مجله دیابت و لیپید ایران. دو ماهنامه خرداد- تیر ۱۳۹۱؛ دوره ۱۱ (شماره ۵) ۴۷۳-۴۶۴

مقایسه فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز گلبول قرمز در بیماران دیابتی نوع ۲ در مقایسه با افراد سالم

احسانه طاهری[۱،۲]، محمود جلالی[۲]، احمد ساعدی[۲]، مصطفی قربانی[۲،۳]، محمدرضا مدنی[۴]

چکیده

مقدمه: بیماری دیابت با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو همراه است. این مطالعه با هدف مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی بر روی ۱۸۰ نفر (۹۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۸۵ فرد سالم) انجام شد. متغیرهای سن، جنس، نمایه توده بدنی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز(GR)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون آماری T-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در بیماران دیابتی نوع ۲، میانگین فعالیت آنزیم‌های SOD (۱۱۱۱/۹۳±۳۵۴/۹۹ U/gr Hb) پایین‌تر از افراد سالم (۱۱۵۸/۵۳±۳۸۱/۲۱ U/gr Hb) بود. اما اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. فعالیت آنزیم GSH-Px در بیماران دیابتی (۶۲/۳۳±۳۶/۲۹ U/gr Hb) از میانگین فعالیت آن در گروه کنترل (۲۴/۶۲±۱۱/۲ U/gr Hb) بالاتر بود. همچنین آنزیم GR در بیماران دیابتی (۷/۱۷±۵/۵۱ U/gr Hb) فعالیت بالاتری در مقایسه با گروه کنترل (۳/۱۶±۲/۹۵ U/gr Hb) داشت. اختلاف آماری در مورد فعالیت آنزیم‌های GSH-Px و GR معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در بروز عوارض دیابت و تشدید مقاومت به انسولین در این بیماران دارد. با شناخت بیشتر از تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل اکسیدانی در این بیماران در مراحل مختلف بیماری و عوامل مؤثر بر آنها می‌توان به اثربخش بودن مداخلات دارویی و تغذیه‌ای در جهت کاهش استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی نوع ۲ امیدوارتر بود.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، استرس اکسیداتیو، آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانی

این مقاله به زبان انگلیسی در ژورنال Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 2012;11:3 با doi:10.1186/2251-6581-11-3 به چاپ رسیده است.

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی صنعت نفت تهران

* ***نشانی:*** تهران، بلوار کشاورز، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه تغذیه و بیوشیمی، صندوق پستی ۴۷۶۳-۱۳۳۹۵، تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۱، نمابر: ۸۸۹۷۴۴۶۲، پست الکترونیک: ehsaneh_taheri@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۰/۱۲/۱۴ تاریخ درخواست اصلاح: ۹۱/۰۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۳/۱۶

مقدمه

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌هایی با واکنش‌پذیری بالا هستند که به طور طبیعی درجریان واکنش‌های متابولیکی بدن تولید می‌شوند. سطوح بالای رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب پروتئین‌های سلولی، لیپیدهای غشایی، اسیدهای نوکلئیک و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله آترواسکلروز، نارسایی میوکارد، بیماری‌های ایمنی، آسیب سلولی و دیابت دارند. رادیکال‌های آزاد شامل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS)[2] می‌باشند. در شرایط تندرستی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن با تولید رادیکال‌های آزاد به مقابله می‌پردازد و از اثرات این مواد تخریب‌گر پیشگیری می‌کند [۱]. ترکیباتی که در بدن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند به دو گروه تقسیم می‌شوند: گروه اول آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل ویتامین‌های A,C,E، کاروتنوئیدها، گلوتاتیون و فلاوونوئیدها هستند؛ از دیگر ترکیبات این گروه می‌توان به α لیپوئیک اسید، کوآنزیم Q_{10}، املاحی مانند مس، روی، منیزیم و سلنیوم اشاره کرد. گروه دوم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی هستند که شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز، آریل استراز و پاراکسوناز می‌شوند [۲]. با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش سطح و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های بدن، این تعادل برهم می‌خورد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. هایپرگلیسمی یکی از عوامل اصلی ایجاد استرس اکسیداتیو است، به طوری که دیابت با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن همراه است [۲]. مطالعات نشان داده‌اند در بیمارانی که دیابت آنها کنترل نشده، سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E و α لیپوئیک اسید کاهش می‌یابد. همچنین شواهد حاکی از آن است که کمبود آنزیم کاتالاز در گلبول‌های قرمز با افزایش خطر ابتلا به دیابت ارتباط دارد [۳].

استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی از طریق مسیرهای سیگنالی سبب ایجاد و تشدید عوارض دیابت و همچنین ادامه مقاومت به انسولین می‌شود [۴]. افزایش گلوکز در داخل و خارج سلول با سازوکارهایی شامل اتواکسیداسیون گلوکز [۵]، گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها [۶]، تشکیل فرآورده‌های نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته (AGEs)[3] و فعال شدن مسیر پلی‌یول (Polyol) سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود. در مسیر پلی‌یول، NADPH که یک کوفاکتور ضروری برای فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز است، مصرف شده و NADH که کوفاکتور ضروری آنزیم NADH اکسیداز (از منابع آنزیمی ایجاد کننده استرس اکسیداتیو) به شمار می‌رود؛ افزایش می‌یابد [۴]. دیابت با افزایش گلوکز و تغییرات بیوشیمیایی در پراکسیداسیون قند و چربی‌ها همراه است. افزایش قند خون از یک سو و ازسوی دیگر اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در دیابت، سبب تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود [۷]. مطالعات invivo نشان داده‌اند استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش قند خون مدت‌ها پیش از این که عوارض دیابت به صورت بالینی نمود کند، رخ می‌دهد. بنابراین استرس اکسیداتیو علاوه برافزایش مقاومت به انسولین و تشدید دیابت، نقش مهمی در پاتوژنز عوارض و تشدید پیامدهای بعدی دیابت دارد. با این وجود مطالعات مختلفی که روی مدل‌های حیوانی و همچنین در گروه‌های مختلف بیماران دیابتی انجام گرفته است؛ نتایج ضد و نقیضی در مورد تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ابتلا به دیابت نوع ۲ نشان داده‌اند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با افراد سالم است.

روش‌ها

این مطالعه بر روی ۱۸۰ نفر شامل ۹۵ فرد بزرگسال (۲۰–۷۵ سال) مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۸۵ فرد سالم انجام گرفت. ۹۵ فرد بزرگسال مبتلا به دیابت نوع ۲ که بیماری آنها توسط

1- Reactive Oxygen Speices
2- Reactive Nitrogen Speices
3- Advanced Glycation End Products

پزشک تایید شده و دارای شرایط ورود به مطالعه بودند، از بین مراجعه کنندگان به انجمن دیابت ایران انتخاب شدند. ۸۵ فرد سالم به عنوان گروه شاهد از بین پرسنل دانشگاه علوم پزشکی تهران که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند، انتخاب شدند. روش نمونه‌گیری در این پژوهش از نوع convenient sampling بوده است و افراد واجد شرایط به ترتیب مراجعه و تا تکمیل حجم مورد نظر به طور تصادفی انتخاب شدند. پس از انجام هماهنگی‌های لازم، نمونه‌گیری از فروردین ۱۳۸۸ آغاز و در پایان تیرماه ۱۳۸۸ به پایان رسید. بنابراین اثر فصل سال روی نمونه‌گیری و سطح سرمی ویتامین D حذف گردید. گروه شاهد از نظر سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داشت. برای کلیه افراد شرکت کننده در این مطالعه فرم رضایت‌نامه کتبی، پرسشنامه اطلاعات عمومی از طریق مصاحبه توسط پژوهشگر تکمیل گردید.

معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از گذشت حداکثر ۵ سال از زمان تشخیص ابتلا به دیابت نوع ۲، مصرف داروهای خوراکی کاهنده قند خون، تمایل به همکاری در طرح و تکمیل رضایت‌نامه کتبی و معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از تزریق انسولین، مصرف مکمل ویتامین‌های E،C،A،D، ابتلا به بیماری‌های کبدی، کلیوی، تیروئیدی و پاراتیروئیدی، بارداری و شیردهی، مصرف مکمل کلسیم و منیزیم، مصرف داروهای ضد تشنج، مصرف داروهای هورمونی، مصرف داروهای پایین آورنده کلسترول (استاتین‌ها)، کشیدن سیگار. سرم از محلول بالایی لوله فاقد ماده ضد انعقاد و پلاسما از محلول بالایی لوله حاوی ماده ضد انعقاد جدا شد. پس از جداسازی پلاسما، همولیزات باقیمانده (رسوب گلبول‌ها) ۳ بار توسط سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ شستشو و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌های سرم، پلاسما و همولیزات در میکروتیوپ‌های کدگذاری شده برای هر بیمار ریخته و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۷۹°C- نگهداری شد. خصوصیات تن‌سنجی شامل قد، وزن و محاسبه نمایه توده بدن در فرم جمع‌آوری داده‌ها ثبت گردید. وزن و قد با استفاده از ترازوی Seca مدل Seca 725 GmbH & co, (Germany) و قد سنج متصل به آن با حداقل پوشش و بدون کفش به ترتیب با دقت کمتر از ۱۰۰ گرم و ۰/۵ سانتی‌متر اندازه‌گیری و BMI از رابطه تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر) محاسبه شد.

اندازه‌گیری قند خون با روش گلوکز اکسیداز و با استفاده از کیت MAN (تهران- ایران) انجام گردید. برای اندازه‌گیری HbA_1c از دستگاهی به نام Nyco Card® READER II ساخت شرکت AXIS-SHIELD کشور نروژ استفاده گردد. این روش براساس میل ترکیبی برونات با هموگلوبین گلیکوزیله است. ابتدا ۵ میکرولیتر از خون کامل EDTA دار به ویال حاوی محلول همولیز کننده و رسوب دهنده اضافه شد. با این روش اریتروسیت‌ها به سرعت لیز شده و تمام هموگلوبین‌ها راسب می‌شوند و کنژوگه اسید برونیک به آرایش سیس- دیولِ هموگلوبین گلیکوزیله متصل می‌شود. سپس مقداری از مخلوط واکنش به Test Device اضافه گردید، با این عمل تمام هموگلوبین‌های راسب شده، کنژوگه باند شده و باند نشده روی فیلتر باقی می‌مانند. هر گونه کنژوگه رنگی اضافی با محلول شستشو از روی فیلتر شسته شده و جدا شد. رسوب روی فیلتر با اندازه‌گیری شدت رنگ آبی (هموگلوبین گلیکوزیله) و رنگ قرمز (هموگلوبین تام) با NycoCord Reader II خوانده می‌شود و نسبت این دو رنگ با درصد HbA_1c متناسب خواهد بود. انسولین به روش رادیوایمنواسی (RIA) با استفاده از کیت Biosorce ساخت کشور دانمارک اندازه‌گیری شد. مدل هموستازی ارزیابی مقاومت انسولین (HOMA-IR) از رابطه زیر محاسبه گردید: (22.5 / [mmol/l) گلوکز ناشتا × (μIU/ml) انسولین ناشتا])= مقاومت انسولین

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

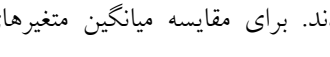
سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گلبول‌های قرمز با استفاده از کیت راندوکس (Randox, No: SD 125) انجام گرفت. در این روش از گزانتین و گزانتین اکسیداز برای تولید رادیکال‌های سوپراکسید استفاده شد. این رادیکال‌ها با ماده‌ای به نام فنیل تترازولیم کلراید واکنش و کمپلکس قرمز رنگ فورمازون را تشکیل داده که غلظت آن با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در

صورت وجود آنزیم در نمونه، رادیکال‌های سوپراکسید با تبدیل شدن به H2O2 و O2 مانع ایجاد فورمازون می‌شود. فعالیت آنزیم SOD از طریق مهار واکنش فوق و اندازه‌گیری جذب نوری کمپلکس فورمازون در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۸].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز(GR)

آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، اکسیداسیون گلوتاتیون را در حضور NADPH کاتالیز نمود. در این واکنش گلوتاتیون اکسید به گلوتاتیون احیا و NADPH به + NADP تبدیل شد. با اندازه‌گیری کاهش جذب نوری به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر، فعالیت این آنزیم اندازه‌گیری شد [۹].



$$GSSG + NADPH \rightarrow NADP^{+} + 2GSH$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px)

آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px)، اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) را به وسیله کیومن هیدروپراکسید کاتالاز نمود. سپس گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH دوباره به گلوتاتیون احیا تبدیل شد. در این واکنش +NADP نیز تولید شد. با اندازه‌گیری کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز تعیین گردید [۹].

$$H_2O_2+2GSH \rightarrow 2H_2O+GSSH$$
$$LOOH+2GSH \rightarrow H_2O+ LOH+GSSH$$

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (TAC)

این روش بر پایه احیای رادیکال کاتیون ABTS توسط مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی است. مولکول ABTS اولیه بی‌رنگ است که با افزودن پرسولفات پتاسیم و تشکیل رادیکال کاتیون $ABTS^{+\circ}$ به رنگ سبز- آبی درآمد و پس از گذشت ۲۴ ساعت به پایداری لازم رسید و تا ۴۸ ساعت پایدار ماند. با افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به این محلول در طی یک زمان مشخص و بسته به فعالیت و غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها، $ABTS^{+\circ}$ احیا و بی رنگ شد. این کاهش جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۳۴ سنجیده و به صورت درصد مهار رادیکال بیان شد. شدت کاهش جذب نوری با ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم یا پلاسما متناسب است. جهت محاسبه از فرمول زیر و برای تبدیل "درصد مهار رادیکال" به واحد g/dl از منحنی استاندارد BSA استفاده شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال} = \frac{OD1-OD2}{OD1} \times 100$$

روش‌های آماری

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در جداول بیان شدند. برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی بین دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم برای متغیرهایی که فاقد توزیع نرمال بودند از روش من ویتنی و برای سایر متغیرها از آزمون t-test مستقل استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۸۰ نفر شرکت کردند که ۵۲/۷۷ درصد (۹۵ نفر) آنها مرد و ۴۷/۲۳ درصد (۸۵ نفر) زن بودند. در میان افراد دیابتی ۵۲/۶ درصد افراد مرد و ۴۷/۴ درصد زن بودند. در افراد سالم نیز ۵۲/۹ درصد مرد و ۴۷/۱ درصد زن بودند. ویژگی‌های بالینی افراد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. اختلاف آماری معنی‌داری بین سن، وزن و نمایه توده بدنی بین بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم مشاهده نشد. مطابق با داده‌های جدول ۲، در افراد دیابتی میانگین سطح سرمی قند خون ناشتا، هموگلوبین گلیکوزیله و شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) از افراد سالم بالاتر و از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). غلظت انسولین ناشتای سرم در افراد دیابتی ۱۱/۷۸ ±۸/۸μU/ml بود که از غلظت آن از افراد سالم (۱۳/۶۷± ۸/۱۵μU/ml) پایین‌تربود؛ ولی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۳ میانگین و انحراف معیار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم نشان می‌دهد. در افراد دیابتی، میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، پایین‌تر از افراد سالم کمتر بود اما اختلاف

معنی‌داری نداشت. میانگین فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بیماران دیابتی بالاتر افراد سالم و اختلاف آن در هر دو مورد معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۱).

نمودار ۱ توزیع فراوانی (درصد) بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم را در ۳ گروه طبقه‌بندی شده نمایه توده بدنی (BMI) نشان می‌دهد. در این طبقه‌بندی، ۳ گروه BMI تعریف شده است. گروه اول، افراد دارای وزن نرمال با۲۴/۹-۱۸/۹= BMI، گروه دوم، افراد دارای اضافه وزن با۲۹/۹-۲۵=BMI و گروه سوم شامل افراد چاق (هر سه گروه چاقی) از BMI=۳۰ تا بالاتر از ۴۰ است. با توجه به این که معمولاً در طبقه‌بندی‌ها افراد چاق نیز به ۳ گروه چاقی درجه ۱ تا ۳ تقسیم‌بندی می‌شوند، اما به علت این که در گروه چاقی درجه ۲ و ۳، تعداد افراد گروه کمتر از ۱۰نفر می‌شد، ۳ گروه چاقی را با هم ادغام کردیم.

جدول ۴ همبستگی میان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با نمایه توده بدنی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با افراد سالم نشان می‌دهد. در این روش از همبستگی پیرسون استفاده شد. در هر دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با افزایش نمایه توده بدنی، ارتباط مستقیمی داشت. این ارتباط در مورد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در افراد سالم از نظر آماری معنی‌دار بود.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیارمتغیرهای سن، وزن، نمایه توده بدنی در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ (n=۹۵) و افراد سالم (n=۸۵)

متغیر	بیماران دیابتی نوع ۲	افراد سالم	P-value
سن (سال)	۵۱±۱۱	۵۱±۱۳	۰/۸۸
وزن (کیلوگرم)	۷۶/۹±۱۳/۸	۷۳/۲±۱۲/۹	۰/۰۹
نمایه توده بدنی(Kg/m2)	۲۶/۲±۹/۳	۲۶/۲±۴/۵	۰/۹۸

داده‌ها برحسب انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) می‌باشد

روش آماری مورد استفاده: آزمون t مستقل

P< ۰/۰۵

جدول ۲- میانگین و انحراف معیارمتغیرهای قند خون ناشتا، HbA_1c، انسولین ناشتای سرم، HOMA-IR در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ (n=۹۵) و افراد سالم (n=۸۵)

متغیر	بیماران دیابتی نوع ۲	افراد سالم	P-value
قند خون ناشتا (mg/dl)	۱۷۴/۸۹±۶۴/۱۸	۸۷/۶۹±۹/۵۸	۰/۰۰۰۱
HbA_1c (٪)	۷/۵۴±۱/۹۳	۴/۹۷±۰/۵۵	۰/۰۰۰۱
غلظت انسولین(µ U/ml)	۱۱/۷۸±۸/۹۰	۱۳/۶۷±۸/۱۵	۰/۱۳
HOMA-IR	۸۹/۴۵±۷۳/۹۲	۵۴/۶۶±۳۱/۰۴	۰/۰۰۰۱

داده‌ها برحسب انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) می‌باشد

روش آماری مورد استفاده: آزمون t مستقل

P< ۰/۰۵

جدول ۳- مقایسه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم

متغیر / گروه	بیماران دیابتی نوع ۲	افراد سالم	P-value
(mg/dl)TAC	۳/۱۵±۱/۰۷	۳/۲۲±۰/۶۹	۰/۰۵۲
(U/gr Hb) SOD	۱۱۱۱/۹۳±۳۵۴/۹۹	۱۱۵۸/۵۳±۳۸۱/۲۱	۰/۳۱
(U/gr Hb) GR	۷/۱۷±۵/۵۱	۳/۱۶±۲/۹۵	۰/۰۰۱
(U/gr Hb) GSH-PX	۶۲/۳۳±۳۶/۲۹	۲۴/۶۲±۱۱/۲	۰/۰۰۱

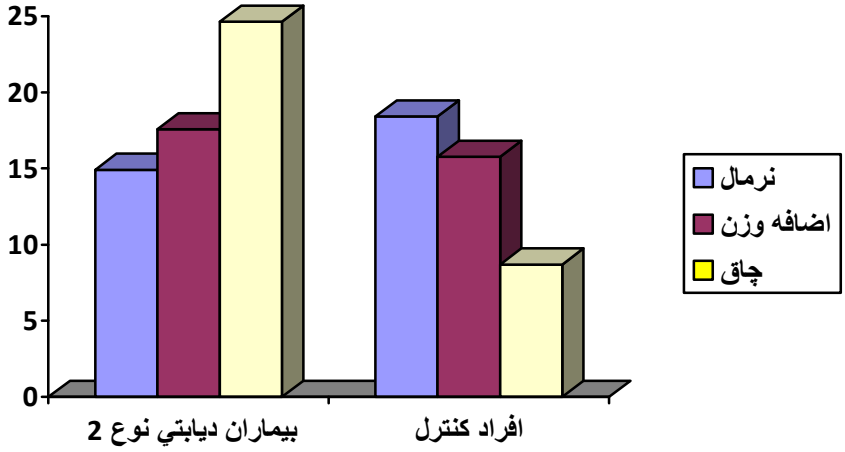
داده‌های مربوط به فعالیت SOD برحسب انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) می‌باشد.

داده‌های مربوط به فعالیت GRx, GR و فعالیت TAC برحسب (Median ± IQR) می‌باشد.

روش آماری مورد استفاده: آزمون من ویتنی

روش آماری مورد استفاده: آزمون t مستقل

P< ۰/۰۵



گروه ۱، وزن نرمال: BMI= ۱۸/۹-۲۴/۹

گروه ۲، اضافه وزن: BMI= ۲۴/۹- ۲۹/۹

گروه ۳، چاق: BMI= ۳۰- ۴۰

نمودار ۱- توزیع طبقه‌بندی نمایه توده بدنی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم

جدول ۴- همبستگی میان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با نمایه توده بدنی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با افراد سالم

متغیرها	بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲	افراد سالم
(U/gr Hb) SOD	r= -۰/۲۱	r= -۰/۳۱
	P= ۰/۰۹	P= ۰/۰۴
GSH-PX (U/gr Hb)	r= -۰/۰۳	r= -۰/۰۹
	P= ۰/۸۱	P= ۰/۶۰
(U/gr Hb) GR	r= -۰/۱۱	r= -۰/۲۳
	P= ۰/۳۲	P= ۰/۰۸
(mg/dl) TAC	r= -۰/۰۳	r= -۰ /۰۲
	P= ۰/۷۸	P= ۰/۸۶

P<۰/۰۵: معنی‌دار

بحث

طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماران دیابتی از افراد سالم پایین‌تر است؛ در حالی که فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در افراد دیابتی بالاتر از افراد سالم می‌باشد. Pasaoglu و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی در سه گروه شامل ۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ که تازه تشخیص داده شده بودند و ۲۰ بیمار تحت درمان با داروهای خوراکی کنترل قند خون و ۲۰ نفر به عنوان گروه کنترل پرداختند. نتایج نشان داد پراکسیداسیون لیپیدها در بیماران دیابتی بالاتر و مقدار تام تیول و سطح گلوتاتیون احیا در گلبول‌های قرمز پایین‌تر از افراد سالم بود. همچنین این مطالعه پیشنهاد کرد که در بیماران دیابتی در مراحل اولیه بیماری سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌پردازد ولی با پیشرفت مراحل بیماری به تدریج سیستم آنتی‌اکسیدانی دچار اختلال شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد [۱۰]. Likidlilid و همکاران در مطالعه بر روی ارتباط میان سطح سرمی قند خون ناشتا و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در ۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۱ با FPG ≤۱۴۰ mg/dL و ۲۰ فرد سالم با FPG ≤۱۱۰mg/dL مورد بررسی قرار دادند. نتایج بیانگر آن بود که در بیماران دیابتی سطح گلوتاتیون احیا پایین‌تر و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بالاتر از افراد سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیمار تطابق داشتند، بود. در بیماران دیابتی ارتباطی منفی بین قند خون ناشتا و سطح سرمی GSH وجود داشت اما این ارتباط در مورد FPG و فعالیت GPx مشاهده نشد [۱۱]. در مطالعات انجام شده در زمینه اثر دیابت روی فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت‌های مختلف، نتایج یکسانی به دست نیامده است. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در بافت‌های کبد [۱۲،۱۳]، کلیه [۱۴،۱۵]، آئورت [۱۶]، پانکراس [۱۷]، خون و گلبول‌های قرمز [۱۲] افزایش و در بافت قلب [۱۸] و شبکیه چشم[۱۹] کاهش داشت. در مورد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در اثر ابتلا به دیابت نیز در مدل‌های انسانی و حیوانی نتایج مشابهی حاصل نشده است. Stefek و همکاران در پژوهش خود دریافتند که سطح فعالیت SOD در بافت قلب پس از ۳۲ هفته از شروع ابتلا به دیابت افزایش می‌یابد؛ اما در بافت آئورت بدون تغییر باقی می‌ماند. برخی مطالعات افزایش و برخی دیگر کاهش فعالیت SOD را در گلبول‌های قرمز، کاهش فعالیت SOD در شبکیه و پلاسما و افزایش آن را در پانکراس گزارش کرده‌اند [۲۰،۲۱]. اختلاف این نتایج می‌تواند به علت تفاوت مطالعات در زمینه جنس، مدت ابتلا به دیابت، بافت مورد بررسی و یا گونه مورد مطالعه در مدل‌های حیوانی باشد. در مطالعات انسانی نیز جنس، جمعیت مورد مطالعه، مدت ابتلا به دیابت، میزان و نحوه کنترل قند خون و گروه‌های مورد مطالعه، متفاوت هستند. در این مطالعه افزایش سطح آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌تواند نشان دهنده پاسخ جبرانی بدن به شرایط اکسیداتیو باشد. هر چند شناخت کامل ما از ماهیت بیماری دیابت و تاثیرآن روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و چگونگی تغییر غلظت و فعالیت این آنزیم‌ها در طول ابتلا به دیابت نوع ۲، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. همان طور که اشاره شد استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بروز و پیشرفت عوارض گوناگون دیابت نوع ۲ دارد که این عوارض علاوه بر تحمیل هزینه‌های درمانی، نقش مهمی در تغییر کیفیت زندگی این بیماران در درازمدت دارد. Aldibasi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه خود بر روی ۱۰۰ بیمار دیابتی مبتلا به رتینوپاتی با ۶۰ بیمار دیابتی که عارضه رتینوپاتی را نداشتند (به عنوان گروه کنترل)؛ نشان دادند که در بیماران دیابتی مبتلا به رتینوپاتی در مقایسه با گروه کنترل، سطح 8-OHdG و مالون دی آلدهید افزایش و میزان فعالیت Cu-Zn- SOD کاهش داشت. این مطالعه چنین نتیجه‌گیری کرد که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت رتینوپاتی در بیماران دیابتی دارد [۲۲].

در بیماران دیابتی علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو، دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن نیز دچار اختلال می‌شود. از آن جایی که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از اولین سدهای دفاعی بدن در مقابل استرس اکسیداتیو می‌باشد، می‌توان انتظار داشت که فعالیت این آنزیم پیش از سایر آنزیم‌ها دچار اختلال شود [۲۳]. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که

میانگین فعالیت SOD در بیماران دیابتی کمتر از افراد سالم است. از سوی دیگر در مطالعه Hamden روی رت‌های دیابتی شده توسط Alloxan نشان داده شد که هایپرگلیسمی سبب افزایش از دست دهی یون Cu^{+2} می‌شود که کوفاکتوری ضروری برای فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز محسوب می‌شود. گلیکوزیلاسیون Cu/Zn SOD (آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حاوی مس و روی که ۹۰ درصد از ایزوآنزیم‌های SOD را تشکیل می‌دهد) در بیماران دیابتی که کنترل گلیسمی خوبی ندارند، مشاهده می‌شود. در واقع گلیکوزیلاسیون Cu/Zn SOD در گلبول‌های قرمز انسانی می‌تواند منجر به غیر فعال شدن این آنزیم شود [۲۳]. در بین مطالعات مشابه در ایران می‌توان به مطالعه مرجانی اشاره کرد. مرجانی و همکاران، ۳۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱۹ فرد سالم که از نظر سن و جنس با یکدیگر همسان بودند را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در بیماران دیابتی نوع ۲ سطح سرمی مالون دی آلدهید بالاتر و میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز پایین‌تر از افراد گروه کنترل بود [۲۴].

اضافه وزن و چاقی یکی از مهم‌ترین عوامل خطر محیطی در ابتلا به بیماری‌های مزمن از جمله دیابت است. نکته قابل توجه در مورد چاقی آن است که در مقایسه با سایر عوامل خطر، شانس بالاتری برای پیشگیری و درمان دارد و از این رو بیشتر مورد توجه است. چاقی به عنوان یک عامل خطر، سبب ایجاد مقاومت به انسولین در مرحله پیش دیابتی می‌شود که خود عامل افزایش هایپرگلیسمی و تشدید سایر علایم بیماری دیابت است. ارتباط محکم بین چاقی و مقاومت به انسولین، این پیشنهاد را مطرح کرد که چاقی با ایجاد استرس اکسیداتیو در بروز مقاومت به انسولین نقش دارد. از جمله سازوکارهای پیشنهادی، نقش چاقی در افزایش تولید تومور نکروز آلفا، لپتین و اسیدهای چرب آزاد است. از سوی دیگر در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، افزایش تولید اسیدهای چرب آزاد با افزایش استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد همراه است [۲۵]. نتایج مطالعه Al-Aubaidy نشان داد در بیماران دیابتی، ارتباط مستقیمی میان سطح سرمی 8- hydroxy 2'-deoxy- guanosine (8-OHdG) که شاخص تخریب DNA در نتیجه استرس اکسیداتیو است و چاقی وجود دارد [۲۶]. Codoñer-Franch در پژوهشی ۲۰ کودک مبتلا به دیابت نوع ۱و ۲۲ کودک مبتلا به چاقی و ۱۶ کودک که از نظر سن و جنس با گروه‌های مورد تطابق داشت را مورد بررسی قرار داد و دریافت که استرس اکسیداتیو هم در کودکان چاق و هم در کودکان مبتلا به دیابت نوع مشاهده می‌شود. بنابراین در بیمارنی که هم دچار چاقی و هم مبتلا به دیابت هستند، استرس اکسیداتیو دچار نوعی هم‌افزایی می‌شود و در مقایسه با نبود چاقی شدیدتر خواهد بود [۲۷].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود این که میانگین نمایه توده بدنی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری ندارد، اما توزیع BMI در بین دو گروه تا حدودی متفاوت است. درصد افراد گروه‌های ۲ و۳ BMI در بیماران دیابتی بالاتر از افراد سالم است که بیشترین اختلاف را در مورد گروه ۳ داریم. مطابق با آنچه در بالا ذکر شد و همان طور که جدول ۴ نشان می‌دهد، ارتباط معکوسی میان BMI و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GR, GSH-Px, SOD و TAC در هر دو گروه بیمار و کنترل مشاهده شد. این ارتباط در مورد فعالیت آنزیم SOD محکم‌تر از سایر پارامترها بود که در افراد گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار نیز بود. شاید توجیه آن این باشد که در میان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، آنزیم SOD پیش‌تر از سایر آنزیم‌ها دچار اختلال می‌شود.

با توجه به محدودیت‌هایی که شاخص نمایه توده بدنی (BMI) در ارزیابی چاقی دارد از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم اندازه‌گیری ترکیب بدن شامل توده چربی بدن اشاره کرد. تعداد کم حجم نمونه، عدم اندازی‌گیری غلظت سرمی مالون دی آلدهید [۲۸] و TBARS و فعالیت کاتالاز و سایر ویتامین‌های دارای نقش آنتی‌اکسیدانی در افراد مورد مطالعه از جمله سایر محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد.

با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده می‌توان چنین برداشت کرد که در مراحل اولیه دیابت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابله با استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد و با افزایش مدت ابتلا به دیابت

و یا کنترل ضعیف قند خون فعالیت این آنزیم‌ها به تـدریج کاهش می‌یابد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد (به شماره طرح ۱۰۰۹۱).

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر صمیمانه خود را ازمساعدت‌های دکتر اسداله رجب رئیس انجمن دیابت ایران و خانم مهناز زارعی و پروانه قره باغی کارشناسان آزمایشگاه، آقای خدایاری مسؤول خانه سلامت ۸ تهران و نیز کلیه عزیزان شرکت کننده در این پژوهش ابراز می‌دارند.

مأخذ

1. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(3):383-391.
2. Maritim AC, Sanders RA, Watkins Iii JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1):24-38.
3. Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med* 2004; 203(3):211-218 .
4. Reaven GM. Insulin resistance and its consequences: type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Circulation* 2000; 93: 1780-1783 .
5. Reiter RJ, Tan D, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7(6): 444-458.
6. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 2000; 49(2): 9-13 .
7. Soliman GZA. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdohyde, glutatione) level in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J* 2008; 49(2):129-136.
8. L'Abbé MR, Fischer PW. Automated assay of superoxide dismutase in blood. *Methods Enzym* 1990; 186: 232-237.
9. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-169.
10. Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exper Med* 2004; 203(3): 211-218.
11. PeerapatditMD T. Glutathione and glutathione peroxidase in type 1 diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 2007; 90(9):1759-67.
12. Sailaja Devi M, Suresh Y, Das U. Preservation of the antioxidant status in chemically induced diabetes mellitus by melatonin. *J Pineal Res* 2000; 29(2): 108-15.
13. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins III JB. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001; 15(3): 159-64.
14. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins III JB. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001; 15(3):143-9.
15. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins III JB. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(6): 329-34.
16. Kocak G, Aktan F, Canbolat O, zogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, et al. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr & Metab* 2000; 13(6): 308-18.
17. El-Khatib AS, Moustafa AM, Abdel-Aziz AAH, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Effects of aminoguanidine and desferrioxamine on some vascular and biochemical changes associated with streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Pharmacognosy Res* 2001; 43(3):233-40.
18. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition* 1995; 11(5 Suppl): 551-4.
19. Obrosova I, Minchenko A, Marinescu V, Fathallah L, Kennedy A, Stockert C, et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44(9): 1102-10.
20. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins Iii JB. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001; 15 (1):41-46.
21. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins Iii JB. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(6): 329-34.
22. Aldebasi Y, Mohieldein A, Almansour Y, Almoteri B. Imbalance of Oxidant/Antioxidant Status and Risk Factors for Saudi Type 2 Diabetic Patients with Retinopathy. *Br J Med Medic Res* 2011; 1(4):371-84.
23. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1,25 Dihydroxyvitamin D3: Therapeutic and

Preventive Effects against Oxidative Stress, Hepatic, Pancreatic and Renal Injury in Alloxan-Induced Diabetes in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009: 55 (3): 215-222

24. Marjane, A. Plasma level of malondialdehyde and activity of antioxidant enzymes in red blood cells of type 2 diabetic patients. *Ardebil medical university* 2006; 6(2):183-187.(Persian).
25. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are Oxidative Stress- Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and -Cell Dysfunction? *Diabetes* 2003; 52(1):1.
26. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol June* 2011; 164 (1): 899-904.
27. Pilar Codoñer-Franch, Sara Pons-Morales, Laura Boix-García, Victoria Valls-Bellés V. Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2010; 11(4): 251-7.
28. Narod SA, Dube MP, Klijn J, Lubinski J, Lynch HT, Ghadirian P, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(23):1773-9.