

Klinički centar Niš, Dečja klinika¹
 Institut za zaštitu dece i omladine Vojvodine Novi Sad²
 Medicinski fakultet Niš, Institut za biohemiju³
 Klinički centar Niš, Klinika za endokrinologiju⁴

Originalni naučni rad
Original study
 UDK 616.379-008.64-02
 DOI:10.2298/MPNS0810458Z

ZNAČAJ OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU DIJABETESA TIP 1 - ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE U LIMFOCITIMA OBOLELIH

*THE IMPORTANCE OF OXIDATIVE STRESS IN PATHOGENESIS OF TYPE 1 DIABETES -
 DETERMINATION OF CATALASE ACTIVITY IN LYMPHOCYTES OF DIABETIC PATIENTS*

Saša ŽIVIĆ¹, Jovan VLAŠKI², Gordana KOCIĆ³, Milica PEŠIĆ⁴, Vesna ĆIRIĆ¹ i Zlatko ĐURIĆ¹

Sažetak - Tip 1 dijabetesa je prototip autoimune bolesti sa intenzivnim oksidativnim stresom. Oksidativni stres podrazumeva poremećaj dinamičke ravnoteže prooksidanata i antioksidanata, bilo zbog povećane produkcije slobodnih radikala kiseonika, bilo zbog smanjenja antioksidativne aktivnosti sistema. Antioksidativni enzim katalaza smanjuje produkciju slobodnog radikala vodonik-peroksida, koji može da bude veoma toksičan za ćelije pankreasa. Naša studija uključuje 40 dece sa tipom 1 dijabetesa. Analizirali smo aktivnost katalaze u limfocitima u različitim fazama bolesti: na početku dijabetesa, u periodu remisije i kasnije u hroničnoj fazi bolesti. Postoji signifikantno uvećanje aktivnosti katalaze u svim fazama bolesti ($p < 0.00001$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Najviša aktivnost katalaze pojavljuje se u ranom toku bolesti ($p < 0.05$), što je praćeno daljim linearnim smanjenjem aktivnosti u hroničnom toku dijabetesa. Sa pogoršanjem metaboličke kontrole aktivnost katalaze postaje veća uz statističku značajnost od $p < 0.05$. Veća rezidualna beta ćelijska sekrecija udružena je sa manjom aktivnošću katalaze. Dakle, aktivnost katalaze je u direktnoj korelaciji sa nivoom GHbA1 ($r = 0.895$) i inverznoj sa nivoom C-peptida ($r = -0.945$). Signifikantno uvećanje aktivnosti katalaze u svim fazama dijabetesa tipa 1 indirektno potvrđuje značaj oksidativnog stresa u nastanku bolesti. Aktivacija katalaze verovatno je sekundarni fenomen. Činjenica da je aktivnost katalaze najveća na početku dijabetesa može imati i prediktivnu vrednost.

Cljučne reči: Diabetes mellitus, tip 1; Oksidativni stres; Katalaza; Dete; Prediktivna vrednost testova

Uvod

Slobodni radikali kiseonika (KSR) podrazumevaju 4 potentna i toksična molekula: superoksidni anjon radikal, vodonik-peroksid, hidroksidni radikal i singletni kiseonik.

Superoksidni anjon radikal nastaje u mitohondrijama redukcijom kiseonika jednim elektronom. Ovaj radikal ima dominantno štetno dejstvo: indukuje lipidnu peroksidaciju i oštećuje ćelijske membrane. U fiziološkim uslovima ne izaziva toksične efekte jer ga enzim superoksid-dismutaza (SOD) transformiše u manje aktivan vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid se u ćelijama obrazuje redukcijom molekula kiseonika sa 2 elektrona, pri čemu je reakcija katalizovana brojnim oksidazama. Iako se ne može definisati kao slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona, i mada predstavlja najstabilniji intermedijarni produkt redukcije kiseonika, vodonik-peroksid takođe iskazuje brojne toksične efekte. To se pre svega odnosi na poremećaj u depopovanju kalcijuma u mitohondrijama, sa konsekvativnim nagomilavanjem kalcijuma u citosolu i gubitkom sulfhidrilnih grupa proteina: ovo je kritičan događaj u genezi ćelijskih oštećenja u oksidativnom stresu. Relativno visoke koncentracije vodonik-peroksida se oslobađaju na mestu bilo koje inflamacije ali i u različitim neinflamatornim ćelijama (fibroblasti, hondrociti, endotel) pod dejstvom citokina kakvi su npr. IL-1 ili TNF- α . Ćelije takođe imaju mogućnosti i da se štite od vodonik-peroksida snažnim enzimskim sistemima: katalazom u peroksizomima i glutation-peroksidazom u mitohondrijama [1]. Hidroksilni radikal je najreaktivniji inter-

medijarni produkt delimične redukcije kiseonika. Ako se vodonik-peroksid ne ukloni katalazom, može da reaguje sa fero jonima i formira potentnije KSR, kakav je hidroksilni radikal (Fentonova reakcija). On, *in situ*, oštećuje mitohondrijalnu membranu (izazivajući gubitak produkcije ATP i energije), oštećuje DNA, oštećuje membranu ćelije modifikujući membranske proteine i izaziva lipidnu peroksidaciju - sve ovo je dovoljno za ireverzibilno uništenje ćelije [2]. Singletni kiseonik nastaje dovodenjem energije u kiseonik sa ciljem menjanja spina jednog od elektrona, što značajno uvećava njegovu reaktivnost. Takođe može da iskaže značajnu toksičnost u različitim biološkim sistemima.

Velika toksičnost KSR uslovljava je tokom evolucije razvoj vrlo efikasnog sistema antioksidativne zaštite. Primarna se ostvaruje redukovanjem kiseonika do vode uz pomoć 4 elektrona i citohrom-oksidade, a bez KSR kao međuprodukta. Sekundarna zaštita je posredovana enzimima: superoksid-dismutazom, glutation - peroksidazom, glutation-S-transferazom i katalazom. Tercijerna zaštita je omogućena malim antooksidativnim molekulima: vitaminima E, A, C, redukovanim glutationom, cisteinom, glukozom, bilirubinom, albuminom, transferinom i ceruloplazminom [3].

Dejstvo antioksidativnih enzima je različito. Superoksid-dismutaza katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid. Katalaza razgrađuje vodonik-peroksid do molekularnog kiseonika i vode. Ovaj detoksikacioni mehanizam je vrlo potentan s obzirom na širinu rasprostranjenosti katalaze i posebno efikasan ukoliko dolazi do stvaranja velike količine

Skraćenice

KSR - slobodni radikali kiseonika

vodonik-peroksida [4]. Glutation - peroksidaza sa selenom kao svojom integralnom komponentom, ima ulogu u redukciji vodonik-peroksida ali i drugih hidroperoksida. Glutation-S-transferaza obavlja detoksifikaciju mnogih toksičnih produkata kiseonika, ksenobiotika, karcinogena i hepatičnih toksina.

Narušavanje dinamičke ravnoteže između (pro) oksidanata i antioksidanata, bilo zbog povećanog stvaranja KSR, bilo zbog smanjene potencije antioksidanata (enzima) uzrok je tzv. oksidativnog stresa.

Lipidna peroksidacija predstavlja najizraženiji negativan fenomen u delovanju KSR: autokatalitički, progredijentan i najčešće ireverzibilan. Za inicijaciju ovog procesa odgovoran je hidroksilni radikal, manje i vodonik-peroksid. Karakteriše se peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina sa konsekvativnom dekompenzacijom svih masnih kiselina i delipidacijom biomembrana, što remeti biološku organizaciju ćelije i dovodi do njene smrti. Visoko reaktivni sekundarni produkti lipidne peroksidacije reaguju sa slobodnim SH i NH₂ grupama amino kiselina, peptida, proteina i nukleotida, što modifikuje funkcije ovih makromolekula. Tako oksidacija tiolnih grupa enzima inaktivise enzime, cepanje DNA je razlog mutacija i kancerogeneze i sl. [2].

Pored dobro poznate uloge KSR u lipidnoj peroksidaciji i oštećenju tkiva, evidentno je da KSR mogu da imaju i važne biološke uloge: u procesima rasta (proliferacije i diferencijacije) - odnosno smrti ćelije. Vodonik-peroksid, vezujući se za iste receptore kao i prirodni faktori rasta i aktivirajući neke transkripcione faktore, može da ima ulogu modulatora različitih intraćelijskih signala. Mnoge ćelije, bilo spontano ili nakon citokinske stimulacije, proizvode male količine KSR, a pre svih vodonik-peroksid [5]. Dodavanje katalaze, koja uklanja vodonik-peroksid iz kulture ćelija, ne samo da inhibira proliferaciju ćelija, već i direktno uslovljava njenu smrt - odnosno apoptozu. Drugim rečima, čini se da propagacija ćelijskog ciklusa, koja je fino balansirana odnosom proliferacije (diferencijacije) i apoptoze, upravo jeste u funkciji KSR! Moguće je da su normalne ćelije uvek "aktivno suicidalne", ali da preko KSR dobijaju onaj *messenger* životni signal, neophodan za očuvanje integriteta ćelije [6]. Očigledno je dakle, da pored različitih hormona i citokina i KSR mogu da imaju ulogu u mehanizmu kontrole i regulacije proliferacije - identične čak onim koje imaju i prirodni faktori rasta!

Danas je gotovo nediskutabilno da je juvenilni dijabetes prototip patološkog stanja sa intenzivnim oksidativnim stresom. Dakle, ne samo da KSR mogu da imaju ulogu u nastanku hroničnih komplikacija dijabetesa [7], već će ovi toksični molekuli možda presudno uticati i na sam nastanak juvenilnog dijabetesa!

Pojačano stvaranje slobodnih radikala kiseonika u ranom toku juvenilnog dijabetesa posledica je ekscitativne citokinske stimulacije. Citokini Th1 profila (interferon- γ i interleukin-2) ne samo da su uključeni u "ćelijsku" imunost i zapaljenje - s obzirom da aktiviraju mnoge citotoksične i inflamatorne mehanizme, već i snažno stimulišu produkciju svih slobodnih radikala, pogotovo superoksidnog anjon radikala i vodonik-peroksida. Potencija u generisanju ovih radikala utoliko je veća ukoliko više citokina deluje sinergistično (npr. IL-1 + TNF- α + INF- γ), što je i neosporna činjenica u periodu inicijacije dijabetesa [8].

Mehanizmi oštećenja β -insularnih ćelija u ekscesu KSR su višestruki. Pod dejstvom KSR dolazi do peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina sa stvaranjem lipidnih radikala koji sa molekularnim kiseonikom daju lipidni peroksid i lipidne hidroperoksid radikale. Ove molekule mogu da deluju toksično na β -insularne ćelije na najmanje dva načina.

Primarno dovode do dekomponovanja masnih kiselina i delipidacije biomembrana, što remeti biološku organizaciju ćelije i dovodi do njene smrti. Visoko reaktivni sekundarni produkti lipidne peroksidacije reagujući sa slobodnim SH i NH₂ grupama aminokiselina, peptida i nukleotida, uslovljavaju i poremećaj funkcije ovih makromolekula. Ovakva intraćelijska proteinska oksidacija predstavlja, pored lipidne peroksidacije, drugi najtoksičniji fenomen delovanja KSR. Oksidacija β -ćelijske DNA pogubna je za njenu dalju sudbinu [9].

Sa druge strane, toksični slobodni radikali kiseonika mogu da *in situ*, ali i migrirajući u okolinu inhibiraju čitav niz važnih ćelijskih enzima kakvi su mikrozomalna glukozo-6-fosfataza, membranska Ca/Mg-aktivirana ATP-aza ili Na/K-aktivirana ATP-azna pumpa.

Sama hiperglikemija koja se postepeno konstituise kroz period predijabetesa, dodatno uvećava produkciju KSR, amplifikujući dalje oštećenje β -ćelija. Termin "autoksidativna glikozilacija" opisuje sposobnost hiperglikemije da redukuje molekularni kiseonik i indukuje nastanak KSR [10].

Katalaza je jedan od najaktivnijih i najrasprostranjenijih enzima u humanoj biohemiji uopšte. Najveća ekspresija ovog enzima je u jetri, zatim u bubrežima. I limfna tkiva su relativno bogata katalazom [1]. Uglavnom je locirana u citosolu, tačnije u peroksizomima: bilo kao solubilna forma, bilo kao forma vezana za membrane. Predstavlja hemohromoproteid - tetramer sastavljen od 4 subjednice sa hemom i trovalentno vezanim gvožđem.

Pokazano je da vodonik-peroksid može da bude direktno toksičan za ćelije pankreasa [11]. Rani i duboki oksidativni stres u bilo kojem organu, a posebno u pankreasu, dovodi i do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima (verovatno kompenzatorno), katalaze pre svega [12]. Uopšte, pojačani oksidativni stres u hronologiji nastanka tipa I dijabetesa zauzima rano i važno mesto: stoga će i

elevacija katalazne aktivnosti biti rani marker nastupajuće bolesti [13]. Tako je sasvim evidentno da na početku razvoja tipa I dijabetesa postoji najmanje dvostruko uvećanje celularne antioksidativne zaštite [14]. Povećanje aktivnosti katalaze u ranom toku bolesti može da bude i posledica terapijske administracije insulina, obzirom da se pokazalo da je insulin snažan induktor katalazne ekspresije [15]. Što je metabolička kontrola bolesti slabija, biće manja i antioksidativna zaštita, odnosno manja aktivnost katalaze [16]. Ovo još jednom upućuje na važnost promptnog postizanja optimalne glikoregulacije na početku juvenilnog dijabetesa. Stoga neuspeli organizma da elevira katalaznu aktivnost može da bude odgovoran za iskazivanje direktnih toksičnih efekata slobodnih radikala (nastalih kao posledica influksa inflamatornih ćelija u insule) sa posledičnom β -ćelijskom destrukcijom i nastankom tipa I dijabetesa. Eksperimentalno dodavanje katalaze u kulturu β -ćelija povećava procenat neoštećenih β -ćelija i na taj način značajno redukuje insulitis [17].

Nema sumnje da katalaza uklanjajući vodonik-peroksid iz tkiva primarno prevenira navedena toksična oštećenja. Međutim, s obzirom na važnu biološku ulogu slobodnih radikala kiseonika (pa i vodonik-peroksida) u kontroli proliferacije i diferencijacije ćelije (odnosno njene apoptoze), hiper ekspresija katalazne aktivnosti može da ima i sasvim drugačije, "neprotektivno" dejstvo. Potpunim uklanjanjem vodonik-peroksida, koji u stvari predstavlja vitalan signal neophodan za očuvanje integriteta ćelija - inače imanentno "aktivno suicidalnih", hiperaktivna katalaza može da vodi ćelije u smrt - apoptozu [18]. Na ovaj način povećana aktivnost katalaze remeti suptilan balans proliferacije (diferencijacije) i apoptoze ćelija. Pojačana ekspresija katalaze može da ima i druge negativne efekte. Umerena produkcija vodonik-peroksida menja (smanjuje) senzitivnost na potencijalno toksično dejstvo TNF- α , redukujući bioaktivnost ovog citokina za više od 60%. Udeo TNF- α u nastanku inicijalne destrukcije β -insularnih ćelija veoma je značajan.

Cilj rada bio je da pokaže da li određivanje biološki najrasprostranjenijeg antioksidativnog enzima katalaze, ovog puta u limfocitima obolelih, može da ukaže na ulogu oksidativnog stresa u nastanku dijabetesa tpa I. Takođe, bilo je potrebno ispitati i prediktivni značaj određivanja ovog enzima.

Materijali i metode

Serija dece obolele od juvenilnog dijabetesa imala je 40 članova, selektiranih u istraživanju u petogodišnjem periodu. Kod sve dece, bolest je dijagnostikovana, lečena i praćena na Endokrinološkom odeljenju Dečje klinike KC u Nišu. Dijagnoza se postavljala u skladu sa preporukama *National Diabetes Data Group*, prihvaćenih od Svetske zdravstvene organizacije [19]. Uzrast dece kretao se u granicama 3,7 godina do 15,7 godina, uz srednje uzrasno doba od 9,09 godina. Distribucija po polu

bila je uravnotežena, dečaka tek nešto više (22 ili 55%) nego devojčica (18 ili 45%).

Sva obolela deca imala su tri vremenski precizno determinisane kontrolne tačke. Prva evaluacija se obavljala unutar prvih 10 dana po dijagnostikovanju bolesti. Drugo testiranje se obavljalo onda kada su postojale naznake remisije (potrebe za insulinom manje od 0,5 IU/kg, dominantna normoglikemija i aglikozurija, potpuni klinički oporavak), obično u periodu 2,5-4,5 meseci nakon početka bolesti. Poslednja obrada u ovom istraživanju dešavala se u stabilnom, hroničnom toku bolesti, nakon izlaska iz perioda remisije, najranije 14 meseci nakon razbolevanja.

Kontrolnu grupu činile su polno i uzrasno prilagođene grupe dece za svaki ispitivani enzim ponasob.

Limfociti su se izdavajali uz gradijent *Lymphoprep-a* (Nyegard and Co, Oslo). Aktivnost katalaze u limfocitima je određivana metodom Gotha iz 1991. godine. Bazirana je na spektrofotometrijskom merenju vodonik-peroksida koji sa amonijum-molibdatom formira stabilni kompleks. Inkubira se 0,2 ml limfocita sa 1 ml supstrata (65 mol/ml vodonik-peroksida u 60 mmol/l Na,K fosfatnog pufera pH=7,4) 5 minuta na 37° C. Reakcija se prekida dodavanjem amonijum-molibdata 32,4 mmol/l. Intenzitet žutog kompleksnog jedinjenja, nastalog između molibdata i vodonik-peroksida, određivan je na 405 nm prema kontroli reagensa. Aktivnost katalaze je izražavana kao kU/mg proteina, gde je K konstanta reakcije prvog reda. Jedna jedinica katalaze razloži 1 mol H₂O₂/1 min pod optimalnim uslovima.

Obrada dobijenih numeričkih vrednosti učinjena je uz pomoć standardnog kompjuterskog programa iz *Microsoft* paketa *EXCEL XP*. Podrazumevala je dobijanje srednjih vrednosti, standardne greške, standardne devijacije, koeficijenta varijacije i t-testa statističke značajnosti. Takođe su predstavljene i korelacije ispitivanih parametara, uz određivanje signifikantnosti ovakvih korelacija.

Rezultati

Kod 36 dece kontrolne grupe srednja vrednost aktivnosti katalaze bila je 25,94, sa standardnom devijacijom od 13,58 i koeficijentom varijacije od 52%, što govori o relativno maloj disperziji podataka, odnosno o činjenici da je kontrolna grupa dobro selekcionisana a dobijene srednje vrednosti reprezentativne.

Aktivnost katalaze dece obolele od tipa I dijabetesa u svim fazama bolesti statistički je visoko signifikantno veća ($p < 0,00001$) nego kod zdrave dece.

Karakteristično je i kretanje aktivnosti katalaze obolele dece kroz različite i lako prepoznatljive faze tipa I dijabetesa: u trenutku razbolevanja, zatim u fazi remisije i, na kraju, u periodu nakon izlaska iz remisije (Tabela I).

Postoje statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze unutar različitih faza bolesti: signifikantno

Tabela 1. Aktivnost enzima kroz različite faze juvenilnog dijabetesa**Table 1.** Enzyme activity through various phases of juvenile diabetes

Grupa Group	Broj isпитanika No of subjects	Srednja vrednost Mean value	SD	CV	p:kontroli Controls	p:1	p:2
Katalaza Catalase	1 2	40 40	58,55 46,59	30,85 19,76	53% 42%	0 0	0,02
	3	40	44,1	16,87	38%	0	0,01 0,28
	4	36	25,94	13,58	52%		

Legenda: 1 - početak bolesti 2 - remisija 3 - hronični tok 4 - kontrolna grupa

je najviša u momentu razboleivanja ($p < 0,05$), nakon toga počinje linearno da pada, a najnižu aktivnost imala je u hroničnom toku dijabetesa.

Ispitivan je i uticaj kvaliteta metaboličke kontrole na aktivnost katalaze. Zbog toga je izvršeno grupisanje dece po nivou GHbA1c, kao relativno pouzdanom indikatoru protekle metaboličke kontrole, bez obzira na fazu bolesti. Formirane su četiri grupe nivoa kvaliteta metaboličke kontrole (GHbA1c grupa 1: 4,2-6,4%, grupa 2: 6,5%-8,5%, grupa 3: 8,6%-10,5% i grupa 4: >10,6%) i određena je aktivnost katalaze u svakoj od njih (Tabela 2).

Tabela 2. Aktivnost enzima u odnosu na kvalitet metaboličke kontrole**Table 2.** Enzyme activity in relation to the quality of metabolic control

Grupa Group	Broj ispitnika No of subjects	Srednja vrednost Mean value	SD	CV	p:kontroli Controls
Katalaza Catalase	1 2	20 40	37,62 50,88	18,25 22,87	49% 45%
	3	40	51,22	24,21	47%
	4	17	57,65	27,69	48%

Legenda: grupe GHbA1c - gr.1: 4,2-6,4%, gr.2: 6,5-8,5%, gr.3: 8,6-10,5%, gr.4: >10,6%

Katalaza ima veoma karakteristično ponašanje: sa pogoršanjem metaboličke kontrole juvenilnog dijabetesa raste i aktivnost katalaze na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$.

Poseban istraživački interes je postojao za detekciju uticaja aktivnosti katalaze na veličinu rezidualne β -ćelijske sekrecije. Stoga su i sva ispitivana obolela deca, po osnovu bazalnih vrednosti C-peptida podeljena u 3 grupe: ona sa minimalnom (srednja vrednost C-peptida 0,13 nmol/l), sa pro-

Tabela 3. Aktivnost enzima u odnosu na veličinu rezidualne β -ćelijske sekrecije**Table 3.** Enzyme activity in relation to the amount of the residual - cellular secretion

Grupa Group	Broj ispitnika No of subjects	Srednja vred- nost/Mean value	SD	CV	p:1	p:2
Katalaza Catalase	1 2	40 40	51,19 52,06	21,3 28,15	42% 54%	0,43
	3	22	41,38	17,67	43%	0,03 0,03

Legenda: grupe C-peptida - gr.1: minimalni gr.2: prosečni gr.3: suficijentni

sečnom (srednja vrednost C-peptida 0,27 nmol/l) i ona sa suficijentnom β -ćelijskom aktivnošću (srednja vrednost C-peptida 0,49 nmol/l) (Tabela 3).

Veća rezidualna beta ćelijska sekrecija praćena je manjom katalaznom aktivnošću. Ovog puta to ima znatno manju statističku signifikantnost ($p < 0,05$).

Aktivnost katalaze direktno koreliše sa kvalitetom metaboličke kontrole ($r = 0,895$), a inverzno sa C-peptidom ($r = -0,945$). Smanjenje nivoa C-peptida praćeno je povećanjem aktivnosti katalaze ($r = -0,855$).

Diskusija

Nema dileme da katalaza - moćni antioksidativni enzim predstavlja jedan od najaktivnijih i najrasprostranjenijih enzima u humanoj biohemiji uopšte. Dobro i davno poznata istina da pojačani oksidativni stres, odnosno da pojačano stvaranje slobodnih radikala kiseonika može da bude uzrok nastanka oštećenja β -ćelija u tipu 1 dijabetesa sa jedne strane, te činjenica da je katalaza jedan od najpotentnijih "čistača" molekula vodonik-peroksida sa druge strane, opravdava su naše interesovanje za određivanje ovog enzima [20]. Pretpostavka je bila da će se kod dece sa dijabetesom, bolesti gde postoji izražen oksidativni stres, otkriti smanjenje antioksidativne zaštite (aktivnosti katalaze).

Ipak, izolovano posmatranje katalaze i očekivanje da će njen pad favorizovati nastanak bolesti a elevacija njene aktivnosti omogućiti apsolutnu "citoprotektivnost" u tipu 1 dijabetesa isuviše je uprošćeno. U našem ispitivanju postoji višestruko povećanje aktivnosti katalaze u svim fazama bolesti u odnosu na zdravu decu. Ovakvo drastično uvećanje aktivnosti - takvo da je kod dece sa juvenilnim dijabetesom uvek na nivou statističke značajnosti veće od $p < 0,000001$ može da ukazuje na to da oksidativni stres ima ulogu u nastanku bolesti - očigledno je bilo potrebno da se podigne nivo antioksidativne zaštite. Katalaza je tu da ukloni vodonik-peroksid pre nego ovaj reaguje sa fero jonima i formira veoma potentne slobodne radikale kiseonika, kakvi su na primer hidroksilni radikali. Cepajući lance DNA, oštećujući mitohondrijalnu produkciju ATP, izazivajući lipidnu peroksidaciju - ovakvi radikali mogu nepovratno da oštete β -ćelije. Gotovo identični rezultati signifikantnog uvećanja katalazne aktivnosti u dijabetesu tipa 1 sreću se i u najnovijim istraživanjima [21].

Činjenica da je aktivnost katalaze ubedljivo najveća u momentu dijagnostikovanja bolesti (58,55 prema 44,10 u hroničnom toku, $p < 0,005$) opravdava stav da je određivanje aktivnosti katalaze - možda - veoma vredan rani marker nastupajućeg dijabetesa. Ipak, stav da, s obzirom na značajnu katalaznu elevaciju u momentu dijagnostikovanja bolesti, određivanje njene aktivnosti može imati i prediktivnu vrednost [13], mora se prihvatiti uslovno. Naime, pokazalo se da administracija egzogenog insulina

snažno podstiče ekspresiju katalaze, te je možda njeno uvećanje u našoj seriji i jatrogeno (prva kontrola u ispitivanju se sprovodila nakon nekoliko dana primanja insulina, kada je to opšte zdravstveno stanje deteta to omogućavalo). Ovakvo razmišljanje daje sasvim drugačiju dimenziju u razmatranju uloge antioksidativnih enzima u nastanku juvenilnog dijabetesa. Moguće je da je nastanak tipa I dijabetesa stvarno u funkciji smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima (katalaze), a da je verifikovano uvećanje ovog enzima u našem ispitivanju samo virtualno i posledica naglog početka supstituisanja visokim dozama insulina.

Očekivanje da će uvećanje katalazne aktivnosti, usled redukcije nivoa slobodnih radikala kiseonika (a vodonik-peroksida pre svih) biti praćena i povećanom (odnosno očuvanom) β -ćelijskom sekrecijom, odnosno većim C-peptidom u ovom istraživanju su potpuno izneverena. Mada je nesumnjivo da povećani oksidativni stres ima značaja u nastanku destrukcije endokrinog pankreasa, čini se da je isključivost u ovoj tvrdnji nepotrebna. Mišljenje da svako smanjenje katalaze omogućuje citotoksičnost suviše je simplifikovano, arbitrarno i sa stanovišta prirode verovatno ne i jedino logično. Slobodni radikali kiseonika nemaju isključivo toksičnu ulogu već su, naprotiv, i važni regulatorni molekuli [18]. Sudbina mnogih ćelija - pa i limfocita, kretanje ka diferencijaciji i proliferaciji ili ka smrti (apoptozi), umnogome može da zavisi od veličine i načina stvaranja radikala kao i njihove distribucije.

Ne samo da uvećanje antioksidativne zaštite ne prati povećanje C-peptida, već je upravo obrnuto: što je aktivnost katalaze veća, manji je C-peptid ($r=-0,855$)! Brojne su teorijske spekulacije koje mogu da pokušaju da objasne ovakav prividni paradoks.

Verovatno je da je elevacija aktivnosti katalaze samo pokušaj organizma da kompenzuje oštećenje nastalo indukcijom oksidativnog stresa. Drugim rečima, povećana ekspresija katalaze samo je pokušaj organizma da zaštiti svoj endokrini pankreas od viška slobodnih radikala, očigledno ne preterano uspešan. U "biološkoj kompeticiji" prooksidantnih mehanizama i katalaze (makar onda kada tip I dijabetesa nastane) očigledno je da će peroksidantni impulsi biti mnogo potentniji, te da će bez obzira na hiperekspresiju katalaze doći do uništenja endokrinog pankreasa. Posmatrajući razvoj bolesti kroz ovakvu prizmu (kompenzatorno, sekundarno i nedovoljno uspešno uvećanje katalaze u sklopu oksidativnog stresa), nije nelogično da će hiperekspresija antioksidativne katalaze ipak biti praćena nižim C-peptidom.

U pokušaju da se dalje pojasni više puta potencirani paradoks (veća katalaza, manji C-peptid), mora se podsetiti na činjenicu da je katalaza jedan od najmoćnijih regulatora stvaranja slobodnih radikala kiseonika, a da su ovi, opet, moćni regulatori dalje ćelijske deobe (ili ćelijske smrti). Preko dejstva na metabolizam fosfoinozitida, metabolizam kalcijuma

i c-GMP-a, te uticajem na determinisanje intracelularnih signala za različite potentne faktore rasta, slobodni radikali kiseonika imaju fiziološku ulogu signalne transdukcije, odnosno biološkog mesenđera [22]. Takođe, potrebno je istaći da određene koncentracije vodonik-peroksida smanjuju senzitivnost ćelija na potencijalno toksično dejstvo TNF- α redukujući bioaktivnost ovog citokina za više od 60%. Tako vodonik-peroksid amortizuje toksičnost ovog citokina, izvanredno značajanog u realizaciji β -ćelijske destrukcije u tipu I dijabetesa.

Metabolička kontrola utiče na aktivnost katalaze. Hiperglikemija indukuje katalaznu aktivnost - možda se i na taj način može objasniti tako visoka ekspresija katalaze na početku bolesti - u periodu kome je prethodila višenedeljna ili višemesečna izražena hiperglikemija [23]. U grupi dece sa referentnim GHbA1c najniža je katalazna aktivnost (37,62), da bi ista linearno rasla do maksimalnih vrednosti (57,65, $p<0,005$) u grupi dece sa najvišim GHbA1c. Pretpostavlja se da je onda kada je metabolička kontrola najbolja a C-peptid najveći (0,40) potrebna i najmanja antioksidativna zaštita i obrnuto: kada je metabolička kontrola najslabija a C-peptid najmanji (0,20, $p<0,00001$), antioksidativna zaštita (katalaza) mora da bude najveća. Ovo je još jedna, indirektna potvrda stava o kompenzatornom povećanju katalazne aktivnosti u uslovima povećanog oksidativnog stresa. To je ujedno još jedno logično objašnjenje koje povezuje nisku katalaznu aktivnost sa visokim C-peptidom, odnosno visoku aktivnost katalaze sa redukcijom C-peptida (statistička značajnost od $p<0,05$).

Dakle, generalno se čini da katalaze nema primarni značaj u nastanku tipa I dijabetesa, odnosno da njena aktivnost ne može presudno da odredi patogenetski tok. Uvećanje katalaze u tipu I dijabetesa pre je sekundarni fenomen, neuspeli pokušaj kompenzacije i redukcije oksidativnog stresa, nego što takva hiperekspresija može značajnije da utiče na razvoj juvenilnog dijabetesa.

Zaključak

Visoko statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u svim fazama juvenilnog dijabetesa indirektna je potvrda značaja oksidativnog stresa u nastanku bolesti, ali je aktivacija ovog enzima samo sekundarni fenomen, neuspeli pokušaj da se oksidativni stres kompenzuje. Moguće je da posebno signifikantna elevacija katalaze na početku bolesti sugeriše prediktivni značaj određivanja ovog enzima i predstavlja u stvari rani marker bolesti. Metabolička kontrola visoko signifikantno utiče na aktivnost katalaze: da bi se organizam "antioksidativno zaštitio" povećavajući aktivnost katalaze, neophodno je da se kvalitet metaboličke kontrole poboljša. Ovakav zaključak obavezuje da se insistira na ranoj detekciji bolesti mnogo pre nego što dođe do značajnijeg metaboličkog dearranžmana.

Literatura

1. Koraćević D. Dijagnostički važni enzimi. U: Koraćević D i sar. Biohemija. Beograd: Savremena administracija; 1996:96-157.
2. Pavlović D. Biološka oksidacija. U: Koraćević D, i sar. Biohemija. Beograd: Savremena administracija; 1996:678-705.
3. Puglia DC, Powell RS. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. Environ Health Perspect 1984;57:307-11.
4. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, et al. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. Clin Chem 1991;37:1932-7.
5. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. Diabetes 2005;54:S97-S107.
6. Collins MKL, Rivas AL. The control of apoptosis in mammalian cells. Trends Biochem Sci 1993;18:307-9.
7. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. Diabetes Care 2003;26:1589-96.
8. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, El-Sheikh A, et al. Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of th1 cytokines correlates with -cell destructive insulinitis and iddm. Diabetes 1996;45:749-54.
9. Haskins K, Bradley B, Powerset K, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci 2003;1005(1):43-54.
10. Habib MP, Dickerson FD, Mooradian AD. Effect of diabetes, insulin and glucose load on lipid peroxidation in the rat. Metabolism 1994;43:1442-45.
11. Tamura K, Manabe T, Imanishi K, et al. Toxic effects of oxygen-derived free radicals on rat pancreatic acini. Hepatogastroenterology 1992;39:536-9.
12. Dabrowski A, Gabryelewicz A. Oxidative stress: an early phenomenon characteristic of acute experimental pancreatitis. Int J Pancreatol 1992;12:193-9.
13. Tan KN, Min HK, Pan L, et al. Biological characteristics of an immunoregulatory activity secreted by an auto-reactive Cd4+ T clone that suppresses autoimmune diabetes in nod mice. Int Immunol 1996;8:689-99.
14. Dedov II, Gorelsheva VA, Romanovskaia GA. Lipid peroxidation and antioxidant enzymatic defense in patients with newly detected Iddm. Probl Endokrinol Mosk 1992;38:32-3.
15. Gupta BL, Ansari MA, Singh JN, et al. Effect of insulin and thyroxine on catalase, glutathion-s-transferase, gsh and gssg in alloxan diabetic rat red cells. Biochem Int 1992;27:793-802.
16. Zelinskyi BO, Palamarchuk AV. Antioxidant system disorder in diabetic patients and the means for its normalization. Lik Sprava 1996;(7-9):99-102.
17. Horio F, Fukada M, Katoh H, et al. Reactive oxygen intermediates in autoimmune islet cell destruction of the nod mouse induced by peritoneal exudate cells (rich in macrophages) but not T Cells. Diabetologia 1994;37:22-31.
18. Remacle J, Michiels C, Raes M. The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and egeneration. EXS 1992; 62:99-108.
19. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes 1979;28:1039-57.
20. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes 2004;53:110-8.
21. Gil-del Valle L, de la Milian L, Toledo A, et al. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type 1. Pharmacol Res 2005;51(4):375-80.
22. Bulkley GB. Physiology of reactive oxidant-mediated signal transduction: an overview. Biochem Soc Trans 1997;25: 804-12.
23. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture: evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. Diabetes 1998;45:471-7.

Summary

Introduction

Type 1 diabetes is a prototype of disease with an intensive oxidative stress. The oxidative stress means disturbing dynamic balance between prooxidants and antioxidants, either due to the increased production of the oxygen free radicals or the decreased antioxidant activity. The antioxidative enzyme catalase diminishes free radical hydrogen-peroxyde, which can be very toxic to pancreatic cells.

Material and methods

Our study included 40 children with type 1 diabetes. We analysed the activity of enzyme catalase in lymphocytes in different phases of disease: at the beginning of diabetes, in remission period and in the later chronic course.

Results

There is a significant increase in the catalase activity during all phases of disease ($p < 0.00001$) compared with the control

group. The highest catalase activity occurs in the early course of disease ($p < 0.05$) followed by a linear decrease and the lowest activity in chronic course. If metabolic control gets worse, the catalase activity gets higher with statistic significance at $p < 0.05$. A higher residual beta cells secretion is associated with a lower catalase activity. Therefore, the catalase activity is in direct correlation with GHbA1 ($r = 0.895$), and inverse correlation with C-peptide ($r = -0.945$).

Discussion and conclusion

A significant increase in the catalase activity in all phases of type 1 diabetes indirectly confirms the importance of the oxidative stress in pathogenesis of disease. The activation of catalase is probably the secondary phenomenon. The fact that the catalase activity reaches its highest values at the beginning of diabetes could implicate the predictive value of catalase determination.

Key words: Diabetes Mellitus, Type 1; Oxidative Stress; Catalase; Child; Predictive Value of Tests

Rad je primljen 26. X 2007.

Prihvaćen za štampu 14. XII 2007.

BIBLID.0025-8105:(2008):LXI:9-10:458-463.