مقایسه میزان محصولات پراکسیداسیون چربیها و هموگلوبین $A1_C$ در افراد مبتلا به دیابت نوع دو با افراد نرمال

پریچهر حناچی [*۱]، رشید حیدری مقدم[۲]، حجت اله نیکبخت[۳]

۱) استادیار بخش بیومدیکال پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران

۲) دستیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۳) استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۵ **تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۱**

چکیده

مقدمه: یکی از مهمترین دلایل بروز عوارضی مانند اترواسکلروز در بیماران دیابتی، اکسیداتیو استرس و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی بر روی اسیدهای چرب در ساختمان لیپیدها می‌باشد. اندازه گیری میزان مالون دی الدهید (MDA) از راههایی است که توسط ان میتوان اکسیداتیو استرس را بررسی نمود.

مواد و روش ها: در این مطالعه جمعاً از ۲۰۰ نمونه استفاده شده که ۱۰۰ نمونه به عنوان گروه مورد (Case group) از افرادی که حداقل ۳ سال سابقه دیابت NIDDM None Insulin Dependent Diabetic Mellitus)) داشته اند و دارای پرونده در مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بودند و ۱۰۰ نفر نرمال (Control group) از افرادی بودند که هیچ گونه سابقه دیابت نداشته و به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر دو گروه سطح MDA و $HbA1_C$ و FBS اندازه گیری شده و سپس میانگین سطح پلاسمایی آنها با استفاده از نر م افزار SPSS (Ver. 11) با یکدیگر مقایسه شد.

یافته های پژوهش: سطح پلاسمائی MDA در گروه شاهد0.04 ± 0.7428 µmol/Lit و در نمونه های مورد0.3 ± 0.9222 µmol/Lit بوده که به شکل معناداری($p<0.05$) با گروه شاهد قابل مقایسه ود. میزان$HbA1_C$ در گروه مورد 2.4 ± 9.387% و در گروه کنترل 1.0 ± 7.356 % بود و میزان FBS در گروه مورد 56 ± 163.31 mg/dl و در گروه شاهد 10.1 ± 85.740 mg/dl بود که نتایج بدست آمده بین گروه شاهد و گروه مورد اختلاف معناداری ($p<0.05$) را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: از نتایج بدست آمده نتیجه‌گیری می شود که میانگین MDA در افراد دیابتی بطور محسوسی بالاتر از گروه کنترل بوده و میانگین$HbA1_C$ و FBS نیز در گروه نمونه بالاتر از گروه شاهد بوده است. در بررسی ارتباط بین MDA با فاکتورهای اندازه گیری شده از نظر ضریب همبستگی ارتباطی وجود نداشت و این امر بیانگر عدم ارتباط سطح MDA با افزایش سطح $HbA1_C$ و FBS در افراد دیابتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هموگلوبن $HbA1_C$، قندخون ناشتا(FBS)، پراکسیداسیون لیپیدها (MDA)

* **نویسنده مسئول:** استادیار بخش بیومدیکال پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران

Email: hanachi_wrc@yahoo.com

مقدمه

دیابت شایعترین بیماری اندوکرین است که با اختلالات متابولیک و عوارض دراز مدت چشمی، کلیوی، عصبی، عروقی و خونی مشخص می‌شود و نهایتاً منجر به بروز ناتوانی و مرگ و میر در بیماران می‌شود. به جز هیپراسمولارتیه، آترواسکروزیس از عوامل مهمی است که منجر به ناتوانی و مرگ و میر در بیماران دیابتی نوع (Non- Insulin Dependent NIDDM Diabetic Mellitus) می‌شود(۱). آترواسکروزیس در این بیماران نسبت به افراد طبیعی زودتر و با انتشار وسیعتر بروز می کند(۲،۳). مطالعات انجام شده بر روی این بیماران نشان می دهد که عمل پراکسیداسیون لیپیدی بر روی اسیدهای چرب موجود در ساختمان لیپیدها انجام می‌گردد که حاصل این پراکسیداسیون محصولاتی از قبیل (MDA) می‌باشد(۴) که در بیماران دیابتی تولید می شود. این محصول می تواند به بعضی از اسیدهای آمینه موجود در پروتئین ها از جمله اسیدهای آمینه لیزین- آرژنین در ApoB100 موجود در ذره LDL واکنش داده و سبب دژنره شدن و عدم شناسائی آن توسط رسپتور مربوطه گردد، از طرف دیگر، در توسعه آترواسکروزیس در افراد دیابتی نیز نقش دارد. افزایش گلوکز در افراد دیابتی منجر به گلیکوزیله شدن پروتئینها در جریان خون گشته که در دراز مدت منجر به بروز عوارض جانبی می‌گردد(۱).

رادیکالهای آزاد عبارتند از هراتم یا مولکولی که حاوی یک یا چند الکترول جفت نشده در مدارآخر خود باشد. این مواد بسیار ناپایدار بوده و به سرعت به مولکولهای دیگر از طریق دادن یا گرفتن الکترون واکنش نشان میدهند(۵). رادیکالهای آزاد به طور طبیعی در سلولهای زنده تولید شده و محصولات آنها در شرایط پاتولوژیک افزایش می یابد و به دلیل فعالیت بالائی که دارند می توانند بر روی اکثر مولکولهای بیولوژیک اثر بگذارند(۶).

رادیکال های آزاد قادرند با زنجیرهای جانبی اسیدهای چرب اشباع که دارای چند باند مضاعف هستند(unsaturated Faty acid (PUFA Poly در لیپیدها و گروههای آمین در پروتئینها و بازها و باقیمانده های قندی در نوکلئوتیدها و اسیدهای نوکلئیک واکنش بدهند. این واکنش ها در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها به ویژه آترواسکلروز نقش بسزائی دارند(۷،۸). یکی از مهمترین اثرات رادیکالهای آزاد شروع پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد که به تخریب غشاء سلولی منجر می‌شود(۹). جداسازی اتم هیدروژن از اسید چرب غیر اشباع توسط رادیکالهای آزاد با ایجاد آندوپراکسیداز و سپس تخریب طیف وسیعی از مواد شامل کتونها، اترها، آلدئیدها انجام می‌شود(۱۰،۱۱). البته باید توجه داشت که تجزیه آندوپراکسیدهای چربی که حداقل ۳ گروه متیلی دارند منجر به تولید MDA می‌گردد.

گلیکاسیون(Glycation) افزایش غیر آنزیمی باقیمانده قند گروههای آمینو پروتئینها می‌باشد(۱۲). از آنجا که بیماران دیابتیک سطح قند خون بالائی دارند در مقایسه با افراد سالم شدیدتر تحت تاثیر این فرایند قرار می گیرند. بنابراین تصور می‌شود که گلیکاسیون مسئول بسیاری از گرفتاریهایی است که در بیماران دیابتی دیده می‌شود(۱۳). با استفاده از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، جزء هموگلوبین مینور با بار منفی را از فراکسیول اصلی هموگلوبین A خارج کرده اند. این اجزاء مینور عبارتند از HbA1 ,c,a1,a2,b که مجموعاً هموگلوبین(۱۴) گلیگوزیله نامیده می‌شود و ۷ درصد کل هموگلوبین در افراد نرمال را تشکیل می دهد. مطالعات نشان می دهد که $HbA1_C$ به طور آهسته در تمام طول عمر گلبول های قرمز تشکیل می‌شود. واکنش بین گلوکز و هموگلوبین A مستقیماً با غلظت گلوکز و طول مدت تماس هموگلوبین با گلوکز ارتباط دارد(۱۴).

میزان $HbA1_C$ به میزان ۳-۲ برابر در گلبولهای قرمز بیماران دیابتی افزایش دارد(۱۵،۱۶). درجه افزایش آن به مقدار دفع ادراری گلوکز و غلظت گلوکز خون ارتباط دارد(۱۷). هدف از انجام این تحقیق مقایسه میزان محصولات پراکسیداسیون چربیها و هموگلوبین $A1_C$ در افراد مبتلا به دیابت نوع دو با افراد نرمال بوده است.

مواد و روش ها

تعداد ۱۰۰ نفر بیمار که دارای پرونده در مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان به شرط داشتن بیش از سه سال دیابت (NIDDM) با میانگین سنی ۷±۵۴ (۲۴ درصد زنان و ۶۶ درصد مردان) بوده و ۱۰۰ نفر به عنوان کنترل به شرط نداشتن دیابت و وضعیت بدنی سالم با میانگین سنی ۶±۵۲ ، بعد از پر کردن پرسشنامه اطلاعات مربوط به دموگرافی، مصرف داروها، کشیدن سیگار، داشتن فشار خون و سابقه بیماری قند فامیلی فاکتورهای FBS و $HbA1_C$ وMDA در نمونه خونشان در حالت ناشتا براساس روش کاری(۱۸)Trinde در سال ۱۹۶۹ انتخاب شدند که در این روش ابتدا گلوکز تحت تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز اکسیده می شود و شدت رنگ حاصله از واکنش که نسبت مستقیم با گلوکز موجود در نمونه را دارد در طول موج ۵۲۰ nm اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری $HbA1_C$ براساس روش(۱۹) با استفاده از روش کالریمتری که در این روش ابتدا Hb گلیکوزیله با اسید اگزالیک حرارت داده شد که در مرحله بعدی هموگلوبین گلیکوزیله به ۵-متیل فورفورال تبدیل شد که ترکیب اخیر با تیوبار بیتوریک اسید ایجاد رنگ زرد نمود که بر حسب شدت رنگ و با استفاده از منحنی استاندارد میزان $HbA1_C$ اندازه گیری شد.

جهت اندازه گیری MDA در خون بعد از دپروتئینه کردن نمونه ها توسط محلول تری کلرواستیک اسید از محلول تیو باربیتوریک اسید ۶۷ درصد استفاده شده و نمونه ها بعد از قرار دادن در حمام آب جوش میزان جذب آنها در طول موج ۵۳۲ nm براساس روش Kastner و همکاران در سال ۱۹۹۷ اندازه گیری شد(۱۲). بعد از جمع آوری اطلاعات نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و انجام روش T-test مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و مقادیر $P<0.05$ به عنوان معنی دار بودن اطلاق گردید.

نتایج

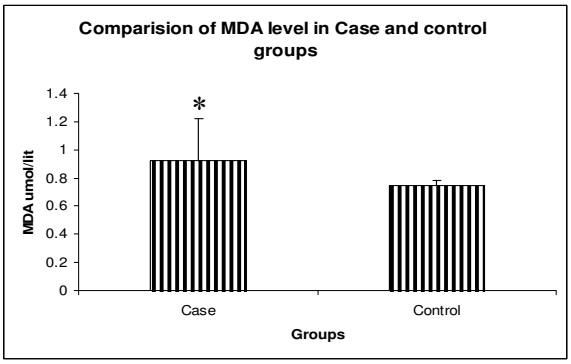
نتایج بدست آمده در مورد اندازه گیری میزان MDA(µmol/lit) در نمودار ۱ میزان MDA گروه شاهد 0.4± 0.7428 و در گروه مورد 0.3±0.9222 را نشان می دهد که مقادیر بدست آمده دارای تفاوت معنی دار است ($P<0.05$). مقادیر بدست آ مده از $HbA1_C$ نشان می دهد که میزان آن در گروه شاهد(نمودار ۲) 1±07.356 و گروه نمونه 2.6±9.387 می‌باشد که نتایج حاصل شده بین گروه شاهد و گروه مورد اختلاف معنی داری را ($p<0.05$) به نمایش می گذارد. مقادیر FBS در گروه شاهد و نمونه نشان می دهد که (نمودار ۳) گروه شاهد 10.1 mg/dl± 85.74 و در گروه مورد 56 mg/dl±163.31 می‌باشد که مقادیر بدست آمده بین دو گروه معنی دار است($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری

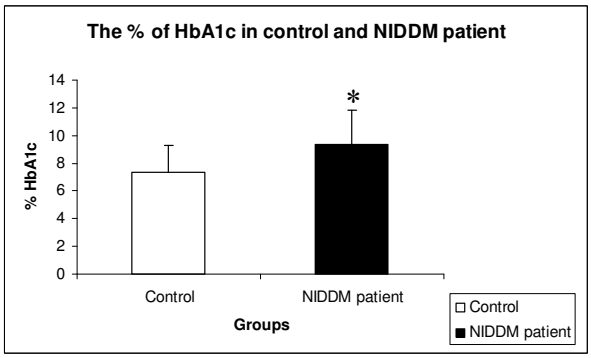
مطالعات نشان می دهد که افزایش گلوکز سبب می‌شود تا مقدار اضافی گلوکز بدون دخالت انسولین وارد سلولهای اندوتلیال عروقی گردد و سبب تخلیه مواد احیاء کننده و افزایش مواد اکسید کننده آن شود، که حاصل آن افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب پذیری و نفوذ پذیری این سلولها به ترکیبات مختلف است(۴). در بررسی انجام شده بین میانگین MDA در گروه شاهد و گروه نمونه ارتباط معنی داری به اثبات رسید که نشان دهنده اثر این رادیکال آزاد در افراد دیابتی می‌باشد، امری که که می تواند باعث بوجود آمدن عوارضی در این بیماران شود. نتایج بدست آمده با تحقیقات Guerci et al, 1999 همخوانی دارد.

همانطور که انتظار می رفت ارتباط معنی داری بین FBS گروه نمونه و شاهد وجود داشت که میزان FBS گروه نمونه دو برابر گروه شاهد است. مقایسه میانگین $HbA1_C$ خون در هر گروه نشان داد که میزان آن در گروه نمونه به شکل معنی داری بالاتر از گروه شاهد بوده است. در ارتباط با سطح پراکسیداسیون لیپیدی MDA با میزان FBS $HbA1_C$ ارتباط معنی داری بدست نیامد و این بیانگر عدم اثر MDA بر روی فاکتورهای فوق می‌باشد. نتایج بدست آمده با تحقیقات Hall et al, 1989 (۵) همخوانی دارد. Giampietro و Mattucci در سال ۲۰۰۰ میزان MDA را در گلبولهای قرمز نیز اندازه گیری نمودند و نتیجه گیری کردند که پراکسیداسیون لیپیدی می تواند بر سلولهای خونی هم تاثیر گذار باشد(۲۰).

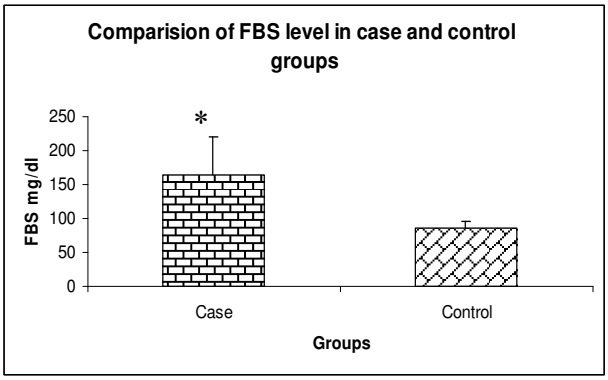
نمودار ۱. میانگین سطح MDA (µmol/lit) در گروه شاهد و نمونه می با شد.
$P<0.05$ به عنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شده است.
*** به مفهوم رابطه معنی دار بین گروه شاهد و نمونه اطلاق می گردد.**



نمودار ۲ . مقایسه میانگین سطح $HbA1_C$ در گروه شاهد و نمونه می باشد.
$P<0.05$ به عنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شده است.
*** به مفهوم رابطه معنی دار بین گروه شاهد و نمونه اطلاق می گردد.**



نمودار ۳ . مقایسه میانگین FBS (mg/dl) در گروه شاهد و نمونه می با شد.
$P<0.05$ به عنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شده است.
*** به مفهوم رابطه معنی دار بین گروه شاهد و نمونه اطلاق می گردد.**



References

1-Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Baccarin L, Laverda B, and Fedele D. *Advanced Glycation End Products and Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients With and Without Peripheral Artery Disease*. Diabetes Care, 2007;30:670-6.

2-Guerci B, Antebi H, Meyer L, Durlach V., Ziegler O, Nicolas J P, Alcindor L G, Drouin P. *Increased Ability of LDL from Normolipidemic Type 2 Diabetic Women to Generate Peroxides*. Clinical Chemistry .1999; 45: 1439-48.

3-Harrison Tensleg Randoiph Horrisons. .*Faster DW- Diabètes mellitus*. *Principles of Internal medicine*. Favci- Brown . 1998; 334: 2060-80.

4-Argani H, Ghorbani A, Rashtchizade N, Rahbaninobar M. *Effect of Lovastatin on Lipid peroxidation and total antioxidant concentrations in hemodialysis patients*. Lipids in Health and Disease. 2004; 3:6.

5-Hall Well B, Gutteridge JMC. *Role of free radical and catalytic metal ions in human disease. An overview methods in enzymology*. 1989;186:1-181

6-Diplock A. *Antioxidant nutrients-efficacy in disease prevention and safety*. Biochemist.1995; 17:16-18.

7-Masoro EJ. *Theories of aging. In: Free Radicals in aging*. Yu, BY (ed.); CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, LJ 1993.Rice Evans CA, Burdon RM. *Free radical damage and its control*. Amsterdam Elsevier, 1994; 46-49: 113.

8-Jonathan Valabhji, MRCP[1], Avril J. McColl, PHD1, William Richmond, PHD[2], Michael Schachter, MB, BS[3], Michael B. Rubens, FRCR[4] and Robert S. Elkeles, FRCP[1]. *Total Antioxidant Status and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes. Diabetes Care*, 2001; 24:1608-13.

9-Buege JA. *Microsomal Lipid Peroxidation Methods in Enzymology*. 1987; (52):302-10.

10-Murray RK. *Harpers Biochemistry*. Appleton and long, 1996; 24:146-157.

11-Kastner K, Horhy KEWJCZ S Jang . P Neunteukfl, T Glogal, D Weidirger, F Maurer G and Ituber, K I . *Oxidative stress study In 100 CAD Patients* . Cardiovascular Research, 1997; 36: 330-36.

12-Mesallamy H E, Salwa Suwailem S, Nadia Hamdy N. *Evaluation of C-Reactive Protein, Endothelin-1, Adhesion Molecule(s), and Lipids as Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes Mellitus Patients*. Mediators Inflamm, 2007; 10:1155.

13-Gabbag KKh, Hasty K, Breslow JL curtis, Ellison R, Franklin Bunn H, and Gallop PM. *Glicosylated hemoglobin and long-term blood glucose control in diabetes mellitus* . JCE, 1997; 44(5): 850-64.

14-Kennedy L, Mehi TD, Elder E, Varghese M and Merime TJ .*Non enzymatic glicosylation of serum and plasma proteins*. Diabetes, 1982; 31,suppl 3: 52-6.

15-Trivell LA, Ranney HM and Hong TL. *Hemoglobin components patient with diabetes mellitus*. NEngi J Med 1971; 284(7):353-57.

16-Ledl F, Schleicher E. *New aspects of the maillard reaction in foods and in the human body*. Angew chem. In Ed Engl, 1990; 29: 565-94.

17-Trinder P, Glucose assay. *A colorimetric enzyme-kinetic method assay*. Ann. Clin. Biochem, 1969; 6: 24.

18-Parker KM, England JD, Da Costa J, Hess R, Goldstein DE. *Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin*. Clin Chem, 1981; 27:669–72.

19-Mattucci E, Giampietro O. *Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients*. Diabetes Care, 2000; 23(8) :1182-6.

A Comparison between lipid Per oxidation Products & Hemoglobin in Patients of Diabetes T.2 with Normal People

Hanachi P.[*1], *Heidari Moghadam R.*[2], *Nikbakht H.*[3]

Abstract

Introduction: Oxidative stress and lipid per oxidation occurrence on fatty acids in lipid structure is held to be a significant factor of atherosclerosis problem in diabetic patients. Measuring Malondialdehyde (MDA) as one way, Oxidative stress can be investigated.

Materials & Methods: A total number of 200 people undertook this investigation of whom 100 people (all with a least diabetes history of 3 years ' None Insulin Dependent Diabetic Mellitus" and examination records at cardio-vascular research center of Esfahan university of Medical Sciences) appeared as the "case group". On the other hand, 100 more people with no history of diabetes took part as the " control group". In both the groups, MDA, HbA1c and FBS levels were measured, then the mean plasma levels were compared among them using a Ver.11 SPSS software.

Findings: According to the results of this study , MDA plasma level was 0.7428±0.04 µmol/lit in the "control group", whil it was 0.9222±0.3 µmol/lit in the " case group", a statistic difference which was significantly comparable. The FBS level was 163.31±56 mg/dl in the " case group", whereas it was 85.740±10.1 mg/dl in the "control group". These finds all proved a significant difference between the two studied groups, ($p>0.05$).

Conclusion: It is concluded that the mean of MDA in diabetic patients has considerably been higher than that of the "control group". Further more, the mean of HbA1c and FBS in the "case group" was higher than that of the "control group". There was no significant relationship between MDA and the measured factors. At last, we come to the conclusion that no association exists between MDA level and any increase in FBS & HbA1c levels in diabetic patients.

Key words: malondialdehyde, FBS, diabetes, lipid per oxidation

1. Associate Prof., Bio-medical Research Center of Women, AL-Zahra University, Tehran (Corresponding author)
2. Medical Resident of Sport physiology, Ilam University of Medical Sciences
3. Full Prof., of Sport Physiology, Research and Science Dept, Azad University, Tehran