مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹، شماره‌ی ۷۶، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۱ تا ۱۲

بررسی سطح هموسیستئین پلاسما در بیماران دیابتی نوع ۲ تحت درمان با متفورمین و ارتباط آن با ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، مالون دی آلدهید، کراتی‌نین سرم، مقاومت انسولینی و کنترل گلایسمیک

وحیده آقامحمدی خیاوی[۱]، دکتر بهرام پورقاسم گرگری[۲]، دکتر اکبرعلی عسگرزاده[۳]

نویسنده‌ی مسئول: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده‌ی بهداشت و تغذیه، گروه تغذیه و بیوشیمی، مرکز تحقیقات تغذیه pourghassemb@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۸۹/۳/۱۷ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۵

چکیده

زمینه وهدف: *افزایش هموسیستئین در دیابت با بدعملکردی اندوتلیال، مقاومت انسولینی، دیس‌لیپیدمی، کنترل ضعیف بیماری، نفروپاتی، ماکروآنژیوپاتی واسترس اکسیداتیو مرتبط می‌باشد. بنابراین در این مطالعه مشاهده‌ای سطوح پلاسمایی هموسیستئین بیماران بررسی شده و ارتباط آن با شاخص‌های بالینی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مطالعه گردید.*

روش بررسی: *این مطالعه مشاهده‌ای روی ۷۰ بیمار مرد دیابتی نوع ۲ تحت درمان با داروی متفورمین (حداقل به مقدار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز) انجام گرفت. افراد براساس هموسیستئین پلاسمایی به دو گروه تقسیم شدند: ۳۱ بیمار با هموسیستئین پلاسمایی طبیعی، گروه ۱ و ۳۹ بیمار با هموسیستئین بیشتر از ۱۵ میکرومول در لیتر، گروه ۲ را تشکیل دادند.*

یافته‌ها: *بیش از نصف بیماران (۵۵/۱ درصد) دارای هموسیستئین پلاسمایی بیشتر از ۱۵ میکرومول در لیتر بودند و همه بیماران فولات و B12 سرمی طبیعی داشتند. اختلاف فولات، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی وکراتینین سرمی بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود، ولی اختلاف شاخص‌های کنترل گلایسمیک و مقاومت انسولینی معنی‌دار نبود. در آنالیز رگرسیون چند متغیره با استفاده از هموسیستئین پلاسما به عنوان متغیر وابسته و دیگر متغیرهای بالینی و بیوشیمیایی مورد مطالعه به عنوان متغیرهای مستقل، غلظت هموسیستئین پلاسما وابسته به سن بیماران (β=۰/۳٤٤)، مقادیر سرمی کراتینین (β=۰/۳۵۱)، ویتامین B12 (β=-۰/۲۳۵)، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (β=۰/۲۸۵) و مالون دی‌آلدهید (β=۰/۲٤۵) بود. هموسیستئین با شاخص‌های کنترل گلایسمیک، مقاومت انسولینی و دریافت ویتامین‌های گروه B و کافئین ارتباط معنی‌دار نداشت.*

نتیجه‌گیری: *جهت بهتر مشخص شدن میزان هموسیستئین پلاسمایی و رابطه‌ی آن با ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی نوع دو به مطالعاتی که حجم نمونه‌ی بزرگتری داشته، ارتباط هموسیستئین را با همه‌ی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در این بیماران بررسی کند، نیاز است.*

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، کنترل گلایسمیک، مقاومت انسولینی، هموسیستئین

۱- کارشناس ارشد علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲- دکترای علوم تغذیه، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکزتحقیقات تغذیه

۳- فوق تخصص غدد درون ریز ومتابولیسم، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز

مقدمه

دیابت نوع ۲ یک بیماری پیشرونده بوده، در بیشتر موارد ناشی از ترکیب مقاومت انسولینی و یا نارسایی سلول‌های بتا می‌باشد، این بیماری دارای عوارض و مشکلات حاد و همچنین دارای مشکلات دراز مدت مانند دیس لیپیدمی، پرفشاری خون، بیماری‌های عروق بزرگ و عروق کوچک می‌باشد (۱). شیوع این بیماری در ایران، در افراد بالاتر از ۴۰ سال، ۲/۴ درصد برآورد شده است (۲). علت مشکلات عروقی در این بیماران ممکن است استرس ناشی از هیپرگلیسمی باشد، منبع بالقوه دیگر استرس اکسیداتیو افزایش هموسیستئین است (۴و۳). هموسیستئین (Hcy) یک اسیدآمینه‌ی گوگرد دار است که در رژیم غذایی وجود نداشته، و در بدن از متیونین سنتز می‌گردد. هموسیستئین مستعد اتواکسیداسیون بوده، آسیب اکسیداتیوی سلول‌های عروقی را تشدید می‌کند. در این بیماران افزایش هموسیستئین با مشکلات بیماران دیابتی نوع ۲ مرتبط بوده، خطر مرگ یا حوادث کرونری را در این بیماران افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که در این بیماران با افزایش هر میکرومول درهموسیستئین، خطر بروز مشکلات کرونری ۲۸ درصد افزایش می‌یابد. کاهش آزادسازی نیتریک اکساید از سلول‌های اندوتلیال و پلاکت‌ها، تشدید تبدیل آراشیدونیک اسید به F2 ایزوپروستان، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تشکیل ترومبوکسان A2 در پلاکت‌ها، افزایش اکسیداسیون LDL و تحریک پرولیفراسیون سلوهای ماهیچه‌ی صاف از جمله آسیب‌های عروقی هستند که در نتیجه‌ی افزایش هموسیستئین در این بیماری به‌وجود می‌آیند (۶). داروی متفورمین (از بیگوانیدها)، تولید کبدی گلوکز را متوقف کرده، مقاومت به انسولین را کاهش می‌دهد. این دارو علاوه بر اثرات مطلوب دارای عوارضی مثل اختلال در جذب ویتامین‌های گروه B از جمله فولات، در طول درمان می‌شود که منجر به افزایش هموسیستئین خون و کاهش سطوح فولات و B12 می‌گردد (۹-۷). شاهین و همکاران گزارش کرده‌اند که متفورمین در طول۶ هفته درمان موجب افزایش هموسیستئین و کاهش فولات و B12 سرمی می‌گردد (۸). در مطالعه‌ی رنجبر و همکاران نیز متفورمین موجب افزایش معنی‌دار در هموسیستئین شد (۱۰). افزایش هموسیستئین در اثر این دارو دردیگر مطالعات نیز تایید شده است (۱۲و۱۱). البته در مطالعات بر مبهم بودن طریقه‌ی افزایش هموسیستئین به وسیله‌ی متفورمین تاکید شده است افزایش سطح هموسیستئین پلاسما وابسته به طول مدت درمان و مقدار دوز مصرفی متفورمین می‌باشد (۱۲و۱۱، ۷). از آنجایی که فولات در انتقال گروه‌های تک کربنه و ساخت متیونین از هموسیستئین نقش دارد، بنابراین کاهش فولات سرم منجربه پیشرفت هیپومتیلاسیون می‌شود که آن هم به مشکلات و عوارض دیابتی منجر می‌گردد (۱۳). افزایش هموسیستئین در بیماری دیابت با بد عملکردی اندوتلیال، مقاومت انسولینی، دیس‌لیپیدمی، کنترل ضعیف بیماری، نفروپاتی، ماکروآنژیوپاتی واسترس اکسیداتیو مرتبط می‌باشد (۱۵و۱۴، ۶). از سوی دیگر مقاومت انسولینی که از ویژگی‌های بیماری دیابت نوع ۲ است، ممکن است منجر به توسعه‌ی افزایش هموسیستئین و استرس اکسیداتیو و در نتیجه ظهور زودرس بیماری‌های عروقی گردد، در این رابطه نتایج ضد و نقیض وجود دارد که به هتروژنیتی افراد و تفاوت در روش‌های مورد بررسی برمی‌گردد (۱۶). انسولین احتمالاً سطوح هموسیستئین پلاسما را با کاهش فعالیت آنزیم سیستاتیونین B سنتتاز و یا افزایش فعالیت آنزیم متیلن‌تترا هیدروفولات کبدی، افزایش می‌دهد (۱۷). جاکوبس و همکاران گزارش کرده‌اند که هموسیستئین پلاسما با افزایش فعالیت سیستاتیونین B سنتتاز کاهش می‌یابد ولی بعداز تجویز انسولین دوباره به سطح قبلی برمی‌گردد (۱۸). البته مطالعات بیشتر برای مشخص کردن ارتباط مستقیم مقاومت انسولینی و متابولیسم هموسیستئین مورد نیاز است. در مطالعات انجام گرفته شده توسط سیگنورلد (۶)، جین (۱۴)،

اورتونو (۱۹)، اموتو (۲۰)، بدون توجه به نوع درمان، نشان داده شده است که بیماران دیابتی نوع ۲ نسبت به افراد سالم هموسیستئین پلاسمایی بالاتری دارند. با عنایت به محدودیت مطالعات انجام گرفته در افراد دیابتی مصرف کننده‌ی متفورمین و ارتباط هموسیستئین با وضعیت آنتی‌اکسیدانی و سایر شاخص‌های بیوشیمیایی و متابولیکی در بیماران دیابتی نوع ۲، در این مطالعه تصمیم گرفته شد تا سطوح هموسیستئین، فولات و B12 در این بیماران بررسی شده، سپس ارتباط هموسیستئین تام پلاسما با سطوح فولات، B12، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون دی آلدهید سرمی، انسولین سرم و شاخص مقاومت انسولینی و کنترل گلایسمیک در بیماران دیابتی نوع ۲ تحت درمان با داروی متفورمین (حداقل به مقدار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز) بررسی گردد.

روش بررسی

این مطالعه مشاهده‌ای روی ۷۰ بیمار مرد دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به کلینیک غدد بیمارستان امام رضا (ع) تبریز که مایل به همکاری بوده، شرایط لازم را مطابق با معیارهای ورود و خروج به مطالعه داشتند، انجام گرفت. مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه تایید شد. ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ (۱)، تمایل به همکاری در مطالعه و مصرف داروی متفورمین (حداقل به مقدار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز) به مدت بیش از ۶ ماه از معیارهای ورود به مطالعه بودند. بیماران از زمانی که بیماری‌شان تشخیص داده شده بود داروی متفورمین مصرف می‌کردند، به عبارت دیگر طول مدت بیماری برابر با طول مدت مصرف داروی متفورمین بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل موارد ذیل بود. مصرف مکمل مولتی- ویتامین مینرال طی ۶ ماه قبل از مطالعه، سیگاری بودن و اعتیاد به مواد مخدر و الکل، تزریق انسولین، ابتلا به بیماری‌های کبدی، کلیوی، قلبی- عروقی، گوارشی، روماتولوژیکی و آندوکرینولوژیکی، لوسمی و اختلالات تیروئیدی، اختلالات مادرزادی در متابولیسم هموسیستئین و مصرف داروهایی نظیر کورتیکو استرویدها، ضدتشنج‌ها و ایزونیازید. لازم به ذکر است که داده‌های این مطالعه، داده‌های اولیه‌ی مطالعه تاثیر مکمل یاری اسیدفولیک برشاخص‌های بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو سرم بیماران دیابتی نوع ۲ می‌باشد. در این مطالعه از همه بیماران رضایت نامه‌ی کتبی گرفته شد. برای هر بیمار پرسشنامه اطلاعات عمومی تکمیل گردید (سن، وزن، قد، داروهای مصرفی، شغل، میزان تحصیلات، میزان فعالیت فیزیکی و ورزشی، طول مدت بیماری و...).

وزن بیماران با استفاده از ترازوی Seca با دقت ۰/۵ کیلوگرم و قد آن‌ها با استفاده از قدسنج مدرج با دقت ۰/۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری‌ها با حداقل لباس و بدون کفش صورت پذیرفت. سپس نمایه‌ی توده‌ی بدن (BMI) از طریق فرمول [^{۲} (متر) قد/ (کیلوگرم) وزن]، محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری فشار خون از فشارسنج جیوه‌ای استفاده شد. از هر فرد ۳ بار اندازه‌گیری فشارخون صورت پذیرفت و در نهایت میانگین آن‌ها گزارش شد. برای هر فرد، پرسشنامه ۳ روز یادآمد غذایی تکمیل گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار Nutritionist III میزان انرژی، پروتئین، کربوهیدرات، چربی تام، ویتامین‌های گروه B و مقدار کافئین مصرفی استخراج شد. از کلیه‌ی افراد ۱۰ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون وریدی ناشتا از ورید سفالیک گرفته شد. بلافاصله بعد از خونگیری ۲ میلی‌لیتر خون تام به منظور تعیین هموسیستئین و هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1C) به لوله‌های حاوی EDTA منتقل شد. سپس نمونه‌های خونی در ۱۵۰۰ دور و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. باقیمانده‌ی خون نیز پس از جداسازی سرم جهت آزمایشات فولات، B12، انسولین، کراتی نین و قندخون ناشتا مورد استفاده قرار گرفت. لازم به توضیح است که به دلیل حساس بودن اسیدفولیک

به نور، کلیه‌ی نمونه‌ها بلافاصله بعد از اخذ تا آخرین مرحله‌ی آزمایش در شرایط دور از نور نگهداری گردید. گلوکز خون ناشتا برپایه‌ی روش آنزیماتیک و رنگ‌سنجی (Enzymatic-Colorimetric/CHOD-PAP) و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر Acylon 300 اندازه‌گیری شد. مقدار HbA1C به روش Ion Exchange HPLC و به صورت اتوماتیک سنجش شد. غلظت انسولین ناشتای سرمی با روش کمی لومینسانت ایمنو اسی (CLIA) و طبق دستورات سازنده و با آنالایزر LIAISON اندازه‌گیری شد. مقاومت انسولینی به صورت HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance) طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۲۰).

HOMA-IR: [انسولین ناشتا* Mu/ml گلوکزناشتا mg/dl]/405

موارد HOMA بیش از ۳/۹ به عنوان مقاومت به انسولین کامل، موارد ۲/۵ تا ۳/۹ به‌عنوان مقاومت نسبی و موارد کمتر از ۲/۵ به عنوان مقاومت به انسولین طبیعی در نظر گرفته شدند (۱۶). کراتی‌نین سرمی به روش واکنش ژافه اندازه‌گیری شد. طبق واکنش ژافه، کراتینین با اسید پیکریک در محیط قلیایی ایجاد کمپلکس نارنجی رنگ می‌نماید که شدت رنگ حاصله با مقدار کراتینین نسبت مستقیم دارد. با این روش می‌توان کراتی‌نین تا غلظت ٦ میلی‌گرم در دسی‌لیتر را اندازه‌گیری نمود.

سپس eGFR (Estimated Glomerular Filtration Ratio) از طریق فرمول Cockroft-Gault برآورد گردید:

GFR= [(140-age) ×weight (kg)]/ [72×serum creatinine (mg/dl)]

GFR به مقدار ۹۰ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان شاخص عملکرد نرمال کلیه در نظر گرفته شد (۲۱). سنجش هموسیستئین پلاسما به روش آنزیم ایمنو اسی (EIA) و با استفاده از کیت هموسیستئین (Axis-Sheld Diagnostic,Uk) صورت پذیرفت. اساس این روش بر این مبنا است که اشکال مختلف هموسیستئین شامل هموسیستئین، دی‌سولفیدهای مرکب هموسیستئین و باند شده به پروتئین با استفاده از DTT (Dithiothreitol) احیا شده، به هموسیستئین آزاد تبدیل می‌گردد، سپس هموسیستئین آزاد در حضور آنزیم S-آدنوزیل هموسیستئین هیدرولاز به S-آدنوزیل هموسیستئین تبدیل می‌گردد. بعد از طی فرآیندهایی رنگ آزاد ایجاد شده با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این مطالعه هموسیتئین کمتر از ۱۵ میکرومول در لیتر، طبیعی در نظر گرفته شد (۲۲). افراد مطالعه نیز براساس این معیار به دو گروه هیپرهموسیستئینمیا و هموسیستئین طبیعی تقسیم شدند.

اندازه‌گیری فولات سرمی به روش رادیو اسی و باکیت Simul TRAC-SNB انجام گرفت. اساس این روش این است که فولات و ویتامین B12 سرم به ترتیب با اسیدفولیک I^{125} و ویتامین B12 نشاندارشده با CO^{57} برای اتصال به پروتئین‌هایی که دارای تعداد محدودی از مکان‌های اتصالی ویژه‌ای هستند، رقابت می‌کنند بنابراین مقدار کمپلکس رادیواکتیو با غلظت اسیدفولیک و ویتامین B12 سرم نسبت عکس دارد. بعد از طی مراحلی نمونه‌ها با محلول محتوی فاکتور داخلی خوک و پروتئین‌های متصل شونده‌ی شیر در pH=۹/۵ انکوبه شده، در نهایت بعد از سانتریفوژ کردن محلول رویی، شمارش توسط دستگاه گاماکانتر صورت گرفت. ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (TAC) به روش قدرت آنتی‌اکسیدان‌ها دراحیای یون فریک (Ferric Reducing Antioxidant Power) سنجش شد. این روش براساس توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در احیای یون فریک Fe^{+3} به یون فرو Fe^{2+} در حضور ماده‌ای به نام TPTZ استوار است و کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{2+}$ کمپلکس آبی رنگ با ماکزیموم جذب ۵۹۳ نانومتر است که میزان قدرت احیا کنندگی پلاسما یا سرم با افزایش غلظت کمپلکس فوق توسط دستگاه اتوآنالایزر به صورت اتوماتیک اندازه‌گیری می‌شود (۲۳). مالون دی‌آلدهید سرم (MDA) نیز بر پایه‌ی

واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) و به روش اسپکتروفتومتریک و مقایسه‌ی جذب با منحنی استاندارد، اندازه‌گیری شد (۲۴). برای به تایید رساندن نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگرواسمیرنوف، جهت مقایسه‌ی متغیرها بین دو گروه هیپرهموسیستئینمیا و هموسیستئین طبیعی از آزمون t-test مستقل و جهت بررسی ارتباط بین متغیرهای مورد مطالعه از ضریب پیرسون و آنالیز رگرسیون چند متغیره استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین به همراه انحراف معیار نمایش داده شدند. در این مطالعه، P <۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

بیش از نصف بیماران (۵۵/۱ درصد) دارای هموسیستئین پلاسمایی بیشتر از ۱۵ میکرومول در لیتر بودند. همه بیماران فولات و B12 سرمی طبیعی داشتند (فولات سرم بیشتر از ۳ نانوگرم در میلی‌لیتر و B12 سرم بیشتر از ۲۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر). برای تعیین ارتباط هموسیستئین با متغیرهای مورد مطالعه، افراد مطالعه برحسب هموسیستئین به دو گروه تقسیم شدند. ۳۱ بیمار با هموسیستئین پلاسمایی طبیعی، گروه ۱ و ۳۹ بیمار با هموسیستئین پلاسمایی بیشتر از ۱۵ میکرومول در لیتر، گروه ۲ را تشکیل دادند میانگین دریافت انرژی و مواد مغذی دریافتی دو گروه مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است، همانطوری که مشاهده می‌شود دو گروه مورد مطالعه از لحاظ شاخص‌های دریافت تفاوت معنی‌دار نداشتند (P >۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه‌ی دریافت انرژی و مواد مغذی دریافتی (میانگین ± انحراف معیار) در دو گروه مورد مطالعه

شاخص‌های دریافت انرژی و مواد مغذی	گروه با هموسیستئین طبیعی (Hcy کمتراز ۱۵ میکرومول در لیتر)	گروه هیپرهموسیستئینمیا (Hcy بیشتراز ۱۵ میکرومول در لیتر)	P- value
انرژی (kcal/day)	۲۵۴۳/۳۱±۵۲۳/۲۹	۲۵۱۸/۱±۶۰۷/۷	NS
پروتئین (gr/day)	۷۷/۰۸±۱۸/۵۷	۸۰/۸۹±۲۳/۳۸	NS
کربوهیدرات (gr/day)	۴۰۲/۱۵±۱۰۱/۷	۴۱۲/۹۶±۱۱۸/۱	NS
چربی تام (gr/day)	۷۱/۷۷±۱۸/۲	۶۴/۰۱±۱۸/۶	NS
ویتامین B2 (mg/day)	۱/۴۴±۰/۵۷	۱/۴۴±۰/۵	NS
ویتامین B6 (mg/day)	۰/۷۷±۰/۳۲	۰/۷۸±۰/۴	NS
فولات (µg/day)	۱۲۶±۷۷/۵۷	۱۲۲/۶۷±۱۰۷/۶۴	NS
ویتامین B12 (µg/day)	۱/۷۸±۱/۲۵	۱/۸±۰/۸۴	NS
کافئین (mg/day)	۳۲۶/۴±۱۵۹/۳۷	۳۱۳/۵۱±۱۲۰/۰۶	NS

براساس شاخص HOMA-IR، ۴۲/۹ درصد افراد مقاومت به انسولین کامل، ۷/۱ درصد بیماران دارای مقاومت نسبی انسولین و ۴۰ درصد دارای مقاومت به انسولین طبیعی بودند. نتیجه‌ی مقایسه‌ی متغیرها بین دو گروه در جدول ۲ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود بین دو گروه شاخص‌های کنترل گلایسمیک و مقاومت انسولینی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. فولات سرمی در گروه ۲ کمتراز گروه ۱ بود (P=۰/۰۲۵). ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و کراتی‌نین سرم در گروه دوم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۱ بود (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P=۰/۰۰۲). تفاوت میانگین فشارخون

دیاستولیک بین دوگروه نیز میل به معنی‌دار شدن داشت (P=۰/۰۵). براساس آزمون پیرسون، همبستگی معنی‌دار مستقیم بین هموسیستئین و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (P=۰/۰۴، r=۰/۲۴۵) و کراتی‌نین (P=۰/۰۰۲، r= ۰/۳۶۵) مشاهده شد. هموسیستئین و سن بیماران همبستگی قوی نشان دادند (P<۰/۰۰۱، r=۰/۴۳۲). هموسیستئین با فولات (r=-۰/۲۷۶)، B12 سرم (r=-۰/۲۵) و GFR (r=-۰/۳۷) نیز ارتباط منفی و معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). طول مدت ابتلا به بیماری دیابت و هموسیستئین نیز همبستگی معنی دار نشان دادند (P=۰/۰۳، r=۰/۲۵۱)(جدول۳). هموسیستئین با وزن بیماران، BMI، شاخص‌های کنترل گلایسمیک، مقاومت انسولینی و مالون دی آلدهید سرم، دریافت ویتامین‌های گروه B و کافئین ارتباط معنی‌دار نداشت (P >۰/۰۵). ولی در آنالیز رگرسیون Stepwise با استفاده از هموسیستئین پلاسما به عنوان متغیر وابسته و دیگر متغیرهای بالینی و بیوشیمیایی مورد مطالعه به عنوان متغیرهای مستقل، غلظت هموسیستئین پلاسما وابسته به سن بیماران، مقادیر سرمی کراتینین، ویتامین B12، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون دی آلدهید بود (جدول ۳).

جدول ۲: مقایسه‌ی مشخصات دموگرافیکی و متغیرهای بیوشیمیایی (میانگین ± انحراف معیار) درگروه‌های مورد مطالعه

گروه شاخص	گروه با هموسیستئین طبیعی (Hcy کمتراز ۱۵میکرومول در لیتر)	گروه هیپرهموسیستئینمیا (Hcy بیشتراز ۱۵میکرومول در لیتر)	P- value
سن (سال)	۵۴/۱±۱/۶	۵۹±۹/۸	۰/۰۱
وزن (کیلوگرم)	۷۶/۸±۱۳	۸۱±۱۲	NS
قد (متر)	۱/۶۶±۰/۰۶	۱/۶۹±۰/۰۷	NS
BMI (kg/m^2)	۲۷/۶۸±۴/۴۸	۲۷/۶۹±۳/۰۱	NS
طول مدت ابتلابه دیابت (سال)= طول مدت مصرف داروی متفورمین	۵/۲۹±۳/۴۴	۷/۱۷±۴/۳۱	۰/۰۲
فشارخون سیستولیک (mmHg)	۱۲۸/۳۸±۱۵/۲۹	۱۳۲/۳۶±۱۶/۳۴	NS
فشارخون دیاستولیک (mmHg)	۸۱/۲۹±۸/۸۴	۸۴/۷۳±۸/۶۱	۰/۰۵
قندخون ناشتا (mg/dl)	۱۴۵±۳۴/۳۸	۱۲۹/۷۶±۳۶/۳	NS
هموگلوبین گلیکوزیله (%)	۷/۵۷±۱/۵۸	۷/۷±۱/۴۷	NS
کراتی نین (mg/dl)	۰/۹۶±۰/۱۵	۱/۰۹±۰/۱۹	۰/۰۰۲
انسولین سرمی (µu/ml)	۱۱/۹۷±۷/۰۱	۱۱/۲۸±۶/۷۶	NS
HOMA-IR	۴/۲±۲/۶	۳/۶±۲/۴	NS
هموسیستئین (µmol/L)	۱۱/۹۴±۱/۴۲	۱۸/۲۳±۳/۶۵	<۰/۰۰۱
فولات سرم (ng/ml)	۶/۲±۰/۷۶	۵/۸±۰/۷۹	۰/۰۲
B12 سرم (pg/ml)	۵۲۲/۸۷±۱۱۵/۶۵	۴۹۷/۳۱±۱۱۷/۰۶	NS
مالون دی آلدهید سرم	۲/۳۳±۰/۵۹	۲/۴۵±۰/۸۹	NS
ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم	۰/۸۹±۰/۱۵	۱/۱۱±۰/۳۴	<۰/۰۰۱

جدول ۳: ارتباط هموسیستئین به عنوان متغیر وابسته با برخی از متغیرهای بالینی وبیوشیمیایی براساس آنالیز رگرسیون stepwise

متغیر*	β	P- value
سن بیماران(سال)	۰/۳۴۴	۰/۰۰۱
کراتی نین سرم (mg/dl)	۰/۳۵۱	۰/۰۰۱
B12 سرم(ng/ml)	-۰/۲۳۵	۰/۰۱۶
ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم	۰/۲۸۵	۰/۰۰۴
مالون دی آلدهید سرم	۰/۲۴۵	۰/۰۱۳

*دیگر متغیرهای وارد شده در این مدل شامل طول مدت درمان با متفورمین، وزن، BMI، فشارخون سیستولیک ودیاستولیک، گلوکز خون ناشتا، HbA1C، انسولین سرمی، شاخص HOMA-IR وفولات سرمی بود. تنها متغیرهای معنی‌دار نشان داده شده‌اند.

بحث

در این مطالعه سطح هموسیستئین در بیماران دیابتی نوع ۲ تحت درمان با داروی متفورمین بررسی شده، ارتباط آن با متغیرهای تغذیه‌ای، بالینی و بیوشیمیایی مطالعه گردید. هیپرهموسیستئینمی به‌طور ثانویه در اثر نواقص ژنتیکی، کمبود فولات و B12، الکلیسم، هیپوتیرئیدیسم، بعضی از داروها و اختلال در عملکرد کلیوی به وجود می‌آید (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر هموسیستئین پلاسما ارتباط منفی با فولات و B12 سرم داشت. این ارتباط در مطالعات قبلی هم تایید شده است (۲۷-۲۵، ۲۲، ۱۷، ۱۴، ۱۲، ۶). فولات و B12 سرم شاخص‌های تغذیه‌ای حساس برای تعیین هموسیستئین پلاسما می‌باشد. افراد دارای فولات و B12 سرمی پایین هموسیستئین بالاتری دارند (۲۷). در این مطالعه همه بیماران فولات و B12 سرمی شان در رنج طبیعی بودند (فولات سرم بیشتر از ۳ نانوگرم در میلی‌لیتر و B12 سرم بیشتر از ۲۰۰پیکوگرم در میلی‌لیتر). این مطلب نشان‌دهنده‌ی آن است که کمبود فولات و B12 یک مشکل نادر در مصرف طولانی مدت متفورمین است، به‌طوری‌که در موارد کمی، آنمی مگالوبلاستیک در بیماران درمان شده با متفورمین دیده شده است (۲۹و ۲۸). سطوح پلاسمایی هموسیستئین با بالا رفتن سن افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که با هر ۲۰ سال افزایش در سن، هموسیستئین به طور میانگین ۱/۳ میکرومول در لیتر افزایش می‌یابد (۳۰). ارتباط معنی‌دار مشاهده شده بین سن و هموسیستئین در این مطالعه در مطالعات دیگر هم دیده شده است (۲۲ و ۱۷، ۱۴). در این مطالعه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم به عنوان شاخص آنتی‌اکسیدانی و مالون دی‌آلدهید سرمی نیز به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته شد. بر اساس آزمون چندمتغیره رگرسیون هموسیستئین تام پلاسما ارتباط معنی‌داری با MDA و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نشان داد. افزایش هموسیستئین با استرس اکسیداتیو مرتبط می‌باشد، زیرا هموسیستئین مستعد اتواکسیداسیون و تولید گونه‌های فعال اکسیژن بوده، موجب اکسیداسیون LDL شده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیس‌موتاز را مهار می‌کند (۲۵ و ۶). ارتباط ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و هموسیستئین معنی‌دار و مثبت بود که احتمالاً به دلیل پاسخ انطباقی بدن به افزایش هموسیستئین باشد. این ارتباط مثبت در مطالعه‌ی وینیسوس و همکاران (۲۵) و نیز مات و همکاران (۳۱)، مشاهده شده است. ارتباط قوی بین نفروپاتی و

هموسیستئین در مطالعات دیده شده است (۲۶و ۲۲، ۱۷، ۱۶، ۱۴). تضعیف عملکرد کلیوی با افزایش هموسیستئین مرتبط می‌باشد (۳۲). تبدیل متیونین به هموسیستئین از طریق دمتیلاسیون صورت می‌گیرد، بنابراین گروه متیل با گلیکوسیامین برای تشکیل کراتی‌نین واکنش می‌دهد، پس در متابولیسم کلیه، هموسیستئین با تشکیل کراتی‌نین مرتبط می‌باشد (۳۳). اتک و الیاس پیشنهاد کرده‌اند که مدیریت هموسیستئین برای پیشگیری از اختلال عملکرد کلیوی مفیداست. افزایش هموسیستئین می‌تواند در کلیه موجب آسیب اندوتلیال میکرواسکولار و افزایش استرس اکسیداتیو گردد (۳۴). روشن کردن این مکانیسم‌ها می‌تواند موضوعی برای مطالعات آینده باشد. مطالعه‌ی حاضر هم ارتباط مثبت بین کراتی‌نین و هموسیستئین را نشان داد. بر اساس یافته‌های یک مطالعه‌ی انسانی دفع هموسیستئین در بیماران دیابتی نوع ۲ و بیماران کلیوی کاهش می‌یابد (۱۴). مطالعه‌ی حاضر ارتباط معنی‌دار آماری را بین هموسیستئین پلاسما و گلوکزخون ناشتا و HbA1C نشان نداد. در مطالعه‌ی ملیسا (۳۵) نیز بین هموسیستئین و کنترل متابولیکی بیماری دیابت ارتباطی مشاهده نشد. ولی در مطالعه‌ی جین و همکاران، هموسیستئین با HbA1C ارتباط معنی‌دار نشان داد (۱۴). در این مطالعه ارتباط معنی‌دار بین هموسیستئین و مقاومت انسولینی مشاهده نشد. این در حالی‌است که بعضی از مطالعات ارتباط مثبت را بین این دو گزارش کرده‌اند (۱۷ و ۱۵). انسولین سطوح هموسیستئین پلاسما را با کاهش فعالیت آنزیم سیستاتیونین B سنتتاز و با افزایش فعالیت آنزیم متیلن تترا هیدروفولات کبدی، افزایش می‌دهد (۱۷).

مشاهده نشدن این ارتباط در مطالعه‌ی کنونی احتمالاً به کم بودن حجم نمونه بر می‌گردد. فشارخون دیاستولیک درگروه هیپرهموسیستئینمیا نسبت به گروه با هموسیستئین طبیعی به‌طور غیر معنی‌دار بالا بود، این تفاوت میل به معنی‌دارشدن داشت (P=۰/۰۵). در مطالعات پیشین آمده است که افزایش هموسیستئین ریسک فاکتور بیماری‌های قلبی- عروقی و پرفشاری خون می‌باشد (۳۶).

نتیجه‌گیری

از نقاط قوت این مطالعه بررسی دریافت غذایی بیماران بود. ارتباطی بین دریافت ویتامین‌های گروه B و کافئین با هموسیستئین پلاسما دیده نشد. از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر می‌توان به بررسی نکردن وضعیت B6 بیماران، کم بودن تعداد شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، ارتباط هموسیستئین با فاکتورهای التهابی و دیگر شاخص‌های استرس اکسیداتیو بررسی شود و برای بیماران دیابتی نوع ۲ که دراز مدت داروی متفورمین مصرف می‌کنند، مکمل یاری فولات و ویتامین‌های گروه B صورت گیرد تا از عوارض افزایش هموسیستئین پیشگیری گردد.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز به جهت تامین اعتبار مالی این مطالعه و کلیه‌ی بیماران عزیز که در مطالعه شرکت نمودند، نهایت تقدیر و تشکر را داریم.

References

1- Franz JM. Medical nutrition therapy for diabetes mellitus and hyperglycemia of nondiabetic origin. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food and nutrition therapy. Missouri: Saunders Elsevier; 2008: 764-804.

2- Haghdoost AA, Rezazadeh-Kermani M,

Sadghirad B, Baradaran HR. Prevalence of type 2 diabetes in the Islamic Republic of Iran: systematic review and meta-analysis. *East Mediterr Health J*. 2009; 15: 591-9.

3- Hunter-Lauin C, Hudson PR, Mukherjee S, et al. Folate supplementation reduces serum Hsp70 level with type2 diabetes. *Cell stress chaperones*. 2004; 9: 344-9.

4- Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Meta.* 2000; 26: 387-92.

5- Becker A, Kostense PJ, Bos G, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with coronary events in type2 diabetes. *J Intern Med*. 2003; 253: 293-300.

6- Signorello MG, Viviani GL, Armani U. Homocysteine, reactive oxygen species and nitric oxide in type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis Res*. 2007; 120: 607-13.

7- Fishman EZ, Motro M, Tenenbuum A. Non insulin antidiabetic therapy in cardiac patients: current problems and future prospects. *Adv cardiol*.2008; 45:154-70.

8- Mustafa S, Neslihan BT, Derun E, Nedret T, Nilgun D. Effects of metformin or resiglatzone on serum concentration of homocysteine, folate and vitamin B_{12} in patients with type 2diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2007; 21: 118-23.

9- Krentz AJ, Bailey CJ. Oral Antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2005; 65: 385-411.

10- Ranjbar GH, Bazarghan O, Mehdizadeh A, Zare N, Saadat N. Serum Homocysteine in patients with type 2 diabetes that use metformin and glibenclamide. *Iranian J Diabetes Lipid Disorder*. 2004; 2: 23-30.

11- Mashavi M, Hanah R, Boaz M, et al .Effect of homocysteine lowering therapy on arterial elasticity and metabolic parameters in metformin treated diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2008; 199: 362-4.

12- Pongchaidecha M, Srikausalanukul V, Chattananon A, Tanjariyapons. Effect of metformin on plasma homocysteine, vitamin B12, folic acid: a cross-sectional study in Patients with type 2 diabetes mellitus. *J med Assos Thai*. 2004; 87: 780-7.

13- Daniel SL. Abnormal methyl metabolism in pancreatic toxicity and diabetes. *J Nutr*. 2002; 2373-76.

14- Gjin N, Adnan K, Seigmund B, et al. Circulating homocysteine levels in patients with T2D. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; 16: 66-73.

15- Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, et al. Framingham offspring study. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study. *Diabetes Care*. 2001; 24: 1403-10.

16- Victor SM, Migel V, Francisco JR, Felix G, Joaguin M, Raimundo G. Elevated plasma

homocysteine levels in hyperinsulinemic obese subjects. *J Nutr Biochem*.2002; 13:75-9.

17- Yumi M, Akira K, Akatuski K, Masoa Y, Nobuki F, Yutaka T. Factors associated with serum total homocysteine level in type 2 diabetes. *Environ Health Prev Med*. 2008; 13:148-55.

18- Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of streptozotocin – induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes*. 1998; 47: 1967-70.

19- Agullo- Ortuno MT, Albaladejo MD, Parra S. Plasmatic homocysteine concentration and its relationship with complications associated to diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2002; 326: 105-12.

20- Mattews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985; 28: 412-9.

21- Cockroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1967; 16: 31-41.

22- Russo GT, Benedetto AD, Giorda C, et al. Correlates of total homocysteine plasma concentration in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 197-204.

23- Iris F, Benzie F, Strain S. The ferric reducing antioxidant assay. *Methods Enzymol*.1999; 292:15-27.

24- Janero D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1998; 9: 515-40.

25- Vinicius D, Areuza V, Altair JM, Decio SB , Rosana AM, Teimi M. Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Nutrotion*. 2007; 23: 242-7.

26- Ilhan T, Berrin C, Zeynep C, PinarT, Aysen A, Bakir K. Homocysteine concentration in type2 diabetic patients with silent myocardial ischemia. *J Diabetes Complications*. 2004; 18:165-8.

27- Fakhrzadeh H, Ghotbi S, Pouebrahim R, et al. Total plasma homocysteine, folate and vitamin B12 status in healthy Iranian adults: the Tehran homocysteine survey (2003-2004)/a cross-sectional population based study. *BMC Public Health*. 2006; 6: 29.

28- Aarsand AK, Carlsen SM. Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long term metformin treatment. *J Inern Med*. 1998; 244: 169-74.

29- Callaghan TS, Hadden DR, Tomkin GH. Megaloblastic anemia due to vitamin B12 malabsorption associated with long term metformin treatment. *Br Med J*. 1980; 17: 1214-15.

30- Stein JH, Bride P. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening and treatment. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 1301-06.

31- Moat SJ, Hill MH, Mcdowell IFW, et al. Reduction in plasma total homocysteine through increasing folate intake in healthy individuals is not associated with changes in measures of antioxidant activity or oxidant damage. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57: 483-9.

32- Ozmen B, Ozmen D, Turgan N, Habif S, Mutaf I, Bayindir O. Association between homocysteine and renal function in patients with type 2diabetes. *Ann Clin Lab Sci*. 2002; 32: 279-86.

33- Mudd Sh, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism*. 1975; 24: 721-35.

34- Elias AN, Eng S. Homocysteine concentrations in patients with diabetes mellitus-relationship to microvascular and macrovascular disease. *Diabetes Obes Metab*. 2005; 7: 117-21.

35- Melissa S, Wei-hsun Ch, Savitri KK, et al. Total homocysteine, Diet, and lipid profiles in type1 and type2 diabetic and non diabetic adolescents. *J Cardiovasc Nurs*. 2006; 21: 47-55.

36- Danvahi R, Falkner B. Relationship of homocysteine with cardiovascular disease and blood pressure. *J Clin Hypertens*. 2004; 6: 494-8.

Evaluation of the Level of Plasma Homocysteine in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus under Metformin Treatment and its Correlation with Serum Total Antioxidant Capacity, Malondialdehyde, Creatinine, Insulin Resistance and Glycemic Control

Aghamohammadi V[1], Pourghassem Gargari B[1], Aliasgharzadeh A[2]

[1]Nutritional Research Center, Dept. of Biochemistry & Nutrition, Faculty of Health &Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

[2]Faculty of Medicine, Endocrine and Metabolism Section, Imam Reza Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

***Corresponding Author*:** Pourghassem Gargari B, Nutritional Research Center, Dept. of Biochemistry& Nutrition, Faculty of Health & Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

***E-mail*:** pourghassemb@tbzmed.ac.ir

Received: 7 Jun 2010 **Accepted:** 15 Nov 2010

***Background and Objective*:** In patients with diabetes, elevated homocysteine levels have been reported to be associated with endothelial dysfunction, insulin resistance, dyslipidemia, poor control of disease, nephropathy, macroangiopathy and oxidative stress. Thus, this observational study was performed to determine the plasma homocysteine level and its correlation with clinical, biochemical and nutritional variables.

***Materials and Methods*:** This study was performed on 70 men with type 2 diabetes under metformin (at least 1500 mg daily) treatment. Regarding plasma homocysteine, patients were divided into two groups: 31patients with normal homocysteine (group 1: Hcy<15 µmol/L) and 39 patients with hyperhomocysteinemia (group 2: Hcy>15 µmol/L).

Results: 55.1% patients had hyperhomocysteinemia but none of them had folate and B12 deficiency. Significant differences between the two groups were found for serum folate, total antioxidant capacity and creatinine. No differences were found for insulin resistance and glycemic control. Multiple stepwise linear regression analysis using plasma homocysteine as a dependent variable and all other clinical and laboratory parameters as independent variables indicated that age (β=0.344), creatinine (β=0.351), vitamin B12 (β=0.235), total antioxidant capacity (β=0.285) and malondialdehyde (β=0.245) were independently associated with homocysteine concentration. No correlation was found between the homocysteine and glycemic control, HOMA-IR and intake of B vitamins and caffeine.

***Conclusion*:** Further studies with a large sample size are required to assess the association of plasma homocysteine with total antioxidant capacity and other biomarkers of oxidative stress in type2 diabetes.

Keywords: Homocysteine, Glycemic control, Insulin resistance, Type II Diabetes Mellitus, Total Antioxidant capacity