.5	414.6±51.1	361.1±35.4	278.1±46.2	136.0±17.6 <sup>a</sup>
Ağırlık (g)	238.1±6.2	144.7±11.1	136.7±8.8	111.8±14.7	117.1±12.7	120.5±11.5	112.1±7.7	149.3±6.7	125.1±14.9

<sup>a</sup>; başlangıç değerine göre karşılaştırıldığında. \*; p<0.05

**Tablo 2.** Ölçülen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması (ortalama±SEM). TBARS; µmol/g prot. GSH-Px; U/g prot. SOD; µg/g prot. katalaz; kU/g prot. Hidroperoksit; µM/g prot olarak sunulmuştur.

Parametreler	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Karaciğer TBARS	10.5±2.8	28.2±7.4	41.5±12.0 <sup>b*</sup>	51.9±3.4	37.9±1.3 <sup>b*</sup>
Böbrek TBARS	23.2±6.6	71.0±18.5 <sup>b*</sup>	96.6±11.1 <sup>b*</sup>	83.7±12.9 <sup>b*</sup>	79.1±12.4 <sup>b*</sup>
Kalp TBARS	29.1±6.0	90.1±14.5 <sup>b*</sup>	79.3±20.6	99.4±24.0 <sup>b*</sup>	83.8±12.3
Karaciğer Hidroperoksit	4.7±0.2	5.4±0.4	5.2±0.8	3.7±0.5	2.2±0.1 <sup>c,d*</sup>
Böbrek Hidroperoksit	11.8±0.7	11.8±1.0	9.9±1.0	8.9±0.5	8.2±1.0
Kalp Hidroperoksit	10.7±1.9	17.9±3.6	13.8±2.3	9.4±1.5	9.0±1.2
Karaciğer GSH-Px	150.0±8.5	140.7±11.9	112.3±23.0	92.2±15.1	51.4±5 <sup>b,c</sup>
Böbrek GSH-Px	243.2±45.7	185.5±42.1	208.3±26.7	244.1±17.8	156.9±21.3
Kalp GSH-Px	147.3±14.9	242.8±42.4	266.8±41.8	235.8±35.3	163.0±23.7
Karaciğer katalaz	695.2±204.2	701.0±133.4	759.8±290.9	353.6±162.7	95.5±15.7
Böbrek katalaz	2588.5±560.0	2851.7±850.6	2712.9±627.0	2532.6±373.3	1214.7±302.4
Kalp katalaz	1752.4±426.0	6860.0±893.6 <sup>b*</sup>	5854.7±1522.6 <sup>b*</sup>	2849.6±641.1 <sup>c*</sup>	1835.0±751.3 <sup>c*</sup>
Karaciğer SOD	1.9±0.1	2.1±0.2	1.9±0.4	1.1±0.1	0.4±0.0 <sup>b,c,d</sup>
Böbrek SOD	6.6±0.5	6.8±0.9	6.5±0.5	4.3±0.8	4.0±0.4
Kalp SOD	6.2±1.1	11.6±1.3 <sup>b</sup>	12.5±1.8 <sup>b</sup>	7.5±1.2	6.7±0.5
AST (U/L)	99.7±8.0	141.5±21.1	140.7±15.6	589.6±88.5 <sup>b,c,d,e*</sup>	269.1±26.6
ALT (U/L)	44.0±5.8	65.1±10.5	57.8±11.8	198.1±37.1 <sup>b,c,d,e*</sup>	72.3±8.7
Trigliserid (mg/dl)	96.4±14.8	81.5±19.6	69.2±11.8	38.1±7.1	41.1±10.2
Total Kolesterol (mg/dl)	58.0±4.6	57.4±4.4	49.5±5.5	43.8±4.9	53.6±5.4
HDL-kol (mg/dl)	46.1±3.4	47.4±4.9	40.5±6.0	38.3±4.4	44.3±4.7
VLDL-kol (mg/dl)	19.4±2.9	16.1±3.9	13.8±2.4	13.8±2.4	8.1±1.9
HbA1c (%)	3.4±0.1	6.1±0.8 <sup>b*</sup>	5.7±0.5	6.8±0.5 <sup>b*</sup>	6.0±0.5

<sup>b</sup>; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

<sup>c</sup>; grup 1'le karşılaştırıldığında

<sup>d</sup>; grup 2'le karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>; grup 4'le karşılaştırıldığında

sunulmuştur. Grup 4'de çalışmanın sonunda, başlangıç düzeyine göre kan glukoz düzeyi anlamlı olarak azalma gösterirken (p<0.05), diğer gruplarda herhangi bir anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir (p>0.05). Başlangıç ve bitiş ağırlıkları karşılaştırıldığında, hiçbir grupta anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (p>0.05).

Tablo 2'de gruplarda ölçülen parametrelerden elde ettiğimiz veriler sunulmuştur. Böbrek

dokusu TBARS seviyesi, kontrol grubuna göre bütün gruplarda artış göstermiştir (p<0.05). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; karaciğer dokusu TBARS seviyesinin grup 2 ve 4'de, kalp TBARS seviyesinin ise grup 1 ve 3'de artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0.05). Karaciğer lipid hidroperoksit seviyesi grup 4'de, grup 1 ve 2'ye göre azalma göstermiştir (p<0.05). Karaciğer GSH-Px seviyesi grup 4'de, kontrol ve grup 1'e göre azalma gös-

termiş ( $p<0.05$ ), karaciğer SOD seviyesi ise yine grup 4'de, kontrol, grup 1 ve 2'ye göre azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kalp katalaz ve SOD seviyesi, kontrol grubuna göre grup 1 ve 2'de artış göstermiş ( $p<0.05$ ), grup 1'e göre kalp katalaz seviyesi grup 3 ve 4'de azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). Serum AST ve ALT seviyesi E vitamin grubunda bütün gruplara göre anlamlı artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). HbA1c düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, diyabet ve E vitamin grubunda anlamlı artış göstermiştir ( $p<0.05$ ).

### TARTIŞMA

Artmış oksidatif stresin diyabet ve komplikasyonlarının gelişimi ve ilerlemesini arttırdığı yaygın olarak kabul edilen bir görüştür. Diyabete genellikle serbest radikallerin artmış üretimi veya bozulmuş antioksidan savunma mekanizması eşlik etmektedir. Çalışmamızda insülinle kombine C vitamini uygulamasının, başlangıç seviyesine göre kan glukoz seviyesinde anlamlı azalma yaptığı tespit edilmiştir. Bilindiği gibi C vitamini (askorbik asit, AA), biyosentetik veya antioksidan reaksiyonlarda elektron kaybederek kısa yarı ömre sahip askorbil radikali ve dehidro askorbik aside (DHA) okside olmakta ve AA çeşitli lipid hidroperoksitlerle direk olarak reaksiyona girerek, hücre membran komponentlerini oksidatif hasardan korumaktadır (17). Kontrol altında olmayan diyabetes mellitusta, hipergliseminin çeşitli hücrelere DHA alımını bozabileceği bildirilmiştir. Normalde insülin, insüline duyarlı hücrelerde kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilen maksimal DHA taşınım hızını artırmakta ve bunun sonucunda da hücre içi AA miktarı artmaktadır (17). Özellikle hipergliseminin varlığında, DHA alımındaki azalmaya bağlı olarak hücre içi AA seviyesinde azalma diyabette antioksidan savunmada azalmaya yol açabilmektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada, diyabetik ratların siyatik sinirlerinde artmış DHA ve azalmış AA konsantrasyonu rapor edilmiştir (18). Çalışmamızın sonuçları, insülinle kombine C vitamini uygulamasının hücre içine glukoz girişini

arttırarak, kan glukoz seviyesinde azalmaya yol açabileceğini düşündürmektedir.

Lipit peroksidasyonu lipid hidroperoksid (LOOH)'lerini meydana getirmek üzere oksijen radikali ile hücre membran fosfolipitlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin reaksiyona girdiği kompleks bir olaydır. Diyabette meydana gelen oksidatif stres diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Oksidatif stres vücutta serbest radikallerin oluşması ve bu radikallerin temizlenmesi arasındaki dengeyi bozmaktadır. Diyabette proteinlerin glikozillenmesi ve glukozun otooksidasyonu serbest radikal oluşumuna neden olmakta ve bu da lipid peroksidasyonunu uyarabilmektedir. Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan TBARS seviyesinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bütün gruplarda artış gösterdiği ve insülinle birlikte verilen A, E ve C vitamini uygulamasının böbrek, karaciğer ve kalp dokularındaki TBARS seviyesindeki artışı diyabet grubuna göre anlamlı olarak azaltmadığı tespit edilmiştir. Yapılan pek çok çalışma diyabette gözlenen lipid peroksidasyonundaki artıştan hiperglisemiye ve dolayısıyla da glukoz otooksidasyonunu birincil olarak sorumlu tutmaktadır. Nitekim Şekeroğlu ve ark. (19) yaptıkları çalışmalarında tip 2 diyabetik hastalara standart diyet uygulamasıyla, hipergliseminin normale dönmesine bağlı olarak, plazma ve eritrositlerde lipid peroksidasyonunun azaldığını ve eritrositlerdeki enzimatik antioksidan sistemlerinin arttığını göstermişlerdir. A, E ve C vitamininin çeşitli hastalıklarda oluşan oksidatif hasarı azalttıkları yapılan değişik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin, ratlarda yapılan bir çalışmada, diyete E vitamini eklenmesi ile glukozla uyandırılmış hiperinsülineminin ve lipid peroksidasyonunun anlamlı oranda azaldığı rapor edilmiştir (20). Yine yapılan başka bir çalışmada, A vitamini tedavisinin diyabetik sıçan kalp dokusunda oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (21). Çalışmamızda ilginç olarak oksidatif stresin bir diğer göstergesi olan lipid hidroperoksid seviyesinin ise, karaciğer dokusunda insülinle kombine C vitamini uygu-

lamasıyla kontrol ve diyabet grubuna göre anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir. C vitamini verilen grupta kan şekeri seviyesinin de başlangıç seviyesine göre anlamlı azalmış olmasının bu sonucu desteklediğini düşünmekteyiz. Fakat bu etkinin sadece karaciğer dokusunda gözlemlenmesi ve TBARS seviyesi üzerinde benzer sonuçlar vermesi de ilginç diğer bir gözlemdir.

Çalışmamızda, insülinle kombine verilen A, E ve C vitamini uygulamasının, tek başına insülin uygulamasına göre karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan etki gösteren GSH-Px, katalaz ve SOD enzimlerinin düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmadığı, hatta insülinle birlikte C vitamini verilen grupta kontrol ve diyabet grubuna göre anlamlı azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Kalp dokusu SOD seviyesi ise kontrol grubuna göre insülinle kombine verilen A vitamini grubunda anlamlı artış gösterirken, sadece insülin verilen diyabet grubuyla karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bilindiği gibi, SOD, vücutta üretilen süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit'e dönüştürürken, GSH-Px ve katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürmektedir. Yapılan değişik çalışmalarda diyabet oluşturulan deney hayvanlarında A, E ve C vitamini uygulamasının serbest radikal artışını önleyerek ve antioksidan enzim seviyelerinde artışa neden olarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (21-23). İnsanlarda vitaminlerin diyabetin komplikasyonlarını önlemede nasıl bir etkiye sahip olabileceğinin karşılaştırılabilmesi için, bu deneysel çalışmada uyguladığımız vitamin dozlarının, insanlar için önerilen günlük dozlar (RDA) ile karşılaştırılmasının da faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Yetişkinlerde yaklaşık RDA değeri A vitamini için; 0.8-1 mg/gün, E vitamini için 8-10 mg/gün ve C vitamini için ise 50-70 mg/gün'dür (24). Bu çalışmada ise, deney hayvanlarına uygulanan A vitamini, RDA değerinin yaklaşık 1.5 katı fazla dozda, E vitamini RDA değerinin yaklaşık onda biri dozda ve C vitamini ise RDA değerine eşit dozda uygulanmıştır. Önceki çalışma-

larda tespit edilen A, E ve C vitamini uygulamasına cevaben artmış antioksidan enzim seviyelerindeki artışın nedeni olarak, artmış oksidatif stresin oluşturabileceği zararlı etkilerin ortadan kaldırılması için, dokuların antioksidan enzim seviyelerini artırarak kendilerini bu zararlı etkilerden koruyabileceği ileri sürülmüştür. Son zamanlarda diyabetik hastalara, diyabete bağlı olarak uzun dönemde oluşan komplikasyonlardan korunmak amacıyla özellikle E vitamini tedavisi başlanılmaya önerilmektedir. Çalışmamızın sonuçları, deneysel olarak diyabetik ratlara insülinle birlikte verilen A, E ve C vitamini uygulamasının karaciğer, kalp ve böbrek dokuları antioksidan enzim seviyelerinde bir artışa yol açmayacağını göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, insülinle kombine C vitamini uygulamasının kan şekeri düzeyinde ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunda bir azalmaya yol açabileceğini, ancak insülinle kombine A ve E vitamini uygulamasının, tek başına insülin uygulamasına göre karaciğer, böbrek ve kalp dokularında lipid peroksidasyonunu azaltıcı ek bir fayda sağlamadığını göstermiştir. Yine bu vitaminlerin antioksidan enzimler üzerine farklı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın dört hafta sürdürüldüğü göz önünde bulundurularak, bu vitaminlerin insülinle birlikte uzun dönemde uygulanmasının oksidatif ve antioksidatif sistemler üzerine ne gibi etkilerinin olduğunun ortaya konulması için daha uzun süreli yapılacak çalışmalarla, çalışmamızın desteklenmesinin faydalı olacağı kanaatini taşımaktayız.

#### KAYNAKLAR

1. Sacks DB. Implications of the revised criteria for diagnosis and classification of diabetes mellitus, Clin Chem 1997; 43(12): 2230-2233.
2. Opera EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. R Soc Health 2002; 122(1): 28-34.
3. Baynes JW. The role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. Diabetes 1991; 40: 405-412.
4. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on

- the oxidant/ anti oxidant balance. *Diabetes Metab (Paris)* 2000; 26:163-176.
5. Wolf SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Med* 1991; 10: 339-352.
  6. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation product: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932-939.
  7. Young IS, Torney JJ, Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 1992; 23: 41-46.
  8. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 1993; 49: 643-652.
  9. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1998; 84: 223-231.
  10. Konukoğlu D, Akcay T, Dincer Y, Hatemi H. The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type2 diabetic patients with angiopathy. *Metabolism* 1999; 48: 1481-1484.
  11. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39: 2522-2526.
  12. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>+2</sup> in the presence of Xylenol orange, comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991; 26(10): 853-856.
  13. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
  14. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity, and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-152.
  15. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
  16. Lowry CH, Rosebrough NJ, Farr RJ. Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
  17. Wilson JX. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters* 2002; 527: 5-9.
  18. Obrosova IG, Fathallah L, Stevens MJ. *Exp Neurol* 2001; 172: 211-219.
  19. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000; 33: 669-674.
  20. Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 1999; 377: 89-92.
  21. Zabalı F, Avcı A, Canbolat O, Karasu C. Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem Funct* 2002; 20 (2): 75-80.
  22. Mekinova D, Chorvathova V, Volkovova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova J, Ondreicka R. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and -carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung* 1995; 39: 257-261.
  23. Gökkuşu C, Mostafazadeh T. Changes of oxidative stress in various tissues by long term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clinica Chimica Acta* 2003; 328: 155-161.
  24. Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. Fourth Ed. Canada: Harcourt Academic Pres; 2002.
- 
- Yazışma adresi:**  
Dr. Tevfik Noyan  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Van  
Tel.-Faks: 0 432 216 19 54, 0 432 216 74 62  
GSM: 05323006796  
E-mail: tnoyan@yyu.edu.tr  
tevfiknoyan@hotmail.com
-