

Dedication

This study is dedicated
to.....
my parents, brothers and
sisters, wife, sons
teachers, ,
colleagues and students.

Seif Eldeen

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks firstly to Allah for allowing me the opportunity to complete this work. .My profound sense of gratitude to my esteemed guide Dr.Badr Eldein Hassan Elabid, MD, Associated Professor of Medicine,. College of Medical laboratory, University of Science and Technology, for his constant encouragement, enriching guidance, valuable suggestions and supervision throughout the preparation of this thesis.

My sincere thanks to my co-supervisor Dr. Mohamed Abd Elrahim Abd Alla for his support and kind cooperation in the study.

Many thanks to Mr. Majed Mohamed Ali (Quality control centre –Khartoum State) for his experience as a technical assistant in completing the practical work of the thesis.

My sincere thanks extended to Jaber Abu Elaaz Centre for Diabetes, in particular to Mrs. (Elham) for her assistance in the collection of samples.

I feel indebted to patients and healthy individuals who donated the samples.

My thanks to the staff of Clinical Chemistry Department for their assistance, Ustaz Abu Elgasium Abass, Statistician,. College of Medical laboratory Science, for his help in statistical analysis and Miss. Rabab Zakaria for the layout of this thesis.

I am grateful to my brother (Elkhair) for his support and motivation toward success.

Finally, I would like to thank and express my deepest gratitude to my wife for her support, encouragement, and patience throughout the years.

ABSTRACT

A cross-sectional study conducted during the period from February 2008 to February 2011 to screen and evaluate the plasma levels of total homocysteine (tHcy), apolipoprotein A-1 (ApoA-1) and lipid profile in Sudanese with long standing type 2 diabetes mellitus. Two hundred Sudanese with type 2 diabetes mellitus were selected as a test group from Jabir Abuelizz Diabetes Centre and Alhoda centre in Khartoum state, Sudan. The test group was compared with a control group which included 100 apparently healthy volunteers. Blood specimens were collected from both groups, and the serum levels of total homocysteine (tHcy), apolipoprotein A-1 and lipid profile (total cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein cholesterol (HDLc) and low density lipoprotein cholesterol (LDLc), in addition to fasting plasma glucose (FPG) and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) were determined.

Age and gender of the test group were matched with the control group. The serum levels of (tHcy) were measured using A25 autoanalyzer and for the serum levels of (ApoA-1) were measured using an autoanalyzer A15 with commercial kits from Spinreact Company and spectrophotometric methods were used for measuring the plasma levels of glucose, total cholesterol, HDLc, LDLc, triglycerides, and HbA_{1c}%. Statistical Package for Social Science (SPSS version 11.5) computer software was used for data analysis.

The results of this study indicate statistically significant increase in the plasma levels of homocysteine, total cholesterol, triglycerides, LDL-c, HbA_{1c} and fasting blood glucose levels, whereas apolipoprotein A-1 and HDL-c levels shows a significant reduction in the test group when compared to the control group.

The result of this study indicate also statistically significant elevation in homocysteine and triglycerides among diabetics group with foot disease when compared with those without foot disease, whereas apolipoprotein A-1 and HDL-

c among diabetic patients with foot disease show a significant reduction when compared with those without foot disease.

The mean of the plasma levels of homocysteine among diabetic patients with hypertension show a significant elevation when compared with those without hypertension, whereas the means of the plasma levels of apolipoprotein A-1, total cholesterol, triglycerides, HDL-c, LDL-c, among diabetic patients with hypertension show insignificant difference when compared with those without hypertension.

In the diabetics group with eye disease the mean of the plasma levels of apolipoprotein A-1, total cholesterol, LDL-c and HDL-c show a significant increase when compared with those without eye disease.

In this study, the diabetic group treated with lipid-lowering agents have a significant high homocysteine levels but total cholesterol, triglycerides and LDL are significantly reduced, whereas in the diabetic group treated with multivitamins only homocysteine show a significant reduction and there were no significant change in the lipemic profile.

In reference to gender, this study shows that females have significantly higher levels of HDL and apolipoprotein A-1, insignificant difference in LDL-c, cholesterol, triglycerides and total cholesterol levels when compared to males.

The results of this study indicate statistically significant elevation in homocysteine, total cholesterol and triglycerides among diabetics group with ischemic heart disease when compared with those without ischemic heart disease, whereas apolipoprotein A-1 and HDL-c among the diabetic group with ischemic heart disease show a significant reduction when compared with those without ischemic heart disease.

The results of the current study indicate insignificant correlations between the HbA_{1C}% and the serum levels of homocysteine, triglycerides and LDL-c, and show significant positive correlations between the HbA_{1C}% and the plasma levels of

total cholesterol, , whereas there is a significant moderate negative correlation between the HbA_{1c}% and the serum levels of as apolipoprotein A-1 and HDLc.

The present study, show significant moderate correlations between the body mass index (BMI) of the diabetic patients and the serum levels of homocysteine ,total cholesterol and LDLc, , and also shows a weak negative correlation between the BMI of diabetic patients and the serum levels of HDL-c, where as there are insignificant correlations between the (BMI) and the serum levels of apolipoprotein A-1, triglycerides and LDL-c.

Diabetic patients with worse glycemic control (HbA_{1c}% > 7%) in this study have significantly raised plasma levels of homocysteine , total cholesterol , triglycerides , LDL-c and fasting blood glucose but, apolipoprotein A-1 and HDL-c significantly decrease .

The present study also shows a significant strong correlation between the HbA_{1c} and FPG , apolipoprotein A-1 and HDL-c,

In conclusion; the current study indicates that the serum levels of homocysteine , apolipoprotein A-1 and lipid profile are important markers for evaluation of atherosclerosis, because homocysteine is significantly correlated with the BMI and significantly increase in diabetic patients with worse glycemic control, whereas apolipoprotein A-1 is negatively correlated with HbA_{1c}%. High plasma levels of homocysteine and low levels of apolipoprotein A-1 are risk factors for atherosclerotic disease, so they can be used as prognostic markers and predictors of myocardial infarction and in follow up of diabetic patients especially in those with complications such as hypertension, ischemic heart disease and lipid abnormalities.

مستخلص الدراسة

اجريت هذه الدراسة المقطعية في الفترة ما بين فبراير 2008 حتى فبراير 2011 لمسح و تقويم مستويات بلازما الهيموسستين ، و ابو البروتين الدهني أ-1، ومجموعة الدهون في السودانيين المصابين بداء السكري النوع الثاني لفترة طويلة.

تم إختيار 200 شخص مصاب بداء السكري النوع الثاني كمجموعة إختبار من مركز جابر ابوالعز لمرضى السكري بولاية الخرطوم (السودان)، حيث قورنت هذه المجموعة مع مجموعة ضابطة تضم 100 من المتطوعين الأصحاء.

تم جمع عينات الدم من كلا المجموعتين ومن ثم تم تحديد مستويات بلازما الهيموسستين ، و ابو البروتين الدهني أ-1، ومجموعة الدهون (الكولستيرول الكلي، و الكولستيرول عالي الكثافة، والكولستيرول منخفض الكثافة ، وثلاثي الجليسريدات)، وجلوكوز الدم فى حالة الصيام، والهيموقلوبين المجلکز. وفي هذه الدراسة طبقت أعمار و جنس مجموعة الإختبار أعمار و جنس المجموعة الضابطة. تم استخدام جهاز A25 لقياس الهيموسستين ، و لقياس ابو البروتين الدهني أ-1 استخدم جهاز A15 . و استخدمت طرق جهاز قياس الأطياف الضوئية لقياس جلوكوز البلازما، والكولستيرول الكلي، والكولستيرول عالي الكثافة، والكولستيرول منخفض الكثافة، وثلاثي الجليسريدات، والهيموقلوبين المجلکز. و اجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS) لتحليل النتائج.

اشارت نتائج هذه الدراسة الى زيادة ذات دلالة إحصائية في متوسطات مستويات بلازما الهيموسستين ، والكولستيرول الكلي ، والكولستيرول منخفض الكثافة، وثلاثي الجليسريدات، وانخفاض ذو دلالة إحصائية في متوسط مستويات بلازما الكولستيرول عالي الكثافة ابو البروتين الدهني أ-1 في مجموعة الإختبار.

كما اظهرت الدراسة ايضا زيادة ذات دلالة إحصائية في متوسطات مستويات بلازما الهيموسستين ، وثلاثي الجليسريدات لدى مرضى السكر المصابين فى الاقدام عندما قورنت بمرضى السكر غير المصابين فى الاقدام ، في حين اظهرت انخفاض ذو دلالة إحصائية في متوسط مستويات بلازما الكولستيرول عالي الكثافة و ابو

البروتين الدهني أ-1 لدى مرضى السكر المصابين فى الاقدام عند مقارنتها بمرضى السكر غير المصابين فى الاقدام.

بينت نتائج هذه الدراسة زيادة ذات دلالة إحصائية فى متوسط مستوى بلازما الهيموسستين لدى مرضى السكر المصابين بإرتفاع ضغط الدم ، بينما لا توجد زيادة ذات دلالة إحصائية فى متوسط مستويات بلازما الكولستيرول الكلي، والكولستيرول منخفض الكثافة، وثلاثي الجليسريدات، ابو البروتين الدهني أ-1 لدى مرضى السكر المصابين بإرتفاع ضغط الدم.

كما أوضحت النتائج وجود فرق ذو دلالة إحصائية فى متوسط ا مستويات بلازما ابو البروتين الدهني أ-1، ، والكولستيرول الكلي، والكولستيرول عالي الكثافة ، والكولستيرول منخفض الكثافة لدى مرضى السكر المصابين بمرض فى العيون عندما قورنت بمرضى السكر غير المصابين بمرض فى العيون. اشارت الدراسة الى ارتفاع الهيموسستين لدى مرضى السكر الذين يتعاطون أدوية لخفض الدهون ، بينما أشارت الى انخفاض الكولستيرول الكلي و الكولستيرول منخفض الكثافة وثلاثي الجليسريدات لديهم .أما مرض السكري الذين يتعاطون أدوية كالفاتمينات فان الهيموسستين منخفض ولا تغير فى مجموعة الدهون .

ومقارنة بالنوع فقد أوضحت هذه الدراسة ارتفاع فى مستوى ابو البروتين الدهني أ-1 و الكولستيرول عالي الكثافة لدى الاناث مقارنة بالذكور ، بينما لا يوجد فرق ذو دلالة احصائية فى مستويات الكولستيرول الكلي و الكولستيرول منخفض الكثافة وثلاثي الجليسريدات.

وأيضاً اظهرت نتائج هذه الدراسة زيادة ذات دلالة إحصائية فى متوسطات مستويات بلازما الهيموسستين والكولستيرول الكلي، ، وثلاثي الجليسريدات لدى مرضى السكر المصابين بمرض نقص تروية القلب عندما قورنت بمرضى السكر غير المصابين بمرض نقص تروية القلب ، بينما اظهرت انخفاض ذو دلالة إحصائية فى متوسط مستويات مصل ابو البروتين الدهني أ-1 والكولستيرول عالي الكثافة لدى مرضى السكري المصابين بمرض نقص تروية القلب عند مقارنتها بمرضى السكري غير المصابين بمرض نقص تروية القلب.

تشير نتائج الدراسة الحالية إلى وجود علاقة إرتباط ايجابية ذات دلالة إحصائية بين والهيموقلوبين المجلکز مستويات بلازما الكولستيرول الكلبي ، بينما هناك علاقة إرتباط عكسي ذات دلالة إحصائية بين الهيموقلوبين المجلکز ومستويات بلازما ابو البروتين الدهني أ-1 والكولستيرول عالي الكثافة. بينما لا توجد علاقة إرتباط قوية بين والهيموقلوبين المجلکز و الهيموستين وثلاثي الجليسريدات والكولستيرول منخفض الكثافة.

وتظهر هذه الدراسة علاقة إرتباط ايجابي ذات دلالة إحصائية بين مؤشر كتلة الجسم لمرضى السكر و مستويات الهيموستين والكولستيرول الكلبي، والكولستيرول منخفض الكثافة و علاقة إرتباط عكسي بين مؤشر كتلة الجسم لمرضى السكر و مستويات بلازما الكولستيرول عالي الكثافة. اشارت الدراسة الى ارتفاع الهيموستين والكولستيرول الكلبي وثلاثي الجليسريدات والكولستيرول منخفض الكثافة لدى مرضى السكر الذين يكون مستوى الهيموقلوبين المجلکز لديهم أعلى من 7 ، وانخفاض أبو البروتين الدهني أ-1 والكولستيرول عالي الكثافة.

وتشير الدراسة الحالية ايضاً لوجود علاقة إرتباط ايجابي قوية ذات دلالة إحصائية بين جلكوز البلازما والهيموقلوبين المجلکز و ابو البروتين الدهني أ-1 والكولستيرول عالي الكثافة.

وفي الختام تشير هذه الدراسة الى أن مستويات الهيموستين و ابو البروتين الدهني أ-1 ، ومجموعة الدهون مؤشر مهم لتقويم مرض تصلب الشرايين وذلك لوجود علاقة إرتباط ذات دلالة إحصائية بينها و بين الهيموقلوبين المجلکز ومؤشر كتلة الجسم لدى مرضى السكر . حيث يعتبر ارتفاع الهيموستين مع انخفاض ابو البروتين الدهني أ-1 مؤشر خطر لمرضى تصلب الشرايين وبالتالي يمكن استخدامها كمؤشرات تشخيصية للتنبؤ بالاصابة بمرض إحتشاء القلب ولمتابعة مرضى السكر خاصة الذين يعانون من المضاعفات كأرتفاع ضغط الدم، ومرض نقص تروية القلب، وخلل الدهون.

List of abbreviations

Apo-A1	Apolipoprotein A1
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ASVD	Arteriosclertic vascular disease
ATP	Adenosine triphosphate
BMI	Body mass index
CAD	Coronary artery disease
CBS	Cysthionine beta synthase
CDC	Centre for disease control
CETP	Cholester-ester transfer protein
CETP	Cholesterol ester transfer protein
CHD	Coronary heart disease
DAG	Diacylglyceride
DKA	diabetic ketoacidosis
DNA	Deoxyribonucleic acid
FAT	Fatty acid transport
FCH	Familial combined hyperlipoproteimemia
FFA	Free fatty acid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GDM	Gestational diabetes milletus
HAAF	Hypoglycemia associated autosomic failure
HbA1c	Glycated haemoglobin
Hcy	Homocysteine
HDL	High density lipoprotein
HDL-c	High density lipoprotein cholesterol .
HL	Hepatic lipase
IDDM	Insulin dependent diabetes milletus
IDL	Intermediate density lipoproteins
IGT	Impaired glucose tolerance
LCAT	Lecithin: cholesterol acyl transferase
LDL	Low density lipoprotein
LDL-c	Low density lipoprotein cholesterol .
LDL-ox	Low density lipoprotein-oxidized
LPL	Lipoprotein lipase
MHC	Major histocompatibility complex
MI	Myocardial infarction
MODY	Maturity – onset diabetes of the young
MS	Methionine synthase
MTHFR	Methyltetrahydrofolate reductase
MTP	Microsomal transfer protein
NCED	National cholesterol eduction program
NH	National health
NIDDM	Non Insulin dependent diabetes milletus
OGTT	Oral glucose tolerance test
PAOD	Peripheral artery occlusive disease
PVD	Peripheral vascular disease
RCT	Reverse cholesterol transport

ROS	Reactive oxygen species
SAH	S-adenosyl Homocysteine
SAM	S-adenosyl methionine
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
TAG	Triacylglyceride
TC	Total cholesterol
TG	Triglycerides
TRL	Triglycerides rich lipoprotein
VLDL	Very Low density lipoprotein
WHO	World health organization

Contents

Subject		Page
Dedication		I
Acknowledgment		II
English Abstract		III
مستخلص الدراسة		VI
Abbreviations		Xiv
List of tables		Xv
List of figures		Xvi
Chapter One : Introduction		
1.1	Rationale	4
1.2	Objectives	6
Chapter Two: Literature Review		
2.1	Diabetes mellitus	7
2.1.1	Diagnosis of diabetes mellitus	7
2.1.2	Classification of diabetes mellitus	9
2.1.2.1	Type1 diabetes mellitus	11
2.1.2.1.1	Pathophysiology of type1 diabetes mellitus	12
2.1.2.1.2	Inheritance of type1 diabetes mellitus	13
2.1.2.2	Type2 diabetes mellitus	13
2.1.2.2.1	Causes of Type2 diabetes mellitus	14
2.1.2.2.2	Risk factors for Type2 diabetes mellitus	16
2.1.2.2.3	Pathophysiology of type2 diabetes mellitus	17
2.1.2.3	Secondary diabetes mellitus	17
2.1.2.4	Gestational diabetes	18
2.1.2.5	Other specific types of diabetes	20
2.1.3	Complication of diabetes mellitus	21
2.1.3.1	Acute Complication of diabetes mellitus	21
2.1.3.1.1	Hypoglycemia	21
2.1.3.1.2	Diabetic ketoacidosis	22
2.1.3.1.3	Hyperglycemia	23
2.1.3.2	Long term Complication of diabetes mellitus	23
2.1.3.2.1	Eye problem	24
2.1.3.2.2	Kidney disease	25
2.1.3.2 .3	Diabetic neuropathies	26
2.1.3.2 .4	Cardiovascular disease	27
2.1.3.2.5	Gum disease	27
2.1.3.2.6	Foot disease	27
2.2	Homocysteine	28
2.2.1	Clinical significances of Homocysteine	29

2.2.2	Metabolism of homocysteine	29
2.2.3	Hyperhomocysteinemia	32
2.2.3.1	Causes of Hyperhomocysteinemia	33
2.2.3.2	Complication of Hyperhomocysteinemia	34
2.2.3.3	Pathogenesis of atherosclerosis in Hyperhomocysteinemia	36
2.2.4	Homocysteine and diabetes	39
2.2.5	Homocysteine and diabetes complications	40
2.2.5.1	Homocysteine and cardiovascular diseases	40
2.2.5.2	Homocysteine and hypertension	41
2.2.5.3	Homocysteine and diabetic nephropathy	41
2.2.5.4	Homocysteine and stroke	42
2.2.5.5	Homocysteine and diabetic retinopathy	42
2.2.5.6	Homocysteine and peripheral vascular disease	42
2.2.5.7	Homocysteine and diabetic neuropathy	42
2.2.6	Homocysteine and vascular smooth muscle cell proliferation	43
2.2.7	Homocysteine and cancer risk	43
2.3	Lipids	44
2.3.1	Categories of lipids	44
2.3.2	Biological function of lipids	46
2.3.3	Metabolism of lipids	48
2.3.4	Triglycerides	49
2.3.5	Cholesterol	52
2.3.6	Lipoproteins	56
2.3.6.1	High density lipoprotein	59
2.3.6.2	Low density lipoprotein	61
2.3.7	Apolipoproteins	63
2.3.7.1	Apolipoproteins B	63
2.3.7.2	Apolipoproteins A-1	64
2.3.8	Hyperlipidemia	66
2.3.8.1	Classification of Hyperlipidemia	66
2.3.9	Lipid metabolism in type2 diabetes mellitus	69
2.4	Atherosclerosis	72
2.4.1	Sign of Atherosclerosis	73
2.4.2	Causes of Atherosclerosis	73
2.4.3	Risk factors of Atherosclerosis	74
2.5	Body mass index	75
Chapter Three: Materials and methods		

3.1.	Study approach and design:	78
3.2	Study area and period	78
3.3.	Target population and sample size	78
3:4	Inclusion and Exclusion Criteria	78
3.5.	Ethical consideration	78
3.6.	Data collection and clinical assessment	78
3.7.	Methods	79
3:7:1	Measurement of total Homocysteine (tHcy]	79
3.7.2	Measurement of apolipoprotein A-1 (APO A-1)	80
3.7.3	Measurement of total cholesterol	82
3.7.4.	Measurement of triglycerides	83
3.7.5.	Measurement of LDL Cholesterol	84
3.7.6.	Measurement ofHDL Cholesterol	85
3.7.7.	Measurement of glucose	86
3.7.8	Measurement of glycated hemoglobin (HbA1c)	87
3:7:9	Quality control	89
3:7:10	Statistical Analysis	89
Chapter Four Results		
	Results	90
Chapter Five : Discussion,		
5.0	Discussion	128
Chapter Six Conclusions and Recommendations		
6.1	Conclusions	137
6.2	Recommendations	138
References		139
Appendixes		173

List of Tables

Table 2.1	Homocysteine levels	33
Table 2.2	Triglyceride levels.	51
Table 2.3	Cholesterol levels	55
Table 2.4	Classification of lipoprotein.	57
Table 2.5	HDL levels.	61
Table 2.6	LDL levels.	63
Table 2.7	Fredrichson classification of hyperlipidemia.	67
Table 2.8	Categories of BMI.	77
Table 4.1	Baseline characteristics of test group and control group.	98
Table 4.2	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group compare with control group	99
Table 4.3	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group with foot disease compare with those without foot disease .	100
Table 4.4	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group with eye disease compare with those without eye disease .	101
Table 4.5	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group with hypertension compare with those without hypertension .	102
Table 4.6 5	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group use lipid lowering drug compare with those donot use lipid lowering drug	103
Table 4.7	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group use multivitamins compare with those donot use multivitamins	104
Table 4.8	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group in reference to gender.	105
Table 4.9	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group with IHD compare with those without IHD.	106
Table 4.10	Hcy, ApoA-1, Ch, TG, LDL, HDL, FPG, HbA1c in test group with HbA1c up to 7.0 % compare with those with HbA1c more than 7.0	107

..

List of figures

Fig. 2.1	Homocysteine species in the blood .	28
Fig. .2.2	Homocysteine metabolism .	31
Fig. .2.3	Homocysteine in atherosclerosis .	39
Fig. 4.1	Relationship between Hcy and HbA1c ..	108
Fig. 4.2	Relationship between ApoA-1 and HbA1c.	109
Fig. 4.3	Relationship between Cholesterol nd HbA1c.	110
Fig. 4.4	Relationship between Triglycerides and HbA1c.	111
Fig. 4.5	Relationship between LDL -c and HbA1c.	112
Fig. 4.6	Relationship between HDL-cl and HbA1c.	113
Fig. 4.7	Relationship between FPG and HbA1c.	114
Fig. 4.8	Relationship between Hcy and BMI.	115
Fig. 4.9	Relationship between ApoA-1 and BMI.	116
Fig. 4.10	Relationship between Cholesterol and BMI.	117
Fig. 4.11	Relationship between Triglycerides and BMI.	118
Fig. 4.12	Relationship between LDL -c and BMI	119
Fig. 4.13	Relationship between HDL-cl and BMI..	120
Fig. 4.14	Relationship between HbA1c and BMI	121
Fig. 4.15	Relationship between FPG and BMI	122
Fig. 4.16	Relationship between HDL-cl and ApoA-1.	123
Fig. 4.17	Frequency of BMI in the test group .	124
Fig. 4.18	Frequency of age in the test group	125
Fig. 4.19	Hcy levels < 15.0 mmol/ L and >15.0 mmol/ L	126
Fig. 4.20	HbA1c levels <7.0 % and >7.	127