

**The Use of Plasminogen Activator
Inhibitor-1 Activity As an Early Marker
of Endothelial Dysfunction in Patients
With Type 2 Diabetes Mellitus**

Thesis

Submitted For partial fulfillment of MSc Degree
in Endocrinology

By
Samira Hussam Sibai
M.B.Bch

Supervised By

Prof. Dr. Abd El Sattar El Sayed El Deeb
Professor of Internal Medicine and Endocrinology
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Prof. Dr. Saad Mohammad Rashad
Professor of Ophthalmology
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Dr. Ahmed Farouk Abdel Aal
Assistant Professor of Radiodiagnosis
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
2009

Contents

Title	Page
List of abbreviations	i
List of Tables.....	iv
List of Figures	vii
Review of literature:.....	1
Chapter I: Diabetes Mellitus	1
Chapter II: Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus	15
Chapter III: Plasminogen Activator inhibitor-1	56
Chapter IV: Diabetes Mellitus type 2 and PAI-1	72
Patients and Methods	83
Results	91
Discussion	115
Summary and Conclusion	127
Recommendations	132
References	133
Arabic Summary	--

استخدام قياس نشاط مثبت منشط
البلاسمينوجين-1 كمؤشر مبكر على
سوء وظيفة البطانة الوعائية في
المرضى المصابين بالداء السكري من
النحو الثاني

رسالة
توطئة لأجل نيل درجة الماجستير في الغدد الصماء

مقدمة من
طبيبة / سميره حسام السباعي

تحت إشراف
أ. د. عبد الستار الديب
أستاذ الغدد والسكر و الباطنة
كلية الطب_جامعة عين شمس

أ. د. سعد محمد رشاد
أستاذ الرمد
كلية الطب_جامعة عين شمس

د.أحمد فاروق عبد العال
أستاذ مساعد في الأشعة التشخيصية
كلية الطب_جامعة عين شمس

الملخص العربي

مثبط منشط البلاسمينوجين -١، مثبط البروتيناز السيريني ذو الوزن الجزيئي ٤ كيلو Dalton، هو مثبط منشط البلاسمينوجين الفيسيولوجي الرئيسي. بالإضافة لدوره في تنظيم التحكم في النزيف، يلعب مثبط منشط البلاسمينوجين -١ دوراً في عدد من النشاطات البيولوجية المعتمدة على منشط البلاسمينوجين أو نشاط البلاسمين. لقد أظهرت دراسات على الفئران المتحولة جينياً دوراً وظيفياً لمثبط منشط البلاسمين -١ في اندماج الجروح، تصلب الشرايين، اضطرابات أيضية مثل البدانة و مقاومة الانسولين، توليد أوعية الأورام، الشدة المزمنة، إعادة هيكلة العظام، الربو، التهاب المفاصل الرثباتي، التليف، التهاب كبيبات الكلى و الانتان.

لقد استنتجت مراجعة حديثة لتأثير مثبط منشط البلاسمينوجين -١ في الداء السكري و أمراض القلب و الأوعية الدموية أن السيطرة على مستويات مثبط منشط البلاسمينوجين -١ قد تكون ذات أهمية ضخمة في المجموعات السكانية المعرضة للخطر، أمثال المرضى ذوي مقاومة الانسولين، اضطراب تحمل الجلوكوز و الداء السكري. من بين العوامل الأخرى، فإن الزيادة في كتلة النسيج الشحمي و ارتفاع مستويات الانسولين يساهمان في ارتفاع المستويات البلاسمية لمثبط منشط البلاسمينوجين -١ مما يؤدي لتأثيرات مساعدة على التخثر و الالتهاب. ترتفع مستويات مثبط منشط البلاسمينوجين -١ عند المرضى المصابةين بالداء السكري من النمط الثاني أو المتلازمة الأيضية؛ يساهم النسيج الشحمي المسبب للبدانة بشكل مهم في مستويات مثبط منشط البلاسمينوجين -١.

كان الهدف من العمل هو تقدير قيمة قياس نشاط مثبط منشط
البلاسمينوجين - ١ في البلاسما كمؤشر على سوء وظيفة البطانة الوعائية في
المرضى المصابين بالداء السكري من النمط الثاني.

تم اجراء هذه الدراسة ١٠٠ - ١ - مريضاً بالداء السكري من النمط
الثاني و ٣٠ متطوعاً من الأقارب - سبعة - مراقبة.

تم تقسيمهم لثلاثة مجموعات:

المجموعة أ: ٣٠ مريضاً بالداء السكري من النمط الثاني مع ظهور سوء وظيفة
البطانة الوعائية مثبتة بوجود اعتلال الكلوي و اعتلال الشبكية السكري.

المجموعة ب: ٣٠ مريضاً بالداء السكري من النمط الثاني دون ظهور سوء وظيفة
البطانة الوعائية مثبتة بغياب كل من اعتلال الكلوي و اعتلال الشبكية السكري.

المجموعة ج: ٣٠ فرداً من الأصحاء (مجموعة ضابطة).

تم اخضاعهم لأخذ القصة السريرية متضمنة العمر، الجنس، مدة الاصابة
بالداء السكري، سوابق توحى بوجود اختلالات السكري و أمراض أخرى مرافقه،
الفحص السريري متضمناً مؤشر كتلة الجسم و ضغط الدم، تقييم رسم القلب
الكهربائي، فحص قاع العين لتقرير وجود اعتلال الشبكية السكري، دوبلكس
للشريان الشبكي و تصويب الأوعية الدموية الشبكية باستخدام صبغة الفلوروستين
عند الحاجة.

كما تم اخضاعهم لاختبار المتغيرات المعملية التالية: سكر الدم الصائم و
بعد الطعام، مستوى الهيموجلوبين السكري، دهون الدم، تقييم وظائف الكبد، تقييم
وظائف الكلية، حمض البول، بيلة الألبومين المجهرية و نشاط مثبط منشط
البلاسمينوجين - ١ في البلاسما.

تم استبعاد المرضى ذوي دليل على وجود اعتلال كلوي سببه ليس السكري بما فيه التهاب المجاري البولية، ذوي دليل على وجود اضطرابات كبدية، اضطرابات تخثيرية، أورام سرطانية أو انتان، أيضاً أولئك في فترة ما بعد العمليات الجراحية، أولئك ذوي سوابق اصابة حديثة بالأزمة القلبية أو السكتة الدماغية أو ذوي اضطرابات في الغدد " - 2 -"

تم تحليل النتائج احصائياً و لاحظنا ما يلي:

- تلازم غير هام احصائياً بين عمر الأفراد و نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 في المجموعتين أ و ب.
- تلازم غير هام احصائياً بين مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 و مدة الاصابة بالداء السكري في مرضى المجموعة أ.
- تلازم ايجابي هام جداً بين مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 و مدة الاصابة بالداء السكري في مرضى المجموعة ب (أولئك دون ظهور سوء وظيفة البطانة الوعائية).
- مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 كانت أعلى بشكل هام في المجموعتين السكريتين بالمقارنة مع مجموعة المراقبة، و أعلى و ان ليس بشكل هام في المجموعة أ عند مقارنتها بالمجموعة ب.
- تلازم غير هام احصائياً بين ضغط الدم الانقباضي و الانبساطي و مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 في كتلا المجموعتين السكريتين.
- تلازم غير هام احصائياً بين مشعر كثرة الجسم و مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 في مرضى السكري.
- تلازم ايجابي هام جداً ($p < 0.01$) بين مستويات نشاط مثبت منشط البلاسمينوجين- 1 و مستويات الشحوم الثلاثية في كتلا المجموعتين أ و ب.

- 3 -
- تلازم غير هام احصائياً بين مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ و كل من الكولسترول الكلي، الكولسترول منخفض الكثافة أو الكولسترول مرتفع الكثافة في الدراسة الحالية في مرضى السكري.
 - تلازم غير هام احصائياً بين مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ و جلوكوز الدم الصائم و الفاطر أو الهيموجلوبين السكري في المجموعتين A و B.
 - تلازم ايجابي هام (مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ و مستويات بيلة الألبومين المجهرية في المجموعة B (سوية الألبومين البولي بالتعريف)، و هام جدا ($p=0.002$) بين مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ و المستويات البولية للألبومين المجهرى في المجموعة A.
 - تلازم غير هام احصائياً بين مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ و وجود أو غياب اعتلال الشبكية السكري في المجموعتين السكريتين، بالرغم من أن مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ كانت أعلى بشكل هام في المرضى ذوي اعتلال الشبكية السكري بالمقارنة مع مجموعة المراقبة ج بغض النظر عن وجود أو غياب بيلة الألبومين المجهرية.
 - تلازم هام جداً بين مؤشرات المقاومة لكل من الشريان الشبكي المركزي و الشريان العيني و مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين - ١ في المجموعة B (دون سوء وظيفة البطانة الوعائية) لكن ليس في المجموعة A.
 - مؤشرات المقاومة في كلا الشريانين كانت أيضاً أعلى في المرضى ذوي اعتلال الشبكية السكري منها في المرضى دون اعتلال الشبكية السكري، لكن هذه الزيادة لم تكن هامة احصائياً، بينما كانت أعلى بشكل هام عندما قورن المرضى ذوي اعتلال الشبكية السكري بمجموعة المراقبة ج.
 - ارتفاع هام جداً في مؤشر المقاومة في مرضي المجموعات السكرية بالمقارنة مع الأسواء من مجموعة المراقبة.

الاستنتاج:

- 4 -

استنتجنا من نتائجنا ان مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- ١ كانت أعلى بشكل هام في مرضي الداء السكري من النمط الثاني بالمقارنة مع أفراد المراقبة، و أعلى و ان لم يكن بشكل هام احصائياً في مرضي السكري ذوي سوء وظيفة البطانة الدموية منها في مرضي السكري الذين لم يكن سوء وظيفة البطانة الوعائية عندهم قابلاً للاحظار بالفحوص السريرية و المعملية المعتادة.

كما استنتجنا أن مثبط منشط البلاسمينوجين- ١ قد يلعب دوراً هاماً في تسريع الأذية في الأوعية الدقيقة للكلية و المساهمة في تطوير اعتلال الكلية السكري، اذ وجدنا أن نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- ١ كان زائداً بشكل هام مع الزيادة في مستوى الألبومين المجهري في البول عند مرضي السكري من النمط الثاني المصابين و غير المصابين باعتلال الكلية السكري.

و استنتجنا أيضاً أن الارتفاع في مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- ١ قد يكون عامل خطورة للتطوير المستقبلي لاعتلال الشبكية السكري، بالرغم من أنه لم يكن هناك فارق هام بين المرضى المصابين و غير المصابين باعتلال الشبكية السكري فيما يخص مثبط منشط البلاسمينوجين- ١، فان نشاطه كان مرتفعاً بشكل هام مع ارتفاع مشعرات المقاومة في كل من الشريان الشبكي المركزي و الشريان العيني في مرضي السكري الذين لم تظهر عندهم أذية في الأوعية الدقيقة.

بناء على كل ما سبق، تقترح نتائجنا أن زيادة نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 في مرضي السكري من النمط الثاني قد تمثل عالمة مبكرة على سوء وظيفة البطانة الوعائية و المضاعفات الوعائية الدقيقة.

- 5 -

الوصيات:

بناء على اكتشافنا أن زيادة نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 في مرضي السكري من النمط الثاني قد تمثل مؤشراً مبكراً على سوء وظيفة البطانة الوعائية و المضاعفات الوعائية الدقيقة، نوصي بما يلي:

- دراسة متابعة لأجل ملاحظة تغير مستويات مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 مع الزمن و تقدم المرض.
- تنفيذ دراسات مماثلة مع مشاركة أعداد أكبر من المرضى.
- دراسات اضافية تتعلق بدور مستويات نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 في المرضى المصابين بالداء السكري من النمط الأول.
- دراسات أخرى تهتم بدور نشاط مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 في اعتلال الشبكية السكري منفرداً.
- دراسات أوسع نطاقاً ترکز على العلاقة بين مثبط منشط البلاسمينوجين- 1 و سيلان الدم في الشرايين خلف المآق، و علاقة السابق بوجود اعتلال الشبكية و الكلية السكري.
- مزيداً من الدراسات المتعلقة بدور الأدوية الخافضة لمثبط منشط البلاسمينوجين- 1 في الوقاية من و علاج سوء وظيفة البطانة الوعائية في الداء السكري و المضاعفات الناتجة عنها.

- 6 -

DIABETES MELLITUS

Definition and description of diabetes mellitus:

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage, dysfunction, and failure of various organs, especially the eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels (*The American Diabetes Association, 2004a*).

Several pathogenic processes are involved in the development of diabetes. These range from autoimmune destruction of the β -cells of the pancreas with consequent insulin deficiency to abnormalities that result in resistance to insulin action. The basis of the abnormalities in carbohydrate, fat, and protein metabolism in diabetes is deficient action of insulin on target tissues. Deficient insulin action results from inadequate insulin secretion and/or diminished tissue responses to insulin at one or more points in the complex pathways of hormone action. Impairment of insulin secretion and defects in insulin action frequently coexist in the same patient, and it is often unclear which abnormality, if either alone, is the primary cause of the hyperglycemia (*The American Diabetes Association, 2005*).

Classification of Diabetes Mellitus:

An international Expert Committee, working under the sponsorship of the American Diabetes Association, was established in May 1995 to review the scientific literature since 1979 and to decide if changes to the classification and diagnosis of diabetes were warranted. In June 1997, it released a report with new recommendations for the classification and diagnosis of diabetes mellitus. These new recommendations

were the result of more than two years of collaboration among experts from the American Diabetes Association (ADA) and the World Health Organization (WHO).

The aim of this document is to define and describe diabetes as we know it today, present a classification scheme that reflects its etiology and/or pathogenesis, provide guidelines for the diagnosis of the disease, develop recommendations for testing that can help reduce the morbidity and mortality associated with diabetes, and review the diagnosis of gestational diabetes (*Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997*).

The vast majority of cases of diabetes fall into two broad etiopathogenetic categories. In one category (type 1 diabetes), the cause is an absolute deficiency of insulin secretion. Individuals at increased risk of developing this type of diabetes can often be identified by serological evidence of an autoimmune pathologic process occurring in the pancreatic islets and by genetic markers. In the other, much more prevalent category (type 2 diabetes), the cause is a combination of resistance to insulin action and an inadequate compensatory insulin secretory response. In the latter category, a degree of hyperglycemia sufficient to cause pathologic and functional changes in various target tissues, but without clinical symptoms, may be present for a long period of time before diabetes is detected. During this asymptomatic period, it is possible to demonstrate an abnormality in carbohydrate metabolism by measurement of plasma glucose in the fasting state or after a challenge with an oral glucose load (*The American Diabetes Association, 2005*).

1. Type 1 diabetes:

This type comprises β -cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency. It can be further classified to:

- **Immune-mediated diabetes:**

This form of diabetes, previously encompassed by the terms insulin-dependent diabetes, type 1 diabetes, or juvenile-onset diabetes, results from a cellular-mediated autoimmune destruction of the β -cells of the pancreas (*Atkinson and Maclaren, 1994*). The common antibodies tested for in diabetes are those to glutamic acid decarboxylase-65 (GAD-65), tyrosine phosphatase (IA-2 α), and the islet cell (ICA). Antibodies to IA-2 α are present in 68.2–79%, GAD-65 in 25–76%, and ICA in 80.5–89.9% of paediatric white type 1 patients at diagnosis (*Porter and Barrett, 2004*). Also, the disease has strong HLA associations, with linkage to the DQA and B genes, and it is influenced by the DRB genes. These HLA-DR/DQ alleles can be either predisposing or protective (*Huang et al., 1996*).

It is believed that autoimmune type 1 diabetes results from an infectious or toxic environmental insult to genetically predisposed persons, whose aggressive immune system destroys the pancreatic β cells while overcoming the invasive agent (*Masharani and German, 2007*).

- **Idiopathic diabetes:**

Some forms of type 1 diabetes have no known etiologies. Some of these patients have permanent insulinopenia and are prone to ketoacidosis, but have no evidence of autoimmunity (*McLarty et al., 1990*). Although only a minority of patients with type 1 diabetes fall into this category, of those who do, most are of African or Asian origin. Individuals with this form of diabetes suffer from episodic ketoacidosis and exhibit varying degrees of insulin deficiency between episodes. This form of diabetes is strongly inherited, lacks immunological evidence for β -cell autoimmunity, and is not HLA associated. An absolute requirement for insulin replacement therapy in affected patients may come and go (*Ahrén and Corrigan, 1984*).

2. Type 2 Diabetes:

Type 2 diabetes is characterised by insulin resistance and defective insulin secretion. It is a disorder of both β cell function and insulin sensitivity; β cell function worsens with duration of diabetes leading to insulin dependence. Insulin resistance is related to body weight in both children and adults, and obesity (particularly deposition of visceral fat) has been linked to type 2 diabetes worldwide. Ethnic groups especially susceptible to type 2 diabetes have been shown to have greater innate insulin resistance (*Porter and Barrett, 2004*).

This form of diabetes which accounts for 90-95% of those with diabetes, previously referred to as non-insulin-dependent diabetes, type 2 diabetes, or adult-onset diabetes, is a term used for individuals who have insulin resistance and usually have relative (rather than absolute) insulin deficiency (*DeFronzo et al., 1997*).

Most patients with this form of diabetes are obese, and obesity itself causes some degree of insulin resistance. Patients who are not obese by traditional weight criteria may have an increased percentage of body fat distributed predominantly in the abdominal region. This form of diabetes frequently goes undiagnosed for many years because the hyperglycemia develops gradually and at earlier stages is often not severe enough for the patient to notice any of the classic symptoms of diabetes (*The American Diabetes Association, 2005*). Nevertheless, such patients are at increased risk of developing macrovascular and microvascular complications (*Andersson and Svaardsudd, 1995*). Whereas patients with this form of diabetes may have insulin levels that appear normal or elevated, the higher blood glucose levels in these diabetic patients would be expected to result in even higher insulin values had their β -cell function been normal (*Polonsky et al., 1996*).

It is often associated with a strong genetic predisposition, more so than is the autoimmune form of type 1 diabetes (**Valle et al., 1997**). However, the genetics of this form of diabetes are complex and not clearly defined.

3. Other specific types of diabetes:

- **Genetic defects of the β-cell function:**

Several forms of diabetes are associated with monogenetic defects in β-cell function. These forms of diabetes are frequently characterized by onset of hyperglycemia at an early age (generally before age 25 years). They are referred to as maturity-onset diabetes of the young (MODY) and are characterized by impaired insulin secretion with minimal or no defects in insulin action (**Herman et al., 1994**). They are inherited in an autosomal dominant pattern. Abnormalities at several genetic loci on different chromosomes have been identified to date. The most common form is associated with mutations on chromosome 12 in a hepatic transcription factor referred to as hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α (**Vaxillaire et al., 1995**). A second form is associated with mutations in the glucokinase gene on chromosome 7p and results in a defective glucokinase molecule (**Froguel et al., 1992**). Glucokinase converts glucose to glucose-6-phosphate, the metabolism of which, in turn, stimulates insulin secretion by the β-cell. Thus, glucokinase serves as the "glucose sensor" for the β-cell. Because of defects in the glucokinase gene, increased plasma levels of glucose are necessary to elicit normal levels of insulin secretion. A third form is associated with a mutation in the HNF-4 α gene on chromosome 20q (**Yamagata et al., 1996**). Another forms result from mutation in pancreatic nuclear transcription factor known as the insulin promoter factor-1(IPF-1) on chromosome 13, mutation of the hepatocyte nuclear factor -1β, or mutations in the gene encoding the islet transcription factor neuroD1 on chromosome 2q (**Masharani and German, 2007**).