

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، محمود جلالی^۲، احمد ساعدی^۳، مصطفی قربانی^۳، محمدرضا مدنی^۴

چکیده

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

روش ها: 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 آنزیم های گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون آماری T-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: در بیماران دیابتی نوع ۲، میانگین فعالیت آنزیم های SOD ($1111/93 \pm 354/99$ U/gr Hb) پایین تر از افراد سالم ($1158/53 \pm 381/21$ U/gr Hb) بود. اما اختلاف آماری معنی داری نداشت. فعالیت آنزیم GSH-Px در بیماران دیابتی ($62/33 \pm 36/29$ U/gr Hb) از میانگین فعالیت آن در گروه کنترل ($24/62 \pm 11/2$ U/gr Hb) بالاتر بود. همچنین آنزیم GR در بیماران دیابتی ($7/17 \pm 5/51$ U/gr Hb) فعالیت بالاتری در مقایسه با گروه کنترل ($3/16 \pm 2/95$ U/gr Hb) داشت. اختلاف آماری در مورد فعالیت آنزیم های GSH-Px و GR معنی دار بود ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: افزایش تولید رادیکال های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش مهمی در بروز عوارض دیابت و تشدید مقاومت به انسولین در این بیماران دارد. با شناخت بیشتر از تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و عوامل اکسیدانی در این بیماران در مراحل مختلف بیماری و عوامل مؤثر بر آنها می توان به اثربخش بودن مداخلات دارویی و تغذیه ای در جهت کاهش استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی نوع ۲ امیدوارتر بود.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، استرس اکسیداتیو، آنزیم های آنتی اکسیدانی

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، نامبر: ۸۸۹۷۴۴۶۲، پست الکترونیک: ehsaneh_taheri@yahoo.com

مقدمه

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌هایی با واکنش‌پذیری بالا هستند که به طور طبیعی در جریان 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)^۱ و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS)^۲ 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، گلوکاتایون و فلاونوئیدها هستند؛ از دیگر ترکیبات این گروه می‌توان به α لیپوئیک اسید، کوآنزیم Q₁₀، املاحی مانند مس، روی، منیزیم و سلنیوم اشاره کرد. گروه دوم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی هستند که شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز، آریل استراز و پاراکسوناز می‌شوند [۲]. با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و 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 غیر آنزیمی پروتئین‌ها [۶]، تشکیل فرآورده‌های نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته (AGEs)^۳ و فعال شدن مسیر پلی‌یول (Polyol) سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود. در مسیر پلی‌یول، NADPH که یک کوفاکتور ضروری برای فعالیت گلوکاتایون 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 از سوی 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 بر افزایش 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 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، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون 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 D, A, C, E، 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 -79°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 725 GmbH & co مدل Seca (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 پروتئین 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- دیول 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: $22.5 / \text{mmol/l}] \times \text{گلوکز ناشتا} \times (\mu\text{IU/ml انسولین ناشتا}) = \text{مقاومت انسولین}$

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

کاهش جذب نوری با ظرفیت تام آنتی اکسیدانی 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.

$$\text{درصد مهار رادیکال} = \frac{001-002}{001} \times 100$$

روش های آماری

آنالیز آماری داده ها توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm 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.

یافته ها

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. ویژگی های بالینی افراد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. اختلاف آماری معنی داری بین سن، وزن و نمایه توده بدنی بین بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم مشاهده نشد. مطابق با داده های 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 معنی دار بود ($P < 0.05$). غلظت انسولین ناشتای سرم در افراد دیابتی $11/78 \pm 8/8 \mu\text{U/ml}$ بود که از غلظت آن از افراد سالم ($13/67 \pm 8/15 \mu\text{U/ml}$) پایین تر بود؛ ولی اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳ میانگین و انحراف معیار ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون ردوکتاز، گلوکاتیون پراکسیداز در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم نشان می دهد. در افراد دیابتی، میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی، پایین تر از افراد سالم کمتر بود اما اختلاف

صورت وجود آنزیم در نمونه، رادیکال های سوپراکسید با تبدیل شدن به H_2O_2 و O_2 مانع ایجاد فورمازون می شود. فعالیت آنزیم SOD از طریق مهار واکنش فوق و اندازه گیری جذب نوری کمپلکس فورمازون در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه گیری شد [۸].

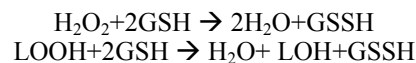
اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز (GR)

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

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

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز (GSH-Px)

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



اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم (TAC)

این روش بر پایه احیای رادیکال کاتیون ABTS توسط مولکول های آنتی اکسیدانی است. مولکول ABTS اولیه بی رنگ است که با افزودن پرسولفات پتاسیم و تشکیل رادیکال کاتیون $\text{ABTS}^{+\bullet}$ به رنگ سبز-آبی درآمد و پس از گذشت ۲۴ ساعت به پایداری لازم رسید و تا ۴۸ ساعت پایدار ماند. با افزودن آنتی اکسیدان ها به این محلول در طی یک زمان مشخص و بسته به فعالیت و غلظت آنتی اکسیدان ها، $\text{ABTS}^{+\bullet}$ 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

در گروه چاقی درجه ۲ و ۳، تعداد افراد گروه کمتر از ۱۰ نفر می‌شد، ۳ گروه چاقی را با هم ادغام کردیم. جدول ۴ همبستگی میان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون 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، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون 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.

معنی‌داری نداشت. میانگین فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بیماران دیابتی بالاتر افراد سالم و اختلاف آن در هر دو مورد معنی‌دار بود ($P=0/001$). 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 با $BMI=18/9-24/9$ ، گروه دوم، افراد دارای اضافه وزن با $BMI=25-29/9$ و گروه سوم شامل افراد چاق (هر سه گروه چاقی) از $BMI=30$ 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

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار متغیرهای سن، وزن، نمایه توده بدنی در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ ($n=95$) و افراد سالم ($n=85$)

متغیر	بیماران دیابتی نوع ۲	افراد سالم	P-value
سن (سال)	51 ± 11	51 ± 13	۰/۸۸
وزن (کیلوگرم)	$76/9 \pm 13/8$	$73/2 \pm 12/9$	۰/۰۹
نمایه توده بدنی (Kg/m^2)	$26/2 \pm 9/3$	$26/2 \pm 4/5$	۰/۹۸

داده‌ها برحسب انحراف معیار \pm میانگین (Mean \pm SD) می‌باشد
روش آماری مورد استفاده: آزمون t مستقل
 $P < 0/05$

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار متغیرهای قند خون ناشتا، HbA_{1c} ، انسولین ناشتای سرم، HOMA-IR در دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ ($n=95$) و افراد سالم ($n=85$)

متغیر	بیماران دیابتی نوع ۲	افراد سالم	P-value
قند خون ناشتا (mg/dl)	$174/89 \pm 64/18$	$87/69 \pm 9/58$	۰/۰۰۰۱
HbA_{1c} (%)	$7/54 \pm 1/93$	$4/97 \pm 0/55$	۰/۰۰۰۱
غلظت انسولین ($\mu U/ml$)	$11/78 \pm 8/90$	$13/67 \pm 8/15$	۰/۱۳
HOMA-IR	$89/45 \pm 73/92$	$54/66 \pm 31/04$	۰/۰۰۰۱

داده‌ها برحسب انحراف معیار \pm میانگین (Mean \pm SD) می‌باشد
روش آماری مورد استفاده: آزمون t مستقل
 $P < 0/05$

جدول ۳- مقایسه ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم های 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

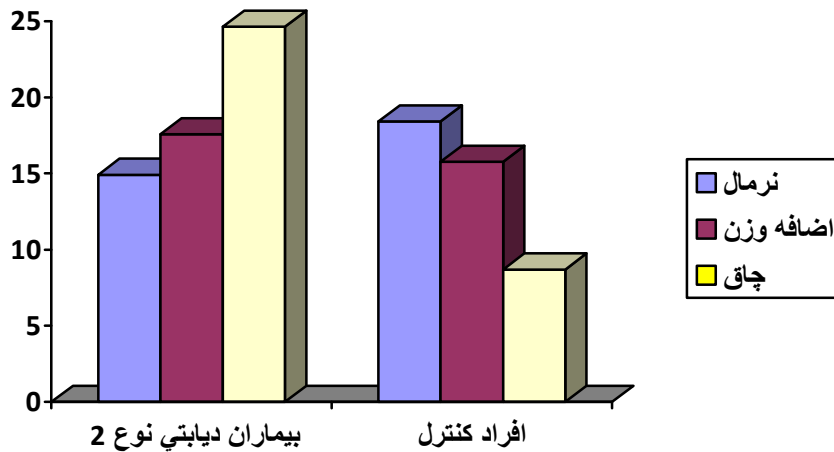
داده های مربوط به فعالیت SOD برحسب انحراف معیار ± میانگین (Mean±SD) می باشد.

داده های مربوط به فعالیت GR, GRx و فعالیت TAC برحسب (Median ± IQR) می باشد.

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 طبقه بندی نمایه توده بدنی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم

جدول ۴- همبستگی میان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی 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 P = ۰/۰۹	r = -۰/۳۱ P = ۰/۰۴
GSH-PX (U/gr Hb)	r = -۰/۰۳ P = ۰/۸۱	r = -۰/۰۹ P = ۰/۶۰
(U/gr Hb) GR	r = -۰/۱۱ P = ۰/۳۲	r = -۰/۲۳ P = ۰/۰۸
(mg/dl) TAC	r = -۰/۰۳ P = ۰/۷۸	r = -۰/۰۲ P = ۰/۸۶

P<۰/۰۵: معنی دار

بحث

طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماران دیابتی از افراد سالم پایین تر است؛ در حالی که فعالیت آنزیم های گلوکوتاتیون ردوکتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز در افراد دیابتی بالاتر از افراد سالم می باشد. Pasaoglu و همکاران در مطالعه ای به بررسی وضعیت آنتی اکسیدانی 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 گلوکوتاتیون احیا در گلوبول های قرمز پایین تر از افراد سالم بود. همچنین این مطالعه پیشنهاد کرد که در بیماران دیابتی در مراحل اولیه بیماری سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به مقابله با رادیکال های آزاد می پردازد ولی با پیشرفت مراحل بیماری به تدریج سیستم آنتی اکسیدانی دچار اختلال شده و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاهش می یابد [۱۰]. Likidilid و همکاران در مطالعه بر روی ارتباط میان سطح سرمی قند خون ناشتا و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، فعالیت آنزیم های گلوکوتاتیون ردوکتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز را در ۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۱ با $FPG \leq 140 \text{ mg/dL}$ و ۲۰ فرد سالم با $FPG \leq 110 \text{ mg/dL}$ مورد بررسی قرار دادند. نتایج بیانگر آن بود که در بیماران دیابتی سطح گلوکوتاتیون احیا پایین تر و فعالیت گلوکوتاتیون 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 آنزیم های گلوکوتاتیون ردوکتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز در بافت های مختلف، نتایج یکسانی به دست نیامده است. فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز در بافت های کبد [۱۲، ۱۳]، کلیه [۱۴، ۱۵]، آئورت [۱۶]، پانکراس [۱۷]، خون و گلوبول های قرمز [۱۲] افزایش و در بافت قلب [۱۸] و شبکه چشم [۱۹] کاهش داشت. در مورد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در اثر ابتلا به دیابت نیز در مدل های 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 می یابد؛ اما در بافت آئورت بدون تغییر باقی می ماند. برخی مطالعات افزایش و برخی دیگر کاهش فعالیت SOD را در گلوبول های قرمز، کاهش فعالیت SOD در شبکه و پلازما و افزایش آن را در پانکراس گزارش کرده اند [۲۰، ۲۱]. اختلاف این نتایج می تواند به علت تفاوت مطالعات در زمینه جنس، مدت ابتلا به دیابت، بافت مورد بررسی و یا گونه مورد مطالعه در مدل های حیوانی باشد. در مطالعات انسانی نیز جنس، جمعیت مورد مطالعه، مدت ابتلا به دیابت، میزان و نحوه کنترل قند خون و گروه های مورد مطالعه، متفاوت هستند. در این مطالعه افزایش سطح آنزیم های گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون ردوکتاز می تواند نشان دهنده پاسخ جبرانی بدن به شرایط اکسیداتیو باشد. هر چند شناخت کامل ما از ماهیت بیماری دیابت و تاثیر آن روی آنزیم های آنتی اکسیدانی و چگونگی تغییر غلظت و فعالیت این آنزیم ها 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 هزینه های 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 نتیجه گیری کرد که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت رتینوپاتی در بیماران دیابتی دارد [۲۲].

در بیماران دیابتی علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو، دفاع آنتی اکسیدانی بدن نیز دچار اختلال می شود. از آن جایی که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از اولین سدهای دفاعی بدن در مقابل استرس اکسیداتیو می باشد، می توان انتظار داشت که فعالیت این آنزیم پیش از سایر آنزیم ها دچار اختلال شود [۲۳]. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که

نتیجه استرس اکسیداتیو است و چاقی وجود دارد [۲۶].
 Codoñer-Franch در پژوهشی ۲۰ کودک مبتلا به دیابت نوع ۱ و 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 بیماری 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 و ۳ 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 SOD, GR, GSH-Px, 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 اندازه‌گیری غلظت سرمی مالون دی‌آلدهید [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

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 دی‌آلدهید بالاتر و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید 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 علائم 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].
 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

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر صمیمانه خود را از مساعدت‌های 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.

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

سپاسگزاری

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

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, malondialdehyde, glutathione) 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. Peerapatdit MD 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.