

АНТИОКСИДАНТНИ СТАТУС БОЛЕСНИКА СА ДИЈАБЕТЕСОМ ТИП 2 У ОДНОСУ НА МИКРОВАСКУЛАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ

Нада КОСТИЋ, Зорица ЧАПАРЕВИЋ, Сања ИЛИЋ

Ендокринолошко одељење, Клиника за интерну медицину, Клиничко-болнички центар
„Др Драгиша Мишовић” – Дедиње, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Липидна пероксидација и антиоксидантни системи су важни фактори који учествују у метаболизму липопротеина у дијабетесу.

Циљ рада Циљ рада је био да се испитају ниво липида и антиоксидантни параметри код болесника са дијабетесом тип 2 и могући утицај дијабетичких компликација на испитиване параметре.

Метод рада Вредности липида, оксидисаног *LDL* (*Ox-LDL*) холестерола, глутатион-пероксидазе (*GSH-Px*), супероксид-дисмутаза (*SOD*) и инхибитора активатора плазминогена (*PAI-1*) одређиване су код 50 болесника са дијабетес мелитусом тип 2. Испитаници су сврстани у две групе: на оне код којих су забележене микроангиопатске компликације и на болеснике код којих су ове компликације изостале. За мерење наведених параметара коришћени су комерцијални китови.

Резултати Резултати су показали статистички значајно веће вредности триглицерида ($3,12 \pm 3,9 \text{ mmol/l}$) код болесника са дијабетесом тип 2 него код здравих испитаника контролне групе ($1,7 \pm 0,9 \text{ mmol/l}$). Ниво *Ox-LDL* холестерола ($84,7 \pm 16,9 \text{ mmol/l}$) и активности *SOD* ($913,4 \pm 120,3 \text{ U/g Hb}$) били су већи код испитаника оболелих од дијабетеса него код испитаника контролне групе, мада разлике нису биле статистички значајне. С друге стране, код болесника са компликацијама дијабетеса вредности *LDL* холестерола, *PAI-1*, *SOD* и *GSH-Px* биле су повишене, али не значајно у односу на испитанике с изостанком компликација. Вредности триглицерида и *Ox-LDL* холестерола биле су ниже код болесника са компликацијама него у групи испитаника код којих су компликације изостале, али статистичка значајност разлике није потврђена.

Закључак Наведени резултати указују на могућност промена у антиоксидантном статусу болесника са дијабетесом тип 2, посебно оних са компликацијама.

Кључне речи: *diabete s mellitus* тип 2; компликације дијабетеса; липидни статус; супероксид-дисмутаза; глутатион-пероксидаза; инхибитор активатора плазминогена (*PAI-1*)

УВОД

Diabetes mellitus (дијабетес мелитус – ДМ) је стање хроничне хипергликемије које погађа 2,5-3% светске популације и један је од водећих узрока морбидитета и морталитета у свету [1, 2]. Хипергликемија доводи до метаболичких поремећаја и разних компликација. Повећани оксидантни стрес се такође уочава код особа које пате од дијабетеса. Повећане су и производња слободних радикала и липидна пероксидација, али је смањен антиоксидантни статус [3, 4]. До развоја хроничних микроангиопатских компликација дијабетеса доводе оксидантни стрес и неензимска гликозилација. Поремећај липидног статуса погодује повећаној осетљивости на липидну пероксидацију, [5], која је одговорна за повећање инциденције атеросклерозе код болесника са дијабетесом [6].

Антиоксидантни систем укључује ензимске и неензимске компоненте, састоји се од антиоксидантних молекула мале молекуларне тежине, као што су глутатион-пероксидаза (*GSH-Px*), супероксид-дисмутаза (*SOD*) и каталаза [7]. Оксидантни стрес се може доказати мерењем његових показатеља или антиоксидантним молекулима. Већина објављених студија о оксидантном стресу у дијабетесу показала је контрадикторне резултате. Забележене су непромењене, повишене и снижене вредности *SOD* [8], односно смањене и повећане вредности *GSH-Px* [9-12] у односу на здраве испитанике.

ЦИЉ РАДА

Циљ испитивања је био да се процене оксидантни стрес и антиоксидантни статус болесника са дијабетесом тип 2 у односу на здраве испитанике контролне групе. Будући да је оксидантни стрес значајан за развој дијабетичких микроваскуларних компликација, испитивани су и липидни статус, оксидисани *LDL* (*Ox-LDL*) холестерол и антиоксидантни статус болесника с овим компликацијама, односно без њих.

МЕТОД РАДА

Испитивањем је обухваћено 50 амбулантно лечених болесника са ДМ тип 2, од чега 20 мушког пола, просечне старости од $50,47 \pm 17,1$ годину, и 30 жена, просечне старости од $56,09 \pm 15,6$ година. Контролну групу чинило је 20 здравих испитаника, просечне старости од $47,33 \pm 15,4$ године. Критеријуми за искључивање болесника из испитивања били су: артеријска хипертензија, коронарна болест, поремећаји ритма рада срца, цереброваскуларна обољења и тешка инсуфицијенција јетре и бубрега. Сви испитаници са ДМ били су искључиво на дијететском режиму исхране или су користили оралне антидијабетичке лекове. Критеријум лоше метаболичке контроле био је ниво гликозилираног хемоглобина (*HbA1c*) већи од 6,5%.

Болесници са ДМ су сврстани у две групе према забележеним дијабетичким микроангиопатским компликацијама. Од укупно 50 испитаника, код 21 су дијагностиковане микровакуларне компликације, код 20 је потврђена дијабетичка неуропатија, док је код пет болесника офталмолошким прегледом утврђена дијабетичка ретинопатија. Болесници са ДМ који болују од нефропатије нису укључени у испитивање.

Када је реч о биохемијским анализама, ниво триглицерида је мерен ензимским колориметријским методом *Elitech*, ниво *LDL* холестерола је одређиван према Фридвалдовој (*Friedwald*) формули, вредности *Ox-LDL* холестерола су мерене Елиса методом (*Mercodia*), ниво *HbA1c* је мерен имунотурбидиметријским методом уз примену комерцијалног кита (*Roche*) и система *Hitachi 902 analyser*, ниво глукозе је одређиван помоћу метода *GOD-PAP*, док су вредности инхибитора активатора плазминогена (*PAI-1*) мерене спектрофотометријским методом уз примену комерцијалног кита (*Behring*).

Антиоксидантни параметри

Активност *SOD* (*U/g Hb*) је одређивана тестом инхибиције оксидантне реакције соли тетразолијума на 500 *nm* са комерцијалним китом (*Randox Laboratories, kit Ransod superoxidisedismutase*). Коефицијент варијабилитета између есеја био је 4,2%. Еритроцитна активност *GSH-Px* (*U/g Hb*) анализирана је такође комерцијалним китом (*Ransel glutathione peroxidase, Randox Laboratories*) у еритроцитима на 340 *nm*, мерењем снижења апсорпције *NADPH*. Коефицијент варијабилитета између есеја био је 4%.

Статистичка обрада вршена је применом програма *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program)*, Студентовог *t*-теста и Ман-Витнијевог (*Mann-Whitney*) *U*-теста. Корелације су одређиване мултиплом регресивном анализом.

РЕЗУЛТАТИ

Сви клинички и биохемијски параметри приказани су у табели 1. Као што се примећује, само су вредности *HbA1c*, гликемије и триглицерида ($p < 0,01$) биле значајно веће код испитаника са ДМ у односу на здраве испитанике контролне групе, индекс телесне масе (*BMI*) се није разликовао међу испитиваним групама, док је болест у просеку трајала 7,18 година. Вредности укупног холестерола и *LDL* холестерола нису се значајно разликовале између болесника са ДМ и здравих испитаника. Ниво *Ox-LDL* холестерола био је виши у групи испитаника да ДМ, али статистички значајна разлика није уочена. Активности *SOD* и *GSH-Px* биле је нешто веће код особа са ДМ, али ни то није било статистички значајно. Такође, није било статистички значајне разлике у вредностима *PAI-1* између болесника са ДМ и испитаника контролне групе.

У табели 2 су приказани резултати испитиваних параметара у односу на забележене дијабетичке микровакуларне компликације. Поређењем резултата добијених из групе испитаника са ДМ код којих су дијагно-

ТАБЕЛА 1. Клинички и биохемијски параметри код здравих и испитаника са дијабетесом тип 2.

TABLE 1. Clinical and biochemical parameters in healthy controls and diabetic type 2 patients.

Параметри Parameters	Контролна група Controls	Болесници са ДМ тип 2 DM type 2 patients
Број испитаника Number of subjects	20	50
Број жена/мушкараца Number of female/male patients	10/10	30/20
<i>BMI</i> (kg/m^2)	27.16±8.1	27.27±7.3
Трајање ДМ (године) Duration of DM (years)	-	7.18±1.1
<i>HbA1c</i> (%)	5.34±0.59	8.03±2.95*
Гликемија (mmol/l) Glycemia (mmol/l)	5.26±0.86	9.79±4.25*
Триглицериди (mmol/l) Triglycerides (mmol/l)	1.74±0.9	3.12±1.09*
<i>LDL</i> холестерол (mmol/l) LDL-cholesterol (mmol/l)	3.61±1.56	3.58±0.72
Укупни холестерол (mmol/l) Total cholesterol (mmol/l)	5.9±1.88	5.63±0.98
<i>Ox-LDL</i> холестерол (mmol/l) Ox LDL cholesterol (mmol/l)	79.00±29.26	84.73±16.9
<i>SOD</i> ($\text{U}/\text{g Hb}$)	877.14±153.18	913.38±120.36
<i>GSH-Px</i> ($\text{U}/\text{g Hb}$)	44.63±13.73	45.04±11.19
<i>PAI-1</i> (U/ml)	2.6±0.35	2.97±1.08

* $p < 0,01$

ДМ – дијабетес мелитус; *BMI* – индекс телесне масе; *HbA1c* – гликолизирани хемоглобин; *Ox-LDL* – оксидисани *LDL*; *SOD* – супероксид-дисмутаза; *GSH-Px* – глутатион-пероксидаза; *PAI-1* – инхибитор активатора плазминогена 1

* $p < 0,01$

DM – diabetes mellitus; BMI – Body Mass Index; *HbA1c* – glycosylated hemoglobin; *Ox-LDL* – oxidized LDL; *SOD* – superoxide dismutase; *GSH-Px* – glutathione peroxidase; *PAI-1* – plasminogen activator inhibitor 1

стиковане компликације и групе болесника са ДМ код којих су оне изостале, нису уочене статистички значајне разлике међу испитиваним параметрима, међутим, вредности *LDL* холестерола, *SOD*, *GSH-Px* и *PAI-1* биле су веће код болесника са компликацијама.

ДИСКУСИЈА

Значај липидне пероксидације и антиоксидантног система огледа се у утицају на оксидацију липопротеина и напредовање како атеросклерозе, тако и развоја хроничних компликација код болесника са ДМ. Циљ ове студије је био да се анализирају вредности *Ox-LDL* холестерола и антиоксидантни параметри, те испита повезаност евентуалних одступања са присуством ДМ тип 2, односно са забележеним микровакуларним компликацијама. У доступној литератури уочени су контрадикторни резултати.

Резултати нашег испитивања нису указали на значајну разлику нити за један испитивани параметар осим за гликемију, *HbA1c* и триглицериде између болесника са ДМ и здравих испитаника контролне групе [8]. Специфичан параметар оксидантног стреса представљао је *Ox-LDL* холестерол, чији је ниво био виши код болесника са ДМ, али статистичка разлика није

ТАБЕЛА 2. Липидни и антиоксидантни статус код здравих и испитаника са дијабетесом тип 2.
TABLE 2. Lipid and antioxidant parameters in healthy subjects and diabetic patients.

Параметри Parameters	Контролна група Controls	Болесници са ДМ тип 2 DM type 2 patients	
		Без компликација Without complications	Са компликацијама With complications
Број испитаника Number of subjects	20	29	21
Триглицериди (mmol/l) Triglycerides (mmol/l)	1.74±0.9	3.78±1.74	1.8±0.58
LDL холестерол (mmol/l) LDL-cholesterol (mmol/l)	3.73±0.69	3.34±0.77	3.74±0.66
Ох-LDL холестерол (mmol/l) Ox LDL cholesterol (mmol/l)	79.0±29.26	87.86±16.23	80.72±22.05
SOD (U/g Hb)	877.14±153.18	895.00±162.89	917.00±66.68
GSH-Px (U/g Hb)	44.63±13.73	43.60±13.24	47.10±7.37
PAI-1 (U/ml)	2.6±0.35	2.78±1.25	3.10±1.21

DM – дијабетес мелитус; Ох-LDL – оксидисани LDL; SOD – супероксид-дисмутаза; GSH-Px – глутатион-пероксидаза; PAI-1 – инхибитор активатора плазминогена 1

DM – diabetes mellitus; Ox-LDL – oxidized LDL; SOD – superoxide dysmutase; GSH-Px – glutathione peroxidase; PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1

била значајна. Овакав налаз није у потпуности конзистентан са резултатима већине објављене литературе с обзиром на то да се код болесника са ДМ тип 2 очекује значајно повећани оксидантни стрес. Ипак, резултати неких студија такође не показују значајне разлике у вредностима Ох-LDL холестерола код особа оболелих од ДМ тип 2 у односу на здраве испитанике [9].

Претпоставља се да оксидантни стрес може бити укључен у настанак микроваскуларних компликација у дијабетесу. У нашем испитивању параметри липидног статуса и Ох-LDL холестерола нису се значајно разликовали међу испитаницима са поменутих компликацијама и оних код којих су те компликације изостале. Ово се делимично може објаснити чињеницом да је ДМ код испитаника трајао мање од 10 година (7,18 година) и да група испитаника, када је у питању вредност *HbA1c*, није била хомогена, што не искључује добру гликорегулацију код већине болесника. Ово је значајно с аспекта утицаја нерегулисаних хипергликемија, као и трајања ДМ тип 2, како на ниво оксидантног стреса, тако и на антиоксидантни статус болесника [10-14].

Иако се код болесника са ДМ очекује смањена антиоксидантна активност, у досад разматраној литератури се налазе подаци и о повећаној и о смањеној активности SOD и GSH-Px [9-12, 15-18]. У неколико објављених студија, као и у нашем испитивању, није забележена статистички значајна разлика између болесника са ДМ и здравих особа [19-21]. Раније разматрани налази Ох-LDL холестерола, којима није потврђено значајно повећање оксидантног стреса, елиминишу потребу повећане одбране од слободних радикала, чиме се објашњава изостанак очекивано смањеног антиоксидантног статуса код испитаника са ДМ. Такође, занимљив је налаз повишених, мада не и статистички значајних, концентрација PAI-1 у плазми болесника са дијабетичким компликацијама, што би могло бити значајно за даље напредовање атеросклерозе код болесника са ДМ тип 2. Повишене вредности PAI-1 исто тако могу утицати на убрзани развој атеросклерозе у стањима која се одликују резистенцијом на инсулин [22].

ЗАКЉУЧАК

Утврђене су повишене, али не и статистички значајне, вредности Ох-LDL холестерола и антиоксидантних ензима SOD и GSH-Px код болесника са ДМ тип 2 у односу на здраве испитанике. Наведени резултати сугеришу да би могла постојати поремећена равнотежа између оксидантног и антиоксидантног система код особа оболелих од ДМ тип 2, док би повећање активности испитиваних ензима могао бити компензациони механизам тела у спречавању оштећења ткива.

Код испитаника оболелих од ДМ тип 2 код којих су дијагностиковане микроваскуларне компликације забележене су веће вредности антиоксидантних ензима SOD и GSH-Px, као и PAI-1 него код болесника код којих су поменуте компликације изостале, мада статистички значајна разлика није потврђена. Резултати наше студије показују значај оксидантно-антиоксидантног система у процесу развоја како микроваскуларних, тако и атеросклерозних компликација код болесника са ДМ. На основу изложених резултата може се претпоставити да је антиоксидантни капацитет у дијабетесу тип 2 очуван. Ипак, потребне су нове студије које би до краја истражиле улогу липидне пероксидације и антиоксидантних одбрамбених механизма у настајању компликација дијабетеса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kannel WB, Mc Gee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. JAMA 1979; 241:2035-8.
2. Froguel P, Velho G. Les marqueurs genetiques du diabete de type 2. Rev Prat 1996; 46:1813-7.
3. Lyons TJ. Oxidised low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? Diabet Med 1991; 8:411-9.
4. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular diseases: which role for oxidative stress. Metabolism 1995; 44:363-8.
5. Steiner G. Atherosclerosis, the major complication of diabetes. Adv Exp Med Biol 1985; 189:277-97.
6. Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and dia-

- betes. *Diabetes* 1988; 37:832-7.
7. Mohan IK, Das UN. Oxidant stress, anti-oxidants and nitric oxide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Med Sci Res* 1997; 25:55-7.
 8. Memisogulari R, Seyithan T, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 2003; 21:291-6.
 9. Zamaklar M, Lalić K, Rajković N, et al. Oxidized LDL and lipids as risk factors for ischaemic heart disease in type 2 diabetes. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(7-8):529-36.
 10. Cerellio A, Bortolotti N, Pirisi M, et al. Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:1589-93.
 11. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:99-105.
 12. Tribe RM, Poston L. Oxidative stress and lipids in diabetes: a role in endothelium vasodilator dysfunction? *Vasc Med* 1996; 1:195-206.
 13. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34:65-70.
 14. Ruiz C, Alegria A, Barbara R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59(2):99-105.
 15. Astley S, Langrish-Smith A, Southon S, Sampson M. Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma LDL in type I diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22(10):1626-31.
 16. Nutthall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U. Age independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Q J Med* 1999; 92:33-8.
 17. Čolak E, Majkić-Singh N, Stanković S, et al. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med* 2005; 37(8):613-20.
 18. Peuchant E, Delmas-Beavieux MC, Couchouron A, et al. Short term insulin therapy and normoglycemia: Effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:202-7.
 19. Yadav P, Sarkar S, Bhatnagar D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes and tissues in aged diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 1997; 35:389-92.
 20. Matkovic B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res* 1982; 14:77-9.
 21. Palanduz S, Ademoglu E, Gokkusu C, Tamer S. Plasma antioxidants and type 2 diabetes mellitus. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 109(5-6):309-18.
 22. Nordt TK, Schneider DJ, Sobel BE. Augmentation of the synthesis of plasminogen activator inhibitor type-1 by precursors of insulin. A potential risk factor for vascular disease. *Circulation* 1994; 89(1):321-30.
 23. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Domiguez C. Biomarkers of diabetes associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(12):1563-74.
 24. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta* 2002; 321:89-96.
 25. Davison G, George L, Jackson S, et al. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type I diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 11(33):1543-51.
 26. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54:176-86.
 27. Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Proc* 2001; 53:33-9.

ANTIOXIDANT STATUS IN TYPE II DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH OR WITHOUT MICROVASCULAR COMPLICATIONS

Nada KOSTIĆ, Zorica ČAPAREVIĆ, Sanja ILIĆ

¹Department of Endocrinology, Clinical Center "Dr Dragiša Mišović" – Dedinje, Belgrade

Introduction Lipid peroxidation and antioxidant systems are important factors affecting the metabolism of lipoproteins in diabetes mellitus.

Objective The aim of this study was to investigate the lipid and antioxidant parameters in type II diabetes mellitus patients, and also to determine the effect of diabetic complications on these parameters.

Method Lipid status, Oxidized LDL cholesterol, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) levels in plasma of 50 type II diabetic patients were measured with commercially available kits.

Results The results showed only statistically significant higher levels of triglycerides (3.12 ± 3.9 mmol/l) in diabetics compared with the controls. Ox-LDL cholesterol (84.7 ± 16.9 mmol/l) and SOD activities (913.4 ± 120.3 U/gHb) in type 2 diabetes mellitus were higher than those of the controls, but there was no statistical significance. On the other hand, in patients with diabetes mellitus and complications, LDL cholesterol, PAI-1, SOD and

GSH-Px activities were higher but not significantly than those without complications. Triglycerides and Ox-LDL cholesterol were lower in the group of diabetic patients with complications in comparison to the group without complications.

Conclusion These results indicate that antioxidant status may be affected in type II diabetic patients and that the rise in some enzyme activities could be a compensatory mechanism to prevent tissue damage. Our results suggest that the rise in PAI-1 in type II diabetics with complications may be a good marker of vascular endothelial dysfunction.

Key words: diabetes mellitus type 2; diabetic complications; lipids; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; PAI-1

Nada KOSTIĆ
Kliničko-bolnički centar „Dr Dragiša Mišović“ – Dedinje
Heroja Milana Tepića 1, 11000 Beograd
Tel.: 011 367 2025

* Рукопис је достављен Уредништву 23. 1. 2006. године.