Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(88): 59-70

Relationship between structural changes of hemoglobin with oxidative status of plasma in diabetic hemodialysis patients

Dorostkar H[1], Ansarihadipour H[2]*, Goodarzi MT[3]

1- Master of Science, Student of Clinical Biochemistry, Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences Arak, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biochemistry and Genetics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Professor, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan Iran.

Received: 28 Dec 2013, Accepted: 9 Apr 2014

Abstract

Background: There is a relationship between diabetes, dialysis and oxidative stress. The aim of this study was the comparison of structural changes in Hb, oxidative damages in plasma proteins, and antioxidant capacity in diabetic hemodialysis patients with those of control subjects.

Materials and Methods: In this experimental study, blood samples obtained from diabetic hemodialysis patients and control group. Oxidative damages in plasma proteins were determined by carbonyl assay and antioxidant power of plasma was performed by FRAP assay. Conformational changes in Hb were detected by spectrophotometric analysis. Blood glucose, urea, creatinine and uric acid in patients were determined usnig routine laboratory methods. Statistical analysis were performed by using regression analysis and t-test in SPSS software version 20.

Results: This study showed a significant correlation between carbonyl content of plasma proteins and optical density of Hb at 630 and 275 nm which corresponds to structural changes in Hb. ferric reducing ability of plasma (FRAP), as an index of total antioxidant capacity of plasma was found to be enhanced significantly in diabetic patients receiving hemodialysis (from 1019.62±129 to 1354.54±129 molare, $p < 0.05$).

Conclusion: The results obtained in the present study showed that inducible factors in diabetic hemodialysis patients contribute to plasma antioxidant activity and probably responsible for prevention of carbonyl formation and oxidative damages in hemoglobin.

Keywords: Diabetic hemodialysis patient, Erythrocyte, Hemoglobin, Oxidative status

*Corresponding Author:
Address: Department of biochemistry and Genetics, Arak Medical University Arak, Iran
Email: ansary@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره ۷ (شماره پیاپی۸۸)،مهر ۱۳۹۳،۷۰-۵۹

ارتباط تغییرات ساختاری هموگلوبین با وضعیت اکسیداتیو پلاسما در بیماران دیابتی دیالیزی

حمیدرضا درستکار[۱]، هادی انصاری هادی پور[۲*]، محمد تقی گودرزی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- استادیار،گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک،اراک،ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی ،دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت:۹۳/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: دیابت و دیالیز با استرس اکسیداتیو در ارتباطاند. هدف از این مطالعه، مقایسه تغییرات ساختاری هموگلوبین، میزان آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های پلاسما و قدرت آنتی اکسیدانی در این بیماران و گروه شاهد است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی تحلیلی، نمونه‌خون وریدی از بیماران دیابتی دیالیزی و گروه شاهد تهیه شد. آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های پلاسما به وسیله سنجش کربنیل و قدرت آنتی اکسیدان پلاسما با روش FRAP بررسی شد. تغییرات ساختاری هموگلوبین نیز با بررسی اسپکتروفتومتریک بررسی شد. قند، اوره، کراتینین و اسید اوریک بیماران نیز توسط روش‌های روتین آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند. در نهایت یافته‌ها با استفاده از آزمون همبستگی، تی تست و شاخص‌های میانگین و انحراف معیار توسط نرم افزار SPSS تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین میزان کربنیل پلاسما و جذب نوری هموگلوبین در طول موج های ۲۷۵ و ۶۳۰ نانومتر که مبین تغییرات ساختاری هموگلوبین است، مشاهده شد. هم‌چنین در بیماران دیابتی دیالیزی میزان FRAP، به عنوان شاخص ظرفیت آنتی اکسیدان تام پلاسما افزایش معنی‌داری را (از ۱۲۹±۱۰۱۹/۶۲ به ۱۲۹±۱۳۵۴/۵۴ میکرومولار) نسبت به گروه شاهد نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که فاکتورهای القا شده در بیماران دیابتی همودیالیزی، در فعالیت آنتی اکسیدان پلاسما دخیل هستند و احتمالا مسئول جلوگیری از تشکیل کربنیل پروتئین‌های پلاسما و حفاظت در مقابل استرس اکسیداتیو در هموگلوبین می‌باشند.

واژگان کلیدی: اریتروسیت، بیماران دیابتی دیالیزی، وضعیت اکسیداتیو، هموگلوبین

***نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک
Email: ansary@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

گونه‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن (Reactive Nitrogen Species- RNS , Reactive Oxyen Species-ROS) به لحاظ شیمیایی اکسیژن‌ها و نیتروژن‌های فعالی هستند که دارای رادیکال‌های آزاد و مشتقات آنها می‌باشند. ROS و RNS، تنظیم کننده مهم سوخت وساز سلولی، بیان ژن و پاسخ‌های مولکولی دیگر هستند(۱). ROS به طور ثابتی در بدن انسان در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تشکیل می‌شوند(۲). فعالیت رادیکال‌های آزاد به وسیله سیستم دفاع آنزیمی و غیر آنزیمی مقابله می‌شود(۳). از آنزیم‌های کلیدی سیستم آنتی اکسیدانی می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismo1tase- SOD)، کاتالاز (Catalase- CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase- GPX) (۴) و از آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نیز می‌توان به اسید اوریک، اوره و بیلی روبین اشاره نمود(۵).

عدم تعادل در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد توسط عوامل مختل، استرس اکسیداتیو را به وجود می‌آورد که اگر این استرس شدید یا طولانی باشد می‌تواند باعث آسیب‌های جدی سلولی شود. رادیکال‌های آزاد در واکنش با قسمت‌های مختلف سلولی باعث آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها و حتی مرگ سلولی می‌شود و این فرایند باعث تسریع در پیدایش بیماری‌های مختلف از جمله سرطان و پیری می‌شود(۶). هم‌چنین افزایش استرس اکسیداتیو همراه با دیابت ، عامل مهمی در افزایش مشکلات ناشی از بیماری است(۷). با افزایش گلوکز، میزان اکسیداسیون آن نیز افزایش یافته و رادیکال‌های آزاد بیشتری نیز تولید می‌شود که می‌تواند به اجزای سلولی صدمه بزند(۸).

در نارسایی مزمن کلیوی (Chronic renal failure-CRF) نیز افزایش استرس اکسیداتیو مشاهده شده است. در این افراد، تعادل سیستم اکسیدان و آنتی اکسیدان بهم می‌خورد و اریتروسیت‌ها واحتمالا سایر بافت‌ها در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند(۹). در بیماران دارای نارسایی کلیوی تحت همودیالیز نیز میزان آسیب اکسیداتیو لیپیدها و پروتئین‌ها افزایش داشته است(۱۰).

گلبول‌های قرمز به عنوان منبع تولید رادیکال آزاد و هدف آسیب اکسیداتیو مورد مطالعه قرار گرفته است. بسیاری از داروها و گزنوبیوتیک‌ها در طی واکنش‌های اکسیداسیون و احیا، موجب صدمه به اریتروسیت‌ها می‌شوند که در نهایت منجر به لیز آن و آنمی همولایتیک می‌شود. اولین مرحله در واکنش این مواد با هموگلوبین، اکسیداسیون هموگلوبین و تبدیل آن به مت هموگلوبین و سپس دناتوره شدن هموگلوبین و رسوب آن به صورت هاینز بادی در اریتروسیت‌ها است(۱۱).

برای مطالعه اثرات واکنش‌های اکسیداتیو بر روی مولکول هموگلوبین، از روش‌های اسپکتروفتومتری استفاده می‌شود. در این روش تشکیل اکسی هموگلوبین، مت هموگلوبین و همی کروم با توجه به طیف جذبی هموگلوبین در طول موج‌های مختلفی که پیشنهاد دادند قابل ارزیابی می‌باشد(۱۲). استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به اکسیداسیون پروتئین‌ها و تشکیل گروه‌های کربونیل بشود و با شرایطی مانند دیابت، پیری و آلزایمر در ارتباط است(۱۳). بیماری هایی هم‌چون آلزایمر، دیابت و بیماری مزمن کلیوی با کربنیلاسیون پروتئین‌ها در ارتباط است و گروه‌های کربنیل به عنوان یک بیومارکر آسیب‌های اکسیداتیو قابل ارزیابی است(۱۴). قدرت احیایی پلاسما در احیا کردن شکل فریک آهن به شکل فرو که به عنوان روش (The Ferric reducing ability of plasma FRAP- FRAP) شناخته می‌شود روشی معمول برای اندازه‌گیری قدرت آنتی اکسیدانی پلاسما است که ساده و ارزان می‌باشد(۱۵).

باتوجه به این که بیماران دیابتی دیالیزی به خاطر بیماری دیابت و نارسایی کلیوی که دارند و هم‌چنین دیالیزی که بر روی خون ایشان انجام می‌شود از نظر مقاومت در برابر بیماری‌ها آسیب‌پذیرتر هستند و برخی به کم خونی نیز دچار می‌شوند و به همین دلیل باید تحت مراقبت و شرایط کنترل شده‌تری باشند. در مطالعه حاضر، آسیب‌های اکسیداتیو،سیستم آنتی اکسیدانی و ساختار هموگلوبین گلبول‌های قرمز در این افراد بررسی می‌شود. هدف ما در این مطالعه بررسی و مقایسه پارامترهای مرتبط با وضعیت استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی اکسیدان در پلاسما و

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

اریتروسیت بیماران دیابتی دیالیزی هم‌چنین تعیین ارتباط تغییرات ساختاری در هموگلوبین با آسیب‌های اکسیداتیو و سیستم آنتی اکسیدانی محیط این سلول‌ها در بیماران دیابتی دیالیزی و افراد گروه شاهد است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده درانجام آزمایش‌ها، به جز کیت‌های تجاری آماده، از شرکت مرک آلمان خریداری شده است. برای آنالیز طیفی از دستگاه اسپکتروفتومتر JENWAY مدل 6505 UV/Vis ساخت اتحادیه اروپا استفاده شد. در این مطالعه ۱۵ نفر از افراد دیابتی دیالیزی و افراد غیر بیمار به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. به عبارت دیگر، افراد بیمار این مطالعه از بیماران دیابتی دیالیزی در دسترسی که شرایط ورود به مطالعه را داشتند و به عنوان بیماری دیابتی که در بیمارستان ولی عصر (عج) تحت همودیالیز قرار گرفته بودند، انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل بیماری‌های حاد نیاز به بستری طولانی مدت، بیماری حاد قلبی- ریوی، سرطان، هپاتیت B و C ، تغذیه وریدی و یا بیماری مسری بود. معیار ورود نیز برای بیماران، دیابتی و دیالیزی بودن محرز شده توسط آزمایشات و متخصصین مربوطه و برای گروه شاهد نیز عدم وجود بیماری دیابت و عدم نیاز به دیالیز با توجه به نتایج آزمایشات ایشان که در دامنه طبیعی بود انجام شد. بیماران دیابتی دیالیزی با توجه به توصیه‌های پزشک متخصص خود تحت رژیم غذایی مناسب بیماران دیابتی و دیالیزی قرار داشتند. افراد مورد مطالعه از لحاظ پارامترهای سن، جنس، قد، وزن، شرایط زندگی و شهر محل سکونت تا حد امکان مشابه انتخاب شدند. در مورد بیماران، به خاطر شرایط خاص بیماری و ملاحظات اخلاقی، منع مصرف داروها، امکان پذیر نبود لکن بیماران تحت درمان با داروهای مشابه انتخاب شدند. این بیماران ۳ بار در هفته و هربار به مدت ۴ ساعت تحت همودیالیز بودند.

جهت آماده سازی نمونه‌ها ابتدا با رضایت افراد، نمونه‌گیری خون به صورت ناشتا از ایشان به عمل آمد. جدا سازی پلاسما و سرم با استفاده از سانتریفوژ (۵ دقیقه با نیروی ۱۸۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. برای جدا سازی پلاسما از ضد انعقاد EDTA استفاده گردید. سپس گلبول‌های قرمز، ۳ بار با بافر فسفات ایزوتونیک (pH=۷/۴) شسته شده و پس از هر بار شستشو محلول رویی برداشته شد و Packed cell برای بررسی ساختار هموگلوبین، جمع‌آوری شد. نمونه‌های پلاسما برای تست FRAP و سرم نیز برای تست‌های روتین بیوشیمیایی استفاده گردید.

برای اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین از کیت تجاری سنجش هموگلوبین شرکت زیست شیمی ایران که به روش سیان مت هموگلوبین است استفاده شد. در این روش جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۶ نانومتر در برابر محلول درابکین به عنوان شاهد خوانده می‌شود و با توجه به منحنی استاندارد رسم شده، غلظت هموگلوبین محاسبه می‌شود.

برای مطالعه بر روی طیف جذبی هموگلوبین اریتروسیت‌ها، گلبول‌های قرمز با استفاده از بافر فسفات هیپوتونیک سرد لیز شده و سپس غلظت هموگلوبین در حد ۴×۱۰^{-۵} مولار تنظیم شد. برای بررسی عملکرد هموگلوبین و تغییر در کنفورماسیون آن، جذب نوری نمونه‌ها در محدوده طول موج‌های ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این، که فرم‌های اکسید شده هموگلوبین در طول موج‌های ۵۶۰، ۵۷۷ و ۶۳۰ نانومتر حداکثر جذب نوری را نشان می‌دهند، از معادلات زیر برای محاسبه غلظت اکسی هموگلوبین و مت هموگلوبین استفاده شد.

$$\text{Oxy-Hb}=119A_{577}-39A_{630}-89A_{560}$$
$$\text{Met-Hb}=28A_{577}+307A_{630}-55A_{560}$$

در این معادلات، A نشانه جذب نوری در طول موج‌های یاد شده است. هم‌چنین جذب نوری در طول موج

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

۲۷۵ نانومتر نیز برای بررسی ساختار هموگلوبین اندازه‌گیری شد(۱۲).

برای سنجش کربنیل از روش "اوانس" استفاده شد(۱۶). در این روش از معرف ۲ و ۴ دی نیتروفنیل هیدرازین (Dinitrophenylhydrazine-DNPH) استفاده می‌شود که پس از واکنش با گروه‌های کربنیل موجب تشکیل۲ و۴ دی نیتروفنیل هیدرازون (۲dinitrophenylhydrazone و۴) با حداکثر جذب نوری در ۳۸۰ نانومتر می‌شود که با روش اسپکترومتری قابل سنجش است.

پس از اندازه‌گیری جذب نوری محلول نهایی و شاهد مربوطه (پروتئین مورد مطالعه در اسید کلریدریک ۲ مولار) طبق روابط زیر میزان گروه‌های کربونیل بر حسب نانومول در هر میلی‌گرم از پروتئین نمونه به دست می‌آید.

$$C = \frac{Abs(355-390nm)}{2.2\times10^4/10^6}$$

$$\text{Carbonyl concentration in nmol/ml} = \Delta A(355-390nm)\times 45.45$$

$$\Delta A(355-390) = A(355-390)\,of\ DNPH\ solution - A(355-390\,nm)\,of\ HCl\ solution$$

Carbonyl concentration (nmol)= nmol of carbonyl per mg of protein

برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام از روش سنجش FRAP که توسط "بنزی" و "استرین" معرفی شد و یک تکنیک حساس، تکرار پذیر و دقیق است استفاده شد(۱۵). در این روش هم‌چنان که از نامش نیز مشخص است قدرت احیایی پلاسما سنجیده می‌شود برای این منظور طبق پروتکل معرفی شده، برای نمونه‌گیری از خون دارای ضد انعقاد استفاده شد و در نهایت پلاسمای جداشده برای انجام این تست به کار برده شد. در این تکنیک عوامل آنتی اکسیدان موجود در نمونه مورد مطالعه موجب تبدیل کمپلکس فریک تری پیریدیل تریازین (Fe^{3+}-TPTZ) به فرم فرو (Fe^{2+}) می‌شوند که در محیط اسیدی به رنگ آبی است و حداکثر جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر می باشد. سرعت واکنش، با قدرت احیاء کنندگی نمونه رابطه خطی دارد. برای رسم منحنی استاندارد نیز از رقت‌های مختلف سولفات آهن با غلظت هزار میکرو مولار استفاده شد.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

قند خون به وسیله روش گلوکز اکسیداز، اوره ،به روش اوره آز، کراتینین به روش ژافه و اسید اوریک نیز به روش اسید فسفوتنگستیک و به وسیله کیت‌های تجاری شرکت زیست شیمی و توسط دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمی سلکترا ایکس ال ساخت کشور هلند مورد سنجش قرار گرفتند.

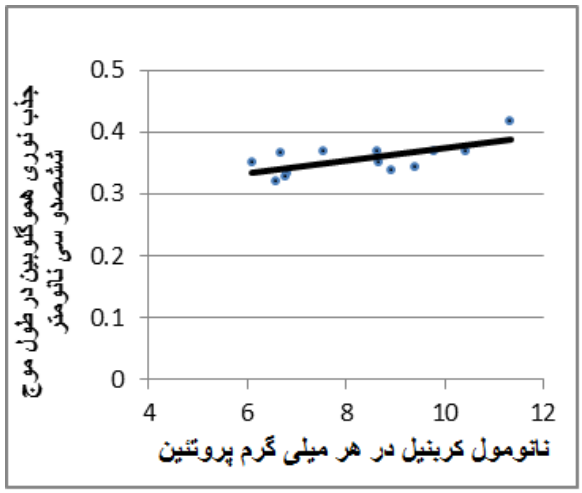
برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. بدین طریق که برای نشان دادن میانگین گروه‌ها و تست‌ها از شاخص میانگین، انحراف معیار، برای مقایسه میانگین دو گروه مورد مطالعه از آزمون تی، برای مطالعه همبستگی بین معیارهای مورد مطالعه از آزمون رگرسیون و برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد. سطح معنی‌دار نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. این تحقیق با موافقت کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک و با کد۶-۱۴۸-۹۲ اجرا و در تمام مراحل تحقیق، اصول بیانیه هلسینکی مورد توجه قرار گرفت.

یافته ها

افراد مورد مطالعه دارای میانگین سنی ۱۵±۵۲ سال و شامل ۱۰ نفر مرد و ۵ نفر زن بودند. ۱۰ نفر از افراد تحت مطالعه از بیماران دیابتی دیالیزی بودند که برای دیالیز به بیمارستان ولی عصر (عج) شهرستان اراک مراجعه می‌نمودند. گروه شاهد نیز ۵ نفر از افراد فاقد بیماری دیابت و بدون نیاز به دیالیز بودند.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

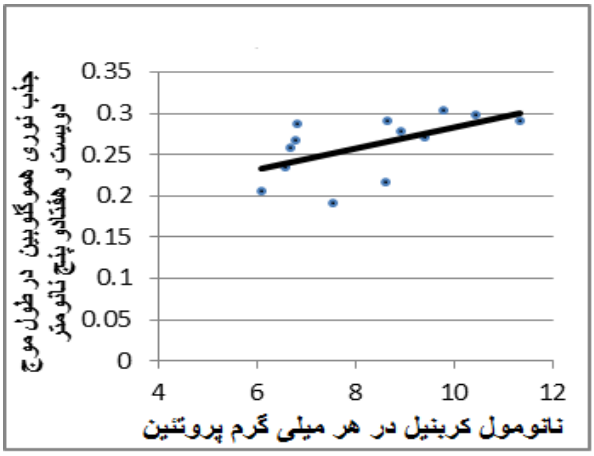
غلظت گروه‌های کربنیل پلاسما از ۶/۰۸۸ تا ۱۱/۳۳ نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین و جذب نوری هموگلوبین در طول موج ۶۳۰ نانومتر بین ۰/۳۲۰ تا ۰/۴۱۸ بود. ارتباط این دو فاکتور از فرمول $Y=0.010x + 0.272$ با $R^2 = 0.436$ تبعیت می‌نماید و در بررسی هبستگی خطی (Linear regression) تغییرات معنی‌داری (p=۰/۰۱۴) را نشان می‌دهد(نمودار ۱).



نمودار ۱. بررسی همبستگی میزان گروه های کربنیل پلاسما و میزان جذب هموگلوبین اریتروسیت ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر در کلیه افراد مورد مطالعه . ($R^2 = 0.436$ و p =۰/۰۱۴)

غلظت گروه‌های کربنیل پلاسما از ۶/۰۸۸ تا ۱۱/۳۳ (نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین) و تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۷۵ نانومتر نیز از۰/۱۹۱ تا ۰/۳۰۳ مشاهده گردید که ارتباط این دو فاکتور از فرمول $Y=0.012x+0.154$ با $R^2=0.328$ تبعیت می‌نماید که در بررسی همبستگی خطی تغییرات معنی‌داری را (p=۰/۰۴۱) نشان می‌دهد(نمودار ۲).

در مقایسه میزان گروه‌های کربنیل پلاسما از ۶/۰۸۸ تا ۱۱/۳۳ (نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین) و میزان تغییرات مت هموگلوبین از ۱/۴ تا ۳/۴ در بررسی همبستگی خطی، تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.



نمودار ۲. بررسی همبستگی میزان گروه های کربنیل پلاسما و میزان جذب هموگلوبین اریتروسیت ها در طول ۲۷۵ نانومتر.(p =۰/۰۴۱)

میانگین غلظت اکسی هموگلوبین بیماران دیابتی دیالیزی و افراد شاهد به ترتیب ۴۳/۵۴(۳/۱۷) و ۴۳/۹(۴/۴۳) میکرومولار و غلظت مت هموگلوبین به ترتیب ۲/۵۷(۰/۶۹) و ۲/۵۸(۰/۶۴) میکرومولار بود که بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

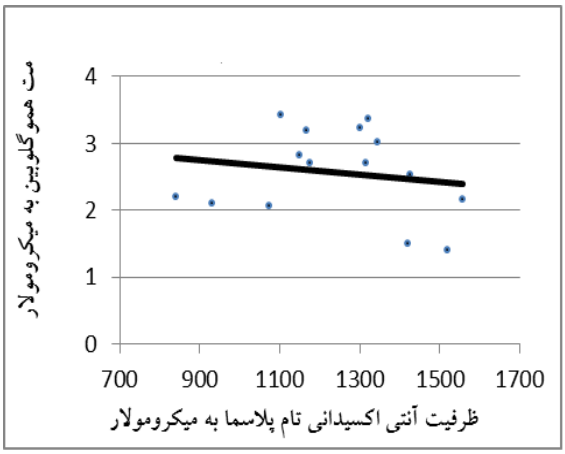
میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما در بیماران دیابتی دیالیزی، ۱۳۵۴/۵۴(۱۲۹) و در افراد شاهد ۱۰۱۹/۶۲(۱۲۹) میکرومولار بود که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد(p=۰/۰۰۰).

میانگین گروه کربنیل در افراد دیابتی دیالیزی ۸/۲۴(۱/۹) و در افراد شاهد ۸/۳۷(۱/۱) نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد که تفاوت معنی‌داری نداشت.

برای افراد مورد مطالعه، مقایسه میزان اکسی هموگلوبین با محدوده تغییرات ۳۹/۰۸ تا ۴۸/۵۱ میکرومولار و میزان مت هموگلوبین با محدوده تغییرات ۱/۴۰ تا ۳/۴۳ میکرومولار با میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما با محدوده تغییرات ۸۴۰ تا ۱۵۵۷/۵ میکرومولار به روش همبستگی خطی، رابطه معنی‌داری دیده نشد(نمودار ۳ و ۴).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

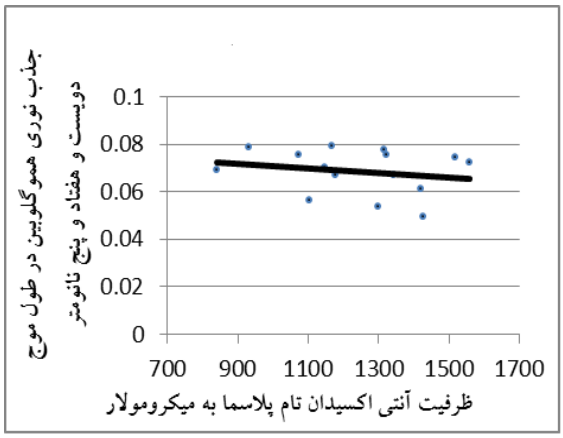
نمودار ۳ . بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تـام پلاسما و میزان اکسی هموگلوبین اریتروسیت ها. (p >۰/۰۵)



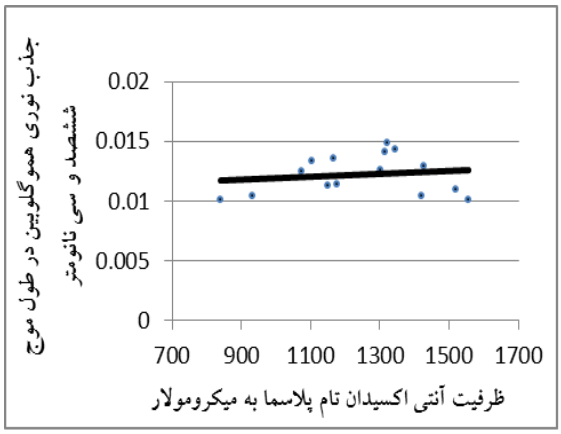
نمودار ۴ . بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تـام پلاسما و میزان مت هموگلوبین اریتروسیت ها. (p >۰/۰۵)

مقایسه ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما با محدوده تغییرات ۸۴۰ تا ۱۵۵۷/۵ میکرومولار با جذب هموگلوبین در طول موج ۲۷۵ نانومتر با محدوده تغییرات ۰/۱۹۱ تا ۰/۳۰۳ و طول موج ۶۳۰ نانومتر با محدوده تغییرات ۰/۳۲۰ تا ۰/۴۱۸ در بررسی همبستگی خطی، دارای رابطه معنی‌داری نبود(نمودار ۵ و ۶).

بیماران دیابتی دیالیزی نسبت به افراد شاهد دارای میانگین بالاتری از غلظت کراتینین ۱/۴۷±۶/۹ میلی‌گرم بر دسی لیتر)، اوره (BUN ۹/۳۲±۵۲/۴ میلی‌گرم بر دسی لیتر) و اسید اوریک (۰/۹۷±۵/۹۳ میلی‌گرم بر دسی لیتر) بودند. در افراد شاهد میانگین کراتینین (۰/۰۴±۰/۹۸ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، اوره (BUN ۱/۴۷±۱۳/۶۸ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و اسیداوریک (۰/۳۵±۵ میلی‌گرم بر دسی لیتر) بود. تفاوت بین دو گروه در مورد کراتینین (p=۰/۰۰۰)، اوره (p=۰/۰۰۰) و اسید اوریک (p=۰/۰۱۹) معنی‌دار بود.



نمودار ۵. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تـام پلاسما و میزان جذب نوری هموگلوبین اریتروسیت ها در طـول موج ۲۷۵ نانومتر. (p >۰/۰۵)



نمودار ۶. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تـام پلاسما و میزان جذب نوری هموگلوبین اریتروسیت ها در طـول موج ۶۳۰ نانومتر. (p >۰/۰۵)

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در افراد دیابتی دیالیزی، دارای مقادیر بالاتری نسبت به افراد شاهد است در صورتی که در میزان آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها این افراد تغییر معنی‌داری نسبت به افراد شاهد نداشتند. " کوکا " نیز در مطالعه خود بر روی افراد همودیالیزی، تفاوتی را از نظر گروه کربنیل مشاهده ننمود ولی در مقادیر اوره، کراتینین، پراکسیداسیون لیپیدی و نیز آنزیم سوپراکسید دسموتاز اریتروسیتی آنها نسبت به افراد

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

سالم، شاهد تفاوت‌هایی بودند(۱۷). در مطالعه علی پناه مقدم و همکاران بر روی بیماران دیالیزی غیر دیابتی، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و عدم تغییر در میزان اکسیداسیون لیپیدها مشاهده شد. این محققیق بیان نمودند که در بیمارانی که در مراحل ابتدایی همودیالیز هستند، فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، مانع تشدید استرس اکسیداتیو می‌شود(۱۸). آجالا و همکاران نیز افزایش ظرفیت آنتی اکسیدان تام را مشاهده نمودند اما ایشان در بیماران دارای نارسایی کلیوی که برای بار اول دیالیز می‌شدند بر خلاف مطالعه پیشین، افزایش آسیب لیپیدی را به طور معنی‌داری مشاهده نمودند. هم‌چنین ایشان مشاهده نمودند که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پس از دیالیز کاهش میابد و عنوان کردند که این کاهش می‌تواند با افزایش آسیب به لیپیدها در ارتباط باشد(۱۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر اکسی هموگلوبین و مت هموگلوبین در افراد دیابتی دیالیزی و افراد غیر دیابتی غیر دیالیزی از تفاوت بارزی برخوردار نیست. توریس و همکاران نیز با مشاهده دو بیمار با نارسایی حاد کلیوی که در طول همودیالیز دچار مت هموگلوبینمی شده بودند به این نتیجه رسیدند که این مت هموگلوبینمی ناشی از سمیت مقدار بیش از حد مجاز کلرآمین بوده است که می‌تواند به آسیب اکسیداتیو گلبول‌های قرمز بیانجامد. در نهایت آنها توانستند کلرامین باقی مانده را حذف نموده و میزان مت هموگلوبین را به حد طبیعی برسانند(۲۰).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در افراد دیابتی دیالیزی و شاهد، همگام با افزایش میزان گروه‌های کربنیل پلاسما، میزان مت هموگلوبین اریتروسیت‌ها اگرچه افزایش نشان می‌دهد، اما این افزایش معنی‌دار نیست. انصاری و همکاران نیز با بررسی میزان طیف جذبی هموگلوبین اریتروسیت‌هایی که تحت انکوباسیون با آهن قرار داشتند افزایش مت هموگلوبین را به طور معنی‌دار مشاهده نکردند اما با کاهش معنی‌دار اکسی هموگلوبین مواجه شدند و ایجاد تغییرات اکسیداتیو را مرتبط با آهن دانستند(۲۱). اما ابراهیم و همکاران با بررسی بیماران دارای آنمی، افزایش میزان مت هموگلوبین و همی کروم و کاهش اکسی هموگلوبین را در این بیماران مشاهده نمودند و دلیل آن را اتواکسیداسیون ناشی از ازدیاد غلظت مت هموگلوبین و همی کروم دانستند(۱۲). ازوبو همکاران در مطالعه‌ای دریافتند که سدیم دودسیل سولفات، لینولئیک اسید و پراکسید هیدوژن در pH ۵ و ۷/۲، غلظت اکسی هموگلوبین را کاهش و غلظت داکسی هموگلوبین و مت هموگلوبین را افزایش می‌دهد و نشان دادند که هموگلوبین به علت واکنش با این مواد داکسیژنه می‌شود(۲۲). پوتور وهمکاران با مطالعه بر روی هموگلوبین، بیان کردند که اکسیداسیون هموگلوبین منجر به تولید مت هموگلوبین (Fe^{3+}) و فریل هموگلوبین (Fe^{4+}) می‌شود که این ترکیبات می‌توانند از گلوبین جدا شده و در نهایت منجر به حساس شدن به مرگ وابسته به مواد اکسیدان سلول‌های اندوتلیال و هم‌چنین اکسید شدن لیپوپروتئین با دانسیته کم بشود که این لیپوپروتئین‌ها و هم‌چنین لیپیدهای مشتق شده از ضایعه آترواسکلروز انسانی، باعث اکسیداسیون هموگلوبین و در نهایت تولید مولتیمرهای فریل هموگلوبین می‌شود(۲۳). گتا و همکاران با بررسی استرس اکسیداتیو و میزان مت هموگلوبین برروی هموگلوبین افراد دارای سیروز کبدی دارای مشکلات خونریزی به این نتیجه رسیدند که در این افراد، مت هموگلوبین افزایش معنی‌داری دارد. هم‌چنان که میزان اکسی هموگلوبین، فعالیت آنزیم مت هموگلوبین ردوکتاز و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آنها به غیر از گلوتاتیون پراکسیداز آنها نیز کم بود(۲۴). دلا روور و همکاران با بررسی استرس اکسیداتیو هموگلوبین در سرطان، بیان نمودند که رادیکال‌های آزاد، می‌توانند موجب استرس اکسیداتیو بر روی اکسی هموگلوبین شوند و منجر به افزایش تولید مت هموگلوبین و همی کروم شوند. این محققین با بررسی میزان مت هموگلوبین در افراد دارای تومور، با افزایش بسیار معنی‌دار هموگلوبین در این افراد مواجه شدند که با سن، جنس، تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، سیگاری بودن و یا مرحله تومور رابطه معنی‌داری نداشت. یافته‌های این دانشمندان باور دارند که رادیکال‌های آزاد می‌تواند

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

نفوذپذیری غشاء اریتروسیت را تغییر دهند و غشای اریتروسیت را به استرس جدید حساستر می‌نمایند(۲۵). هری و همکاران در تحقیقی بر روی ارتباط مت هموگلوبین و استرس اکسیداتیو در آنمی، افزایش کم ولی ثابتی را در میزان مت هموگلوبین مشاهده نمودند و بیان کردند که افزایش مت هموگلوبین می‌تواند بیومارکری از هایپوکسی القا شده توسط آنمی در بافت باشد. این دانشمندان فهم ارتباط بین آنمی، مت هموگلوبین و درمان را برای توسعه درمان‌های جدید برای کاهش مر و میر ناشی از آنمی، کمک کننده دانسته‌اند(۲۶).

هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان کربنیل پلاسما در افراد سالم و بیماران دیابتی دیالیزی، با افزایش جذب نوری هموگلوبین در طول موج ۶۳۰ نانومتر ارتباط معنی‌داری دارد. انصاری و همکاران نیز با بررسی میزان طیف جذبی هموگلوبین اریتروسیت‌هایی که تحت استرس اکسیداتیو با آهن قرار داشتند با افزایش معنی‌دار جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر مواجه شدند. این محققیق، کاهش اکسی هموگلوبین را مشاهده نمودند اما افزایش مت هموگلوبین را به طور معنی‌داری مشاهده نکردند(۲۱). ابراهیم و همکاران، کاهش جذب در نسبت طول موج‌های (۵۷۷/۵۴۲ نانومتر) و در طول موج ۴۲۰ نانومتر را همزمان با ظهور باند در ۶۳۰ نانومتر، به طور بارزی مشاهده نمودند و این را به معنی افزایش تبدیل اکسی به مت هموگلوبین دانستند و میزان این تبدیل را وابسته با واکنش‌های بین هم – هم در طول موج ۵۷۷ نانومتر و افزایش جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر دانسته‌اند. در ادامه، این دانشمندان با بررسی ساختمان هموگلوبین، افزایش جذب در ۶۳۰ نانومتر را در بیماران دارای کمخونی فقر آهن، بتا تالاسمی و نقص آنزیمی G۶PD مشاهده نمودند(۱۲). گتا و همکاران با بررسی جذب هموگلوبین در طول موج‌های ۶۳۰ نانومتر و ۵۷۷ نانومتر استرس اکسیداتیو بر روی هموگلوبین افراد دارای سیروز کبدی دارای مشکلات خونریزی، به این نتیجه رسیدند که در این افراد، میزان اکسی هموگلوبین کاهش و میزان مت هموگلوبین افزایش معنی‌داری دارد(۲۴).

هم‌چنین نتایج مطالعه نشان داد که همگام با افزایش میزان کربنیل پلاسما، میزان جذب هموگلوبین در طول موج ۲۷۵ نانومتر افزایش می‌یابد. ابراهیم و همکاران نیز شاهد افزایش جذب هموگلوبین اریتروسیت‌ها در طول موج ۲۷۵ نانومتر در بیماران دارای آنمی فقر آهن و تالاسمی بودند و این تغییرات را مبین افزایش تغییرات غیر طبیعی ساختمانی، کاهش تا خوردگی‌های طبیعی و کاهش حرکت مولکولی هموگلوبین دانستند. این محققین در بیماران دارای فقر آنزیمی G۶PD تفاوت معنی‌داری را در این زمینه مشاهده نکردند(۱۲). ازبو و همکاران نیز با بررسی طیف جذبی هموگلوبین، به این نتیجه رسیدند که سدیم دودسیل سولفات در پ هاش ۵ ، با هموگلوبین واکنش داده و تاخوردگی‌های هموگلوبین را باز می نماید(۲۲).

در این مطالعه از سنجش میزان گروه‌های کربنیل پلاسما برای ارزیابی میزان آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو پروتئین‌های پلاسما استفاده نموده‌ایم که شاهد ارتباط افزایش آن با تغییراتی در هموگلوبین نیز بودیم. انصاری و همکاران نیز شاهد افزایش میزان گروه‌های کربنیل پروتئین‌های موجود در اریتروسیت‌های تحت استرس ناشی از آهن شدند و این افزایش را با میزان آهنی که علت استرس اکسیداتیو القا شده بود دارای رابطه مستقیم دانستند(۲۱). چویون و همکاران با بررسی استرس اکسیداتیو بر روی پروتئین‌ها، میزان گروه‌های کربونیل را به عنوان مارکری از آسیب‌های وارد شده به پروتئین‌ها در اثر استرس اکسیداتیو معرفی نمود که می‌تواند در اثر وجود ROS و RNS به وجود بیاید(۲۷). داله دونه و همکاران نیز میزان گروه‌های کربنیل را به عنوان بیو مارکری از استرس اکسیداتیو مطرح نمودند که می‌تواند در برخی بیماری‌هایی هم‌چون آلزایمر، دیابت و نارسایی حاد کلیوی و در شرایطی که تعادل مواد اکسیدان و آنتی اکسیدان به هم می خورد افزایش یابد(۲۸).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

در این طرح هم‌چنین مشاهده شد که رابطه معنی‌داری بین ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و میزان مت هموگلوبین، اکسی هموگلوبین و ساختار طبیعی هموگلوبین اریتروسیت‌ها وجود ندارد(نمودار ۵). فیروز رای و همکاران در مطالعه‌ای که برروی حساسیت اریتروسیت‌های افراد دیابتی و وضعیت آنتی اکسیدانی این افراد به استرس اکسیداتیو انجام دادند از تست فرپ برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام استفاده نمودند و بیان کردند که در این بیماران، افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی می‌تواند به علت کنترل ضعیف وضعیت قند خون ایشان باشد(۲۹).

نتایج مطالعه نشان داد که در بیماران دیابتی دیالیزی، اوره، کراتینین و اسید اوریک به طور معنی‌داری بالاتر از افراد گروه شاهد است. علی پناه مقدم و همکاران نیز در مطالعه خود بر روی بیماران دیالیزی غیر دیابتی مشاهده نمودند این پارامترها به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل است(۱۸). رامپراساد نیز در مطالعه خود مشاهده نمود که در افراد همودیالیزی، میزان اوره، کراتینین، آلبومین، اسید اوریک، و میزان هموگلوبین با افراد سالم متفاوت است(۳۰). در مطالعه بر روی بیمارانی که برای بار اول دیالیز می‌شدند نیز شاهد افزایش معنی‌دار در سه پارامتر ذکر شده بودند(۱۹).

نتیجه گیری

ما با مطالعه بر روی بیماران دیابتی دیالیزی و افراد گروه شاهد، مشاهده نمودیم که بیماران دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری هستند که ممکن است ناشی از بالا بودن برخی پارامترهای بیوشیمیایی در آنها باشد که همین افزایش می‌تواند باعث عدم افزایش برخی آسیب‌ها و تغییرات اکسیداتیو در این بیماران باشد. اما مشاهده شد که در همه افراد تحت مطالعه، اریتروسیت‌ها می‌توانند تحت استرس اکسیداتیو، همگام با محیط اطراف خود دچار تغییراتی شوند که این تغییرات می‌تواند از کارایی این سلول‌ها بکاهد و این امر در مورد افرادی که دچار بیماری هستند می‌تواند برای ما حائز اهمیت باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود برای بررسی وضعیت گلبول‌های قرمز و سیستم آنتی اکسیدانی و سنجش آسیب‌های اکسیداتیو در بیماران مختلف که هم‌چون بیماران دیالیزی ممکن است با مشکل کم‌خونی نیز روبرو باشند و وضعیت سلامت گلبول‌های قرمز برایشان بیشتر حیاتی است، می‌توان از این تست‌ها به دلیل سادگی و دردسترس بودن استفاده نمود تا بتوان در هر زمان این پارامتر ها را پایش نمود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از همه افراد تحت مطالعه، کارشناسان آزمایشگاه‌های تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک و هم‌چنین از کمیته تحقیقات دانشجویی برای همکاری در این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. Ageing research reviews. 2007;6(1):12-27.
2. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;899(1):136-47.
3. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;899(1):136-47.
4. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. Life sciences. 2010;86(1):39-44.
5. Marciniak A, Lutnicki K, Szpringer E, Barham S. Influence of non-enzymatic antioxidants on antioxidation status in acute haemorrhagic necrotizing pancreatitis in rat. Bull Vet Inst Pulawy. 2005;49:133-9.
6. Taysi S, Oztasan N, Efe H, Polat M, Gumustekin K, Siktar E, et al. Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver. Acta Physiologica Hungarica. 2008;95(4):337-47.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017

7. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. Current medicinal chemistry. 2005;12(3):267-8.
8. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit. 2006;12(7):130-47.
9. Durak I, Kavutcu M, Çimen M, Avcı A, Elgün S, Öztürk H. Oxidant/antioxidant status of erythrocytes from patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. Medical Principles and Practice. 2001;10(4):187-90.
10. Varan HI, Dursun B, Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G. Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: Comparison of two dialysis membranes. International journal of nephrology and renovascular disease. 2010;3:39-40.
11. Winterbourn CC. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. Environmental health perspectives. 1985; 64: 321-2.
12. Ibrahim M, El-Gohary M, Saleh N, Elashry M. Spectroscopic study on oxidative reactions of normal and pathogenic hemoglobin molecules. Romanian Journal Biophys. 2008;18(1):39-47.
13. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(33):20313-6.
14. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. Trends in molecular medicine. 2003;9(4):169-76.
15. Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996;239(1):70-6.
16. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. Methods in enzymology. 1999;300:145-6.
17. Koca T, Berber A, Koca HB, Demir TA, Koken T. Effects of hemodialysis period on levels of blood trace elements and oxidative stress. Clinical and experimental nephrology. 2010;14(5):463-8.
18. Alipanahmogadam R, Mazani M, Baghi AN, Nemati A, Amani M, Bashardoost B, et al. Oxidative Stress and Trace Elements in Patients with Non-Diabetic Hemodialysis. J Ardabil Univ Med Sci. 2011;11(3):228-37.[persian]
19. Ajala M, Ogunro P, Odun A. Effect of hemodialysis on total antioxidant status of chronic renal failure patients in government hospitals in Lagos Nigeria. Nigerian journal of clinical practice. 2011;14(2):154-8.
20. DeTorres JP, Strom JA, Jaber BL, Hendra KP. Hemodialysis-associated methemoglobinemia in acute renal failure. American Journal of Kidney Diseases. 2002; 39(6):1307-9.
21. Ansarihadipour H, Ziafatikafi H. Structural and spectroscopic changes of human hemoglobin during iron-mediated oxidative stress. Arak Medical University Journal. 2012; 14(6):10-8.
22. Ezebuo FC, Chilaka FC, Eze SOO. Ligands Induced Formation of Heme Radicals at pH's 5.0 and 7.2: Implication in Malaria Resistance. Advances in Bioresearch. 2012;3(2):66-74.
23. Potor L, Bányai E, Becs G, Soares MP, Balla G, Balla J, et al. Atherogenesis may involve the prooxidant and proinflammatory effects of ferryl hemoglobin. Oxidative medicine and cellular longevity. 2013;2013.
24. Geetha A, Lakshmi Priya M, Jeyachristy SA, Surendran R. Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis. Indian Journal of Medical Research. 2007; 126(3):204-5.
25. Della Rovere F, Granata A, Broccio M, Zirilli A, Broccio G. Hemoglobin oxidative stress in cancer. Anticancer research. 1994;15(5B):2089-95.
26. Hare GM, Tsui AK, Crawford JH, Patel RP. Is methemoglobin an inert bystander, biomarker or a mediator of oxidative stress-The example of anemia? Redox biology. 2013;1(1):65-9.
27. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. Free Radical Research. 2000;33:S99-108.
28. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica chimica acta. 2003;329(1):23-38.

29. Firoozrai M, Nourbakhsh M, Razzaghy-Azar M. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress and antioxidant status in patients with type 1 diabetes. Diabetes research and clinical practice. 2007;77(3):427-32.

30. Ramprasad N , Al-Ghonaim Mohammed I. Role of Trace Elements and Lipid Peroxidation levels in pre and post Hemodialysis of Chronic renal failure patients. International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics. 2012; 3:1-6.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:07 +0330 on Saturday November 18th 2017