

**Универзитет „Св. Кирил и Методиј” Медицински
факултет - Скопје**

Докторска дисертација

**Хомоцистеинот и неговата корелација со
микроваскуларните и макроваскуларните
компликации кај пациенти со дијабетес
мелитус тип 2**

Автор:

**Д-р. Ксенија Богоева
Костовска**

Ментор:

**Проф. Д-р. Чедомир
Димитровски**

Скопје, 2016 година

АБСТРАКТ

Хомоцистеинот (Hcy) е аминокиселина што содржи сулфур. Целото количество на хомоцистеин во организмот се формира преку циклусот на метилација од аминокиселината метионин, како основен и единствен извор на хомоцистеин.

Тој не се наоѓа во протеините што ги внесува човекот со храната поради што и не постои ДНК код за него. Во плазмата хомоцистеинот се наоѓа слободен само 1%, додека 70% се наоѓа врзан за албумините. Во метаболизмот на хомоцистеинот се инволвирани три ензими: метионин синтаза (МС), метилентетрихидрафолат редуктаза (МТХФР), цистатионин Б синтаза (ЦБС), како и витамините Б6, Б12 и фолната киселина, како кофактори на овие ензими.

Во случај на нарушување на метаболизмот на Hcy поради ензимски дефект или поради недостиг од некој интрацелуларен кофактор, доаѓа до акумулирање на хомоцистеин во клетката и потоа до негово екскретирање и зголемување на нивоата во циркулацијата.

Патогениот механизам и улогата на хомоцистеинот во оштетувањето на крвните садови се уште не е јасен, но високите вредности на хомоцистеинот се издвојуваат меѓу ризик факторите што доведуваат до оштетување на ендотелот на крвните садови придружено со појава на атеросклероза и тромбози. Податоците од истражувањата за генезата и механизмот на настанување на атеросклеротичните промени говорат дека основниот патоген процес се случува на молекуларно ниво, каде што високите вредности на хомоцистеин во услови на оксидативен стрес и високи гликемии дејствуваат патогено и придонесуваат во оштетувањето на медијата на артериските садови.

Истражувањата говорат за присуство на хиперхомоцистеинемијата т.е. зголемени нивоа на хомоцистеин кај пациентите со дијабетес мелитус тип 2, со преваленца во прилог на поголем ризик од микроваскуларните и макроваскуларните компликации, како и појава на невропатија кај пациентите со покачени вредности на хомоцистеин. Исто така во прилог на овие тврдења одат и покачените вредности на хомоцистеин измерени кај пациентите со дијагностицирана хипертензија и дислипидемија, како и кај пациентите со дијабетес мелитус и присутна ретинопатија.

Целта: на ова истражување е да се добијат податоци со кои би се докажала корелацијата на плазма хомоцистеинот во однос на етиологијата на микроваскуларните и макроваскуларните компликации, како и можноста за негова употреба како ран предиктор во дијагностиката на васкуларните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус.

Да се истражи можноста за корелацијата помеѓу покачените вредности на HbA1c, гликемиската контрола и плазма хомоцистеинот, и нивната улога во прогресијата на дијабетичните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус.

Методи: Трудот претставува лонгитудинално-проспективно истражување што се одвиваше на Клиниката за ендокринологија и болести на метаболизмот во Скопје.

Студијата вклучи 80 пациенти со дијабетес мелитус 2, со потврдена дијагноза и поставена инсулинска или орална терапија. Пациентите беа регрутирани во период од девет месеци и ја посетуваа Клиниката на контролен преглед- скрининг визита. Регрутираните пациенти беа поделени во две групи: 50 пациенти со дијагностицирани васкуларни компликации и група од 30 пациенти без придружни компликации, што наедно ја назначивме и како контролна група.

Добиените резултати се обработувани со помош на методите на дескриптивна и аналитичка статистика.

Резултати: Од обработката на податоците, помеѓу микроваскуларните компликации сигнификантно најзастапена беше нефропатијата со 32%, потоа ретинопатијата со 29% и микроалбуминуријата со 27,5%. Од макроваскуларните компликации сигнификантно и значајно најзастапени беа хипертензивната болест со процентуална застапеност од 31%, и периферната артериска болест со 12,50%. Високи вредности на хомоцистеин од 16,05 $\mu\text{mol/l}$, беа нотирани кај двете групи на пациенти со микроваскуларни и макроваскуларни компликации во однос на контролната група пациенти, каде што вредностите на хомоцистеин беа помеѓу нормалните граници, 10,44 $\mu\text{mol/l}$.

Во заклучокот, може да се изнесе дека се очекува дека хиперхомоцистеинемијата претставува ризик фактор во етиологијата на хронични компликации кај пациентите со дијабетес мелитус тип 2. Сепак, потребни се понатамошни истражувања што би дале јасни податоци за влијанието на

зголемените нивоа на хомоцистеин и неговата улога во оштетувањето на ендотелот на крвните садови и појава на долготрајни васкуларни компликации.

Клучни зборови: хомоцистеин, ендотел, васкуларни компликации, дијабетес мелитус.

ABSTRACT

Homocysteine (HCY) is a sulphur containing amino acid. The entire amount of homocysteine in the body is formed through the cycle of methylation of the amino acid methionine, as the primary and only source of homocysteine.

Homocysteine is not found in the protein intake of the human food because of which there is no DNA code for it. The plasma free HCY is only 1%, while 70% is bound to albumin. The metabolism of HCY involves three enzymes: methionine synthase(MS) methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cystathionine B synthase (CBS) and the vitamins B6, B12 and folic acid as cofactors of these enzymes.

In case of metabolic disturbance of the metabolism of HCY due to enzymatic defect or because of lack of intracellular cofactor, homocysteine accumulates in the cells, after which it is excreted from the cells and its plasma levels rise.

The pathogenic mechanism and the role of homocysteine in the blood vessel damage is not yet clear, but high levels of homocysteine are allocated among the risk factors that lead to impairment of the endothelium of blood vessels accompanied by thrombosis and atherosclerosis. Data obtained from the studies researching the genesis and mechanism of atherosclerosis are indicating that main process is based on molecular level where homocysteinemia in medium of oxidative stress and prolonged hyperglycemia can be potential factor in endothelial damage of the arterial blood vessels.

Studies have indicated the presence of hiperhomocysteinemia, i.e. increased levels of homocysteine, in patients with diabetes mellitus type 2, with prevalence for a higher risk of cardiovascular disease, microvascular and macrovascular complications, as well as the occurrence of neuropathy in patients with elevated homocysteine. In support of these statements, goes an increased homocysteine measured in patients diagnosed with hypertension and dyslipidemia, as well as in patients with present diabetic retinopathy.

The purpose of this survey is to obtain data that would prove the correlation of plasma homocysteine regarding the etiology of the microvascular and macrovascular complications of diabetes and the possibility of its use as an early predictor in the diagnosis of vascular complications in patients with diabetes mellitus.

To prove correlation between elevated values of HbA1c, glycaemic control and plasma homocysteine, and their role in progression of complication in patients with diabetes mellitus type 2.

Methods: This paper is a longitudinal-prospective study that was conducted at the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases in Skopje.

The study have included 80 patients with diabetes mellitus 2, confirmed diagnosis and treated with insulin and oral treatment. The groups of patients were recruited continuously over the period of 9 months. During this period, patients have visit the clinic for regular check-up - screening visit. Recruited patients were divided into two groups: 50 patients diagnosed with vascular complications and a group of 30 patients without associated complications, which is mentioned as a control group.

The results are processed using methods of descriptive and analytical statistics.

Results: The study has included 80 patients with diabetes mellitus 2. From the preliminary results of the microvascular complications the most frequent and statistically significant is the prevalence of the nephropathy with 32%. Retinopathy was represented with 29% and microalbuminuria was detected in 27,5% of the patients. Among the macrovascular complications 31% of the patients were diagnosed with arterial hypertension and 12,50% with peripheral arterial diseases. In the present study higher levels of homocysteine within 16,05 $\mu\text{mol/l}$ were detected in group of diabetic subjects with microvascular and macrovascular complications comparing to control group of patients where no complications were diagnosed and levels of homocysteine were among reference ranges, 10,44 $\mu\text{mol/l}$.

In conclusion, it can be stated that it is expected that hiperhomocysteinemia represents a risk factor in the etiology of chronic complications in patients with diabetes mellitus type 2. However, further research would provide clear evidence of the impact of increased levels of homocysteine and its role in damage to the endothelium of blood vessels and the emergence of long-term vascular complications.

Keywords: homocysteine, endothelium, vascular complications, diabetes mellitus.

КРАТЕНКИ

Нсу	Хомоцистеин
NO	Азотен оксид
НbA1c	Гликозилиран хемоглобин
MTHFR	Метилентетрахидрофолат редуктаза
ОАД	Орални антидијабетици
БМИ	Индекс на телесна маса
Д.М	Дијабетес мелитус
ADA	American diabetes association
ФПГ	Fasting plasma glucose/ Гликемија на гладно
ППГ	Post-prandial glucose/Гликемија по оброк
ЕКГ	Електрокардиограм
ТТ	Телесна тежина
UKPDS	Unated Kingdom prospective diabetes study
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	10
1.1 ЕПИДЕМИОЛОШКИ ПОДАТОЦИ	13
1.2 ЗНАЧЕЊЕТО НА ХОМОЦИСТЕИНОТ	14
1.3 ШТО ПРЕТСТАВУВА ХОМОЦИСТЕИНОТ	15
1.4 ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И МАКРОВАСКУЛАРНИ КОМПЛИКАЦИИ - ВАСКУЛАРНИ БОЛЕСТИ	18
1.5 ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ДИЈАБЕТИЧНА НЕФРОПАТИЈА	19
1.6 ДИЈАБЕТИЧНА РЕТИНОПАТИЈА	20
1.7 ДИЈАБЕТИЧНА НЕВРОПАТИЈА	21
1.8 ДИЈАБЕТИЧНО СТАПАЛО И ПРОМЕНИ НА КРВНИТЕ САДОВИ НА ДОЛНИТЕ ЕКСТРЕМИТЕТИ	21
1.9 ТРЕТМАН НА ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈАТА	22
1.10 ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА НИВОТО НА ХОМОЦИСТЕИН	23
2. МОТИВ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	25
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	25
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	26
4.1 КРИТЕРИУМИ ЗА ВКЛУЧУВАЊЕ/ИНКЛУЗИОНИ КРИТЕРИУМИ	27
4.2 КРИТЕРИУМИ ЗА ИСКЛУЧУВАЊЕ	27
4.3 КРИТЕРИУМИ ЗА ПОВЛЕКУВАЊЕ	27
4.4 РАЦИОНАЛНОСТ ВО ИЗБОРОТ НА ПОПУЛАЦИЈАТА	28
4.5 ПРОТОКОЛ НА РАБОТА	28
4.6 КОНТРОЛНА ПРЕГЛЕД / ВИЗИТА 1	29
4.7 РАСПОРЕД НА АКТИВНОСТИ	30
4.8 ПАРАМЕТРИ НА ЕФИКАСНОСТ	31
4.9 ДРУГИ ПАРАМЕТРИ	31
4.10 МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ХОМОЦИСТЕИН	32
4.11 РЕФЕРЕНТНИ ВРЕДНОСТИ И ИНТЕРПРЕТАЦИЈА	32
5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	33
6. РЕЗУЛТАТИ	34

6.1	ДИСТРИБУЦИЈА НА ПРОЦЕНТНА ЗАСТАПЕНОСТ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД ПОЛОТ, ВОЗРАСТА, ВРЕМЕТРАЕЊЕТО НА БОЛЕСТА И ЗАСТАПЕНОСТА НА ВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ	34
6.2	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ДИЈАБЕТИЧНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ, ПРОЦЕНТНА ДИСТРИБУЦИЈА ПОЕДИНЕЧНО ИЛИ ВО КОМБИНАЦИЈА КАКО И СО ПРИДРУЖНИ БОЛЕСТИ	38
6.3	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА БМИ (ИНДЕКС НА ТЕЛЕСНА) ТЕЖИНА КАЈ ДВТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ	41
6.4	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН ВО ОДНОС НА ПОЛОТ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ	42
6.5	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА HbA1c И ХОМОЦИСТЕИН И НИВНА КОРЕЛАЦИЈА КАЈ ДВЕТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА ВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ	43
6.6	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА – КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИНОТ И HbA1c И ХОМОЦИСТЕИНОТ И LDL ХОЛЕСТЕРОЛОТ	45
6.7	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ДИЈАБЕТИЧНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ, ПРОЦЕНТНА ДИСТРИБУЦИЈА ПОЕДИНЕЧНО	46
6.8	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА МИКРОВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ	47
6.9	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА МАКРОВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ	50
6.10	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ВИДОТ НА ТЕРАПИЈА КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО ВАСКУЛАРНИ КОМПЛИКАЦИИ	53
7.	ДИСКУСИЈА	54
8.	ЗАКЛУЧОК	58
9.	ЛИТЕРАТУРА	59

1. В О В Е Д

Шеќерната болест претставува една од најстарите болести присутна кај сите човечки раси и општества. Може да започне во кое било доба од животот, постепено нарушувајќи го здравјето во почетокот, а потоа земајќи агресивен тек. Денес, повеќе од кога било, болеста е многу поприсутна во целиот свет и претставува не само медицински, туку економски и социјален проблем што ги менува животните навики. Дијабетесот е водечка причина за губење на видот, бубрежно страдање како причина за дијализа, ампутација, хоспитализација и ризик повеќе за појава на исхемична болест на срцето што заедно со покачениот крвен притисок претставува најголема закана за здравјето на човекот во денешно време.

По дефиниција, дијабетесот е агресивно и прогресивно метаболно заболување, со мултипла етиологија, во чија основа лежи нарушување на метаболизмот на јаглехидратите, со одраз на метаболизмот на масните и протеините. Нарушувањата се резултат на намалената инсулинска секреција, нарушеното дејствување на инсулинот, или и двете врз кои огромно влијание имаат и наследните фактори и факторите на средината.

Дијабетесот има разни дефиниции и толкувања. Сепак, најблиску до одсликување на реалната слика на болеста би била дефиниција што дијабетесот го објаснува како **хронично нарушување на метаболизмот на јаглехидратите со засегање на метаболизмот на масните и протеините што се карактеризира со специфични промени на малите крвни садови**. Промените на малите крвни садови се јавуваат како резултат на метболните нарушувања, но и како последица на автоимуните промени и другите сè уште непроучени фактори.

Иако клинички и терапевтски битно се разликуваат, двете главни форми на дијабетесот (тип 1 и тип 2) може да се гледаат и како една болест според акцелераторска теорија на Wilkin, 2001. Можно е двата типа на дијабетесот да се разликуваат само по брзината на губењето на бета клетките во Лангерхансовото острово, но и според типот на специфичниот акцелератор чија генеза и класификацијата на болеста се протега помеѓу внатрешниот потенцијал за апоптоза на бета клетката и/или инсулинската резистенција што исто така предизвикува исцрпување на бета клеточната маса и ја забрзува апоптозата, а подоцна и експресијата на дијабетесот (1-4).

Според најновите согледувања, дијабетесот се толкува како одраз на инфламациите и инфламаторните маркери што се јавуваат како продукт на лезии на органите. Инфламаторните маркери се резултат на нарушувањата на функциите на различните органи, особено на масното ткиво. Посебно се патогени инфламаторните елементи од масното ткиво што се наоѓа околу крвните садови. Инфламаторните маркери, како што се: TNF алфа, IL 1, IL 6, CRP фибриноген, NEFA, серум амилоид А и др., доведуваат до нарушен трансендотелијален транспорт и лоша пенетрација на инсулинот во ткивата. Во основа, лежи ендотелната дисфункција. Ендотелот претставува орган што е сензитивен на инсулин. Инсулинот ги стимулира вазоконстрикцијата и вазодилатацијата, преку синтезата на NO (азотен оксид). Инфламаторните маркери, исто така, доведуваат и до акцелерирана апоптоза на Бета клетката, со што се редуцира нејзината способност за продукција на инсулин (5 - 8).

Најбитна карактеристика на дијабетесот сепак, претставуваат типичните за него промени на малите крвни садови, познати како дијабетична микроангиопатија.

Промените на крвните садови кај дијабетесот се делат на две главни групи според големината на садовите на:

- *Микроангиопатија*, што ги засега малите крвни садови: ретината, бубрезите и нервите или *retinopathia*, *nephropathia* и *neuropathia*, каде основна карактеристика на дијабетичната микроангиопатија е задебелување на базалната мембрана на капиларите што се бои по PAS- специфично само за дијабетесот .
- *Дијабетична макроангиопатија*, што ги засега големите крвни садови, како што се мозочните, коронарните и периферните садови, а промените се исти или слични како и кај атеросклерозата.

Во етиопатогенезата на васкуларните компликации се разгледуваат многу фактори што водат до патофизиолошки промени на ендотелот на крвните садови (10-11).

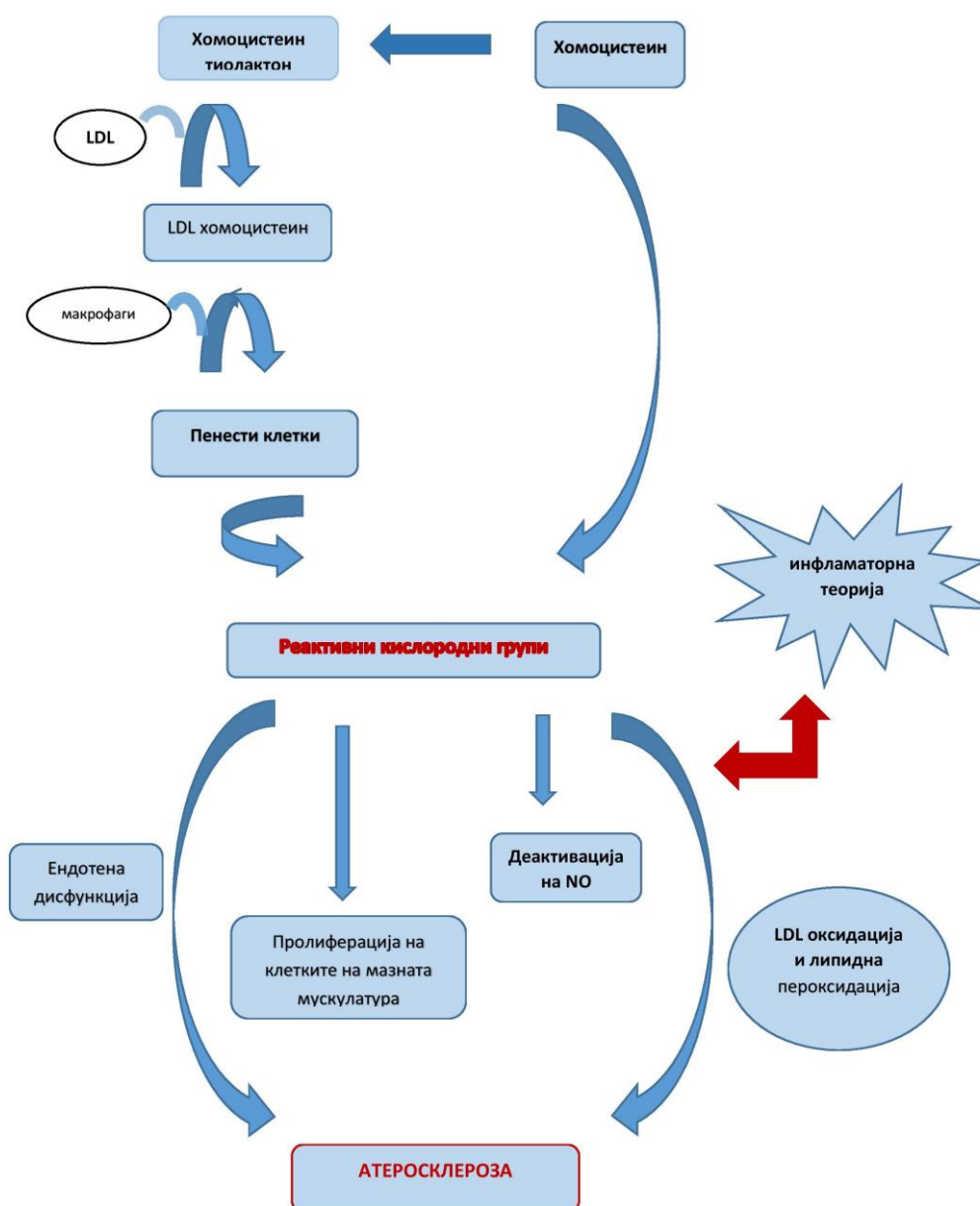
Хипергликемијата и оксидативниот стрес како најагресивни во патогенезата, своето дејство врз ендотелот на крвните садови го остваруваат преку активирање на инфламаторниот одговор, хемиска модификација на липидите и липопротеините и инхибиција на вазодилаторното дејство на NO врз ендотелот, доведувајќи до негова дисфункција (12).

Високите вредности на хомоцистеинот, исто така претставуваат еден од факторите што индуцираат патофизиолошки промени на ендотелот на крвните садови, сугерирајќи неколку можни механизми:

- оксидација на LDL-липопротеините;
- агрегација на тромбоцитите;
- акумулација на колаген;
- засилена инфламаторна хиперплазија;
- фиброза на масните клетки и акумулација на слободни кислородни радикали;
- засилување на оксидативниот стрес преку интеракција на Hcy и NO, како моќен вазоконстрикторен агенс.

Истражувањата поврзани со генезата и механизмот на атеросклеротичната лезија на крвните садови сугерираат дека основниот патоген процес се случува на молекуларно ниво. Вишокот на Hcy (хомоцистеин) гради тиолактон, кој како високо реактивен естер влегува во хемиска реакција со протеинската компонента на LDL липопротеините, формирајќи LDL-хомоцистеин тиолактон агрегати. Овие молекули на LDL-хомоцистеин претставуваат атрактивен материјал за клеточните макрофаги, кои претворајќи ги во пенести (foam) клетки, лесно и брзо ги депонираат во ендотелот на артериите. Депонирани во ваква форма, LDL липопротеините и хомоцистеинот го започнуваат процесот на хиперплазија и фиброза на клетките на мазната мускулатура, и ја олеснуваат акумулацијата на слободни кислородни радикали (13-14).

Кон овој процес на настанување на атеросклероза, секако главно место заема и инфламаторната теорија каде што високите вредности на хомоцистеин дејствуваат проинфламаторно помагајќи го активирањето на леукоцитите, цитокините, интерлеукините 1 β , 6 и 8, некротизирачкиот фактор α , а понатаму, и нивното претворање во проинфламаторни фенотипови. Оваа теорија ја надополнува и фактот дека хомоцистеинот во интеракција со азотниот оксид, како моќен вазоконстриктор ја формираат листата на фактори инволвирани во патогенезата на атеросклерозата (15-17).



Слика бр. 1: Патогенетски механизам на атеросклерозата и влијанието на Нсу

1.1 ЕПИДЕМИЛОШКИ ПОДАТОЦИ

Денес дијабетесот зазема епидемски размери, претставувајќи здравствен, социјален и економски проблем во развиениот свет и во земјите во развој. Тенденцијата за пораст на бројот на заболени е огромна и се смета дека се должи на урбанизацијата, нарушената јаглехидратна толеранција, стареењето на популациите и дебелината. Дијабетесот денес, претставува болест што ги напаѓа сите возрасти и сите етнички групи, намалувајќи го квалитетот на живот на лицата со дијабетес и, наедно претставувајќи огромен социјален и економски товар на семејствата и здравствениот систем.

Поради тенденцијата на пораст и рапидно растечкиот број на лица заболени од дијабетес мелитус, се очекува бројката од 415 милион заболени лица во 2015 година да порасне на 642 милиони во 2040 година, на светско ниво.

Пандемијата најголем импакт ќе има на лицата постари од 56 години во развиениот свет, додека кај адултните лица на возраст над 20 години преваленцата ќе биде повисока од 6,3%. Иако најголем пораст на новозаболени лица со дијабетес има во развиените земји, тенденцијата на пораст, сепак, ќе продолжи до 2030 година со преваленца од 8,4% во однос на земјите во развој каде што болеста ќе биде во постепен пораст со преваленца од 6,0%.

Америка, Јапонија и Италија се трите водечки земји со најголем број регистрирани случаи со дијабетес мелитус во развиениот свет.

Најголемиот дел од светската популација која страда од дијабетес мелитус припаѓа на д.м тип 2 (90-95%). Највисока преваленца на појава на нови случаи во последниве десет години има во Соединетите Американски Држави, каде што најзасегната е популацијата над 20 години, а во однос на расната припадност најголем број случаи припаѓаат на non-Hispanic, белата и црна раса каде што преваленцата на јавување е 6,9%.

За разлика од рапидната прогресија на бројот на лица заболени со дијабетес мелитус тип 2, бројот на лица со дијабетес тип 1 постепено расте. Според IDF (International Diabetes Foundation) најголем број случаи со дијабетес тип 1 има на Европа, 1,27 милиони; по кој што следува Америка со 1,04 милиони заболени. Децата на возраст помала од 14 години ја формираат најголемата група лица со дијабетес мелитус тип 1 (18-19).

Во Република Македонија дијабетес мелитус претставува едно од почестите заболувања и се јавува кај околу 6% од населението. Бројот на регистрирани лица со дијабетес кои се на инсулинска терапија во моментот во Република Македонија е 36.230, од кои 2.230 се лица со тип 1 дијабетес и околу 34.000 со тип 2 дијабетес мелитус. Согласно податоците од Интернационалната Дијабетолошка Федерација во и податоците од Националниот регистар за дијабетес на Република Македонија преваленцата на оваа болест во 2015 година е 12,0%, а вкупниот број заболени и дијагностицирани лица со дијабетес мелитус е 185.600 лица (19).

1.2 ЗНАЧЕЊЕТО НА ХОМОЦИСТЕИНОТ

Поврзаноста на хомоцистеинот со хуманите болести за првпат била забележана во 1962 год. во научните трудови во кои се наоѓаат тврдењата за поврзаноста на високите вредности на хомоцистеинот и појавата на предвремени оклузивни кардиоваскуларни болести дури и во младата возраст со што се наметнало прашањето дали зголемената концентрација на плазма хомоцистеинот може да претставува ризик фактор за кардиоваскуларните болести и васкуларните компликации кај популациите.

Од средината на осумдесеттите години од дваесеттиот век направени се многубројни студии на повеќе од 13.000 пациенти каде што е утврдено дека умерено зголеменото ниво на плазма серум хомоцистеинот е маркантен ризик фактор во појавата на оклузивните артериски болести на коронарните, церебралните и периферните крвни садови, како и кај васкуларните компликации кај дијабетесот.

Кај пациентите со дијабетес мелитус акутните и хроничните високи вредности на Нсу се асоцираат со инсулинската резистенција, остварувајќи негативен ефект на бета глукозниот метаболизам и инсулин секреторниот одговор. Хомоцистеинот генерира РОС радикали (реактивни оксигени специеси) кои што ја ослабуваат функцијата на инсулин секретирачките клетки, водејќи до редуцирана гликокиназна фосфорилација, намалена секреција и клеточна смрт. Тргувајќи од биолошката функција на β клетките, плазма нивоата на Нсу може да се доведат во корелација и со генетскиот полиморфизам и предиспозиција кон дијабетес (20-21).

Хиперхомоцистеинемията е почеста кај дијабетичните пациенти со васкуларни компликации, особено кај оние со покачен крвен притисок во споредба со пациентите кои немаат компликации. Кај овие пациенти е најдена и значително повисока преваленца на мутација на MTHFR генот (5,10 метилентетрахидрофолат редуктаза ензим), дијагностицирано со тестови направени со оптоварување со метионин – како индикатор за ензимски дефекти (22-23).

Исто така, во прилог на овие наоди одат и тврдењата на Passaro и сор.; дека tНсу корелира со времетраењето на болеста, нивото на гликемија во крвта но, и со нивото на гликозилираниот хемоглобин (24).

Од резултатите добиени од истражувањата водени во последните десет години, може да се потврди дека инсулинот има влијание врз концентрацијата на хомоцистеинот и дека хиперинсулинемијата ја намалува концентрацијата на Нсу кај здравите лица. Во прилог оди и корелацијата помеѓу инсулинската резистенција и зголеменото ниво на плазма хомоцистеин, а особено се издвојува и фактот за корелацијата помеѓу покачените вредности на гликозилиран хемоглобин и плазма хомоцистеин кај пациентите со инсулин независен дијабетес мелитус, со лоша метаболичка контрола, третирани со максималните дози на хипогликемични препарати (24).

Кај пациентите со дијабетес мелитус тип 2 – употребата на орални антидијабетични лекови доведува до зголемување на нивото на плазма хомоцистеинот. Бигванидите и Метформинот се доведуваат во најтесна врска со зголемените плазма вредности на хомоцистеин. Се претпоставува дека истите ја

намалуваат апсорпцијата на витаминот B_{12} , преку блокирање на рецепторите на B_{12} intrinsic факторот во дисталниот дел на илеумот (25).

Резултатите од студиите направени на пациенти со дијабетес мелитус тип 2 и кардиоваскуларни болести говорат дека третманот со метформин (2гр дневно) во период од 12 недели доведува до зголемување на плазма вредностите на Hcy за 7,2% и за 13,8% како третман користен во период од 40 недели. Суплементацијата со калциум кај овие пациенти може да ја нормализира намалената метформин – индуцирана апсорпција на витаминот B_{12} .

Плазма или серум хомоцистеинот претставува и чувствителен маркер и за функцијата на фолатниот и кобаламинскиот метаболизам како и статусот на В витамините во организмот. Резултатите од многубројните студии говорат дека суплементацијата со фолати, кобаламин и витамин B_6 , како и нивните комбинации го намалуваат нивото на плазма хомоцистеинот и кај лица без дијагностицирани васкуларни компликации. Овие сознанија ја наметнуваат можноста за употреба на витамините во терапијата и намалувањето на вредностите на плазма хомоцистеинот, како и прашањето: дали намалувањето на неговите вредности ќе има ефект врз прогресијата на васкуларните оштетувања и болести поврзани со хомоцистеинемичката (26-29).

Од досега спроведените клинички истражувања значењето на вредностите на плазма хомоцистеинот остануваат да бидат корисен предиктор во морбидитетот и морталитетот од васкуларните болести, како и за болестите што не се директно поврзани со кардиоваскуларниот систем.

1.3 ШТО ПРЕТСТАВУВА ХОМОЦИСТЕИНОТ?

Хомоцистеинот (Hcy) е аминокиселина што содржи сулфур и целото количество на хомоцистеин во организмот се формира преку циклусот на метилација од основната аминокиселина метионин, како основен и единствен извор на хомоцистеин.

Тој не се наоѓа во протеините што ги внесува човекот со храната поради што и не постои ДНК код за него. Во плазмата Hcy се наоѓа слободен само 1%, додека 70% се наоѓа врзан за албумините. Во метаболизмот на Hcy се инволвирани три ензими: метионин синтаза (МС), метилентетрихидрафолат редуктаза (МТХФР), цистатионин Б синтаза (ЦБС) како и витамините B_6 , B_{12} и фолната киселина, како кофактори на овие ензими (29).

Во случај на нарушување на метаболизмот на хомоцистеин поради ензимски дефект или поради недостиг од некој интрацелуларен кофактор, доаѓа до акумулирање на Hcy во клетката и потоа до негово екскретирање и зголемување на нивоата во циркулацијата.

Хомоцистеинот се елиминира преку процесот на катаболизам во бубрезите, и тоа само 1% преку урината како резултат на гломеруларната филтрација.

Референтните вредности на хомоцистеинот се движат помеѓу 5 и 15 $\mu\text{mol/l}$. Вредностите на Hcy помеѓу 15-30 $\mu\text{mol/l}$ се сметаат за покачени, вредностите од 30-

100 $\mu\text{mol/l}$ претставуваат средна хиперхомоцистеинемија, а вредностите поголеми од 100 $\mu\text{mol/l}$ се сметаат за тешка хиперхомоцистенемија (29-32).

Врз нивото на хомоцистеинот во организмот влијаат повеќе фактори, а најголем дел од нив се поврзани со начинот на живеење. Меѓу нив се издвојуваат (29):

- Начинот на исхрана (дали содржи метионин, витамини Б6, Б12, фолна киселина);
- Возраста (концентрациите на Hcy растат со возраста);
- Расната припадност (кај Индијанците и Пакистанците нивоата се пониски);
- Консумирањето алкохол (покачени вредности поради инхибиција на ензимот метионин синтаза);
- Пушењето (покачени вредности поради директно влијание на токсичните состојки врз процесот на метилација);
- Влијанието на хормоните (бременост, менопауза и стареење);
- Генските мутации (Полиморфизам на MTHFR генот како резултат на недостиг на цистатионин Б синтаза и витамин Б6);
- Болестите (гастроинтестиналните, бубрежните, автоимуните заболувања, хипотироидизам, малигните заболувања и дијабетес мелитус);
- Лековите (антиконвулзивните, антилипемичките, антибиотичките, антидијабетиците).



Слика бр. 2: Поврзаноста меѓу различни физиолошки фактори што влијаат врз метаболизмот на Нсу. ('Тајната на Хомоцистеинит'; Марија Крстевска стр 18)

Во однос на нивоата на хомоцистеин најдено е дека кај пациентите со дијабетес мелитус нивото на плазма хомоцистеинот е значајно повисоко во однос на здравите лица.

Различните гастроинтестинални нарушувања, особено оние со присутна атрофија на мукозата јајенумот доведуваат до зголемени вредности на хомоцистеин поради намалена апсорпција на фолната киселина и витаминот B₁₂.

Пациентите со бубрежни заболувања исто така, имаат хиперхомоцистеинемија. Оваа група болни е од особено значење за појаснување на корелацијата помеѓу абнормалните вредности на хомоцистеин и оштетување на бубрежниот паренхим и крвните садови. Високите вредности на хомоцистеин корелираат со серумските вредности на креатинин и брзината на гломеруларната филтрациона стапка што во нарушени услови го оневозможуваат физиолошкиот пат на филтрација и

реапсорпција на хомоцистеин во гломеро-тубуларниот систем на бубрезите (29, 33, 34).

Високите вредности на хомоцистеин се наоѓаат и кај канцерогените заболувања но, и кај хипотиреоидизмот. Фактите водат кон контрадикторни објаснувања, што сепак, се должат на можноста дека канцерогените клетки секретираат определени количества на хомоцистеин (29, 35).

1.4 ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И МАКРОВАСКУЛАРНИ КОМПЛИКАЦИИ - ВАСКУЛАРНИ БОЛЕСТИ

Основна промена и механизам кај макроваскуларните компликации, или кардиоваскуларните болести е атеросклерозата. Во основата на патогенезата се наоѓа хроничната инфламација, оксидативниот стрес и инхибицијата на вазодилаторното дејство на NO како тригер фактори на активација на имуниот одговор што доведува до оштетување на ендотелот на крвните садови и формирање на плаки. Комплексниот и каскаден систем што се одвива на молекуларно ниво, ја вклучува хемиската модификација на липидите и липопротеините, оксидацијата на LDL липопротеините, нивното згуснување и акумулација во ѕидот на крвните садови. Ова доведува до хиперплазија, фиброза на клетките на мазната мускулатура и проинфламаторна активност и акумулација на моноцити, макрофаги и продукција на инфламаторни маркери или цитокини, како што се: TNF α , IL 1, IL 6, CRP-фибриноген, серум амилоид A и кислородни слободни радикали.

Во прилог на патогенезата на атеросклерозата, постојат многубројни податоци што укажуваат на улогата на хомоцистеинот во синтезата на азотниот оксид, намалената вазодилатација и хиперхомоцистеинемијата, издвојувајќи го хомоцистеинот како ризик фактор во развојот на коронарната артериска болест, инфаркт на миокардот, оклузивни цереброваскуларни болести, артеријални и венски тромбози (36 - 38).

Ротердамската студија спроведена на скоро 8.000 испитаници говори дека ризикот за инфаркт на миокардот се зголемува за 6-7% за секој 1 $\mu\text{mol/l}$ покачување на Hcy од базичното ниво. Ризикот за морбидитет расте кај пациентите чие ниво на Hcy е над 18 $\mu\text{mol/l}$, со што се потврдува фактот дека прогресивните покачувања на вредноста на хомоцистеинот од 15- 20 $\mu\text{mol/l}$, придонесуваат во патогенезата на атеросклеротичните кардиоваскуларни болести.

Хомоцистеинот, како независен ризик фактор за васкуларните болести може да придонесе за создавање на атероматозните лезии кај 38-50% од пациентите со периферни васкуларни болести.

Покрај високиот ефект на хомоцистеинот во етиологијата на кардиоваскуларните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус, имаат влијание и покачените нивоа на:

- HbA1c;
- Гликемиските вредности;
- Возраста и BMI;

- Липидниот статус;
- Крвниот притисок;
- Начинот на живот (пред се пушењето, седантерен живот и алкохолот);
- Наследните фактори;

Нивото на HbA1c (гликозилираниот хемоглобин) е во директна корелација со ризикот од кардиоваскуларни компликации, а особено важна е корелацијата со миокардниот инфаркт. Со секое намалување на хемоглобинот за само 1%, се намалува кардиоваскуларниот ризик над 10%. (39 - 40)

Со возраста расте и ризикот од кардиоваскуларни болести, потенцирано со напредувањето на атеросклерозата.

Липидниот статус, особено нивото на LDL и триглицеридите, значајно влијаат врз состојбата и статусот на крвните садови кај секого, а особено кај лицата со дијабетес мелитус тип 2 (41).

1.5 ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈА И ДИЈАБЕТИЧНА НЕФРОПАТИЈА

Нарушувањата во реналната функција претставуваат една од најсериозните компликации на дијабетесот и по правило кореспондираат со времетраењето на болеста, регулираноста на гликемиите, како и со крвниот притисок.

Дијабетичната нефропатија се дефинира со појава на протеинурија поголема од 500 mg за 24 часа или микроалбуминурија од 30-299 mg/24 часа.

7% од пациентите со дијабетес мелитус тип 2 веќе имаат детектибилна микроалбуминурија во моментот кога се дијагностицирани со основната болест.

Истражувањата направени кај луѓе и животни укажуваат на сигнификантна корелација помеѓу брзината на гломеруларната филтрациона рата (GFRs), серум креатининот и плазма концентрацијата на хомоцистеинот. Кај реналната болест нивоата на креатининот и на хомоцистеинот се покачени. Серум креатининот претставува маркер со силна сензитивност и детерминантност на плазма концентрацијата на хомоцистеинот, додека (GFR) фактор за клиренсот на хомоцистеинот, знаејќи дека околу 70% од Hcy се филтрира, реасорбира преку гломерулите во бубрезите.

Потврдено е дека плазма вредностите на хомоцистеинот се покачени три до пет пати кај пациентите со дијабетес мелитус и резвиена нефропатија. Причини: атеросклерозата и покачениот крвен притисок присутни многу години пред клинички видливите промени. Овие процеси водат до нефросклероза и нарушување на реналната функција што е високо релевантна за клиренсот на плазма цистеинот.

Покачените вредности на Hcy и до 45% кај пациентите со нарушена бубрежна функција водат кон фактот дека хомоцистеинот претставува сензитивен предиктор

на ризикот од морбидитет и исходот на истиот кај пациентите со бубрежни компликации (42-45).

1.6 ДИЈАБЕТИЧНА РЕТИНОПАТИЈА

Дијабетичната ретинопатија е една од најчестите микроваскуларни компликации на дијабетесот. Ризикот за развој на ретинопатијата, како и другите микроваскуларни болести зависи од должината на болеста и степенот на зачестеност на хипергликемиите. Развојот на ретинопатијата може да започне и до седум години пред поставување на клиничката дијагноза на дијабетесот. Главно промените може да се категоризираат во две групи: промени што водат до ексудација и едем на ретината и макулат, и облитеаративни промени што резултираат со исхемија и пролиферација, т.е. редукција на видот.

Дијабетичната ретинопатија може да постои во два облика: пролиферативна и непролиферативна.

Во патогенезата се набројуваат повеќе фактори од кои оксидативниот стрес, продукцијата на РОС радикали, тумор некротизирачкиот фактор Б и реактивните кислородни спесиеси ја формираат групата ризици одговорна за компликациите кај дијабетесот.

Пролиферативната дијабетична ретинопатија е производ на долготрајната ретинална хипоксија. Високите вредности на хомоцистеин се токсични за васкуларниот ендотел сами по себе, но се и контрибуирачки фактор во микроваскуларната ангиопатија преку формирање на тромбози и тромби кои што дополнително ја компромитираат крвната перфузија во веќе и онака оштетеното ткиво.

Во групата ризик фактори, покрај должината на траењето на дијабетесот, нивото на HbA_{1c}, висината на систолниот крвен притисок, посебно место завзема и корелацијата помеѓу хомоцистенемията и развојот на дијабетична ретинопатија-каде што плазма концентрациите на хомоцистеин може да бидат корисен маркер за акцелерација на микроваскуларните промени на ретината; а зголемените вредности од само 1 mmol/l, се тригер за интензивикацијата на третманот на ризик факторите на компликациите кај дијабетесот, воопшто (46-48).

1.7 ДИЈАБЕТИЧНА НЕВРОПАТИЈА

Невропатијата како честа компликација кај дијабетесот, особено кај лицата со дијабетес мелитус тип 2, се дефинира како присуство на знаци или симптоми на периферна нервна дисфункција. Како и кај другите микроваскуларни компликации ризикот за развој на невропатија е пропорционален со должината на хипергликемијата и степенот на лезиите на крвните садови, вазоконстрикцијата и нервната исхемија.

Постојат неколку вида на дијабетична невропатија: моторна, сензорна и автономна. Најголем процент припаѓа на хроничната сензомоторна полиневропатија, а најмал процент на сензорната невропатија што е релативно асоцирана со периодите на лоша гликемиска контрола (32).

Патогенезата на сензорната невропатија претставува интеракција помеѓу васкуларните и метаболичните фактори. Улогата на депресија на нивото на азотниот оксид (NO) во васкуларните лезии и оштетувањето на нервите претставува линк помеѓу метаболичната и васкуларната теорија. Покачените вредности на плазма хомоцистеинот потенцијално влијаат врз намалување на нивоата на NO, ендотелната дисфункција и прогресивната васкуларна лезија.

Покаченото ниво на хомоцистеин во комбинација со биохемиските абнормалности кај дијабетичните пациенти, повторно е разгледуван ризик фактор кој преку намалување на улогата на NO како вазодилататор води до ендотелна и вазомоторна дисфункција што резултира со нервна – фибер исхемиа.

Модификацијата на ризик факторите, подобрувањето на гликемиската контрола, но и воведувањето на суплемементи на витаминот B₁₂ и фолната киселина би имале позитивен ефект врз намалувањето на плазма концентрациите на хомоцистеин (49).

1.8 ДИЈАБЕТИЧНО СТАПАЛО И ПРОМЕНИ НА КРВНИТЕ САДОВИ НА ДОЛНИТЕ ЕКСТРЕМИТЕТИ

Дијабетичното стапало е посебен предмет на иследување кај дијабетесот, особено доколку постои ризик, како што се деформитети на прстите, на ноктите, како и претходна историја за ампутација или за промени на садовите на потколениците.

Во стандардните методи на иследување спаѓаат и испитувањата на пулсациите на дорзалните артерии-доплер, како и испитување на постоењето на придружна невропатија, со микрофиламент од 10 г или 128 Hz звучна виљушка. Ризикот од исхемија расте со намалување на сензациите или со постоење на претходни улцерации (50).

1.9 ТРЕТМАН НА ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈАТА

Во основа на лекувањето на хиперхомоцистеинемијата лежи промената на начинот на живеење и збогатување на исхраната со овошје, зеленчук и животински продукти што се природен извор на фолна киселина и Б витамини. Зелениот зеленчук, мешункастиот зеленчук, портокалите, интегралните житарки, цералиите, месото, рибата, јајцата и млекото; претставуваат иницијација во третманот на намалување на зголемените концентрации на хомоцистеин во крвта кај здравите лица.

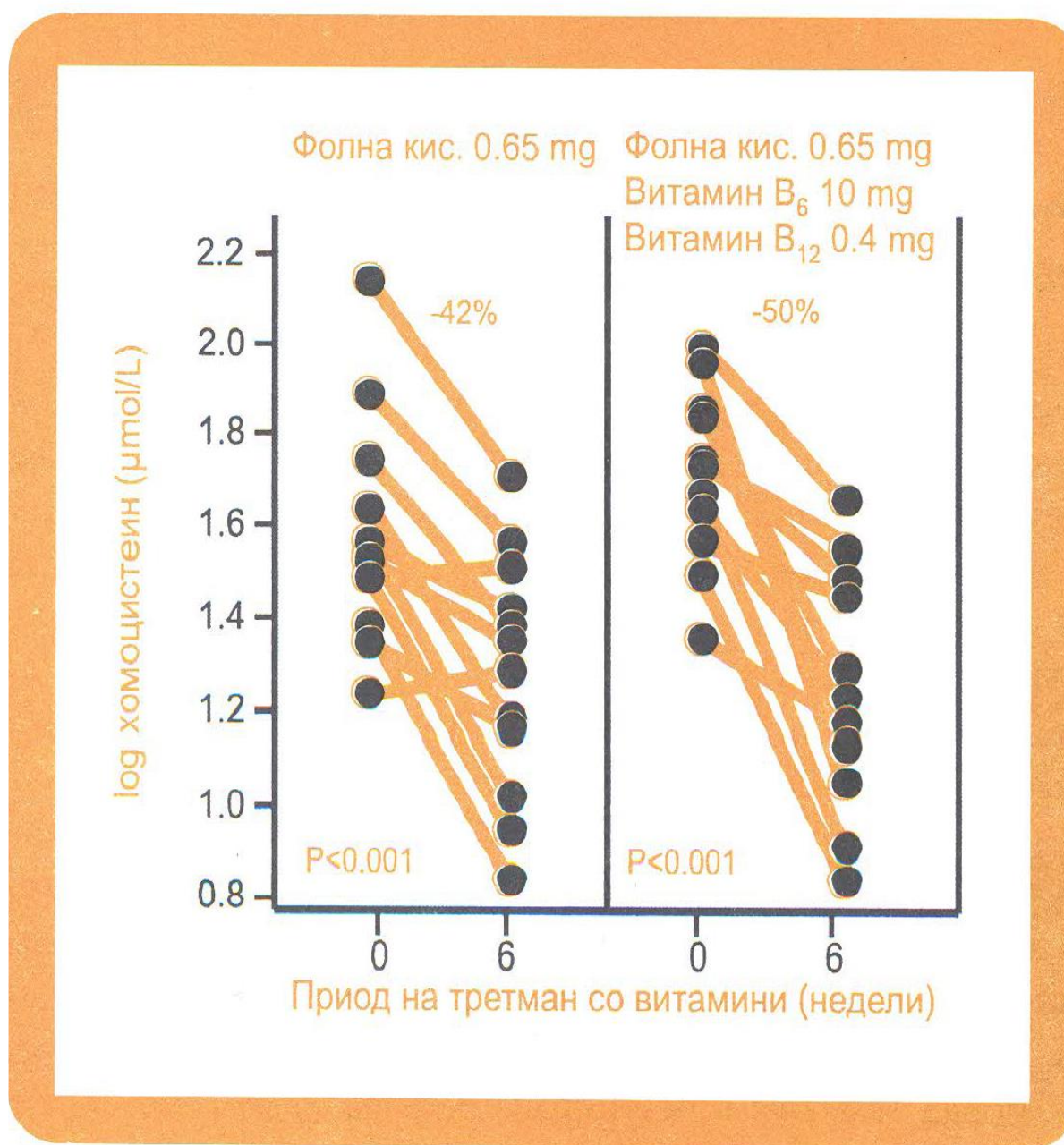
Комбинацијата на фолатите со витамините B_{12} и B_6 ефикасно го намалува нивото на хомоцистеин, без разлика дали станува збор за пациенти или за здрави лица. За жал оптималната доза на овие витамини сè уште не е јасна. Постојат податоци дека третманот со фолна киселина во дози од 100 μg до 10 mg дневно значително го намалува нивото на хомоцистеин и во крвта, а третманот со фолна киселина во дневни дози од 0,65 mg дневно може да го намали нивото на хомоцистеин и до 42%. Сепак, комбинацијата на фолати и витаминот B_{12} во дози од 0,4 mg и B_6 во дози од 10 mg дневно ги намалуваат плазма концентрациите на Hcy и до 50%.

Со идентификацијата на хомоцистеинот како важен ризик-фактор за појавата на микроваскуларните и макровакуларните компликации и кардиоваскуларни болести се наметнува прашањето дали супституцијата со фолати и витаминот B_{12} и B_6 како дополнителен третман би влијаеле на намалувањето на tHcy во крвта, односно дали би го намалиле ризикот од појава на истите.

Резултатите одат во прилог на комбинирана терапија со овие витамини, говорејќи дека истата доведува до намалување на во крвта за 20-50%, подобрување на ендотелната функција, како и до подобрување на прогнозата на васкуларните компликации.

Во однос на бубрежните компликации и заболувања, каде што бубрежната функција е важна детерминанта за нивото на tHcy на гладно, суплементацијата на витамини и фолна киселина укажува на значајно намалување на високите концентрации.

Третирањето на пациентите со бубрежни заболувања со фолна киселина во дози од 5 mg дневно во тек на 12 недели покажало дека се намалува нивото на хомоцистеин за 12%. Со додавање на витамин B_6 во дози од 250-300 mg/ дневно во период од четири месеци и витамин B_{12} во дози од 1 mg во период од четири недели се намалува нивото на плазма хомоцистеинот за 30-40% (29, 51-53).



Слика бр. 3: Ефект на намалување на хомоцистеинот само со фолна к-на во комбинација со витамини В₆ и В₁₂. ('Тајната на Хомоцистеинит'; Марија Крстевска стр.54)

1.10 ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА НИВОТО НА ХОМОЦИСТЕИН

За определување на нивото на хомоцистеин се користи примерок на крв во епрувети со ЕДТА (етилendiаминотетраoетна киселина). Начинот на земањето на примерокот е од исклучителна важност, бидејќи невнимателно земениот примерок може да резултира со вештачки зголемено ниво на хомоцистеин.

Времето на ингестија на храната пред земање на примерокот е од голема важност бидејќи оброците богати со протеини може да го зголемат нивото на Нсу. Исто така, од практично значење е стандардизирањето на положбата на телото за време на земањето на примерокот поради нивото на албумини при различни положби (лежечка или седечка).

Еден од методите за следење и докажување на зголемените нивоа на хомоцистеин е оптоварувањето на организмот со метионин. Ова претставува стрес-тест за метаболизмот на метионинот како и за постпрандијалните промени на Нсу. Тестот се изведува со внесување на 100 mg/kg метионин растворен во сок од портокал.

Се земаат примероци на крв на гладно и четири до шест часа по оралниот внес. Кај патолошките состојби се очекува вредностите да бидат два до три пати повисоки од нивото на хомоцистеин на гладно.

Тестот со оптоварување со метионин е од посебно значење за потврдување на компликациите кај дијабетесот и откривање на лицата со ризик фактор за појава на васкуларни болести.

Во прилог е табела со различна дистрибуција на плазма концентрации на хомоцистеин кај здрави испитаници на гладно и четири до шест часа по оптоварување со метионин (29).

Процент	2.5	5	10	20	50	80	90	95	97.5
µmol/L									
Вкупно (n=800)									
Гладни	5.9	6.4	7.0	7.7	9.5	12.1	13.4	15.7	18.5
ПОМ	17.4	19.2	21.5	24.2	29.9	38.0	43.7	51.3	58.1
Мажи < 45 год. n = 232									
Гладни	6.3	6.8	7.2	7.8	9.6	12.9	15.8	18.8	29.6
ПОМ	17.3	19.0	20.9	23.8	11.9	39.8	47.5	56.4	60.9
Жени < 45 год. n=135									
Гладни	4.8	5.3	6.0	6.6	8.1	10.4	12.6	13.6	16.9
ПОМ	16.0	16.6	17.9	20.0	26.0	34.1	40.2	44.7	48.2
Мажи > 45 год. n=338									
Гладни	6.8	7.2	7.8	8.5	10.3	13.7	15.9	18.6	31.0
ПОМ	21.0	22.0	23.6	25.7	12.6	38.0	42.9	50.3	57.0
Жени > 45 год. n=95									
Гладни	5.8	6.3	6.7	7.1	9.1	54.2	11.4	12.9	13.7
ПОМ	16.8	19.6	21.5	24.0	31.2	15.1	36.9	42.4	50.1

ПОМ, по оптоварување со метионин.

Слика бр. 4: Дистрибуција на плазма концентрациите на хомоцистеин кај здрави испитаници на гладно и четири до шест часа по оптоварување со метионин..('Тајната на Хомоцистеинит'; Марија Крстевска стр.51)

2. МОТИВ ЗА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Мотив за истражувањето претставува постоење на недоволен број рани маркери што би се искористиле во откривањето на васкуларните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус. Со следење на плазма вредностите на хомоцистеинот би се дополнила листата на анализи и показатели во раната дијагностика на микроваскуларни и макроваскуларни компликации кај пациентите со дијабетес мелитус. Со евалуација на вредностите на хомоцистеинот, би се овозможила достапност на уште еден ран маркер во дијагнозата и следењето на васкуларните компликации.

3. ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА

Примарни цели на студијата :

1. Да се определи значењето и асоцираноста на хомоцистеинот како предиктор во појавата и развојот на васкуларните компликации кај дијабетесот.
2. Да се истражи можноста за корелацијата помеѓу покачените вредности на HbA1c, гликемиската контрола и плазма хомоцистеинот, и нивната улога во прогресијата на дијабетичните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус.

Секундарни цели:

1. Да се добијат податоци за присуство на хронични дијабетични компликации од микроваскуларен и макроваскуларен тип кај испитуваната популација
2. Анализа на придружните состојби на дијабетесот, БМИ, липидниот статус и нивната корелација со дијабетичните компликации.
3. Корелација на хомоцистеинемиската со полот, возраста, времетраењето на болеста.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Трудот претставува проспективно-лонгитудинално истражување што е спроведено на Клиниката за ендокринологија и болести на метаболизмот во Скопје.

Во студијата беа вклучени 80 пациенти со дијабетес мелитус тип 2. Регрутираните пациенти беа поделени во две групи: 50 пациенти со дијагностицирани васкуларни компликации и група од 30 пациенти без придружни компликации, што во понатамошното истражување претставува контролна група. Групите на пациенти беа регрутирани континуирано во период од девет месеци. Во овој период пациентите ја посетуваа Клиниката, започнувајќи со контролен преглед/визита 1 или скрининг визита. На оваа визита се вклучуваа пациентите кои ги задоволуваа критериумите за влез во истражувањето, а во втората фаза се формираа и двете групи. Сите податоци беа внесувани во согласени и единствени формулари.

Испитуваната група пациенти е составена од пациенти со дијабетес мелитус тип 2, со потврдена дијагноза и поставена инсулинска иили орална терапија.

Пациентите кои ги задоволија инклузионите критериуми и земаа учество во истражувањето се идентификуваа со броеви, со цел да се заштити идентитетот и личните податоци.

На прегледот-визита 1 се нотираа податоци за детална медицинска историја од секој пациент, вклучувајќи и информации за почетокот и времетраењето на дијабетесот, тип на дијабетес мелитус, присуство на ренални, кардиолошки и невролошки компликации, хипертензија, кардиоваскуларни болести, ретинопатија и невропатија.

По првата визита и по добиените анамнестички податоци се доби увид за постоењето и состојбата на васкуларни компликации, како и за типот на терапијата кај регрутираните пациенти.

Состојбата на болеста и регулираноста на дијабетесот кај пациентите беше следена преку евалуација на мерењата на гликемијата на гладно пред појадок и постпрандијалната гликемија што пациентите ја мереа со самомерач. На контролниот преглед-визита беа следени и вредностите на HbA_{1c}, како биомаркер за долгорочно следење на гликемиската контрола и вредностите на хомоцистеин како ран индикатор за развојот и прогресијата на васкуларните компликации. Појавата и текот на веќе постојните компликации од макроваскуларен и микроваскуларен тип се проценувани и следени преку контролата на липидниот статус со определување на вкупниот холестерол, LDL, HDL како и триглицеридите, хомоцистеин, уреа и креатинин во серум, гликозурија, мукроалбуминурија, телесна тежина и висиночина, индекс на телесна маса, крвен притисок, ЕКГ, очен преглед (фундоскопија) и преглед на стопало. Од секој пациент на првата визита за анализа на потребните параметри беше земено вкупно 15 ml венска крв. Сите анализи, вклучувајќи ја и анализата за хомоцистеинот претставуваат анализи што рутински се изработуваат во секојдневната клиничка практика и беа изработувани во Лабораторијата за клиничка биохемиски анализи при интерните клиници во Скопје.

4.1 КРИТЕРИУМИ ЗА ВКЛУЧУВАЊЕ/ИНКЛУЗИОНИ КРИТЕРИУМИ

Во студијата се вклучени пациенти со дијабетес тип 2 кои ги исполнуваат следниве критериуми:

1. Потпишан формулар за информирана согласност пред сите студиски процедури;
2. Машки или женски пациенти на возраст ≥ 18 години ;
3. Дијабетес мелитус тип 2 повеќе од шест месеци;
4. $HbA1c \geq 7,5\%$;
5. Пациенти со диета и ОАД (орални антидијабетици), терапија со инсулин, ОАД или комбинација на ОАД и инсулин (повеќе од три месеци);
6. $BMI \leq 40 \text{ kg/m}^2$;
7. Можност и способност за придржување кон студиските процедури.

**ОАД- дозволени се сите видови орални антидијабетици, вклучувајќи ги и метформинот и бигванидите.*

4.2 КРИТЕРИУМИ ЗА ИСКЛУЧУВАЊЕ

1. Секундарен дијабетес;
2. Системска терапија со кортикостероиди;
3. Бременост, доење или интенција за забременување;
4. Позната или суспектна алергија на инсулин;
5. Ренална, хепатална и миокардна инсуфициенција;
6. Пролиферативна ретинопатија;
7. Малигни заболувања;
8. Ментални нарушувања и потешкотии за следење на студиските процедури;
9. Пушачи;
10. Хронично консумирање алкохол.

4.3 КРИТЕРИУМИ ЗА ПОВЛЕКУВАЊЕ

Субјектите/пациентите вклучени во ова истражување може да се повлечат во кое било време.

1. Забременување или интенција кон забременување во текот на истражувањето;
2. Тешка хипогликемија и/или хоспитализација;
3. Девиијација од процедурите на истражувањето што би го нарушиле текот на истото.

4.4 РАЦИОНАЛНОСТ ВО ИЗБОРОТ НА ПОПУЛАЦИЈАТА

Пациентите, вклучени во ова истражување, се пациенти со дијабетес мелитус тип 2 дијагностициран шест или повеќе месеци пред вклучување во истражувањето, кои примаат терапија за болеста најмалку три месеци и вредности на HbA1c $\geq 7,5\%$.

Целта на избраната популација е да се вклучат и пациенти со и без дијагностицирани васкуларни компликации со што би се добиле податоци за влијанието и присуството на хомоцистеинот кај микро и макроваскуларните компликации.

Како терапија се дозволени сите видови на ОАД и долго и краткодејствувачки инсулини, со што би се добиле информации за влијание на терапијата користена во третман на дијабетесот врз нивоата на хомоцистеин. Следењето на инклузионите критериуми би осигурало група пациенти што ќе биде репрезентативен примерок на пациентите во секојдневната клиничка практика.

4.5 ПРОТОКОЛ НА РАБОТА

Активностите се одвиваа во три фази:

- Фаза на подготовка;
- Фаза на практична изведба;
- Завршна фаза, во која е направена статистичка анализа на добиените резултати и нивна евалуација.

4.6 КОНТРОЛЕН ПРЕГЛЕД / ВИЗИТА 1

Контролен преглед - Визита на скринирање. На овој контролен преглед на пациентите им беа објаснети студиските процедури од страна на истражувачот. Пациентите беа целосно информирани (на устен и писмен начин) за одговорностите во истражувањето, како и за бенефитот и можните ризици. Субјектите согласни да учествуваат, беа замолени да потпишат Формулар за информирана согласност пред сите студиски процедури. Со ова, пациентите имаа можност да ја дадат својата согласност за учество во истражувањето, одкако имаа доволно време за разгледување на условите.

На оваа визита беа разгледани инклузионите и екслузионите критериуми од страна на истражувачот и се нотираа демографските податоци: полот, возраста, информациите за почетокот на болеста, тековната терапија и нејзиниот почеток, податоци за постојните компликации и придружни болести. На визитата 1 беше мерена телесна тежина, височина и БМИ, беше извршен физикален преглед, витални знаци (пулс и притисок), ЕКГ преглед, фундоскопија и ултрасонографски доплер преглед и преглед на дијабетично стапало.

Пациентите од женски пол беа прашани за репродуктивниот статус и користењето на контрацептивни мерки. На оваа визита беа земени и примероци на крв за: ФПГ, HbA1c, липиди, диференцијална крвна слика, биохемиски анализи и хомоцистеин, уреа, креатинин, како и анализи за микроалбуминурија и урина за дипстик тестирање тест за бременост. Пациентите беа прашани за составот и начинот на исхраната, како и за навиките за пушење и консумирање алкохол.

На првата визита се утврди ефикасноста на тековната терапија врз текот на основната болест, присуството на дијабетичните компликации, нивниот тек и корелацијата со покачените вредности на плазма Hsu и вредностите на HbA1c, како и нивното влијание врз појавата на истите.

4.7 РАСПОРЕД НА АКТИВНОСТИ НА ВИЗИТА 1

Број на визита	B1
Време на визита (месеци)	0
Можност за отстапување	+/- 3 дена
Студиски процедури	
Информирана согласност	X
Инклузиони/ексклузиони критериуми	X
Критериуми за исклучување	X
Демографија	X
Физикален преглед	X
Витални знаци	X
ЕКГ	X
Фундоскопија	X
Доплер	X
Преглед на стапало	X
Височина	X
ТТ	X
БМИ	X
Дијагноза на ДМ	X
Терапија за ДМ	X
Придружни болести и медикација	X
Несакани настани	X
ФПГ	X
HbA1c	X
ФПГ/ППГ	X
Биохемиски анализи	X
Диференцијална крвна слика	X
Липиди	X
Урина тестови	X
Тест за бременост (урина)	X
Микроалбуминурија	X
Уреа и креатинин	X
Хомоцистеин	X
Диететски режим	X
Пушење	X
Конзумирање алкохол	X

Табела бр.1. Распоред на активности на визита 1

4.8 ПАРАМЕТРИ НА ЕФИКАСНОСТ

1. Плазма вредности на хомоцистеин од 5-15 μ mol/L;
2. Гликемија на гладно од 4,4 до 6,1 μ mol/l (ќе се определува со ензимски метод/самомерач);
3. Постпрандијална гликемија на два часа по ручекот помала од 7,8 mmol/ (ензимски метод/самомерач);
4. Вредности на HbA1c до 6,5%. (работени според метод на јоноизменувачка хроматографија).

4.9 ДРУГИ ПАРАМЕТРИ

1. Липиден статус, со определување на вкупен холестерол, LDL, HDL како и триглицериди (работени според ензимски PАР методи);
2. Хомоцистеин (Еклиа Електрохемилуминисцентен имуноесеј);
3. Уреа во серум (ензим UV тест);
4. Креатинин во серум (Jaffe-ова реакција);
5. Муикроалбуминурија (работена со семиквантитативен метод);
6. Телесна тежина и височина (вага со висиномер);
7. Индекс на телесна маса (БМИ – табела; ТТ (кг) / Височина (м) x Височина (м);
8. Крвен притисок (живин мерач);
9. ЕКГ (12 –канален ЕКГ апарат);
10. Очен преглед (фундоскопија);
11. Тест за бременост (урина тест);
12. Урина анализи (дипстик ленти) еритроцити, протеини, глукоза и кетони, ПХ.

4.10 МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ХОМОЦИСТЕИН

- За целите на ова истражување ќе биде користен методот ЕКЛИА Електрохемилуминисцентен имуноесеј;
- Сите лабораториски анализи се работени во Лабораторијата за клиничка биохемиски анализи при интерните клиници во Скопје.

4.11 РЕФЕРЕНТНИ ВРЕДНОСТИ И ИНТЕРПРЕТАЦИЈА

Референтните вредности за tHcy се движат меѓу 5 и 15 $\mu\text{mol/l}$. Вредностите поголеми од 15 $\mu\text{mol/l}$ говорат за хиперхомоцистеинемија. Таа може да биде:

- Умерена 15 - 30 $\mu\text{mol/l}$;
- Средна 30-100 $\mu\text{mol/l}$;
- Тешка > 100 $\mu\text{mol/l}$.

5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Опфаќа статистичка анализа на добиените податоци. Во статистичката анализа на добиените резултати од студијата се користени повеќе методи на дескриптивната и аналитичка статистика (параметриска и непараметриска).

- Фреквенции;
- Проценти;
- Пропорции;
- Аритметичка средина (средна вредност);
- Стандардна девијација;
- Кростабулации (вкрстувања).

За тестирање на нултата хипотеза и донесување на валидни заклучоци, беа користени:

1. Еднофакторска анализа за пропорции за атрибутивни обележја на набљудување – one way ANOVA за пропорции;
2. Student's t test за пропорции ;
3. ρ – Спирманов коефициент на корелација на рангови;
4. Student's t test за два неврзани големи примероци;
5. χ^2 тест;
6. Fisher-ov егзактен тест;
7. Гаусова распределба на податоци.

При споредувањето на податоците помеѓу двете групи беше користен Mann-Whitney U-test.

$P < 0,05$ и $p < 0,01$, беа прифатени како параметри на статистичка сигнификантност како и за веројатноста на остварување на нултата хипотеза, согласно со меѓународните стандарди за биомедицински науки.

6. РЕЗУЛТАТИ

6.1 ДИСТРИБУЦИЈА НА ПРОЦЕНТНА ЗАСТАПЕНОСТ НА ПАЦИЕНТИТЕ СПОРЕД ПОЛОТ, ВОЗРАСТА, ВРЕМЕТРАЕЊЕТО НА БОЛЕСТА И ЗАСТАПЕНОСТА НА ВАСКУЛАРНИ КОМПЛИКАЦИИ

Графикон бр.1: Дистрибуција на процентна застапеност на пациентите според полот, без дијагностицирани компликации



Направената статистичка анализа со Анова за пропорции покажа дека нивото на веројатност за остварување на нултата хипотеза изнесува $p < 0,05$, што значи дека постои статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенциите на испитуваните пациенти кај кои не беа дијагностицирани компликации во однос на полот.

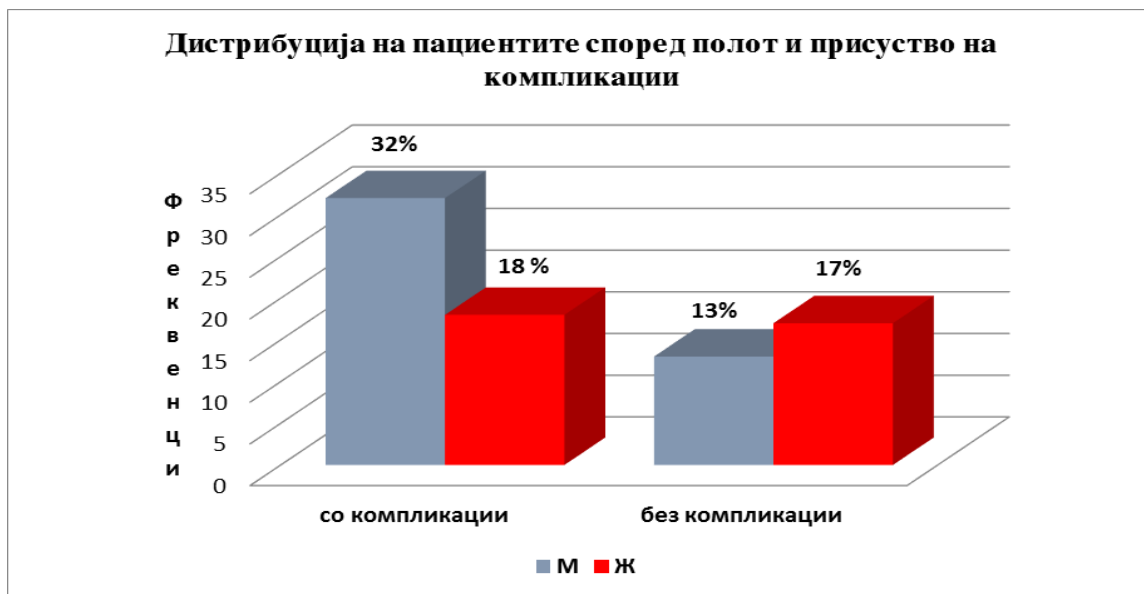
Статистички значајно доминира женскиот пол. Од испитуваната група на пациенти без компликации 17% беа жени, а 13% припадници на машкиот пол.

Графикон бр. 2: Процентна застапеност на пациентите според полот, со дијагностицирани компликации

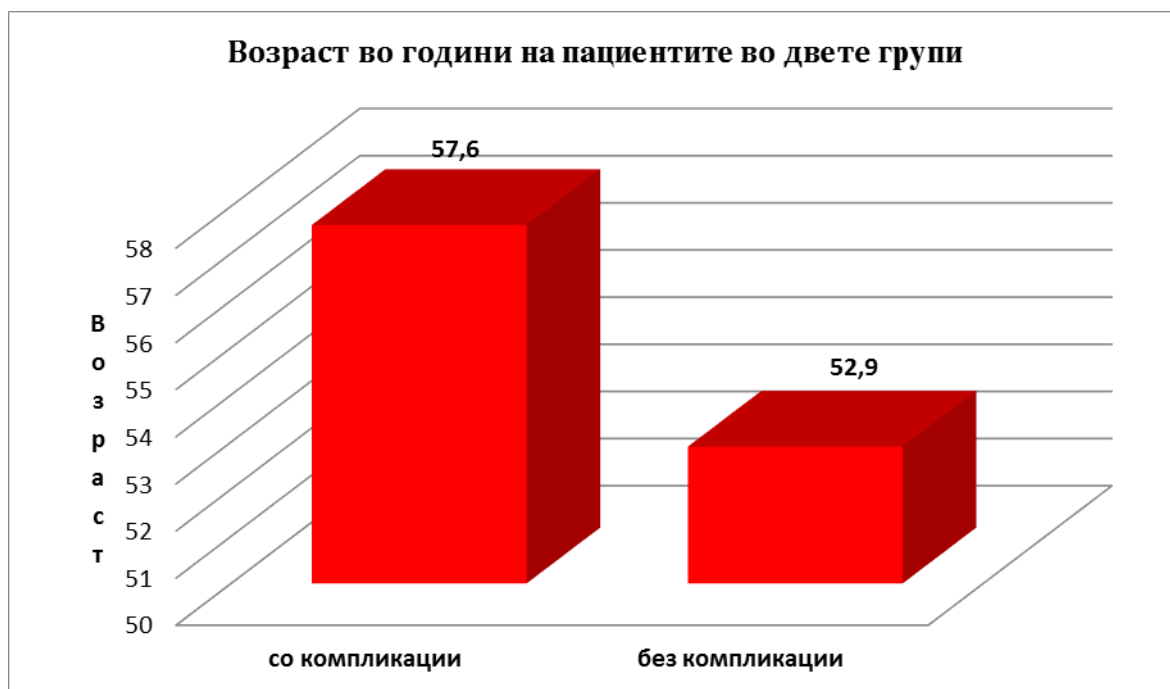


Направената статистичка анализа со Анова за прпорции покажа дека нивото на веројатност за остварување на нултата хипотеза изнесува $p < 0,05$. Тоа значи дека постои статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенциите на испитуваните пациенти во однос на полот, кај кои беа дијагностицирани компликации. Во оваа група пациенти татистички значајно доминира машкиот пол. Во групата пациенти кај кои беа дијагностицирани васкуларни компликации машкиот пол беше застапен со 32% а женскиот со застапеност од 18% .

Графикон бр. 3: Дистрибуција на испитуваните пациенти според полот и присуството на компликации

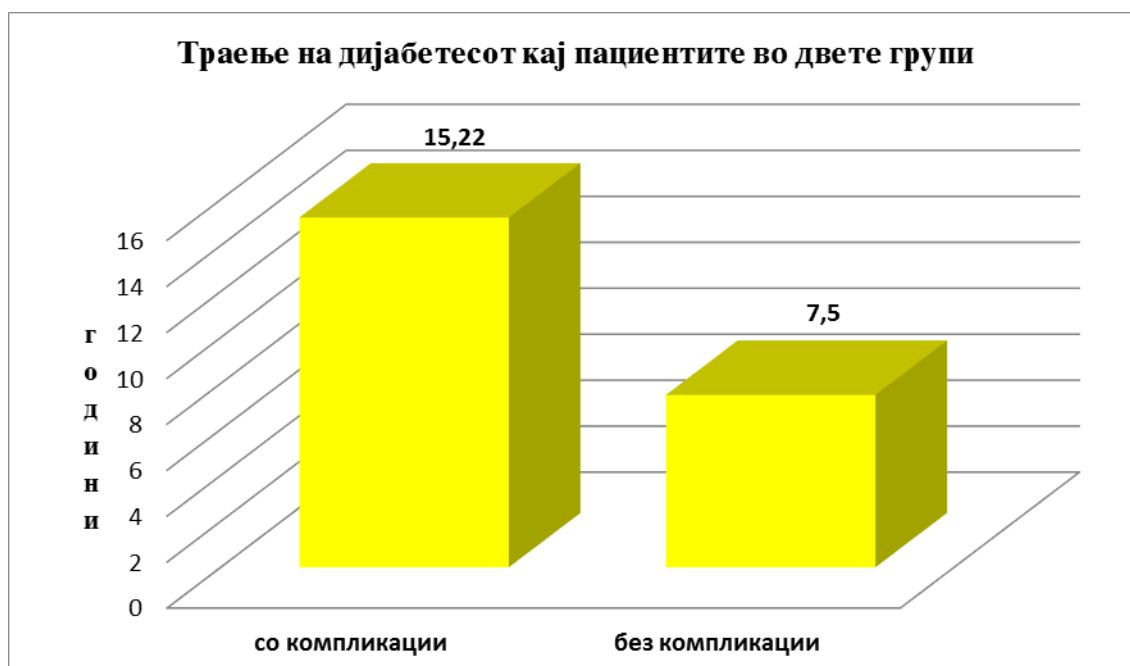


Графикон бр. 4: Дистрибуција на возраст кај испитуваните пациенти



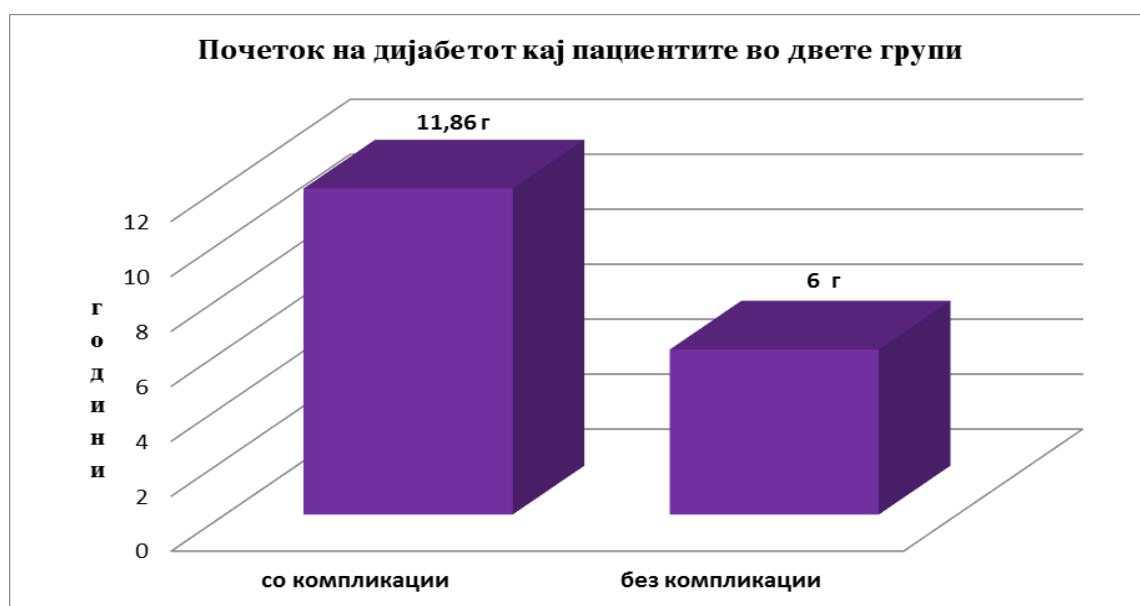
Просечната возраст кај испитуваните пациенти со компликации е 57,6 години со стандардна девијација 11,96 години, а кај испитуваните пациенти без компликации е 52,9 години со стандардна девијација 14,52 години. Направениот Студентов т-тест за два големи неврзани примероци покажа $t=1,569$, $DF=78$, и $p>0,05$, што значи дека не постои статистички значајна разлика во просечните вредности на староста во години помеѓу двете испитувани групи на пациенти.

Графикон бр. 5: Дистрибуција на времетраење на дијабетес мелитус тип 2 кај испитуваните групи со и без компликации



Направениот Ман-Витниев U тест на инверзија покажа дека веројатноста на остварување на нултата хипотеза изнесува $p < 0,01$, што значи дека постои високо-статистички значајна разлика во просечните вредности на времетраењето на болеста кај двете групи. Статистички високозначајно е подолго времетраење на болеста кај пациентите со компликации. Времетраење на дијабетесот кај групата на пациенти со компликации изнесува 15,22 години, со стандардна девијација од 9,9 години, а кај пациентите без компликации времетраењето е 7,5 години, со стандардна девијација од 7,347 години.

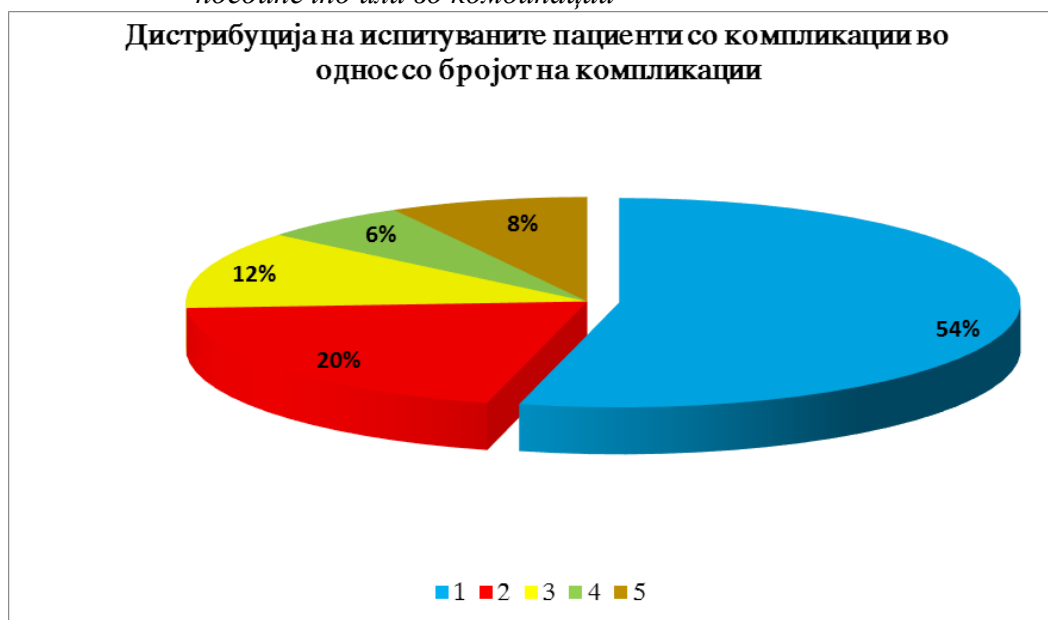
Графикон бр. 6: Дистрибуција на почетокот на дијабетес мелитус тип 2 кај испитуваните групи пациенти со и без компликации



Почетокот и времетраењето на болеста кај групата пациенти со компликации е 11,86 години со стандардна девијација 9,348 години. Болеста кај групата без компликации е започната пред шест години со стандардна девијација од 4,86 години. Во двата случаи немаме Гаусова распределба на податоците, поради што во статистичкото тестирање на нултата хипотеза користиме непараметарски Ман-Витниев U тест на инверзија. Овој тест покажа дека веројатноста на остварување на нултата хипотеза е $p < 0,01$, од што би можело да се заклучи дека воочената разлика е високо-статистички значајна, односно дека помеѓу почетокот на болеста во двете групи сигнификантно подоцна започнува болеста кај пациентите без компликации.

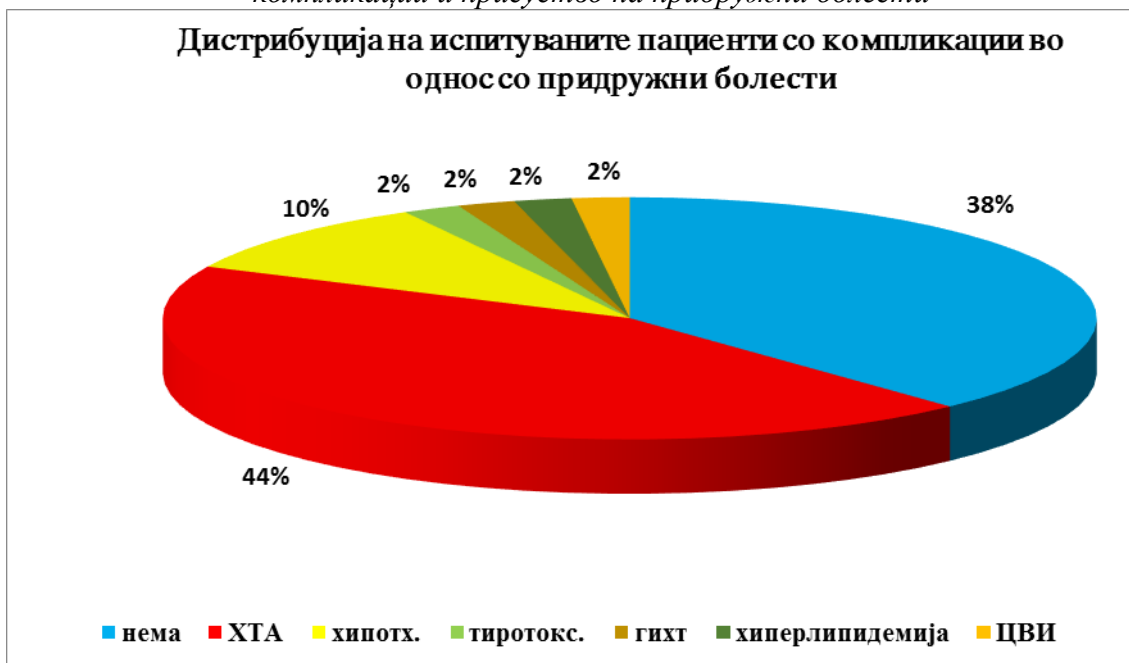
6.2 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ДИЈАБЕТИЧНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ, ПРОЦЕНТНА ДИСТРИБУЦИЈА ПОЕДИНЕЧНО ИЛИ ВО КОМБИНАЦИЈА, КОМБИНАЦИЈА СО ПРИДРУЖНИ БОЛЕСТИ

Графикон бр. 7: Процентна дистрибуција на дијабетичните компликации поединечно или во комбинации



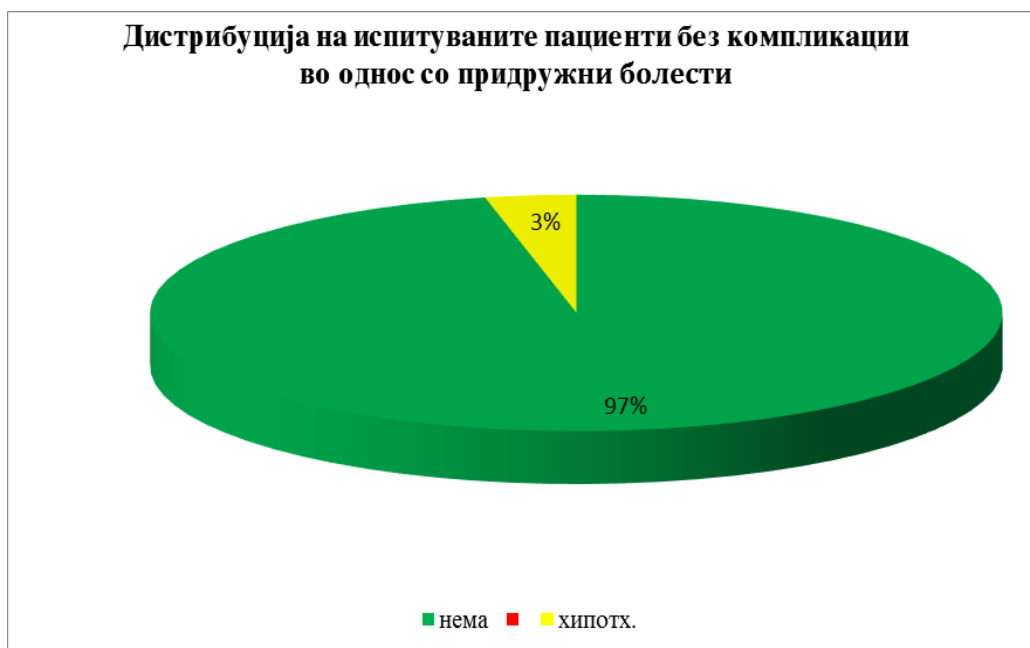
Процентната застапеност на бројот на компликациите е обработена со Хи-квадрат тест на слагање со кој се доби: Хи-квадрат=53,94, DF=5 и $p < 0,01$, од каде произлезе статистички високо-значајна разлика во фреквенците на пациентите со број на компликации односно статистички високо-сигнификантно доминираат пациенти со една компликација.

Графикон бр. 8: Процентна дистрибуција на испитуваните пациенти со компликации и присуство на придружни болести



Хи-квадрат тестот како тест на слагање покажа: Хи-квадрат=165, DF=6, и $p < 0,01$, поради што може да се заклучи дека статистички високо-значајно доминираат пациентите со компликации кај кои најчеста придружна болест е хиперлипидемијата.

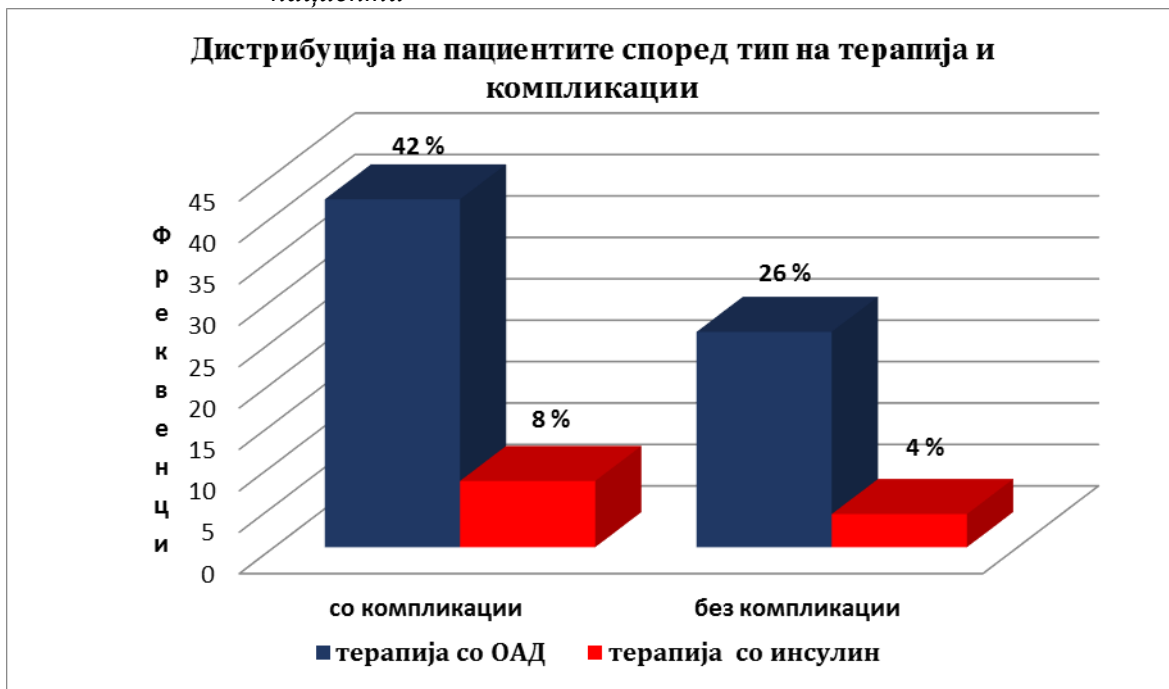
Графикон бр. 9: Процентна дистрибуција на придружните болести кај групата пациенти без компликации :



Направениот Фишеров егзактен тест покажа $p < 0,01$, што значи дека статистички високозначајно доминира групата пациенти без компликации и без придружни болести. Меѓусебната споредба на двете групи користејќи го Ман-

Витниевит У тест на инверзија, покажа веројатност на остварување на нултата хипотеза $p < 0,01$, каде статистички високо-сигнификантно имаме разлика во однос на придружните болести кои се далеку почести во групата на болни со компликации.

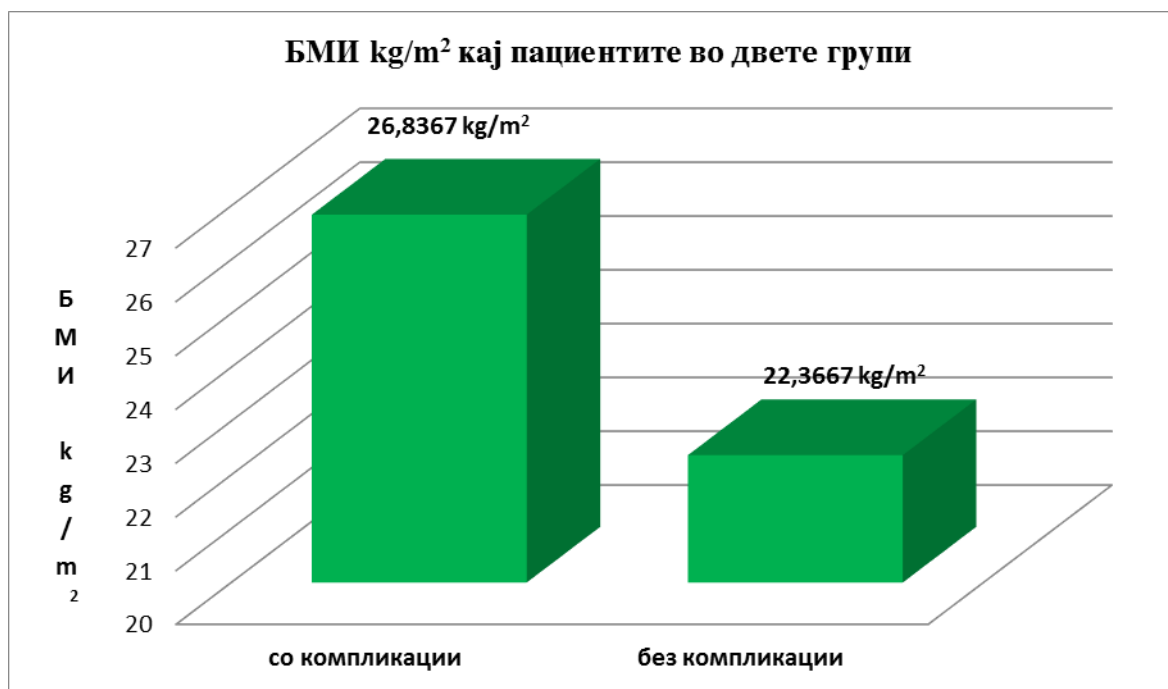
Графикон бр. 10: Процентна дистрибуција на типот на терапија кај двете групи пациенти



Направениот Ман-Витниев тест на инверзија покажа дека не постои статистички значајна разлика во однос на дистрибуцијата на фреквенциите на пациентите од двете групи во однос на типот на терапија.

6.3 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА БМИ (ИНДЕКС НА ТЕЛЕСНА ТЕЖИНА) КАЈ ДВЕТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ

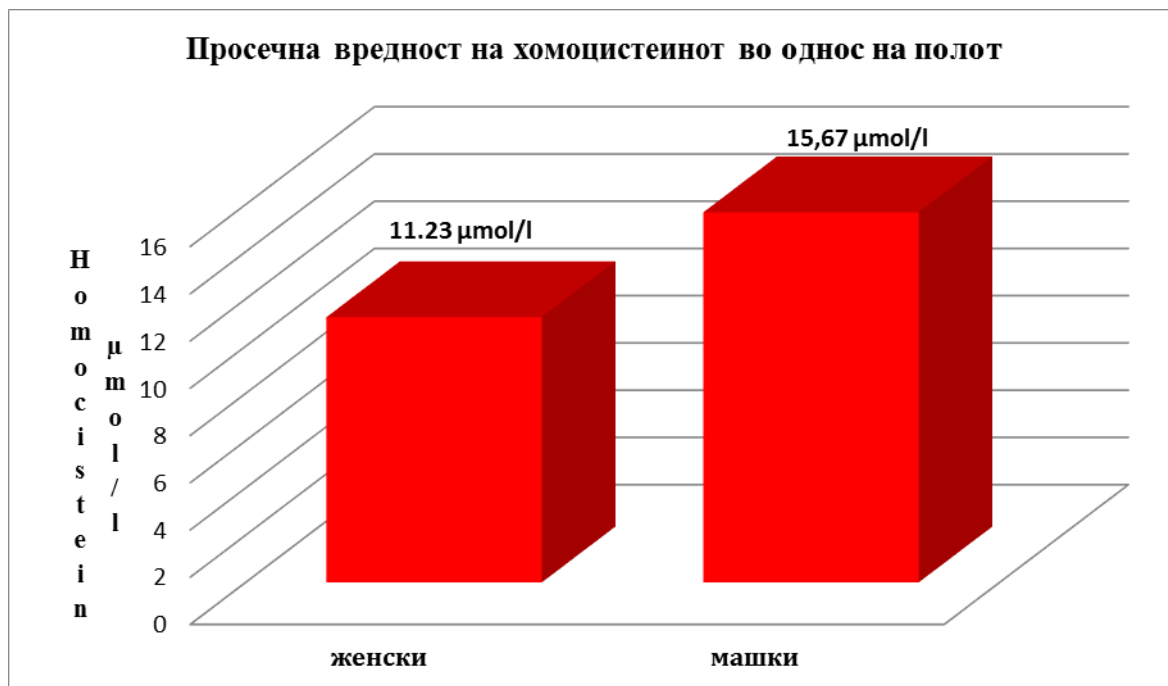
Графикон бр. 11: Дистрибуција на вредностите на БМИ кај испитуваните групи пациенти



Дистрибуција на вредноста на индексот на телесна тежина (БМИ) кај групата пациенти со компликации изнесува $26,8367 \text{ kg/m}^2$ со стандардна девијација од 2,84566, додека кај групата пациенти без компликации БМИ просечно изнесува $22,3667 \text{ kg/m}^2$ со стандардна девијација од 2,65854. Помеѓу податоците постои нормална Гаусова распределба и во двете групи, што овозможува тестирање на нултата хипотеза е со параметриски Студентов т-тест за два големи неврзани примероци. Од добиениот резултат: $t=3,837$, $DF=77$, $p < 0,01$, можеме да заклучиме дека статистички-значајно имаме повисока вредност на БМИ кај пациентите со компликации во однос на вредноста на БМИ кај пациентите без компликации.

6.4 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН ВО ОДНОС НА ПОЛОТ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ

Графикон бр. 12: Дистрибуција на вредностите на хомоцистеин кај испитуваната група пациенти во однос на полот

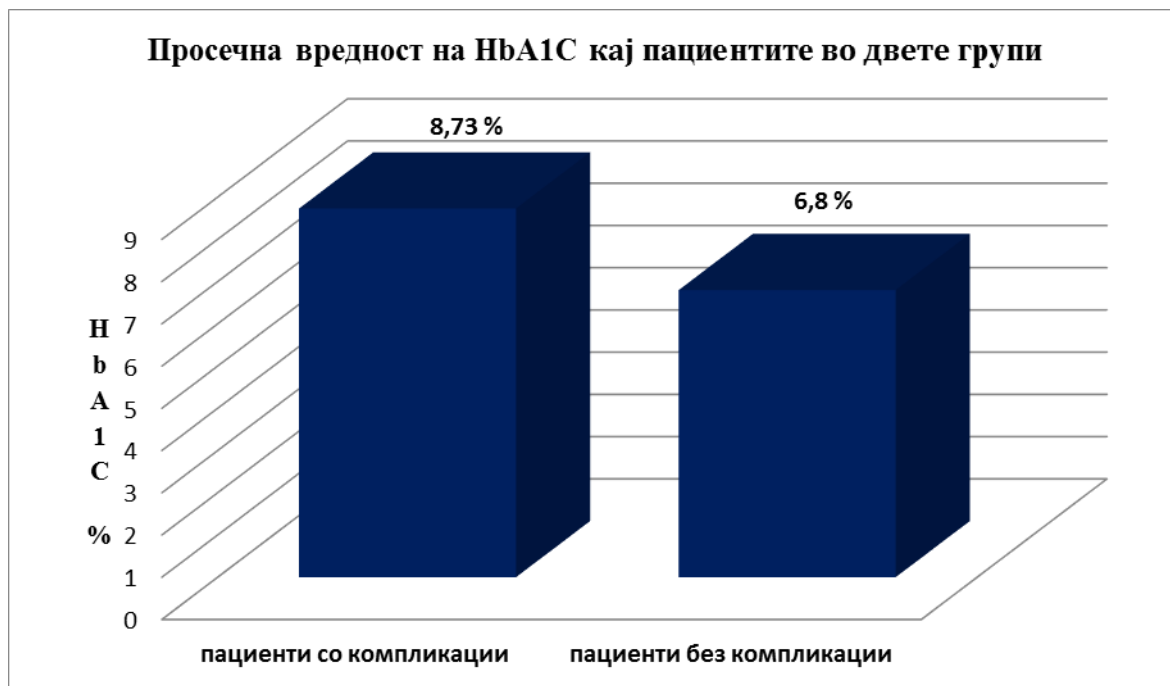


Процентната застапеност на вредностите на хомоцистеинот во однос на полот е изработена со помош на Ман-Витниев U тест на инверзија кој покажа статистички висока разлика, $p < 0,01$ на вредностите на хомоцистеин кај машкиот пол во однос на женскиот.

Просечните вредности на хомоцистеин кај машкиот пол изнесуваат $15,67 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација $4,11 \mu\text{mol/l}$, а кај женскиот пол $11,23 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $3,97 \mu\text{mol/l}$.

6.5 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА HbA1c И ХОМОЦИСТЕИН И НИВНА КОРЕЛАЦИЈА КАЈ ДВЕТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА ВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ

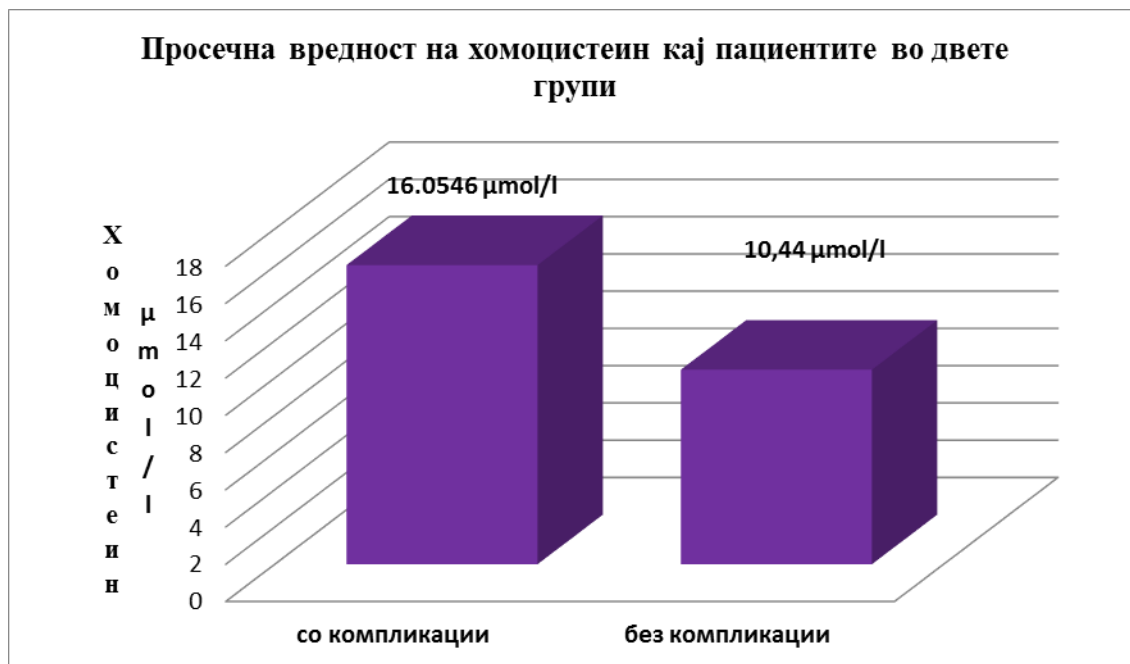
Графикон бр. 13: Дистрибуција на вредностите на HbA1c кај испитуваната група пациенти



Просечната вредност на HbA1c кај групата пациенти со компликации изнесува 8,73% со стандардна девијација 1,76%, а кај групата пациенти без компликации изнесува 6,8% со стандардна девијација 2,51%. Овие вредности овозможуваат нормална распределба на податоците, и кај истите имаше можност за користење на параметарски тест.

Направениот студентов т-тест за два големи неврзани примероци резултираше со $t=2,345$, $DF=76$, $p<0,01$ од каде произлезе дека постои статистички високозначајна разлика во процентните вредности на испитуваниот параметар HbA1c помеѓу двете групи. Статистички сигнификантно повисоки вредности на HbA1c постојат кај пациентите со васкуларни компликации.

Графикон бр. 14: Дистрибуција на просечната вредност на хомоцистеинот кај двете групи пациенти: со и без компликации



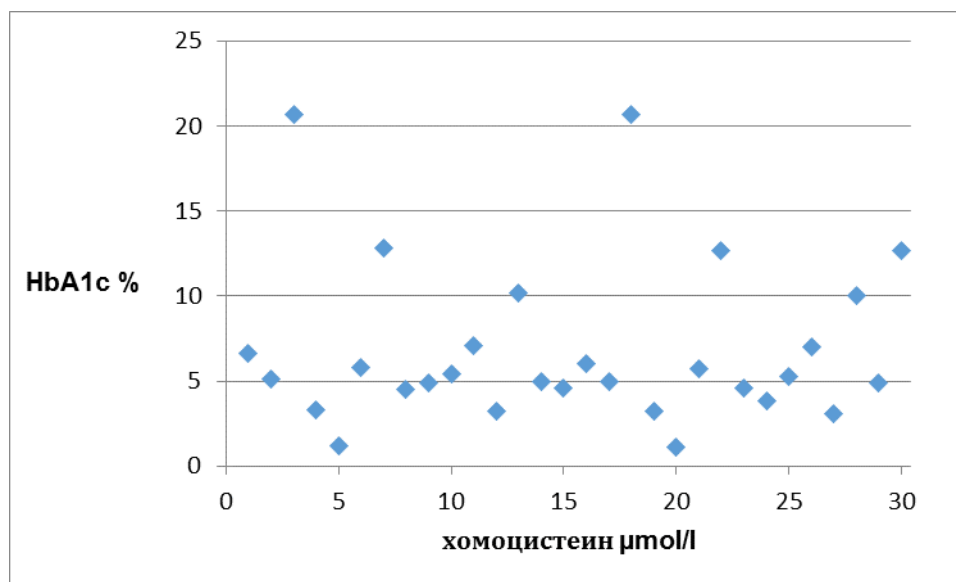
На графиконот број 14 е прикажана дистрибуцијата на вредностите на хомоцистеин кај испитуваните групи пациенти со и без васкуларни компликации. Кај групата пациенти кај кои беа дијагностицирани васкуларни компликации просечната вредност на хомоцистеинот изнесува 16,054 µmol/l со стандардна девијација од 5,75 µmol/l а кај втората група без компликации просечната вредност на хомоцистеинот е 10,44 µmol/l со стандардна девијација 3,45 µmol/l.

Во овој случај не можеше да се искористи методот на Гаусовата нормална распределба, затоа во меѓусебната споредба на податоците беше употребена непараметарска статистика - односно Ман-Витниев U тест на инверзија.

Со овој тест се доби ($p < 0,0$), односно, постоење на статистички значајна разлика во просечните вредности на хомоцистеинот помеѓу двете групи, со позитивна корелација помеѓу покачените вредности на хомоцистеин кај пациентите со присуство на васкуларни компликации.

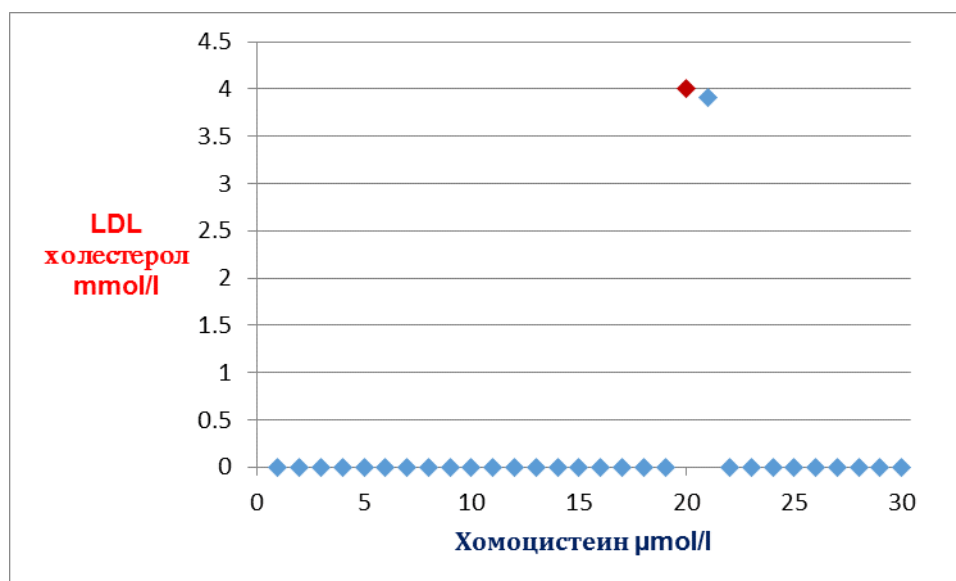
6.6 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА – КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН И НБА1с И ХОМОЦИСТЕИНОТ И LDL ХОЛЕСТЕРОЛОТ

Графикон бр. 15: Корелационен дијаграм помеѓу хомоцистеинот и вредностите на НБА1с



Направената непараметриска корелација според Спирман покажа: $R_0=0,475$, $DF=78$, и $p<0,05$, што ја докажува статистички значајната корелација помеѓу покачените вредности на хомоцистеин и високите вредности на НБА1с кај испитуваните пациенти.

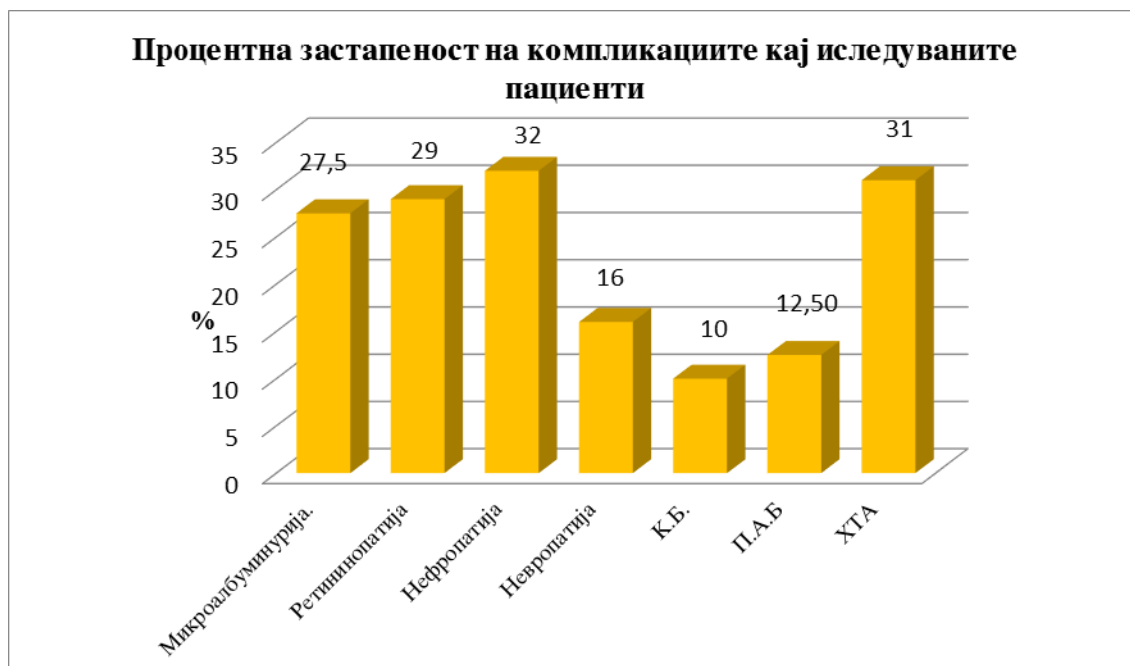
Графикон бр.16: Корелационен дијаграм помеѓу хомоцистеинот и LDL холестерол



Корелацијата на хомоцистеинот со LDL холестеролот статистички е обработена со користење на Спирман тест за корелации што покажа постоење на статистички високзначајна корелација на високите вредности на двата параметри ($R_0=0,871,DF=21, p<0,01$).

6.7 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ДИЈАБЕТИЧНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ, ПРОЦЕНТНА ДИСТРИБУЦИЈА ПОЕДИНЕЧНО

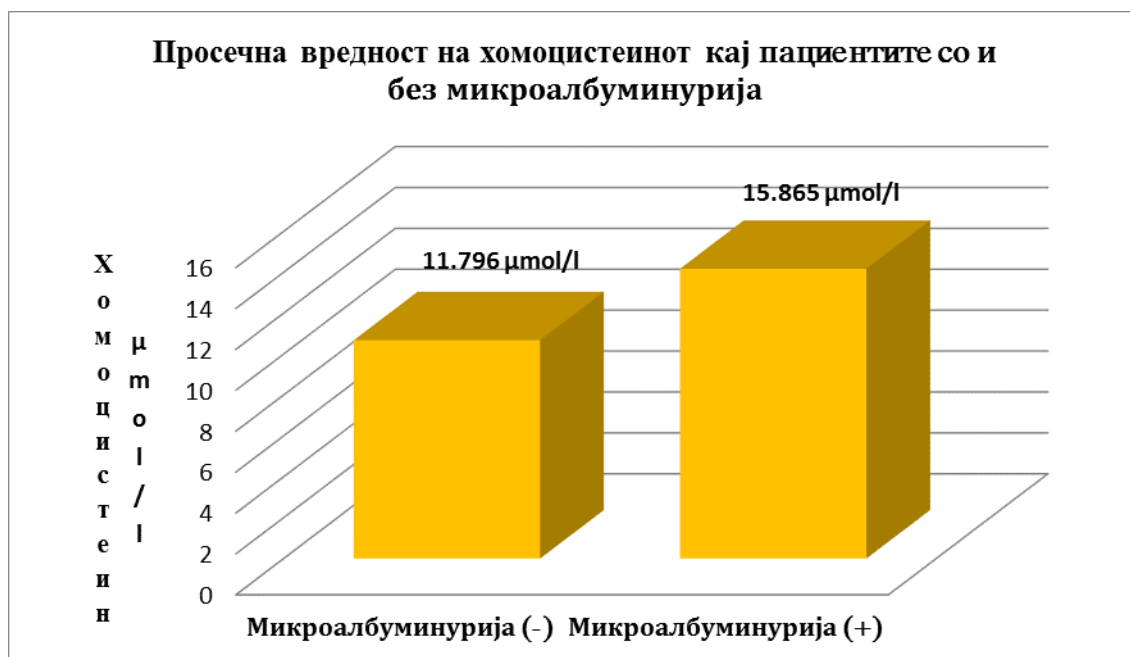
Графикон бр.17: Процентна застапеност на компликациите кај иследуваните пациенти



На графиконот бр.17 е дадена процентната застапеност на одделните компликации кај испитуваните пациенти. Направениот тест АНОВА за пропорции покажа: $F=11/2$. $DF=6$, $p<0,01$, статистички значајно се разликуваат васкуларните компликации според процентна застапеност, каде што во најголем процент е застапена нефропатијата со 32% и ХТА со 31%.

6.8 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА МИКРОВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ

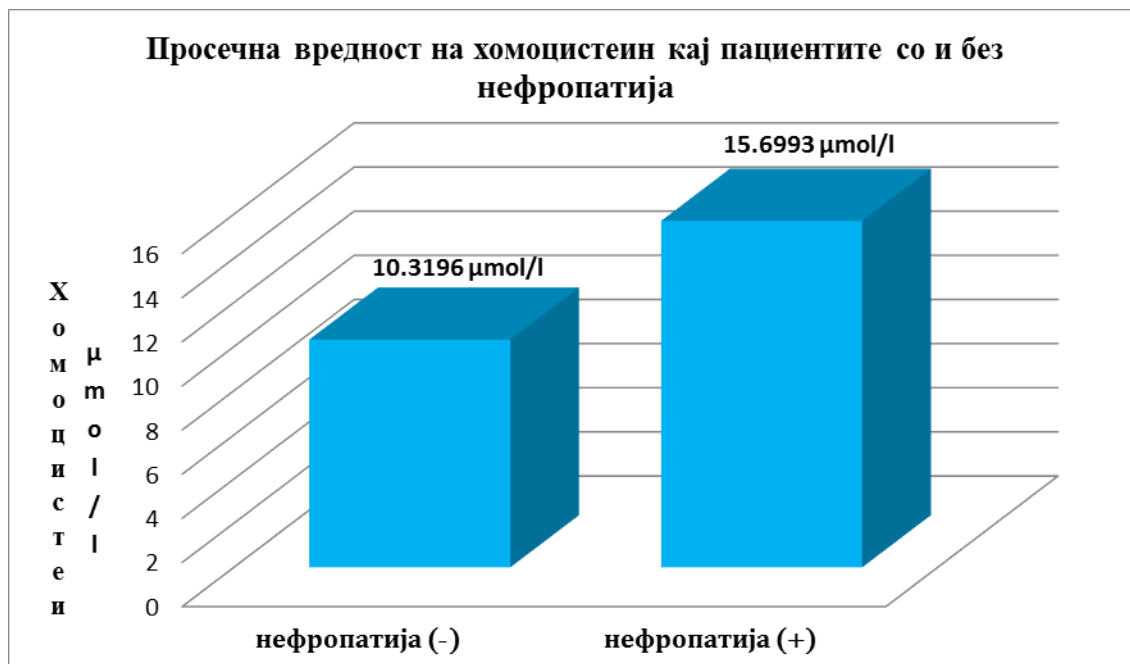
Графикон бр.18: Дистрибуција на просечната вредност на хомоцистеинот кај двете групи пациенти: со и без детектирана микроалбуминурија



На графиконот бр.18 се прикажани вредностите на хомоцистеин во однос микроалбуминуријата. Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите кои немаат микроалбуминурија е $11,796 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $4,1 \mu\text{mol/l}$. Кај пациентите кај кои беше детектирана микроалбуминурија вредноста на хомоцистеин беше $15,865 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $6,803$.

Во статистичката анализа беше користен непараметарски Ман-Витниев U тест на инверзија, кој покажа дека постои статистички значајна разлика ($p < 0,05$) во просечните вредности на хомоцистеинот кај пациентите кои имаат микроалбуминурија во однос на групата пациенти кои немаат микроалбуминурија.

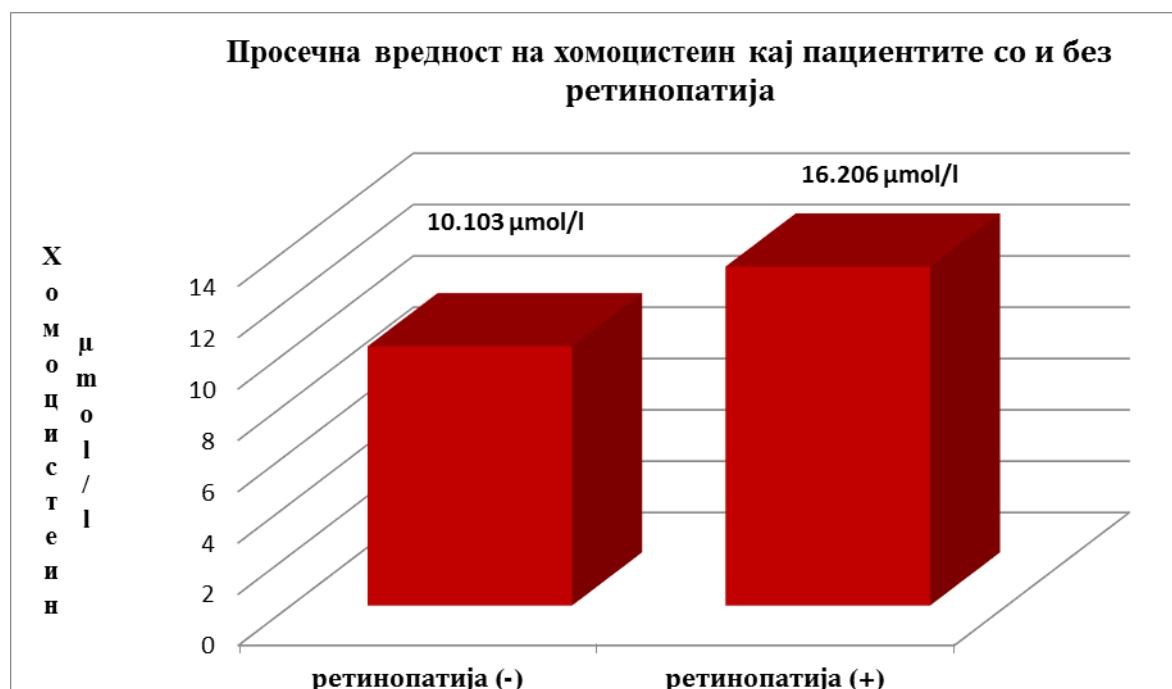
Графикон бр. 19: Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без нефропатија



Направената статистичка анализа со Ман-Витниевит У тест на инверзија покажа ($p < 0,05$), статистички значајна разлика во просечните вредности на хомоцистеинот помеѓу двете иследувани групи, каде просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со дијабетична нефропатија изнесува 15,6993 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 6,486 $\mu\text{mol/l}$.

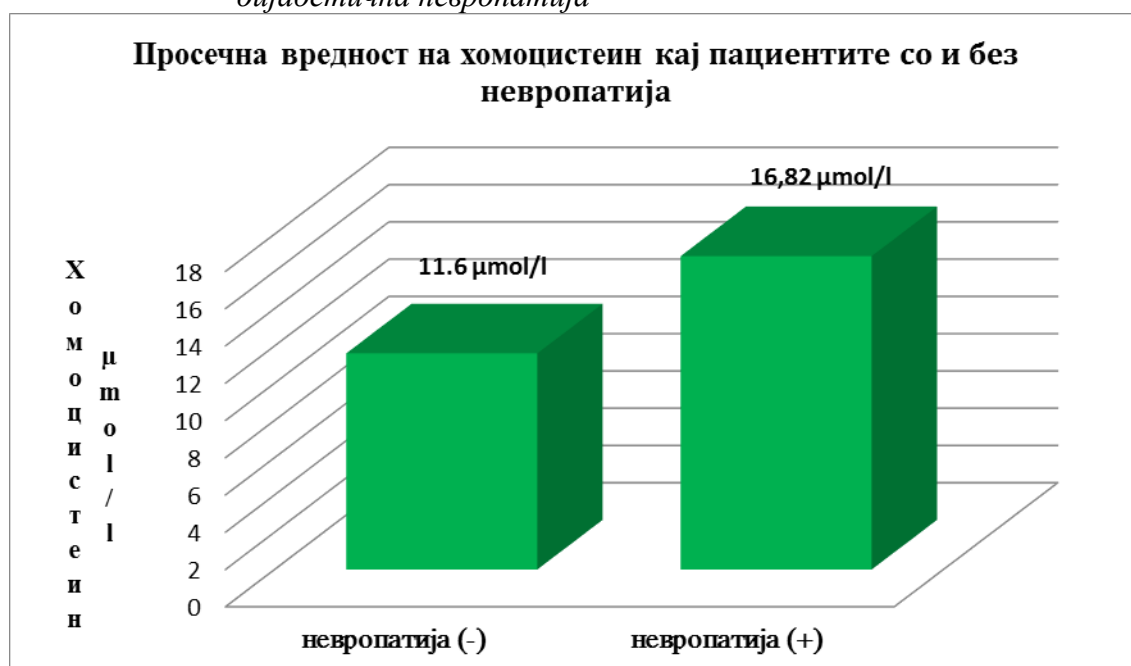
Кај пациентите кои немаат нефропатија просечната вредност на хомоцистеинот е 10,3196 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 4,2 $\mu\text{mol/l}$, одејќи во прилог на позитивна релација помеѓу хиперхомоцистеинемијата и нефропатијата како микроваскуларна компликација.

Графикон бр. 20: Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без дијабетична ретинопатија



Статистичката анализа на параметрите со Ман-Витниев U тест на инверзија покажа статистичка значајна разлика ($p < 0,05$) помеѓу просечните вредности на хомоцистеинот кај пациентите со и без ретинопатија. Статистички доминираат повисоките вредности на хомоцистеин, $16,206 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $5,6 \mu\text{mol/l}$ кај пациентите со дијабетична ретинопатија во однос вредностите на хомоцистеин од $10,103 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација $4,82 \mu\text{mol/l}$, кај пациентите кои немаа ретинопатија.

Графикон бр. 21: Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без дијабетична невропатија



Кај пациентите кои имаат невропатија просечната вредност на хомоцистеинот е 16,82 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 5,6 $\mu\text{mol/l}$, додека кај пациентите кои немаат невропатија просечната вредност на хомоцистеинот е 11,6 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 4 $\mu\text{mol/l}$.

Повторно во статистичката анализа е користен непараметарски Ман-витниев U тест на инверзија а веројатноста на остварувањето на нултата хипотеза е $p < 0,05$ која докажува дека воочената разлика е статистички значајна, односно статистички значајно пониски се вредностите на хомоцистеинот кај оние пациенти кои немаат невропатија.

6.9 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ СПОРЕД ЗАСТАПЕНОСТ НА МАКРОВАСКУЛАРНИТЕ КОМПЛИКАЦИИ

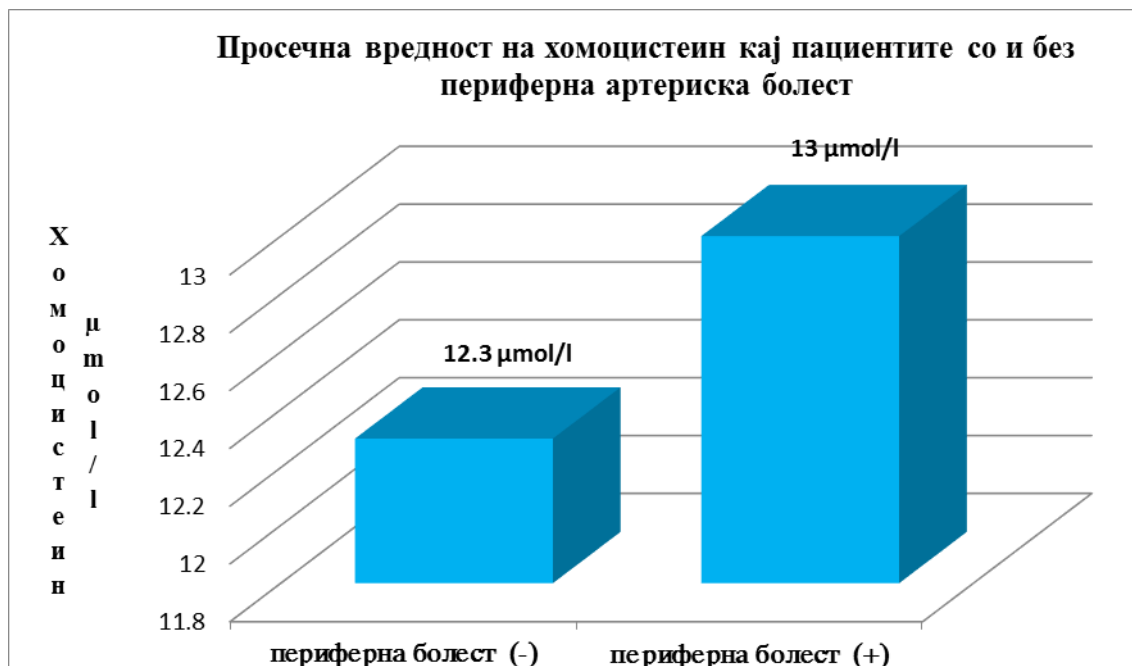
Графикон бр. 22: Просечна вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без коронарна болест



Кај пациентите со коронарна болест како компликација просечната вредност на хомоцистеинот е 16,54 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација 5,6 $\mu\text{mol/l}$, а кај оние кои немаат компликација коронарна болест просечната вредност на хомоцистеинот е 11,93 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација 4,77 $\mu\text{mol/l}$.

Поради распределбата која не е Гаусова се користи Ман-Витниевиот U тест на инверзија како непараметарски тест. Од анализата се доби $p < 0,05$, кој говори дека воочената разлика е статистички значајна, односно просечните вредности на хомоцистеинот кај оние пациенти кои имаат коронарна болест е статистички значајно повисока во однос на просечните вредности кај пациентите без коронарна болест.

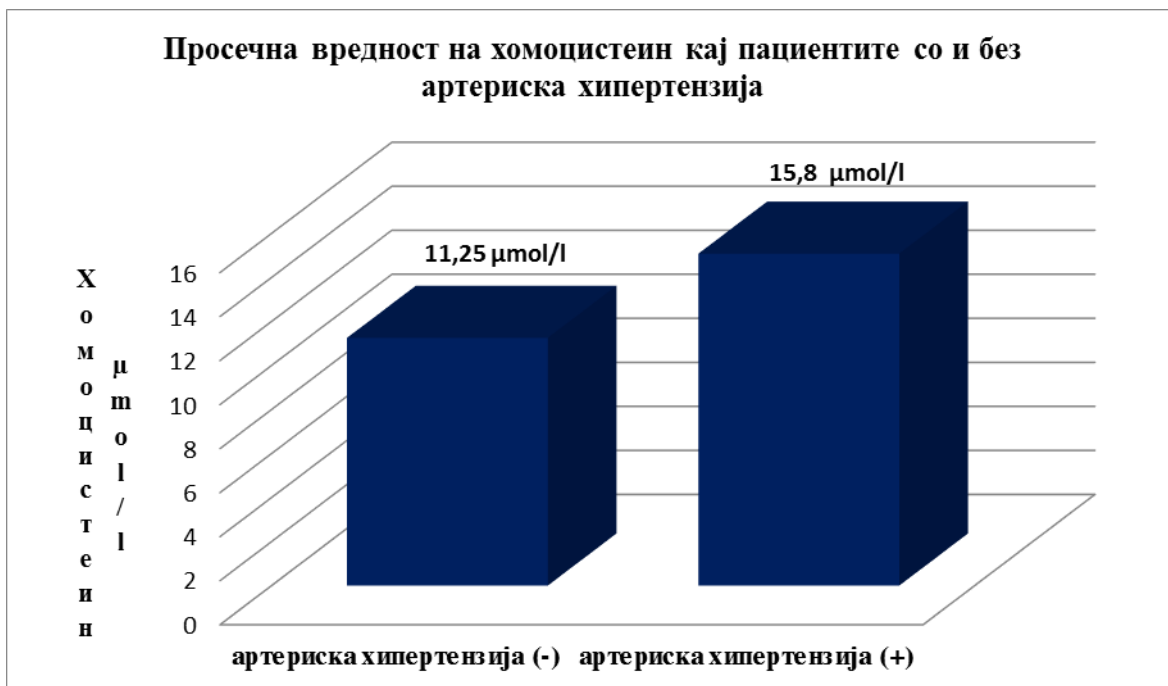
Графикон бр. 23: Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без периферна артериска болест



Кај пациентите кои имаат периферна артериска болест како компликација на дијабетесот просечната вредност на хомоцистеинот е 13 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 3,8 $\mu\text{mol/l}$, а кај пациентите кај кои не беше дијагностицирана периферна артериска болест просечната вредност на хомоцистеинот е 12,3 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 5,21 $\mu\text{mol/l}$.

Поради прераспределбата на параметрите која не е Гаусова нормална распределба, користен е непараметарски Ман-Витниев U тест на инверзија со што се доби ($p > 0,05$) и воочената разлика не е статистички значајна.

Графикон бр. 24: Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со и без артериска хипертензија

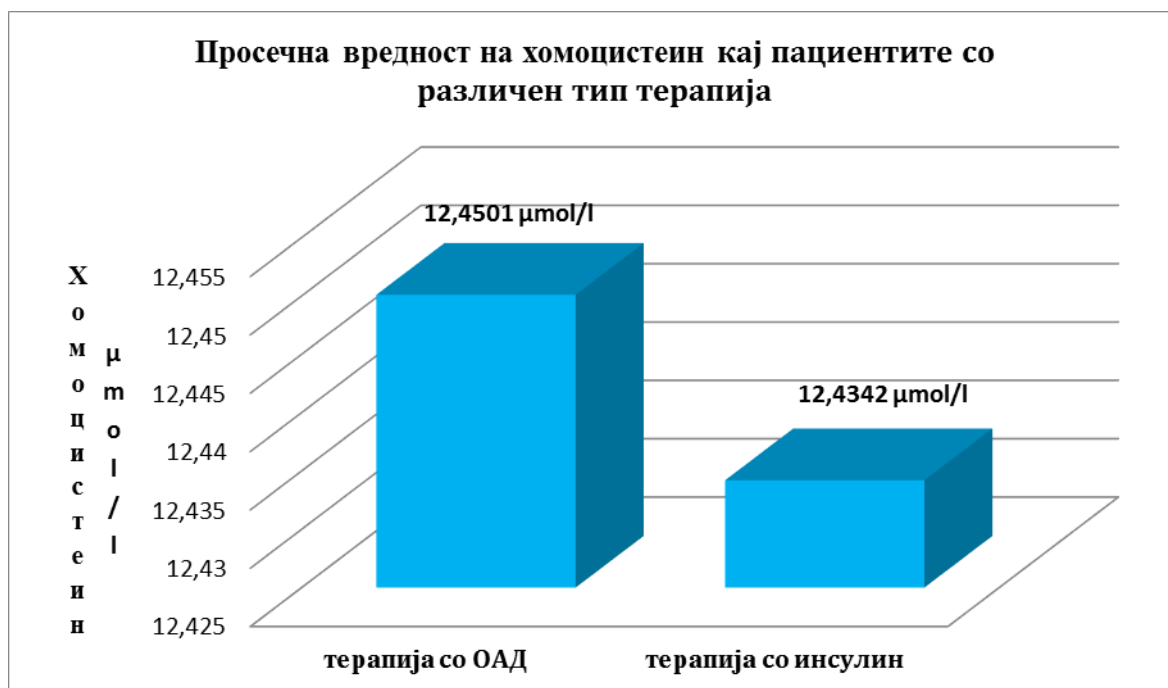


Кај пациентите кои имаат артериска хипертензија просечната вредност на хомоцистеинот е 15,08 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 6,125 $\mu\text{mol/l}$. Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите кои немаат артериска хипертензија изнесува 11,25 $\mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од 4 $\mu\text{mol/l}$.

Направената анализа со Ман-Витниев U тест како непараметарска метода покажа $p < 0,05$, што значи дека постои статистички значајна разлика помеѓу двете групи на иследувани пациенти каде вредноста на хомоцистеин е статистички значајно повисока кај пациентите кои имаат хипертензија.

6.10 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА НА ВРЕДНОСТИТЕ НА ХОМОЦИСТЕИН КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ СПОРЕД ВИДОТ НА ТЕРАПИЈА КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО ВАСКУЛАРНИ КОМПЛИКАЦИИ

Графикон бр.25: Дистрибуција на просечната вредност на хомоцистеинот кај групата пациенти со ОАД терапија и кај групата пациенти со инсулинска терапија



На графиконот бр. 25 е прикажана дистрибуцијата на пациенти според видот на терапија: група пациенти кои примаат орална антидијабетична терапија (ОАД) и група пациенти кои примаат инсулинска терапија и односот на вредностите на хомоцистеин кај двете групи. Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со орална антидијабетична терапија (ОАД) е $12,4501 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $5,152 \mu\text{mol/l}$, а кај втората група пациенти кои примаат инсулинска терапија вредноста на хомоцистеин е $12,4342 \mu\text{mol/l}$ со стандардна девијација од $4,6234 \mu\text{mol/l}$.

Направената статистичка анализа со непараметарски Ман-Витниев U тест на инверзија покажа дека веројатноста на остварување на нултата хипотеза е $p > 0,05$, што значи дека не постои статистички значајна разлика во просечните вредности на хомоцистеинот помеѓу пациентите третирани со двата вида терапија.

7. ДИСКУСИЈА

Во ова истражување беа вклучени вкупно 80 пациенти, со дијагностициран дијабетес мелитус тип 2. Според клиничкиот преглед и биохемиски параметри пациентите беа поделени во две групи. Првата група вклучи 50 пациенти кај кои беа дијагностицирани васкуларни компликации и придружни болести. Втората група вклучи 30 пациенти со дијабетес мелитус тип 2 кај кои не беа детектирани васкуларни компликации, а истата беше користена како контролна група.

Статистички групите беа поделени во однос на полот и застапеност на компликациите, со што застапеноста на машкиот пол значајно доминира со 32% во групата пациенти со васкуларни компликации.

Во испитуваната група кај која немаше васкуларни компликации статистички значајно доминира женскиот пол во однос на машката популација.

Во однос на возраста на пациентите не беше нотирана статистички значајна разлика. Просечната возраст помеѓу двете групи изнесува помеѓу 52,9 и 57,6 години.

Што се однесува до времетраењето на болеста, статистички значајно е траењето на болеста од околу 15,22 години, и тоа кај групата пациенти со компликации во однос на групата пациенти без васкуларни компликации кај кои болеста е со просечно времетраење од 7,5 години.

Во однос на почеток на болеста, кај испитуваната група од 50 пациенти дијабетесот за првпат е дијагностициран пред 11,86 години со статистички висока важност во однос на контролната група каде болеста за првпат е дијагностицирана пред шест години.

Застапеноста на компликациите поединечно, но и во комбинации беше обработено со методот на Хи-квадрат тест на сложување каде што во најголем процент со 54% беше застапена групата пациенти кои имаат само една васкуларна компликација, по која следуваше групата на пациенти со две компликации со застапеност од 20%.

Хи – квадрат тестот на сложување беше употребен и во анализата на податоците за процентна дистрибуција на придружните болести кај пациентите со дијабетес мелитус и васкуларни компликации. Најзастапено заболување, со 45% е хиперлипидемијата и хипотиреозата со 10%, додека 39% од испитаниците немаа придружни заболувања. Во групата испитаници кај кои немаше васкуларни компликации само 3% од пациентите имаа хипотиреоза, од каде што би можело да се констатира дека придружните болести значајно се позастапени во групата пациенти кај кои имаме дијагностицирано барем една васкуларна компликација.

Терапијата што ја користеа пациентите во двете групи беше поделена на ОАД и инсулинска терапија, но дистрибуцијата според пациенти не беше статистички значајна.

Дистрибуцијата на вредностите на хомоцистеин во однос на половите беше анализирана со помош на Ман-Витниев U тест на инверзија кој покажа статистички висока разлика помеѓу вредностите на хомоцистеин кај машкиот пол од 15,67 $\mu\text{mol/l}$

во однос на женскиот пол каде што вредноста на хомоцистеинот изнесува 11,23 $\mu\text{mol/l}$.

Вредноста на БМИ (индекс на телесна тежина) кај пациентите со дијабетес мелитус и компликации изнесува 26, 8367 во однос на пациентите без компликации каде БМИ изнесува 22,3667.

Хордаланд Хомоцистеин – студијата базирана врз 18.000 машки и женски испитаници говори за улогата на физиолошките и life-style фактори како полот, возраста, физичката активност, високиот крвен притисок и нарушениот липиден метаболизам и нивното влијание во дневните вредности на тотален хомоцистеин. Жените имаат пониски концентрации на хомоцистеин (6-10 $\mu\text{mol/l}$) во однос на мажите (8-12 $\mu\text{mol/l}$). Вредностите на хомоцистеин се менуваат и се зголемуваат со текот на годините. Во периодот по 40 година од животот разликата на tHcy помеѓу половите е околу 2 $\mu\text{mol/l}$, со средни вредности од 11 $\mu\text{mol/l}$ кај машкиот и од 9 $\mu\text{mol/l}$ кај женскиот пол. Објаснувањето на разликите во концентрациите на хомоцистеинот кај различните полови би можело да се најде во различната активност на хепаталните ензими кај машкиот и женскиот пол, поголемата мускулна маса кај мажите и формирањето на креатинин што генерира создавање на Hcy, индивидуалните навики на живеење и хормоналниот статус каде нивото на естрогени хормони се доведува во корелација со пониските вредности на хомоцистеин кај жените, особено во периодот на менопауза и по породувањето. Покачените вредности на хомоцистеин би можеле да се асоцираат и со покачен ризик од остеопороза кај жените, но и со висок ризик од кардиоваскуларен морбидитет и морталитет кај двата пола (54).

Плазма вредностите на хомоцистеин кај пациентите со дијабетични компликации кај кои траењето на болеста е над 15 години изнесуваа 16,056 $\mu\text{mol/l}$ во однос на плазма вредноста од 10,44 $\mu\text{mol/l}$ кај пациентите без компликации и времетраење на дијабетесот од 7,5 години, потврдувајќи ја статистички значајната разлика во просечните вредности на хомоцистеинот помеѓу двете групи, со позитивна корелација помеѓу покачените вредности на хомоцистеин кај пациентите со присуство на васкуларни компликации и времетраење на дијабетесот над 10 години (графикон бр: 5 и 14).

Слични се и заклучоците во студиите на Passaro. A и cop, што говорат дека tHcy корелира со времетраењето на болеста но, и позитивната асоцијација на високите вредности на хомоцистеин со ризикот од појава на хроничните компликации кај пациентите со дијабетес мелитус тип 2 (24).

Клучен податок за регулираноста на дијабетесот и текот на васкуларните компликации беа вредностите на гликозилираниот хемоглобин (HbA1c). Просечната вредност од 8,73% измерена кај пациентите со васкуларни компликации за разлика од вредностите на HbA1c од 6,8% кај пациентите без компликации статистички значајно го потврдува фактот за улогата на високите вредности на гликозилираниот хемоглобин во појавата и текот на микро и макроваскуларните компликации.

Во формирањето на просечната вредност на гликозилираниот хемоглобин исклучителна важност имаат вредностите на постпрандијалните гликемии кои заедно со лошата контрола на болеста, промените на липидниот статус, покачената телесна маса и крвниот притисок претставуваат континуиран ризик фактор во појавата на кардиоваскуларните болести и придонесуваат во сложената етиологија на оштетување на крвните садови (55,56).

На графиконот бр.15 е покажана статистички високозначајната корелација помеѓу високите вредности на HbA1c и хомоцистеинемията помеѓу пациентите во групата со компликации. Истата, е опишана и во истражувањата на Pissaro и со, каде што е утврдено значењето помеѓу нивото на гликозилиран хемоглобин и хомоцистеинемията кај пациентите со лоша метаболна контрола кои заедно со мутација на генот MTHFR имаат важна улога во појавата и лошиот тек на компликациите кај дијабетесот.

Во UKPDS студијата, докажано е дека секое намалување на HbA1c за само 1% доведува до редуција на микроваскуларните компликации за 37% и намалување на смртноста за 21% кај двете форми на дијабетес (57).

Во Ротердамската студија било пресметано дека ризикот за инфаркт на миокардот се зголемува за 6-7% за секој 1 $\mu\text{mol/l}$ покачување на хомоцистеин во однос на базичното ниво (58).

Во текот на истражувањето беше направена корелација помеѓу вредностите на LDL холестеролот и нивото на хомоцистеин. Кај пациентите со васкуларни компликации кај кои постоеше хиперлипидемија вредностите на LDL холестеролот изнесуваа 4 mmol/l и статистички високо корелираа со покачените вредности на хомоцистеин кај испитуваната група. Оваа статистички значајна корелација помеѓу абнормалните вредности на хомоцистеин и LDL масти во голема мера ја потврдуваат и претпоставката за патофизиолошките промени што настануваат на крвните садови во услови на долготрајна хиперхомоцистеинемија, како и теоријата на McCully KS објавена во 1969 год, што говори за хемиската модификација на LDL холестеролот во средина на високи нивоа на хомоцистеин и нивно депонирање во облик на пенести клетки во ѕидот на артериите доведувајќи до хиперплазија и фиброза на клетките на мазната мускулатура (слика бр.1).

Од обработката на податоците со тестот АНОВА за пропорции секоја од компликациите се прикажани во процентна застапеност на графиконот бр.17. Од микроваскуларните компликации сигнификантно најзастапена беше нефропатијата со 32%, потоа ретинопатијата со 29% и микроалбуминуријата со 27,5%, додека од макроваскуларните компликации сигнификантно најзначајна со процентуална застапеност од 31% е ХТА и периферната артериска болест со 12,50%.

Статистички беа обработени и параметрите од групата пациенти со васкуларни компликации, кои според добиените вредности, беа поделени во графички прикази на просечната вредност на хомоцистеинот со микроваскуларните и макроваскуларните компликации и истите споредени со групата на пациенти без компликации.

Слично како и заклучоците на светските автори и во оваа студија беше најдена позитивна корелација помеѓу покачените вредности на хомоцистеин и инциденцата на микроваскуларни компликации.

На графикот бр.18 се прикажани вредностите на хомоцистеин кај двете групи на пациенти со и без детектирана микроалбуминурија. Вредностите на хомоцистеин од 15,865 $\mu\text{mol/l}$ кај пациентите со микроалбуминурија се статистички значајни во однос на вредностите од 11,796 $\mu\text{mol/l}$ кај пациентите без микроалбуминурија, исто како и вредностите на плазма хомоцистеин од 15,6993 $\mu\text{mol/l}$ кај пациентите со дијагностицирана нефропатија, во однос на пациентите кај кои немаше податок за нефропатија, а вредностите на хомоцистеинот изнесуваа 10,3196 $\mu\text{mol/l}$ прикажани на графиконот бр.19.

Во однос на просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со ретинопатија вредноста на плазма хомоцистеинот изнесува 16,206 $\mu\text{mol/l}$ и статистички сигнификантно е значајна во однос на онаа група пациенти кај кои не беше дијагностицирана дијабетична ретинопатија при извршената фундоскопија, и вредностите на хомоцистеин изнесуваа 10,103 $\mu\text{mol/l}$.

Невропатијата беше застапена со 16%, а вредностите на хомоцистеин изнесуваа 16,82 $\mu\text{mol/l}$, статистички сигнификантно во однос на групата на пациенти кај кои немаше дијагностицирани микроваскуларни компликации.

Анализите направени во Hoorn студијата на Hoogeveen et al, говорат за асоцијацијата помеѓу нивото на хомоцистеин и појавата на ретинопатија помеѓу пациентите со дијабетес мелитус, наоѓајќи преваленца од 16,5% на постојна ретинопатија кај пациентите со вредности на хомоцистеин над нормалните, претпоставувајќи ја улогата на хомоцистеинот во создавање на токсични услови на хипоксија на ретината и тромбоза на малите крвни садови на бубрезите и нервната исхемија (59).

Од макроваскуларните компликации и придружни болести кај 31% од пациентите беше нотирана артериска хипертензија, кај 12,5 периферна артериска болест и коронарната болест кај 10% од испитаниците. Плазма вредностите на хомоцистеинот од 16,54 $\mu\text{mol/l}$ се статистички значајни кај пациентите со коронарна артериска болест, а вредностите на хомоцистеин од 15,08 $\mu\text{mol/l}$ кај групата пациенти со артериска хипертензија говорејќи за можна корелација. Кај пациентите со периферна артериска болест хомоцистеинемията не беше статистички значајно застапена.

На графикот бр.25 е прикажан односот на вредностите на хомоцистеин во однос на двете групи пациенти според видот на терапија: група на пациенти кои примаат орална антидијабетична терапија (ОАД) и група на пациенти кои примаат инсулинска терапија. Просечната вредност на хомоцистеинот кај пациентите со орална антидијабетична терапија (ОАД) е 12,4501 $\mu\text{mol/l}$ а кај втората група пациенти кои примаат инсулинска терапија вредноста на хомоцистеин е 12,4342 $\mu\text{mol/l}$. Направената статистичка анализа со непараметарски Ман-Витниев U тест на инверзија не покажа статистички значајна разлика во просечните вредности на хомоцистеинот помеѓу пациентите третирани со двата вида терапија.

8. ЗАКЛУЧОК

- Покачените вредности на хомоцистеин беа сигнификантно застапени кај пациентите со микроваскуларни компликации, доведувајќи ги во корелација хомоцистеинемичката и дијабетичната нефропатија и ретинопатија, како и високите вредности на хомоцистеин и периферна дијабетична невропатија. Хомоцистеинемичката корелира и со промени во гломеруларната филтрациона стапка, како и со присуство на микроалбуминурија.
- Помеѓу двете групи пациенти високите вредности на хомоцистеин беа застапени кај пациентите со хипертензија и коронарна артериска болест во однос на втората група пациенти.
- Слично како и во светските студии, асоцијацијата помеѓу вредностите на хомоцистеин и присуството на атеросклероза, и кардиоваскуларните болести доведува до заклучокот дека хомоцистеинот претставува независен ризик фактор во појава и прогресија на истите.
- Од овде би можеле со големо внимание и сигурност да ја разгледуваме врската помеѓу хиперхомоцистеинемичката и појавата на атерогени лезии, и можноста за улогата на хомоцистеинот во дијагнозата на болестите на големите крвни садови кај дијабетесот.
- Високите вредности на хомоцистеин кај пациентите со дијабетес мелитус кај кои имаше веќе развиени микро и макроваскуларни компликации, корелираа и со високите вредности на HbA1c над 8,5%, и високите вредности на LDL холестеролот, висок БМИ и лоша гликемска контрола, кои воедно ја претставуваат и најважната групата фактори кои доведуваат до појава на компликациите кај дијабетесот, притоа издвојувајќи го хомоцистеинот како независен ризик фактор во етиологијата на истите.
- Оттука би можеле да заклучиме дека хомоцистеинот би можел да послужи како маркер во детекцијата на васкуларните компликации, кој заедно со вредностите на гликозилираниот хемоглобин и гликемските вредности е уште еден предиктор според кој би можеле да ја претпоставиме прогнозата на дијабетичните компликации.
- Нормализирањето на вредностите на хомоцистеинот би можело да биде од големо значење во намалувањето на ризикот од појавата на компликации кај дијабетесот.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, Keen H. International Textbook of Diabetes Mellitus, 2-nd edn. Chachester: wilwy,1997; Preamble: The history of diabetes.
2. Global Guideline for type 2 Diabetes, available at: [http://www.idf.org/webdata/docs/IDF% 20 GGT2D.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF%20GGT2D.pdf),accessed january 16,2006
3. ACE/AACE
Diabetesrecomandatio. EndocrinePractice, jan/fev.2006, Vol.12.Suppl.1.p 6-13
4. The Diabetes control and complications trial research group. The Effects of Intensive treatment of diabetes on the Development and progression of Long term complications in Insulin –Dependent diabetes mellitus. NEJM 1993; 329-977-86.
5. Bogoev M, Diabetes Mellitus, Etioptogeneza, Mikrovaskularni komplikacii i terapija. Vol 1. Skopj, 3D-studio; 2003: 11-205
6. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20: 1183–1197, 1997
7. Monnier L.,Colett C. :Contribution of Fasting and Postprandial Glucose to Hemoglobin A1c. Endocrine Practice, jan/fev 2006 Suppl.1.pp.34-42
8. Boyle PJ: Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. Am J Med 120: S12-S17,2007
9. Khaw KT.,Wareham N. and al.:Association of hemoglobin A1c with Cardiovascular diseze and mortality in adults:the European prospective investication into canncer in Norfolk, Ann.Inter. Med. 141(2004) 413-420.
10. Genuth S.: Insights From the DCCT Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study on the Use of Intensive Glycaemic Treatment to Reduce the Risk of Complications of Type 1 Diabetes. Endocrine Practice, Jan/Feb.2006, Suppl.1.pp.31-34
11. Liebl A and al.: Evaluation of risk factors for development of complications in type 2 diabetes in Europe. Diabetologia 45(2002)S23-S28.
12. UKPDS Group in UK: prospective diabetes study 16.Overview of 6 years therapy of type 2 diabetes: a progressive disease, Diabetes 44 (1995) 1249-1259.
13. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. Pathogenesis of the atherosclerotic lesion. Implications for oabetes mellitus . Diabetes care 1992:15:1156-1167.
14. Donahue RP, OrchardTJ. Diabetes mellitus and macrovascular complications. An epidemiological perspective. Diabetes care 1992:15:1141-1155.

15. Jones SL, Close CF, Mattock MB, et al. Plasma Lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *BMJ* 1989;298:487-490.
16. Winocour PH, Durrington PN, Bhatnagar D, Influence of early diabetic neuropathy on very low density lipoprotein, intermediate density lipoprotein and low density lipoprotein composition. *Atherosclerosis* 1991;89:49-57.
17. Holven K, Aukrust P, Retterstol K, Hagve T, Morkrid L, Ose L, et al. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 45–54.
18. S. H. Wild. N. G. Forouhi: What is the scale of the future diabetes epidemic, and how certain are we about it. *Diabetologia* (2007):50: 903-0647-7
19. IDF world atlas: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>
20. Buysschaert M, Dramais AS, Wallemacq PE, Hermans MP: Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance
21. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, et al.: Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults.
22. Ali N. the relationship between MTHFR genotype, serum homocysteine and folate levels. *Biochem Soc Trans* 1977;25:3865.
23. Passaro A, Delia K, Pareschi PL, Calzoni F, Carantoni M, Fellin R, Solini P. Factors influencing plasma homocysteine levels in type 2 diabetes. *Diabetes care* 2000;23:420-1
24. Buaman WA, Show, Jayatilleke E, Spunquen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin b1, malabsorption induced by metformin. *Diabetes care* 2000;23:1227-31
25. Lim H S, Heo Y R. Plasma total homocysteine, folate, and vitamin B12 status in Korean adults. *J Nutr Sci Vitaminol* 2002; 48: 290-7.
26. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, et al. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991–1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999;131:331–9.
27. Song Y, Cook NR, Albert CM, Van Denburgh M, Manson JE: Effect of homocysteine-lowering treatment with folic Acid and B vitamins on risk of type 2 diabetes in women: a randomized, controlled trial.
28. Marija Krstevska. *Tajната na homocisteinot*. ISBN 9989-2188-6-2
29. Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1 : 228–237

30. Finkelstein JD (1996) Concluding remarks: epilogue or prologue. In: Mato JM, Caballero A (eds) Methionine metabolism: molecular mechanisms and clinical implications. CSIC, Madrid, pp 277–282
31. Frontiera MS, Stabler SP, Kolhouse JF, Allen RH (1994) Regulation of methionine metabolism: effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. *J Nutr Biochem* 5 : 28–38
32. Janson J J, Galarza C R, Murúa A, Quintana I, Prygoda P A, Waisman G et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in an elderly population. *Am J Hypertens* 2002; 15: 394-7.
33. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:587–593
34. Stehouwer CDA, Gall M-A, Hougaard P, Jakobs C, Parving H-H. Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin-dependent diabetic patients with and without albuminuria. *Kidney Int.* 1999;55:308–314. CrossRefMedline
35. Becker A, Kostense P, Bos G, Heine R, Dekker J, Nijpels G, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with coronary events in type 2 diabetes. *J Intern Med* 2003; 253:293–300.
36. Deepa R, Velmurgan C, Saravanan G, Kartujhi, Dwarkanath V, Mohan V. Absence of association between serum homocysteine levels and coronary artery disease in South Indian males. *Indian Heart J.* 2001;53: 44–3.
37. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Ronnema T. Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004;140:94–100.
38. Schnell, E. Standl: Impaired glucosen Tolerance, Diabetes, and cardiovascular Disease. *Endocrine Practice*, Jan/Feb.2006. Vol.12, Suppl.1. pp.13-16.
39. Stratton I and col.: Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, Fev.2007 pp.405-412
40. Young G, Dean H, Sellers E. Dyslipidemia in youth with 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2003; 52 (supl 1): a405 (abstr).
41. Ettinger LM, Freeman K, DiMartino-Nardi JR, Flynn JT. Microalbuminuria and abnormal ambulatory blood pressure in adolescents with type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2005; 147: 67-73.
42. Yoo EG, Choi IK, Kim DH. Prevalence of microalbuminuria in young patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J PediatrEndocrinol Metab* 2004; 17: 1423-27.

43. Abdella N, Mojiminiyi OA, Akanji AO. Homocysteine and endogenous markers of renal function in type 2 diabetic patients without coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50:177–85.
44. Stabler S, Estacio R, Jeffers B, Cohen J, Allen R, Schrier R: Total homocysteine is associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus *Metabolism* 48:1096–1101, 1999
45. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease Huang EJ, Kuo WW, Chen YJ, Chen TH, Chang MH, Lu MC, et al. Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clin Chim Acta.* 2006;366:293–8.
46. Keenan HA, Costacou T, Sun JK, Doria A, Cavallerano J, Coney J, Orchard TJ, Aiello LP, King GL: Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study. *Diabetes Care* 30 : 1995-1997,2007
47. Brazionis L, Rowley Sr K, Itsiopoulos C, O’Dea K. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2008;31:50–6.
48. A Rudy^[1], I Kowalska^[1], M Strączkowski^[1], I Kinalska Homocysteine concentrations and vascular complications in patients with type 2 diabetes - 17/02/08, Doi : DM-04-2005-31-2-1262-3636-101019-200513247
49. Drzewoski J¹, Czupryniak L, Chwatko G, Bald E. Hyperhomocysteinemia in poorly controlled type 2 diabetes patients.
50. Krupková-Meixnerová L, Veselá K, Vitová A, Janosíková B, Andel M, Kozich V. Methionine-loading test: evaluation of adverse effects and safety in an epidemiological study. *Clin Nutr.* 2002;21(2):151-6.
51. Den Heijer M, Bos GM, Brouwer IA, Gerrits WB, Blom HJ. Variability of the methionine loading test: no effect of a low protein diet. *Ann Clin Biochem.* 1996;33 (Pt 6):551-4.
52. Mansoor MA, Kristensen O, Herving T, Bates CJ, Pentieva K, Verfring H, Osland A. plasma total homocysteine response to oral doses of folic acid and pyridoxine hydrochloride in healthy individuals. Oral doses of vitamin b6 reduce concentrations of serum folat. *Scand J Clin Lab invest* 1999;17:1074-81
53. Refsum H¹, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygård O, Vollset SE. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease.
54. DCCT Trial/Epidemiology of Diabetes interventions and complications research group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N.Engl.J.Med* 2000; 342:381-9.
55. DCCT: Lifetime benefits of intensive therapy as practiced in the DCCT. *JAMA* 1996; 278:25.

-
56. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [erratum in Lancet, 1999; 354: 602]. Lancet. 1998; 352:837-853.
 57. Vermeer SE¹, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Oudkerk M, Hofman A, Clarke R, Breteler MM. Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam Scan Study
 58. Hoogoven EK, Kostence PJ, Jacobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD. Does metformin increase the serum total homocysteine in insulin dependent diabetes mellitus? J inter med 1997;42:389-94.