

## بررسی سطح نیتروتایروزین پلاسما در بیماران دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی شهر تهران در سال ۱۳۹۰

منوچهر نججوانی<sup>۱</sup>، سحر رجبزاده کنفی<sup>۲\*</sup>، علیرضا استقامتی<sup>۱</sup>، احسان مرادی فارسانی<sup>۳</sup>، لاله قدیریان<sup>۴</sup>

### چکیده

**مقدمه:** شیوع دیابت و عوارض ناشی از آن در حال افزایش بوده و استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل مهم پاتوژنیک در رابطه با ایجاد عوارض آن شناخته شده است. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری نیتروتایروزین به عنوان نشانگری برای استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی است.

**روش‌ها:** این مطالعه مورد شاهدهی برای مقایسه بیماران دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به بیمارستان امام شهر تهران با افراد سالم انجام شد. در هر گروه ۷۰ نفر وارد شدند و معیارهای خروج شامل سطح کراتینین خون بالای ۲ mg/dl ابتلا به نارسایی احتقانی قلب، مصرف آنتی اکسیدان‌ها، مشکلات کبدی، عفونت فعال و ابتلا به سرطان بود. گروه کنترل از لحاظ سن و جنس مشابه بیماران بودند (Paired match). اندازه‌گیری سطح نیتروتایروزین به روش ELISA انجام گردید. داده‌های به دست آمده، توسط نرم‌افزار آماری SPSS (version 13) و با کمک آزمون‌های آماری کای دو، t test و ضریب همبستگی اسپیرمن و در سطح معناداری ۰/۰۵ آنالیز گردید. اطلاعات بیماران محفوظ و ورود به مطالعه پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه از افراد انجام شد.

**یافته‌ها:** شیوع جنسی و میانگین سنی در دو گروه مشابه بود (در گروه دیابت  $(\pm 11/34)$  ۵۴/۴ سال و در گروه شاهد  $(\pm 10/76)$  ۵۱/۱ سال). سطح نیتروتایروزین در سرم بیماران مبتلا به دیابت با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ( $P < 0/001$ ) و در بیماران دیابتی با افزایش سن مربوط بود ( $P < 0/025$ ,  $r = 0/27$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس این مطالعه سطح سرمی نیتروتایروزین در بیماران دیابتی بالاتر از افراد سالم است بنابراین استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان علتی برای عوارض بیماری دیابت مورد بررسی قرار گرفته و برای طراحی مداخلات به منظور پیشگیری از عوارض مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** نیتروتایروزین، دیابت نوع ۲، استرس اکسیداتیو

- ۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک و غدد درون‌ریز، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- ۲- بخش بیماری‌های داخلی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- ۳- بخش بیماری‌های قلب و عروق، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
- ۴- مرکز تحقیق و توسعه سیاست‌های دانشگاه در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

\***نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بلوار کشاورز، بیمارستان امام خمینی (ره) دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش بیماری‌های داخلی، تلفن: ۸۸۹۶۷۸۹۵، نامبر: ۸۸۹۶۷۸۹۵، پست الکترونیک: drsahar.mf127@yahoo.com

## مقدمه

بیماری دیابت یک بیماری مزمن متابولیک است که در سراسر جهان شایع بوده و نگرانی‌های زیادی برای دست اندرکاران بهداشت عمومی در جوامع گوناگون ایجاد کرده است. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در حوزه‌های مختلف طب، شیوع دیابت و عوارض ناشی از آن در حال افزایش است [۱]. مطالعات انجام شده در ایران نشان می‌دهد شیوع کلی دیابت در کشور  $7/7\%$  (فاصله اطمینان:  $7/5-7/9$ ) که معادل ابتدای بیش از ۲ میلیون ایرانی در رده سنی ۲۵-۶۴ سال می‌باشد [۲]. رابطه میان دیابت و عوارض عروقی در مطالعات متعدد نشان داده شده است و بیماران دیابتی در معرض مرگ و میر و عوارض ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی قرار دارند [۳]. استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل مهم پاتوژنیک در رابطه با عوارض میکروواسکولار و ماکروواسکولار شناخته شده است [۴]. در بیماران دیابتی استرس اکسیداتیو، میزان تولید سوپراکسید و نیتریک اکسید را بالا می‌برد که این پدیده می‌تواند منجر به تولید ماده پروکسی نیتريت شود [۴-۶]. پروکسی نترات اکسید شده توانایی اکسید کردن لیپوپروتئین‌های با دانسیته کم، عدم کارکرد مناسب عروقی و توانایی نیتراته کردن دنباله‌های تیروزینی در پروتئین‌ها را دارد [۷-۹]. با توجه به این که اندازه‌گیری پروکسی نیتريت به لحاظ آزمایشگاهی مشکل است اندازه‌گیری نیتروتایروزین به عنوان جایگزین آن پیشنهاد شده است [۹].

در بیماران دیابتی در مطالعات قبلی کاهش سطح آنتی اکسیدانی و افزایش تولید سوپر اکسید نیتروژن و NO گزارش شده است [۵،۴]. همچنین چند مطالعه محدود افزایش سطح نیتروتایروزین را در این گروه از بیماران نشان داده‌اند [۱۰-۱۲].

مطالعه‌ای در سوئد در سال ۲۰۰۹، نشان داد که وضعیت گلیسمیک حتی در بیماران با کنترل قند خون مناسب، با استرس اکسیداتیو مربوط است ( $P=0/01$ ) [۱۳]. مطالعات دیگری نیز نشان دادند که در بیماران مبتلا به DM2، همبستگی مستقیمی میان افزایش قند خون پس از صرف غذا با تولید نیتروتایروزین که مارکری برای استرس اکسیداتیو است وجود دارد و این بیومارکرها بعنوان نشانگر

برای اختلال عملکرد اندوتلیوم عروق مناسب تشخیص داده شدند [۱۴،۱۵] لذا شناسایی استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از سازوکارهای فیزیوپاتولوژیک موثر در ایجاد عوارض در بیماری دیابت می‌تواند به شکل بالقوه اهمیت پیشگیری و درمانی داشته باشد.

با توجه به یافته‌های فوق و از آن رو که مطالعات بر روی جمعیت بیماران دیابتی در ایران محدود است این مطالعه به منظور اندازه‌گیری سطح نیتروتایروزین در بیماران دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران و مقایسه آن با گروه کنترل و همچنین تعیین عوامل موثر بر میزان نیتروتایروزین در بیماران دیابتی طراحی شد.

## روش‌ها

مطالعه به صورت مورد-شاهدی و بر روی بیماران دیابتی نوع ۲ مراجعه کننده به درمانگاه دیابت بیمارستان امام خمینی انجام شد. گروه کنترل از افراد سالم (کارکنان بیمارستان و همراهان بیماران) که از لحاظ سن و جنس مشابه بیماران بودند انتخاب شدند (paired match). معیارهای خروج شامل سطح کراتینین خون بالای  $2 \text{ mg/dl}$ ، ابتلا به نارسایی احتقانی قلب (CHF) مصرف آنتی اکسیدان‌ها و داروهای دارای خاصیت آنتی اکسیدانی مانند آسپرین، استاتین، Vit C, E، مشکلات کبدی، عفونت فعال و ابتلا به سرطان بود. ابزار جمع‌آوری اطلاعات چک لیست و روش جمع‌آوری آن پرونده بیماران و انجام آزمایش خون بود. نمونه‌گیری به صورت آسان (convenience) و از میان بیماران دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان امام که دارای پرونده بودند انجام شد. اطلاعات شامل سن، جنس، وزن، زمان شروع بیماری، مدت بیماری، سطح FBS، HDL، LDL، Total Cholesterol، Triglyceride و Liver function test و داروهای مصرفی و دوز داروهای مصرفی و عوارض بیماری ثبت شد. اندازه‌گیری گلوکز خون و لیپیدها توسط کیت پارس آزمون و دستگاه BS-400 MINDRAY بود. اندازه‌گیری سطح نیتروتایروزین به روش ELISA انجام گردید این کیت توانایی اندازه‌گیری سطح نیتروتایروزین در محدوده ۲ تا ۱۵۰۰ نانومول را دارد. (Hycult, Bioteck, )

بودند و تفاوتی از نظر شیوع جنسی در دو گروه وجود نداشت (جدول ۱).

میانگین سنی در گروه بیماران مبتلا به دیابت  $(54/4 \pm 11/34)$  سال و در گروه بدون دیابت  $(51/1 \pm 10/76)$  سال بود که تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشت. از نظر آزمایشات بیوشیمیایی HDL ، Triglyceride ، Total Cholesterol ، LDL ، و Liver function test نیز تفاوت معنی داری بین دو گروه دیده نشد (جدول ۲).

میان مدت بیماری در گروه مبتلا به دیابت ۵ سال بود. سطح نیتروتایروزین در سرم بیماران مبتلا به دیابت  $(median=18/8)$  و گروه شاهد  $(median=6/3)$  تفاوت معنی دار داشت  $(P<0/001)$  (نمودار ۱).

بین سطح نیتروتایروزین با سن در بیماران دیابتی ارتباط معنی دار وجود دارد  $(r=0/27, P<0/025)$  ولی در افراد سالم چنین ارتباطی وجود نداشت  $(P<1)$ . بین سطح نیتروتایروزین در بیماران دیابتی و سالم در دو جنس تفاوتی وجود نداشت  $(P<0/16)$  و  $(P<0/95)$  (جدول ۳).

بین سطح نیتروتایروزین با مدت زمان ابتلا، وجود و عدم وجود فشار خون، چربی‌های خون، سطح HbA1C و BMI در بیماران دیابتی و سالم ارتباطی وجود نداشت  $(P<0/84)$ .

بین سطح نیتروتایروزین با سطح قند خون ناشتا در افراد سالم رابطه وجود داشت  $(r=0/26, P<0/03)$  ولی در بیماران دیابتی چنین رابطه‌ای وجود نداشت  $(P<0/97)$  (نمودار ۲).

Elisa-Hk501 9 Gt (هلند). دستگاه مورد استفاده نیز Elisa reader MINDRAY (Bio tek، آمریکا) بود.

روش محاسبه حجم نمونه با استفاده از فرمول مقایسه دو میانگین بود که در آن  $\alpha$  برابر با ۰/۰۵ و  $\beta$  برابر با ۰/۲ در نظر گرفته شد، در مجموع ۱۴۰ نفر (در هر گروه ۷۰ نفر) وارد مطالعه شدند. داده‌های به دست آمده، توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۳ مورد آنالیز قرار گرفت (در سطح معناداری ۰/۰۵). سطح نیتروتایروزین در ۲ گروه بیماران و افراد سالم با استفاده از آزمون‌های آماری t-test و Mann-Whitney U و بررسی میزان همبستگی نیتروتایروزین با سن، سطح قند خون ناشتا، BMI، HbA1c و لیپیدهای سرم با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن انجام شد. کلیه اطلاعات شخصی بیماران سری و محفوظ بود و برای شرکت در مطالعه از شرکت کنندگان رضایت‌نامه آگاهانه کتبی کسب شد. عدم تمایل بیماران برای شرکت در مطالعه از محدودیت‌های پژوهش بود که با توضیح اهمیت مطالعه برای بیماران و گروه کنترل، تلاش در جهت کاهش آن شد.

## یافته‌ها

در مجموع ۱۴۰ بیمار، ۷۰ بیمار در گروه مبتلا به دیابت و ۷۰ بیمار در گروه شاهد، مورد آزمایش خون برای اندازه‌گیری نیتروتایروزین سرم قرار گرفتند. در گروه دیابت، ۳۰ نفر  $(49/2\%)$  مرد و ۴۰ نفر  $(50/6\%)$  زن و در گروه شاهد نیز ۳۱ نفر  $(50/8\%)$  مرد و ۳۹ نفر  $(49/4\%)$  زن

جدول ۱- فراوانی جنسیتی در هر یک از دو گروه افراد با دیابت و بدون دیابت در مراجعه کنندگان به بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۰

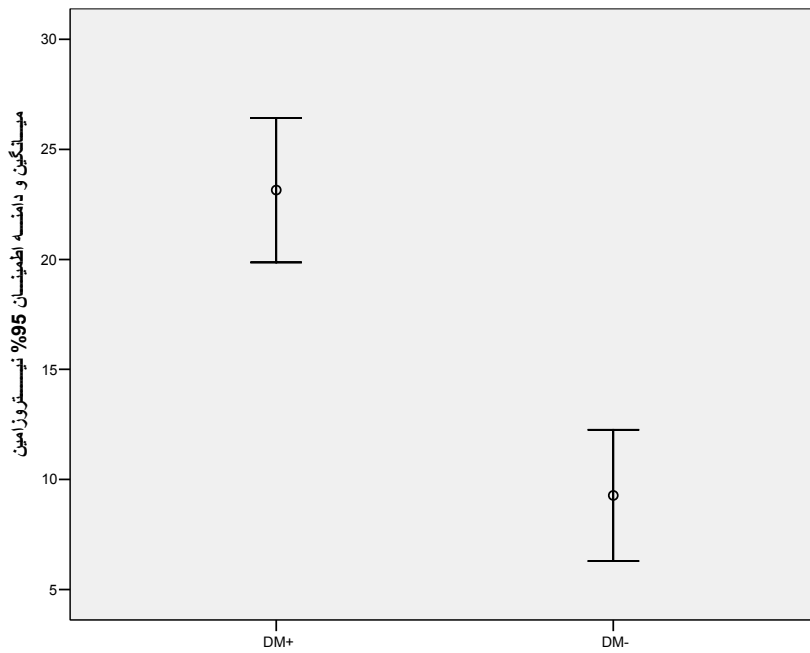
P value	DM- (شیوع) تعداد	DM+ (شیوع) تعداد	متغیر
۱			جنس
	۳۱ (۵۰/۸)	۳۰ (۴۹/۲)	مرد
	۳۹ (۴۹/۴)	۴۰ (۵۰/۶)	زن
	۷۰ (۱۰۰)	۷۰ (۱۰۰)	جمع

\*  $P<0/05$  معنی دار است، Chi square test

جدول ۲- میانگین سنی، کلسترول تام و تری گلیسرید در هر یک از دو گروه افراد با دیابت و بدون دیابت در مراجعه کنندگان به بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۰

متغیر	گروه	تعداد	میانگین سنی	انحراف معیار	P value
سن	DM+	۷۰	۵۴/۴	۱۱/۳	۰/۰۸
	DM-	۷۰	۵۱/۱	۱۰/۸	
کلسترول توتال	DM+	۷۰	۲۸۵/۵	۴۰/۳	۰/۰۵
	DM-	۷۰	۲۵۳/۳	۳۲/۶	
تری گلیسرید	DM+	۷۰	۳۷۵/۴	۷۳/۲	۰/۰۶
	DM-	۷۰	۲۶۷/۷	۵۵/۶	

\* P < ۰/۰۵ معنی دار است، Independent samples T test

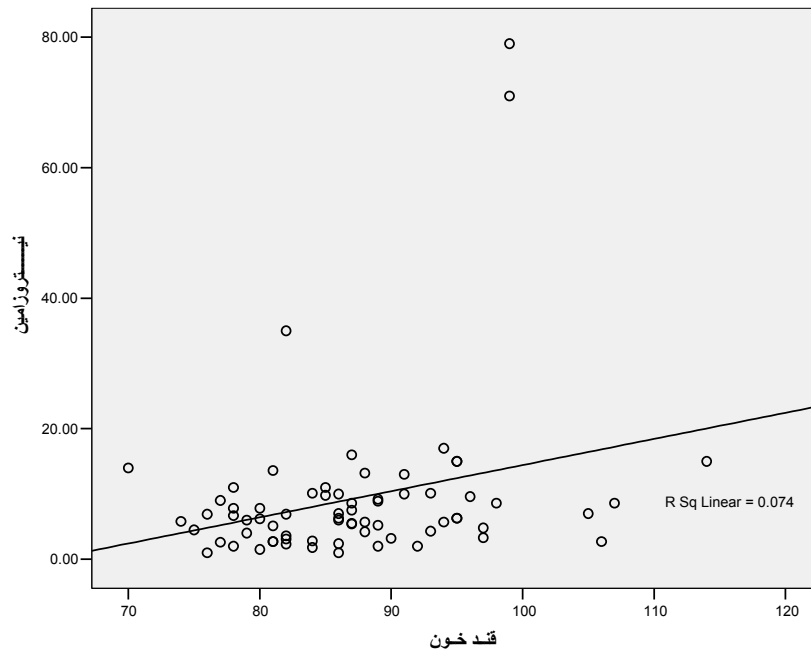


نمودار ۱- Error bar میانگین نیتروتایروزین در دو گروه افراد با دیابت و بدون دیابت در مراجعه کنندگان به بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۰

جدول ۳- نیتروتایروزین در دو جنس در افراد سالم و بیماران مبتلا به دیابت مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۰

متغیر	گروه	جنس	تعداد	میان	P value
نیتروتایروزین	DM+	مرد	۲۹	۱۹	۰/۱۶
		زن	۳۹	۱۷/۸	
	DM-	مرد	۳۱	۶/۳	۰/۹۵
		زن	۳۹	۶/۹	

\* P < ۰/۰۵ معنی دار است، Mann Whitney U



نمودار ۲- Scatter plot سطح نیتروتایروزین با سطح قند خون ناشتا در افراد سالم مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۰

## بحث

این مطالعه مورد- شاهدهی بر روی ۱۴۰ نفر صورت گرفت که ۷۰ نفر مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۷۰ نفر افراد سالم به عنوان گروه شاهد بودند. از نظر میانگین سنی و شیوع جنسی تفاوت معنی داری میان دو گروه وجود نداشت. سطح نیتروتایروزین در سرم بیماران مبتلا به دیابت و افراد سالم تفاوت معنی دار داشت که مشابه با مطالعه Ceriello در ایتالیا و Pereira در برزیل بود [۱۴،۱۵].

بین سطح نیتروزامین با سن در بیماران دیابتی ارتباط معنی دار وجود داشت ولی در افراد سالم چنین ارتباطی دیده نشد.

سطح نیتروتایروزین در بیماران دیابتی با جنس ارتباط نداشت که متفاوت با مطالعه Wang بود که سطح نیتروتایروزین را در مردان بالاتر از زنان گزارش نموده بود [۱۱].

سطح نیتروتایروزین در بیماران مبتلا به دیابت با مدت ابتلا به بیماری دیابت، وجود و عدم وجود فشار خون ارتباط وجود نداشت. سطح نیتروتایروزین با سطح قند خون ناشتا در بیماران مبتلا به دیابت ارتباط نداشت که این یافته مشابه با مطالعه Bo ولی متفاوت از مطالعه Rytter بود [۱۲،۱۳].

به طور متناقض بین سطح نیتروتایروزین با سطح قند خون ناشتا در افراد سالم رابطه وجود داشت، اگرچه شدت رابطه بسیار ضعیف بود. علت این ارتباط می تواند ناشی از وجود مخدوشگرهای دیگری باشد که شناسایی آنها نیاز به مطالعات بیشتر را می طلبد.

بین سطح نیتروتایروزین با BMI و HbA1c و سطح چربی های خون در بیماران و افراد سالم ارتباط وجود نداشت، ولی در مطالعه Rytter بین سطح HbA1c با سطح نیتروتایروزین ارتباط مشاهده شده است [۱۳]. شاید دلیل این اختلاف تفاوت حجم نمونه در زیر گروهها باشد به این صورت که مطالعه حاضر بر روی دو گروه ۷۰ نفری صورت گرفت در حالی که در مطالعه Rytter ۹۶ نفر بیمار و ۱۶ نفر کنترل وارد شدند.

از نقاط ضعف این مطالعه، محدودیت آن به بیمارستان امام شهر تهران (تک مرکزی بودن) و گروه کنترل بیمارستانی آن بود که با انجام این مطالعه بر مبنای جامعه و با گروه های کنترل بیشتر، امکان یافتن ارتباطات با دقت بیشتر میسر می گردد.

بر اساس مطالعه حاضر سطح نیتروتایروزین در سرم بیماران مبتلا به دیابت بالاتر از افراد سالم است و با افزایش سن

غذایی خاص (مصرف آب آشامیدنی با نیترات بالا) و یا بررسی نقش احتمالی مصرف آنتی اکسیدان‌ها در جلوگیری از ایجاد عوارض در بیماران دیابتی کمک کننده خواهد بود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه علوم پزشکی تهران که حمایت مالی از این پژوهش را به عهده داشت ابراز می‌دارند.

نیز بیشتر می‌شود. پیشنهاد می‌گردد مطالعاتی برای یافتن ارتباط میان سطح نیترونتایروزین و عوارض بیماری دیابت انجام شود تا بتوان با توجه به سطح نیترونتایروزین به دنبال تشخیص و جلوگیری از پیشرفت عوارض خاص دیابت بود.

انجام مطالعات کوهورت برای تعیین ارتباط سطح نیترونتایروزین با احتمال وقوع دیابت در آینده هم برای تشخیص زودرس دیابت و پیشگیری از عوارض آن مفید خواهد بود. بررسی تاثیر شرایط محیط زندگی و رژیم‌های

### مأخذ

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-53.
2. Esteghamati A, Gouya MM, Abbasi M, et al. Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose in the Adult Population of Iran: The National Survey of Risk Factors for Non-Communicable Diseases of Iran. *Diabetes Care* 2008; 31:96-98.
3. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; 23(2):105-11.
4. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19(3):257-67.
5. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96(1):25-8.
6. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998; 11-1: (1) 356.
7. Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 1993; 330(2):181-5.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(4): 1620-4.
9. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1): C1424-37.
10. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001; 44(7):834-8.
11. Wang XL, Rainwater DL, Leone A, Mahaney MC. Effects of diabetes on plasma nitrotyrosine levels. *Diabet Med* 2004; 21(6):577-80.
12. Bo S, Gambino R, Guidi S, et al. Plasma nitrotyrosine levels, antioxidant vitamins and hyperglycaemia. *Diabet Med* 2005; 22(9):1185-9.
13. Rytter E. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *Br J Nutr* 2009; 101(10):1423-6.
14. CERIELLO A, et al. Role of Hyperglycemia in Nitrotyrosine Postprandial Generation. *Diabetes Care* 2002, Vol 25, Num 8.
15. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, Arpad Faludi A, Monte O, Toros Xavier H, Pereira TV, Parra Abdalla DS. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry* 2008; 41: 1454-1460.