KUFA UNIVERSITY
COLLEGE OF
MEDICINE

OXIDATIVE STRESS IN DIABETES MELLITUS

A THESIS
SUBMITTED TO THE COLLEGE OF MEDICINE
KUFA UNIVERSITY AS A PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN
BIOCHEMISTERY

BY
DHAFIR QAHTAN SAAED AL-AMEEN
B.Sc. PHARMACY 1994
BAGHDAD UNIVERSITY

SUPERVISOR
Dr. HAMZA JASIM MOHAMMED

2008

Acknowledgements

First of all, thanks God for giving me strength and health to complete this work and get this degree.

I would like to introduce my deep gratefulness to my supervisor Dr. Hamza Jasim for his guidance and kindness throughout my study.

This work has been produced under the admirable and professional guidance of Dr. Majid Kadhum to whom I would like to express my deepest thankfulness. It has been an opportunity for me gaining his experience, learning the milestone of the scientific work principles, during these years.

I am deeply thankful to the president of Kufa University, Prof. Dr. Abdul-Razzak Abdul-Jaleel for his fairness and generosity.

I want to thank the staff of the Department of Biochemistry, College of Medicine, Kufa University, particularly the head of the Department, Dr. Ahmed Almuhana for his kind, support, attention, cooperation and notification during the work.

I am so thankful to Miss Muna Abdul-Redha for all her scientific knowledge, kind and patience.

My deepest thank to Babylon Pediatrics and Maternity Hospital and Marjan Specialized Hospital, especially the staff of biochemistry laboratories.

I am so grateful to my partner in soul and my life companion; my wife Shafaq Al-Azzawi for her support and help.

I would like to express sincere gratitude to my parents, my brothers; Ali, Kais and Ziad and my beloved sisters; Suhair and Zeena.

Dhafir

Contents:

Chapter One: Introduction and literature review	
Introduction	1
1.1. Diabetes Mellitus	2
1.1.1. Insulin	3
1.1.2. Regulation of blood glucose	4
1.1.2.1. After a meal - the role of insulin	4
1.1.2.2. Fasting - the role of glucagon	6
1.1.3. Classification of diabetes mellitus	8
1.1.3.1. Type I diabetes	9
1.1.3.2. Type II diabetes	9
1.1.3.3. Secondary diabetes	9
1.1.3.4. Gestational diabetes	10
1.1.3.5. Impaired glucose tolerance (IGT)	10
1.1.4. Diabetic complications and their pathogenesis	10
1.1.4.1. Acute complications	11
1.1.4.2. Chronic complications	12
1.1.4.2.1. Diabetic retinopathy	12
1.1.4.2.2. Neuropathy	13
1.1.4.2.3. Nephropathy	14

1.1.4.2.4. Cardiovascular morbidity and mortality	14
1.1.4.2.5. Infections	15
1.2. Oxidative stress	15
1.2.1. Free radicals	16
1.2.1.1. Generation of free radicals	17
1.2.1.2. Production and consumption of oxidants	19
1.2.2. Chemical and biological effects of oxidative stress	19
1.2.2.1. Oxidative damage to lipid	20
1.2.2.2. Oxidative damage to protein	22
1.2.2.3. Oxidative damage to DNA	23
1.2.3. Causes of oxidative stress	24
1.2.3.1. Toxic agents	24
1.2.3.2. Disease and tissue injury	25
1.2.3.3. Environmental air pollutants	25
1.2.4. Antioxidant protection	26
1.2.4.1. Dietary antioxidants	26
1.2.4.1.1. Ascorbic acid	26
1.2.4.1.2. Tocopherol	27
1.2.4.2. Endogenous antioxidants	27
1.2.4.2.1. Reduced glutathione (GSH)	27

1.2.4.2.2. Glutathione peroxidase	30
1.2.4.2.3. Glutathione reductase	30
1.2.4.2.4. Catalase	30
1.2.4.2.5. Superoxide dismutase (SOD)	31
1.2.5. Oxidative stress and human diseases	31
1.2.5.1. Atherosclerosis and heart disease	32
1.2.5.2. Cancer	32
1.2.5.3. Pulmonary disorders	33
1.2.6. Oxidative stress in diabetes mellitus	34
The aims of the work	37
Chapter Two: Materials and methods	
2.1. Chemicals	38
2.2. Apparatus and equipment	39
2.3. Patients and control group	39
2.4. Collection of samples	40
2.5. Methods	40
2.5.1. Determination of serum reduced glutathione (GSH)	40
2.5.2. Determination of malondialdehyde (MDA)	42
2.5.3. Determination of serum glutathione peroxidase (GPx)	44
2.5.4. Biostatistical analysis	46

Chapter Three: Results and discussion	
3.1. Measurement of GSH, MDA and GPx in diabetic patients and control group.	47
3.2. Sex differences of GSH, MDA and GPx in diabetic patients**.**	49
3.3. Relevance of ages of diabetics with GSH, MDA and GPx**.**	49
3.4. Influence of body mass index (BMI) on GSH, MDA and GPx values in diabetic patients.	51
3.5. Modulation of GSH, MDA and GPx values in diabetic patients due to complications.	52
3.6. GSH, MDA and GPx values dependency on duration of diabetes mellitus.	54
3.7. Treatment relationship with GSH, MDA and GPx levels in diabetes mellitus.	55
Conclusions	74
References	75

Abbreviations

A ……………………………….	Absorbance
ADP……………………………..	Adenosine diphosphate
AGE ……………………………	Advanced glycosylation end product
ADS ……………………………	Antioxidant defense system
ALP ……………………………	Alkaline phosphatase
ANOVA ………………………...	Analysis of variance
ATP ……………………………	Adenosine triphosphate
BMI ……………………………	Body Mass Index
DM …………………………….	Diabetes mellitus
DKA ……………………………	Diabetic ketoacidosis
DTNB …………………………	5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA …………………………	Ethylenediamine tetra acetic acid
FAD ……………………………	Flavin mononucleotide
FFA ……………………………	Free fatty acid
g ……………………………….	Gram
GPx ……………………………	Glutathione peroxidase

GSH ……………………………	Reduced glutathione
GSSG …………………………..	Oxidized glutathione
GST ……………………………	Glutathione S-transferase
HDL ……………………………	High density lipoprotein
IGT ……………………………	Impaired glucose tolerance
KD ……………………………	Kilo Dalton
L ………………………………..	Liter
LDL ……………………………	Low density lipoprotein
LPO ……………………………	Lipid peroxidation
MDA …………………………	Malondialdehyde
ml ………………………………	Milliliter
µl ………………………………..	Microliter
µM ……………………………	Micromolar

NADPH …………………………	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NKHS ……………………………..	Non-ketotic hyperosmolar state
NIDDM …………………………	Non insulin dependant diabetes mellitus
NOS ………………………………	Nitric oxide synthase
8-OHdG …………………………	8-hydroxydeoxyaguanosine
nm ……………………………….	Nanometer
PKC ………………………………	Protein kinase C
PUFA ……………………………	Poly unsaturated fatty acid
r …………………………………..	Correlation coefficient
ROS ………………………………	Reactive oxygen species
SD ………………………………	Standard deviation

SOD ………………………………	Superoxide dismutase
TBA ………………………………	Thiobarbituric acid
TCA ………………………………	Trichloro acetic acid
TNFs ………………………………	Tumor necrosis factors
VLDL ……………………………..	Very low density lipoprotein

Abstract

The present study was conducted to verify the oxidative stress status in diabetes mellitus (DM). To achieve this aim, 20 patients of type I, 70 patients of type II, and 46 healthy subjects (control group) were subjected to the study. The results showed significant ($p<0.001$) decrease of reduced glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) levels and significant ($p<0.001$) increase malondialdehyde (MDA) levels in both types of DM when compared with those of the control group and the extent of oxidative stress status changes was higher in type II when compared with type I diabetic patients. The linear regression analysis demonstrated significant ($r = 0.44\text{-}0.46$, $p<0.01$) negative correlation for GSH and GPx values respectively and significant ($r = 0.42$, $p<0.01$) positive correlation for MDA values with age of diabetic patients. The same analysis indicated significant ($r = 0.54\text{-}0.36$, $p<0.01$, $p<0.05$) negative correlation for GSH and GPx values respectively and significant ($r = 0.54$, $p<0.01$) positive correlation for MDA values with duration of disease. The results showed significant ($p<0.05$) decrease in GSH and

GPx values and significant ($p<0.05$) increase in MDA levels in obese patients when compared with non obese diabetic patients. The results also demonstrated significant ($p<0.01$) decrease in GSH and GPx values and significant ($p<0.05$) increase in MDA levels in complicated patients when compared to those of non complicated diabetic patients. The evaluation of sex differences and type of treatments did not exhibit significant variation in diabetic patients.

The results indicate that diabetes mellitus is associated with oxidative stress.

جامعة الكوفة
كلية الطب

الإجهاد التأكسدي
لدى مرضى
داء السكري

رســالة

مقدمة إلى عمادة كلية الطب في جامعة الكوفة

كإستكمـال جزئي لمتطلبـات نيـل درجة الماجستيـر

في الكيمياء الحياتية

من قبل

ظافر قحطان سعيد الأمين

بكالوريوس علوم صيدلة

جامعة بغداد ١٩٩٤

إشراف

الدكتور حمزة جاسم محمد

٢٠٠٨

الخلاصة

تم تصميم الدراسة الحالية للتحقق من تغيرات الإجهاد التأكسدي عند مرضى داء السكري . شملت الدراسة ٢٠ مريض من النوع الأول و ٧٠ مريض من النوع الثاني لمرض داء السكري و ٤٦ شخص سوي بوصفهم مجموعة سيطرة . تم تقدير مستويات الكلوتاثايون المختزل ، مالون ثنائي الألديهايد و كلوتاثايونبيروكسيدايز في أمصال المرضى ومجموعة السيطرة . وجد نقصان ملحوظ ($p<0.001$) في مستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز مع زيادة ملحوظة ($p<0.001$) في مستوى مالون ثنائي الألديهايد لدى المرضى من كلا النوعين عند مقارنتها مع مثيلاتها في مجموعة السيطرة .كما أظهرت النتائج أن نسبة التغير في حالة الإجهاد التاكسدي كانت أكثر لدى النوع الثاني عند مقارنتها بالنوع الأول لمرضى داء السكري، حيث وجد نقصان ملحوظ ($p<0.05$) في مستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز مع زيادة ملحوظة ($p<0.05$) في مستوى مالون ثنائي الألديهايد لدى النوع الثاني مقارنة بالنوع الأول. اظهر تحليل الانحدار الخطي ارتباطاً معنوياً ($r = 0.44, 0.46, p<0.01$) سالباً لمستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز وارتباطاً معنوياً ($r = 0.42, p<0.01$) موجباً لمستوى مالون ثنائي الألديهايد مع أعمار مرضى داء السكري. واظهر نفس التحليل على ارتباط معنوي ($r=0.54,0.36, p<0.01, p<0.05$) سالب في مستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز على التوالي مع ارتباط معنوي ($r =0.54, p<0.01$) موجب في مستوى مالون ثنائي الألديهايد لدى المرضى نسبة

إلى طول الفترة الزمنية للمرض. أظهرت النتائج وجود نقصان ملحوظ (p<0.0٥) في مستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز مع زيادة ملحوظة ($p<0.05$) في مستوى مالون ثنائي الألديهايد لدى المرضى المصابين بالسمنة مقارنة مع المرضى أصحاب الأوزان الطبيعية. كما أظهرت النتائج وجود نقصان ملحوظ (p<0.0١) في مستويات الكلوتاثايون المختزل و كلوتاثايونبيروكسيدايز مع زيادة ملحوظة ($p<0.05$) في مستوى مالون ثنائي الألديهايد لدى المرضى المصابين بالمضاعفات الناتجة من المرض مقارنة بالمرضى الغير مصابين بهذه المضاعفات . ولم يظهر تقويم الفرو قات الجنسية أو نوع العلاج الذي يستعمله مرضى داء السكري تغيرات ملحوظة في مستويات الإجهاد التأكسدي لدى هؤلاء المرضى.

توضح النتائج إن هناك دور لمرض داء السكري في زيادة حالة الإجهاد التأكسدي.