

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

Dorostkar H¹, Ansarihadipour H^{2*}, Goodarzi MT³

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 using 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

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 ارتباطند. هدف از این مطالعه، مقایسه تغییرات ساختاری هموگلوبین، میزان آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های پلاسما و قدرت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدان تام پلاسما افزایش معنی‌داری را (از $1019/62 \pm 129$ به $1354/54 \pm 129$ میکرومولار) نسبت به گروه شاهد نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که فاکتورهای القا شده در بیماران دیابتی همودیالیزی، در فعالیت آنتی‌اکسیدان پلاسما دخیل هستند و احتمالاً 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

مقدمه

گونه‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن (Reactive Nitrogen Species- RNS , Reactive Oxygen 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 و ساز 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 Dismolase- SOD)، کاتالاز (Catalase- CAT) و گلوکوتاتیون 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 و احتمالاً 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).

گلوبول‌های 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 اسپکتروفوتومتری 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). بیماری‌هایی 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).

با توجه 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 کم‌خونی 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 گلوبول‌های 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

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 $10^{-5} \times 4$ 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

اریتروسیت بیماران دیابتی دیالیزی هم‌چنین تعیین ارتباط تغییرات ساختاری در هموگلوبین با آسیب‌های اکسیداتیو و سیستم آنتی‌اکسیدانی 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 در انجام 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 هر بار به مدت ۴ ساعت تحت همودیالیز بودند.

(۲-dinitrophenylhydrazone) 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.

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

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

$$\Delta A(355 - 390) = A(355 - 390) \text{ of DNPH solution} - A(355 - 390nm) \text{ of HCl solution}$$

$$\text{Carbonyl concentration (nmol)} = \text{nmol of carbonyl per mg of protein}$$

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 کد ۶-۱۴۸-۹۲ اجرا و در تمام مراحل تحقیق، اصول بیابیه هلسینکی مورد توجه قرار گرفت.

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه دارای میانگین سنی 52 ± 15 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.

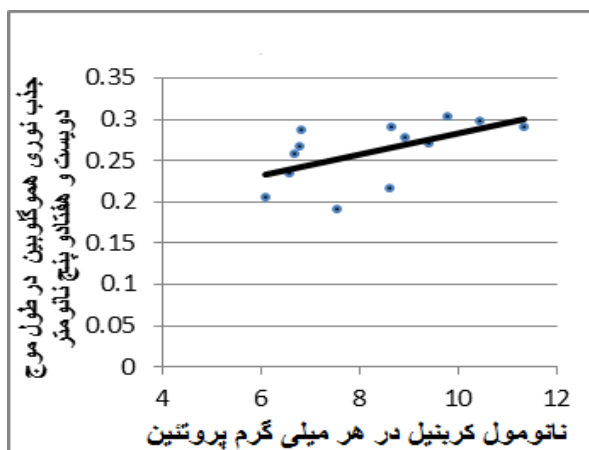
۲۷۵ نانومتر نیز برای بررسی ساختار هموگلوبین اندازه‌گیری شد (۱۲).

برای سنجش کربنیل از روش "وانس" 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 تشکیل ۲ و ۴ دی نیتروفنیل هیدرازون

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 جدا شده برای انجام این تست به کار برده شد. در این تکنیک عوامل آنتی‌اکسیدان 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 می‌باشد. 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



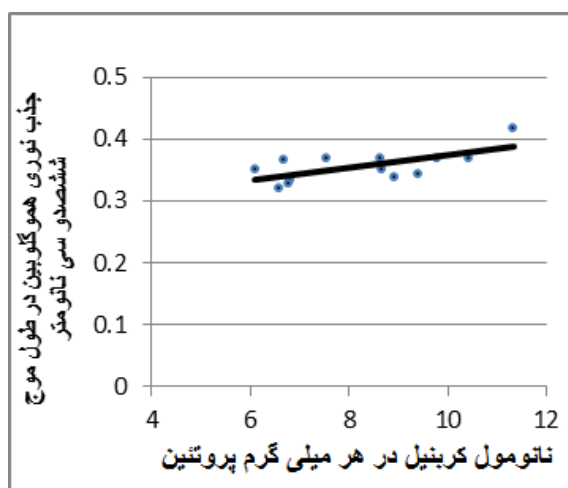
نمودار ۲. بررسی همبستگی میزان گروه‌های کربنیل پلاسما و میزان جذب هموگلوبین اریتروسیت‌ها در طول ۲۷۵ نانومتر. ($p=0/041$)

میانگین غلظت اکسی هموگلوبین بیماران دیابتی دیالیزی و افراد شاهد به ترتیب $43/54(3/17)$ و $43/9(4/43)$ میکرومولار و غلظت مت هموگلوبین به ترتیب $2/57(0/69)$ و $2/58(0/64)$ میکرومولار بود که بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما در بیماران دیابتی دیالیزی، $1354/54(129)$ و در افراد شاهد $1019/62(129)$ میکرومولار بود که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد ($p=0/000$).

میانگین گروه کربنیل در افراد دیابتی دیالیزی $1/98/24(1/9)$ و در افراد شاهد $1/18/37(1/1)$ نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد که تفاوت معنی‌داری نداشت. برای افراد مورد مطالعه، مقایسه میزان اکسی هموگلوبین با محدوده تغییرات $39/08$ تا $48/51$ میکرومولار و میزان مت هموگلوبین با محدوده تغییرات $1/40$ تا $3/43$ میکرومولار با میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما با محدوده تغییرات 840 تا $1557/5$ میکرومولار به روش همبستگی خطی، رابطه معنی‌داری دیده نشد (نمودار ۳ و ۴).

غلظت گروه‌های کربنیل پلاسما از $6/088$ تا $11/33$ نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین و جذب نوری هموگلوبین در طول موج 630 نانومتر بین $0/320$ تا $0/418$ بود. ارتباط این دو فاکتور از فرمول $Y=0.010x + 0.272$ با $R^2 = 0.436$ تبعیت می‌نماید و در بررسی همبستگی خطی (Linear regression) تغییرات معنی‌داری ($p=0/014$) را نشان می‌دهد (نمودار ۱).

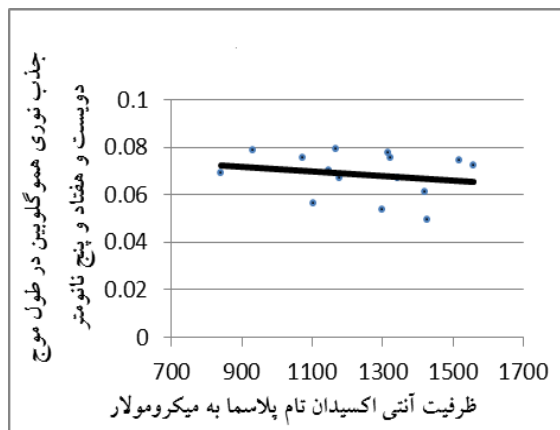


نمودار ۱. بررسی همبستگی میزان گروه‌های کربنیل پلاسما و میزان جذب هموگلوبین اریتروسیت‌ها در طول موج 630 نانومتر در کلیه افراد مورد مطالعه. ($R^2 = 0.436$ و $p=0/014$)

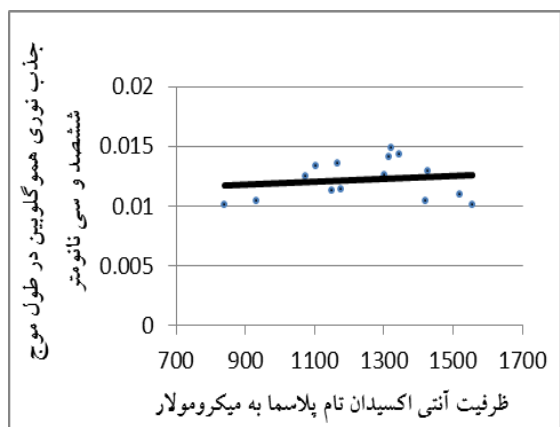
غلظت گروه‌های کربنیل پلاسما از $6/088$ تا $11/33$ (نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین) و تغییرات جذب نوری در طول موج 275 نانومتر نیز از $0/191$ تا $0/303$ مشاهده گردید که ارتباط این دو فاکتور از فرمول $Y=0.012x+0.154$ با $R^2=0.328$ تبعیت می‌نماید که در بررسی همبستگی خطی تغییرات معنی‌داری را ($p=0/041$) نشان می‌دهد (نمودار ۲).

در مقایسه میزان گروه‌های کربنیل پلاسما از $6/088$ تا $11/33$ (نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین) و میزان تغییرات مت هموگلوبین از $1/4$ تا $3/4$ در بررسی همبستگی خطی، تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

بود. تفاوت بین دو گروه در مورد کراتینین ($p=0/000$)، اوره ($p=0/000$) و اسید اوریک ($p=0/019$) معنی دار بود.



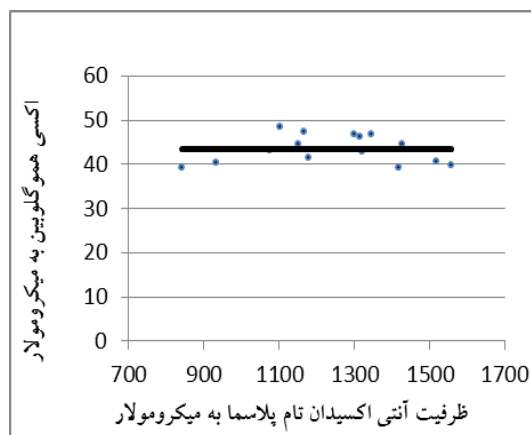
نمودار ۵. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و میزان جذب نوری هموگلوبین اریتروسیت ها در طول موج ۲۷۵ نانومتر. ($p > 0/05$)



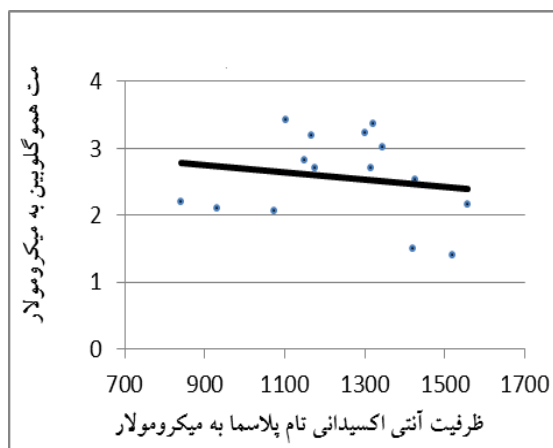
نمودار ۶. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و میزان جذب نوری هموگلوبین اریتروسیت ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر. ($p > 0/05$)

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 پروتئین ها این افراد تغییر معنی داری نسبت به افراد شاهد نداشتند. "کوکا" نیز در مطالعه خود بر روی افراد همودیالیزی، تفاوتی را از نظر گروه کربنیل مشاهده نمود ولی در مقادیر اوره، کراتینین، پراکسیداسیون لیپیدی و نیز آنزیم سوپراکسید دسموتاز اریتروسیتی آنها نسبت به افراد



نمودار ۳. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و میزان اکسی هموگلوبین اریتروسیت ها. ($p > 0/05$)



نمودار ۴. بررسی همبستگی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و میزان مت هموگلوبین اریتروسیت ها. ($p > 0/05$)

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 معنی داری نبود (نمودار ۵ و ۶).

بیماران دیابتی دیالیزی نسبت به افراد شاهد دارای میانگین بالاتری از غلظت کراتینین $6/9 \pm 1/47$ میلی گرم بر دسی لیتر، اوره (BUN) $52/4 \pm 9/32$ میلی گرم بر دسی لیتر) و اسید اوریک ($5/93 \pm 0/97$ میلی گرم بر دسی لیتر) بودند. در افراد شاهد میانگین کراتینین ($0/98 \pm 0/04$ میلی گرم بر دسی لیتر)، اوره (BUN) $13/68 \pm 1/47$ میلی گرم بر دسی لیتر) و اسید اوریک ($5 \pm 0/35$ میلی گرم بر دسی لیتر)

سالم، شاهد تفاوت‌هایی بودند (۱۷). در مطالعه علی پناه مقدم و همکاران بر روی بیماران دیالیزی غیر دیابتی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و عدم تغییر در میزان اکسیداسیون لیپیدها مشاهده شد. این محققین بیان نمودند که در بیمارانی که در مراحل ابتدایی همودیالیز هستند، فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مانع تشدید استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۸). آجالا و همکاران نیز افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدانی تام پس از دیالیز کاهش می‌یابد 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 کلرآمین 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 آنکوباسیون 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 هیدروژن 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 و همکاران 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 بر روی 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 گلوکاتیون 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

میزان اکسی هموگلوبین کاهش و میزان مت هموگلوبین افزایش معنی داری دارد (۲۴).

هم چنین نتایج مطالعه نشان داد که همگام با افزایش میزان کربنیل پلاسم، میزان جذب هموگلوبین در طول موج ۲۷۵ نانومتر افزایش می یابد. ابراهیم و همکاران نیز شاهد افزایش جذب هموگلوبین اریتروسیت ها 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 خوردگی های طبیعی و کاهش حرکت مولکولی هموگلوبین دانستند. این محققین در بیماران دارای فقر آنزیمی G6PD تفاوت معنی داری 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 تا خوردگی های هموگلوبین را باز می نماید (۲۲).

در این مطالعه از سنجش میزان گروه های کربنیل پلاسم برای ارزیابی میزان آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو پروتئین های پلاسم استفاده نموده ایم که شاهد ارتباط افزایش آن با تغییراتی در هموگلوبین نیز بودیم. انصاری و همکاران نیز شاهد افزایش میزان گروه های کربنیل پروتئین های موجود در اریتروسیت های 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 پروتئین ها، میزان گروه های کربونیل را به عنوان مارکری از آسیب های وارد شده به پروتئین ها در اثر استرس اکسیداتیو معرفی نمود که می تواند در اثر وجود ROS و RNS به وجود بیاید (۲۷). داله دونه و همکاران نیز میزان گروه های کربنیل را به عنوان بیو مارکری از استرس اکسیداتیو مطرح نمودند که می تواند در برخی بیماری هایی هم چون آلزایمر، دیابت و نارسایی حاد کلیوی و در شرایطی که تعادل مواد اکسیدان و آنتی اکسیدان به هم می خورد افزایش یابد (۲۸).

نفوذپذیری غشاء اریتروسیت را تغییر دهند و غشای اریتروسیت را به استرس جدید حساستر می نمایند (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 می تواند بیومارکری از هایپوکسی القا شده توسط آنمی در بافت باشد. این دانشمندان فهم ارتباط بین آنمی، مت هموگلوبین و درمان را برای توسعه درمان های جدید برای کاهش مر و میر ناشی از آنمی، کمک کننده دانسته اند (۲۶).

هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش میزان کربنیل پلاسم در افراد سالم و بیماران دیابتی دیالیزی، با افزایش جذب نوری هموگلوبین در طول موج ۶۳۰ نانومتر ارتباط معنی داری دارد. انصاری و همکاران نیز با بررسی میزان طیف جذبی هموگلوبین اریتروسیت هایی که تحت استرس اکسیداتیو با آهن قرار داشتند با افزایش معنی دار جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر مواجه شدند. این محققین، کاهش اکسی هموگلوبین را مشاهده نمودند اما افزایش مت هموگلوبین را به طور معنی داری مشاهده نکردند (۲۱). ابراهیم و همکاران، کاهش جذب در نسبت طول موج های (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 واکنش های بین هم - هم در طول موج ۵۷۷ نانومتر و افزایش جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر دانسته اند. 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 G6PD مشاهده نمودند (۱۲). گتا و همکاران با بررسی جذب هموگلوبین در طول موج های 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،

حائز اهمیت باشد. در نهایت پیشنهاد می‌شود برای بررسی وضعیت گلبول‌های قرمز و سیستم آنتی‌اکسیدانی 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 پارامترها 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 نمایم.

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.

در این طرح هم‌چنین مشاهده شد که رابطه معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما و میزان مت هموگلوبین، اکسی هموگلوبین و ساختار طبیعی هموگلوبین اریتروسیت‌ها وجود ندارد (نمودار ۵). فیروز رای و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی حساسیت اریتروسیت‌های افراد دیابتی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی این افراد به استرس اکسیداتیو انجام دادند از تست فرپ برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام استفاده نمودند و بیان کردند که در این بیماران، افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی 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. علی‌پناه 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، آلومین، 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).

نتیجه‌گیری

ما با مطالعه بر روی بیماران دیابتی دیالیزی و افراد گروه شاهد، مشاهده نمودیم که بیماران دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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

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.