

Συσχέτιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων των ερυθροκυττάρων [υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) και δυσμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD)] και του μεταβολικού ελέγχου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2

Περίληψη

P. Τσιταμίδου
X. Φυτίλη
E. Πάγκαλος¹
M. Τσαρδάκη
E. Πρόγια

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου EPO παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριοσκλήρωση, ο καρκίνος. Αμυντικοί μηχανισμοί προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από τις EPO, όπως είναι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα γλουταθειόνη του υπεροξειδίου (GPX), και η δυσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Σκοπός της εργασίας είναι η εκτίμηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και η σχέση με το μεταβολικό έλεγχο σε διαβητικούς ασθενείς. Προσδιορίσαμε τη δραστηριότητα των ενζύμων SOD, GPX στα ερυθρά αιμοσφαίρια 41 ασθενών με τύπου 2 σακχαρώδη διαβήτη και 20 υγιών μαρτύρων. Ακόμη προσδιορίσαμε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAS). Η μέση τιμή της HbA_{1c} ήταν 7,89%. Οι ασθενείς είχαν ηλικία 39-80 χρόνια και διάρκεια διαβήτη >1 χρόνο. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη μέση τιμή της HbA_{1c} < ή > 7,89%. Η δραστηριότητα των ενζύμων SOD και GPX καθώς και η TAS δεν παρουσίασαν διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων με HbA_{1c} < ή > από τη μέση τιμή. Παρατηρήσαμε ελάττωση της δραστηριότητας της SOD και GPX στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα της TAS δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Συμπεραίνουμε ότι παρατηρείται μια τάση ελάττωσης της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας στους διαβητικούς χωρίς να βρεθεί σχέση με το μεταβολικό έλεγχο. Απαιτείται περισσότερη μελέτη για την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στα αντιοξειδωτικά ένζυμα των ερυθροκυττάρων.

Το στοιχείο O₂ είναι απαραίτητο για τη ζωή των οργανισμών. Στους ιστούς χρησιμοποιείται μέσω βιοχημικών αντιδράσεων και υπό φυσιολογικές συνθήκες οδηγεί σε δημιουργία διαφόρων τελικών προϊόντων. Το μεγαλύτερο μέρος του μοριακού οξυγόνου καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια όπου οξειδώνεται και μετατρέπεται σε H₂O. Το υπόλοιπο μεταβολίζεται σε άλλα τελικά προϊόντα που ονομάζονται «ελεύθερες ρίζες οξυγόνου»

Τμήμα Κλινικής Χημείας
¹ Διαβητολογικό Ιατρείο
Γ.Π.Ν. «Γ. Παπανικολάου»,
Θεσσαλονίκης

Ανακοινώθηκε στο 12th European Congress of Clinical Chemistry Βασιλεία Ελβετίας 1997.

(EPO). Οι ρίζες αυτές έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο συμμετέχοντας στο μεταβολισμό των λιπιδίων στην κυτταρική αναπνοή, στην ανοσολογική απάντηση και στη φαγοκυττάρωση.

Εντούτοις η έκθεση ενός οργανισμού σε υψηλές πυκνότητες οξυγόνου πολλαπλασιάζει τους κινδύνους ανάπτυξης σοβαρών βλαβών διάφορων ιστών λόγω της ανεξέλεγκτης ατελούς αναγωγής του μοριακού O που έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή EPO με τοξική δράση.

Ο οργανισμός διαθέτει ένα ισχυρό ενδογενές σύστημα με σκοπό την προστασία των κυττάρων και των ιστών από την τοξική δράση των EPO. Οι μηχανισμοί που μετέχουν στην εκκαθάριση των βλαπτικών EPO είναι ένζυμα όπως: 1) η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) η κύρια λειτουργία της οποίας είναι η εξουδετέρωση των υπεροξειδικών ριζών οξυγόνου, 2) Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), που εξουδετερώνει το τοξικό υπεροξείδιο των λιπιδίων και 3) Η καταλάση που απομακρύνει το H₂O₂ ο αντιοξειδωτικός της όμως ρόλος είναι αμφισβητήσιμος. Ακόμα μη ενζυμικοί μηχανισμοί δρουν προστατευτικά έναντι του οξυγόνου όπως η βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ.

Σήμερα υπάρχουν πολλές ενδείξεις και πειραματικές αποδείξεις για την συσχέτιση μεταξύ των τοξικών μεταβολιτών του οξυγόνου, του σακχαρώδη διαβήτη και των επιπλοκών του. Μελέτες αναφέρουν ελάττωση της δραστηριότητας της SOD σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, ενώ τα αποτελέσματα για την συσχέτιση με τον μεταβολικό έλεγχο παραμένουν αντιφατικά. Έχει επίσης υποστηριχθεί βιβλιογραφικά ότι η δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου να ελαττώνεται σημαντικά με την γλυκοζυλίωση τόσο in vivo όσο και in vitro¹⁻⁵.

Σκοπός της εργασίας είναι να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών αιμοσφαι-

ρίων των διαβητικών που εκφράζεται με τη δραστηριότητα των ενζύμων SOD, GPX καθώς και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού (TAS), και η σχέση τους με το μεταβολικό έλεγχο.

Ασθενείς και μέθοδοι

Στη μελέτη μας πήραν μέρος 41 άτομα με τύπου 2 σακχαρώδη διαβήτη (10 άνδρες και 31 γυναίκες) ηλικίας από 39-80 ετών και διάρκεια διαβήτη μεγαλύτερη από ένα χρόνο με μέση τιμή HbA_{1c} 7,89% (φυσιολογική τιμή 4-6%) και 20 υγιείς μάρτυρες ίδιας περίπου ηλικίας με τους διαβητικούς. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη τιμή της HbA_{1c} στην Ομάδα Α με HbA_{1c} <7,5% που θεωρήθηκαν ότι ήταν καλά ρυθμισμένοι και στην Ομάδα Β με HbA_{1c} >9% που θεωρήθηκαν ότι δεν ήταν καλά ρυθμισμένοι. Τα άτομα της μελέτης έπαιρναν αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία η ινσουλίνη, κανένας δε δε έπαιρνε οποιαδήποτε αντιοξειδωτική αγωγή.

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 1.

Η HbA_{1c} προσδιορίσθηκε με ανοσολογική μέθοδο με μονοκλωνικά αντισώματα (DCA-2000 Bayer). Οι EPO ανιχνεύθηκαν έμμεσα δια του προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών ενζύμων στα ερυθροκύτταρα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), της υπεροξειδάσης, της γλουταθειόνης (GPX) και τέλος ανιχνεύθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα το ορού (TAS: Total Antioxidant Status).

Αρχές των μεθόδων

Η SOD επιταχύνει την μετατροπή της τοξικής ρίζας του ανιόντος υπεροξειδίου το οποίο παράγεται από το σύστημα ξανθίνης και οξειδάσης της ξανθίνης που χρησιμοποιείται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο.

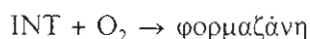
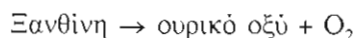
Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

	n	φύλο Α/Γ	ηλικία	διάρκεια διαβήτη	HbA _{1c} %
Υγιείς μάρτυρες	20	8/12	50 ± 8	-	5,36 ± 0,28*
Ασθενείς ΜΙΣΔ	41	10/3	55 ± 11,9	11,8 ± 8,79	7,89 ± 2,01

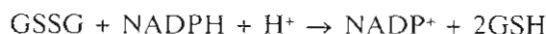
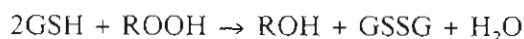
*p < 0,001

Δισχρωμογόνο υπόστρωμα χρησιμοποιείται το INT: 2-(4-nitrophenyl)-5phenyltetrazolium chloride του οποίου η αντίδραση με το ανιόν του υπεροξειδίου οδηγεί στο σχηματισμό φορμαζάνης ερυθρού χρώματος.

Η δραστηριότητα της SOD προσδιορίζεται από το βαθμό αναστολής της αντίδρασης: Μετρείται στα 505 nm



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) καταλύει την οξειδωση της γλουταθειόνης (GSH) από το acmene hydroperoxide. Παρουσία της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) και NADPH η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) αμέσως ανάγεται με ταυτόχρονη οξειδάση του NADPH σε NADP⁺. Η ελάττωση της απορρόφησης μετρείται στα 340 nm



Η TAS μετρήθηκε στον ορό με χρωματομετρική μέθοδο στα 600 nm. Το αντιδραστήριο ABTS^R (2,2' Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sylphonate]) επώάζεται με μια υπεροξειδάση (μεθμυσοφαιρίνη) και H₂O₂ για να παραχθεί η ελεύθερη ρίζα ABTS^{R+} που έχει χρώμα. Το χρώμα του αντιδραστήριου αυτού αλλάζει με την προσθήκη των αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στο πλάσμα και η μεταβολή αυτή του χρώματος είναι ανάλογη της ολικής συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών του πλάσματος.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με στατιστικό πρόγραμμα σε IBM συμβατό υπολογιστή.

Η κανονική κατανομή των μετρήσεων στις παραμέτρους που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με την δοκιμασία W των Shapiro και Wilk.

Οι παράμετροι οι οποίοι παρουσίαζαν κανονική κατανομή των μετρήσεων μελετήθηκαν με το student's t test για μη συνεξυγμένες παρατηρήσεις και συσχετίστηκαν με το συντελεστή Pearson. Ενώ αντίθετα οι παράμετροι οι οποίοι δεν παρουσίαζαν κανονική κατανομή των μετρήσεων μελετήθηκαν με το Mann-Whitney U test και συσχετίστηκαν με τον συντελεστή Spearman.

Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν το p ήταν μικρότερο από 0,05.

Αποτελέσματα

Στους πίνακες 2-4 και στην εικόνα 1 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν. Δεν παρατηρήσαμε διαφορά στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων μεταξύ των 2 ομάδων των διαβητικών. Παρατηρήσαμε όμως ελάττωση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD και

Πίνακας 2. Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων (SOD, GPX, TAS) (μέση τιμή σταθερά απόκλιση σε υγιείς και ασθενείς)

	SOD u/grHb	GPX U/gr Hb	TAS mmol/L
Ασθενείς n:41	538,9 ± 189,79**	58,65 ± 14,6***	1001 ± 0,38
Υγιείς μάρτυρες n: 20	667,25 ± 247	72 ± 12,76	1059 ± 0,47

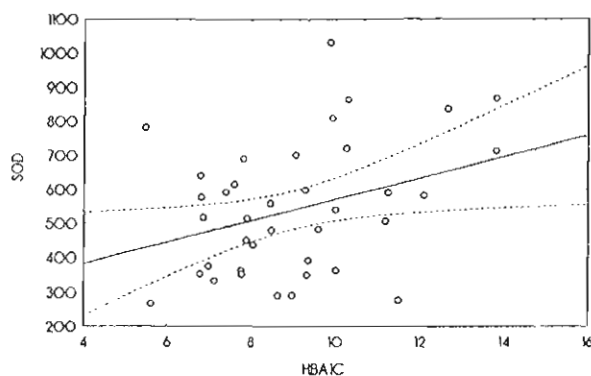
p < 0,05. * p < 0,001

Πίνακας 3. Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων (SOD, GPX, TAS) στους ασθενείς ανάλογα με τη μέση τιμή της HbA_{1c}

	Ομάς Α	Ομάς Β
SOD Ugr/Hb	508,3 ± 167,4	598,5 ± 213,58
GPX u/gr/Hb	62,54 ± 16	56,32 ± 14,2
TAS mmol/L	0,927 ± 0,29	1,015 ± 1,47

Πίνακας 4. Συσχέτιση της HbA_{1c} με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες

HbA _{1c} %	r	p
SOD Ugr/Hb	0,33	0,034
GPX u/gr/Hb	-0,105	χωρίς σημαντικότητα
TAS mmol/L	-0,05	χωρίς σημαντικότητα



Εικ. 1. Συσχέτιση της HbA_{1c} με SOD. $SOD = 258.01 \pm 31.322 * HbA_{1c}$, $r = 0.33$.

GPX) στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Όσον αφορά τα επίπεδα της TAS στους ασθενείς δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες. Βρέθηκε μικρή συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της SOD και της HbA_{1c} ενώ δεν βρέθηκε στατιστική σημαντική συσχέτιση μεταξύ της HbA_{1c} και GPX και TAS.

Συζήτηση

Όπως τονίζεται σε διάφορες μελέτες, η επιμονή υπεργλυκαιμία σχετίζεται με την ανάπτυξη όψιμων διαβητικών επιπλοκών. Εντούτοις οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση των επιπλοκών δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ελάττωση της αντιοξειδωτικής άμυνας ή η αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου συντελούν στην ανάπτυξη οξειδωτικού stress το οποίο ενοχοποιείται για την ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών.

Οι μηχανισμοί που συνδέουν την υπεργλυκαιμία και το οξειδωτικό stress έχουν να κάνουν με ένα πολυσύνθετο κύκλο αλληλοεπιδράσεων όπως είναι η οξείδωση της γλυκόζης, η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και η υπεροξειδωση των λιπιδίων^{4,6}. Παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι η δημιουργία των EPO από αυτές τις αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνεται από την αύξηση της παραγωγής υπεροξειδικών ριζών οξυγόνου στο πλάσμα, και στα πολυμορφώδη διαβητικών ασθενών.

Πειράματα⁷ σε ποντίκια τα οποία κατέστησαν διαβητικά με τη χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης παρουσίασαν μεταβολές στις δραστηκότητες του υπεροξειδίου γλουταθειόνης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου τόσο της Cu-Zn-SOD που απαντά-

ται στο κυτταρόπλασμα όσο και της Mn-SOD που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Έτσι, παρατηρήθηκε ελάττωση της σύνθεσης της ηπατικής γλουταθειόνης, ελάττωση της SOD στους ιστούς του ήπατος και νεφρού καθώς και στα ερυθροκύτταρα. Με χορήγηση δε ενδομυκώς ινσουλίνης η συγκέντρωση της γλουταθειόνης επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα, η δραστηκότητα της SOD αυξήθηκε στο ηπατικό και νεφρικό ιστό αλλά όχι στα ερυθροκύτταρα⁸. Μελετητές υποστηρίζουν ότι η CuZnSOD είναι επιδεκτική σε γλυκοζυλίωση και τροποποίηση από τις EPO, γεγονός που εκφράζεται με ελάττωση της δραστηκότητας στα ερυθροκύτταρα⁹.

Τα πειραματικά δεδομένα των Sakurai και συν. αναφέρουν απώλεια της ενζυμικής δραστηκότητας λόγω γλυκοζυλίωσης όταν επώασθηκε κεκαθαρωμένη SOD με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης¹⁰. Επίσης παρατεταμένη έκθεση της SOD σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 μπορεί να προκαλέσει κατάτμηση του ενζύμου¹¹.

Διαφορετικοί μηχανισμοί δεν μπορεί να έχουν σχέση με την ελαττωμένη ενεργότητα της GPX στους διαβητικούς ασθενείς. Το NADPH (nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate) σχετίζεται με την παραγωγή ελαττωμένης γλουταθειόνης, η οποία γλουταθειόνη είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση του H_2O_2 μέσω της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο GPX. Η βασική πηγή παραγωγής NADPH είναι η οδός της μονοφωσφορικής εξόξης στα ερυθρά και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι υπάρχει διαταραχή στην οδό αυτή στο σακχαρώδη διαβήτη⁷. Ελαττωμένη γλουταθειόνη ανευρίσκεται στα ερυθροκύτταρα λόγω γλυκοζυλίωσης των ενζύμων *γ-glutamylcysteine synthetase*, *glutathione reductase* που συμμετέχουν στη σύνθεσή της και στην οξείδωσή της.

Στα αποτελέσματα μας παρατηρήσαμε ελάττωση^{12,13} της δράσης των ενζύμων SOD και GPX στην ομάδα των διαβητικών με σημαντικότητα $p < 0,05$ και $p < 0,001$ αντίστοιχα. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η TAS των ασθενών δεν είχε σημαντική διαφορά από τους υγείς. Επειδή η TAS είναι κατά κύριο λόγο η ατομική ευαισθησία, σε μια οξειδωτική μεταβολή, περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό συστατικών, που ενέχονται στην αυξομείωση της, και οι ατομικοί αυτοί παράγοντες δρουν με διαφορετικό τρόπο για να μεταβάλλουν την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση, μας κάνει να υποθέσουμε ότι δεν μπορεί να μας δώσει συγκεντρώσεις που να δίνουν το μέτρο της οξειδωτικής

βλάβης, ή της αντιοξειδωτικής άμυνας.

Συνοψίζοντας πιστεύουμε ότι υπάρχει μια τάση μειωμένου αντιοξειδωτικού μηχανισμού που εκφράζεται με την ελαττωμένη δραστηριότητα των ενζύμων στους διαβητικούς. Απαιτείται περισσότερη έρευνα και γνώση για την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στα αντιοξειδωτικά ένζυμα των ερυθροκυττάρων των διαβητικών.

Summary

Tsitamidou R, Fiteli Cr, Pagkalos E, Tsardaki M, Proyia E. Antioxidant status in erythrocyte and metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. Hellen Diabetol Chron 1998; 2: 165-169.

Free radical is thought to play a role in the pathogenesis of a variety of conditions: diabetes, arteriosclerosis, cancer. Protective mechanism exist which limit free radical damage, these consist of enzymes including glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD). The study's aim was to investigate the relationship between antioxidant enzymes and metabolic control in diabetic patients. We have studied the activity of the antioxidant SOD, GPX in erythrocytes of 41 patients with type 2 diabetes mellitus and compared them with the control group (n = 20). We also determined the activity of total antioxidant status (TAS) in serum. The levels of nonenzymatically glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) were $7,89 \pm 2,01\%$. Patients aged 39-80 years with ≥ 1 year duration of diabetes. Diabetic patients were classified according to their metabolic control (mean HbA_{1c} either \pm or $> 7,89\%$). The results showed that the activities of enzymes (SOD, GPX) in erythrocytes and TAS did not exhibit differences in patients with controlled hyperglycemia (HbA_{1c} $< 7,89\%$) than those with uncontrolled hyperglycemia (HbA_{1c} $> 7,89\%$). Erythrocyte SOD and GPX activities were slightly decreased compared to those of controls. No significant difference in TAS levels was found between patients and controls. There was no correlation between GPX, TAS and HbA_{1c}, but only a slight correlation was observed between SOD and HbA_{1c}. Conclusion: The results support the hypothesis that there was at least a tendency towards decrease of antioxidant

activity which might not be related to glycemic control. Further study is needed to clarify the effect of hyperglycemia on erythrocytes antioxidant enzymes in diabetic patients.

Βιβλιογραφία

1. Slater TF. Free radicals mechanisms in tissue damage. *Biochem J* 1984; 222.
2. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidant as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12): 1819-28.
3. Davies K. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects *J Biol Chem* 1987; 262: 4895-9901.
4. Vucic K, Gavella M, Bozicou V, Ashroft SJH, Rocic B. Superoxide dismutase activity in Lymphocytes and polymorphonuclear cells in diabetic patients. *Eur J Clin Chem Biochem* 1997; 35:7: 517-21.
5. Oda A, Banai C, Yamaoka T, Katori T, Matsushima T, Yamashita K. Inactivation of Cu-Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation and in erythrocytes of diabetic patients. *Horm Metab Res* 1994; 26: 1-4.
6. Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
7. Ceriello A, Giuliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Lefebvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diab Med* 1991; 8: 540-2.
8. Loven Dean, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, Oberley L. Effect insulin and oral glutathione on glutathione levels and SOD activities in organ of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 1986; 35: 503-7.
9. Strange RC. Expression of Cu-Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes from diabetic and non-diabetic subjects. *Clin Chem Acta* 1992; 207: 261-3.
10. Sakurai T, Matsuyama M, Tsuchiya S. Glucation of erythrocyte superoxide dismutase reduces its activity. *Chem Pharm Bull* 1987; 35: 302-7.
11. Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJA. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem* 1990; 265: 11919-27.
12. Sushil K, McVie J and R. Effect of glycemic control, race and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetes patients. *Metabolism* 1994; 43: 306-9.
13. Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Simada M, Kawakami Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 1989; 38: 753-8.