

بررسی پروفایل اسیدهای آمینهی سرم در نروپاتی دیابتی

علی جلیلی^۱، فریده رضی^۲، انسیه نسلی اصفهانی^۲، مصطفی قربانی^۳، باقر لاریجانی^{۱*}

چکیده

مقدمه: نروپاتی دیابتی یک بیماری مزمن کلیوی و یکی از شایع‌ترین عوارض دیابت نوع ۲ است. مارکرهای کنونی تشخیصی نروپاتی دیابتی مانند آلبومین و کراتینین تنها قادر به شناسایی این بیماری در مرحله آسیب کلیوی است. هدف از مطالعه حاضر بررسی متابولومیکس هدفمند اسیدهای آمینه سرم به منظور شناسایی ارتباط پروفایل اسیدهای آمینه سرم با دیابت و نروپاتی دیابتی می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه مقطعی توصیفی-تحلیلی در سال ۹۵-۱۳۹۴ بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به نروپاتی دیابتی متعاقب دیابت نوع ۲، ۳۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ مراجعه کننده به کلینیک دیابت ۱ پژوهشگاه غدد و ۳۰ فرد غیردیابتی انجام شد. هموگلوبین، HbA1c و BUN خون و سطح سرمی آلبومین، اسیداوریک، آلبومین نمونه رندوم ادرار صبحگاهی و کراتینین ادرار با روش‌های استاندارد و سطح سرمی اسیدهای آمینه با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس با کارایی بالا (HPLC) اندازه گیری شد. از آزمون ANOVA و کروسکال والیس و از رگرسیون اسمی (Nominal regression) به منظور مقایسه گروه‌های مورد بررسی استفاده شد.

یافته‌ها: تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی هر ۸ اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای آمینه شاخه‌دار، اسیدهای آمینه آروماتیک و نیز ۸ اسیدهای آمینه غیرضروری آلانین، اسید آسپارتیک، سرین، گلوتامین، آرژینین، گلیسین، تیروزین و اورنی‌تین بین ۳ گروه مورد بررسی نروپاتی دیابتی، دیابت و افراد غیردیابتی مشاهده شد. سطح سرمی آرژینین و ایزولوسین در گروه دیابت بالاتر از غیردیابتی بود. در حالی که، مقادیر اسیدهای آمینه سرین، گلوتامین، گلیسین، ترئونین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، اورنی‌تین و لیزین در ۲ گروه نروپاتی دیابتی و دیابت بالاتر از گروه غیردیابتی بود. به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی اسیدهای آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نروپاتی دیابتی به ترتیب ۳/۲۵۷ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۹۴ - ۰/۱۰ و $P=0/039$)، ۲/۲۰۷ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۸۱ - ۰/۱۸ و $P=0/039$) و ۲/۶۵۲ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۹۶ - ۰/۲۱ و $P=0/012$) برابر شد.

نتیجه‌گیری: کاهش سطوح سرمی اسیدهای آمینه سرین، لوسین و آلانین ممکن با بروز و پیشرفت نروپاتی دیابتی مرتبط باشد و می‌توان از این ارتباط در آینده و با مطالعات بیشتر کاربرد در کنترل متابولیک و بهبود پیش‌آگهی بیماران مبتلا به نروپاتی دیابتی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نروپاتی دیابتی، متابولومیکس هدفمند، اسیدهای آمینه، دیابت نوع ۲

۱- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات دیابت، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، طبقه‌ی پنجم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، کد پستی: ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن:

۰۲۱۸۸۲۲۰۰۳۷، نامبر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۰۲

تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۶/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۱

مقدمه

نفروپاتی دیابتی یک بیماری مزمن کلیوی و یکی از شایع‌ترین عوارض دیابت نوع دو است که سبب افزایش مرگ و میر [۱] و هزینه‌های درمانی بهداشتی [۲] مرتبط با بیماری دیابت می‌شود و بیشتر مرگ و میر قلبی-عروقی بیماری دیابت با بیماری مزمن کلیوی در ارتباط است [۳].

تغییرات توبولی می‌تواند نقش مهمی در بروز و پیشرفت اختلال عملکرد کلیوی در دیابت داشته باشد و این تغییرات قبل و یا حداقل همراه تغییرات اولیه گلوومرول‌ها اتفاق می‌افتد [۴]. به‌طور معمول، افزایش دفع ادراری آلبومین در تشخیص نفروپاتی دیابتی به‌کار می‌رود [۵]. با این حال، آلبومینوری نشان‌دهنده‌ی نفروپاتی است و بیومارکر خوبی برای پیشگویی بیماری نیست [۶]. آلبومینوری به‌خصوص در محدوده‌ی میکروآلبومینوری فاقد ویژگی^۱ و حساسیت^۲ لازم برای طبقه‌بندی بیماران در معرض خطر نفروپاتی دیابتی است [۷]. اگر بتوان نفروپاتی دیابتی را قبل از بروز میکروآلبومینوری شناسایی کرد، پیشگیری و معکوس کردن روند پیشرفت بیماری مزمن کلیوی امکان‌پذیر خواهد بود [۸].

متابولومیکس مجموعه‌ای از تکنولوژی‌های جدید در تشخیص و اندازه‌گیری تمام و یا گروهی از مولکول‌های کوچک متابولیتی از یک نمونه‌ی کوچک بیولوژیکی از یک آزمایش است [۹]. در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری در ارتباط با متابولومیکس در نفروپاتی دیابتی انجام شده [۱۰-۲۱] و بسیاری از مسیرهای متابولیک جدید مرتبط با نفروپاتی دیابتی شناسایی شده‌است. مسیرهای متابولیکی که در تشخیص نفروپاتی دیابتی بیشتر نقش دارند عبارتند از مسیرهای متابولسمی لیپیدها (اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، کارنتینین‌ها و فسفولیپیدها)، اسیدهای آمینه (فنیل‌آلانین و تیروزین، تریپتوفان، والین، لوسین و ایزولوسین و سیکل‌اوره)، نوکلئوتیدها (پورین و پیریمیدین) و نیز چرخه‌ی اوره [۲۲]. متابولیت‌های متابولسم لیپید مانند بوتونیل کارنتینین [۲۳]، اسیدهای چرب غیرضروری، فسفولیپیدها [۲۴]، سرامیدهای با زنجیره‌ی بسیار بلند [۲۴]، اسیل‌کارنتینین‌ها [۲۶] و اسیدهای آمینه مانند اسیدهای آمینه ضروری [۲۶]، هیستیدین، گلوتامین و تیروزین [۲۳] و متابولیت‌های متابولسم تریپتوفان [۲۵] از

جمله متابولیت‌های پیشگویی کننده‌ی پیشرفت بیماری کلیوی در بیماران دیابتی بوده‌است.

کلیه‌ی انسان نقش مهمی در هموستاز مخزن اسیدهای آمینه بدن دارد. این کار از طریق سنتز، تجزیه، فیلتراسیون، بازجذب و دفع ادراری اسیدهای آمینه و پپتیدها صورت می‌گیرد [۲۷]. مطالعات افزایش سطح سرمی اسیدهای آمینه شاخه‌دار (والین، لوسین، ایزولوسین)، آروماتیک (فنیل‌آلانین، تیروزین)، آلانین، افزایش نسبت اورنی‌تین به سیتروالین، افزایش نسبت اورنی‌تین به آرژینین، کاهش سطح سرمی هیستیدین، گلوتامین و متیونین را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نشان داده‌است [۲۸-۳۷]. در بیماری مزمن کلیوی افزایش سطح سرمی اورنی‌تین، سیتروالین، سرین، گلیسین و اسپارژین [۳۸، ۳۹]، [۱۷] و در نفروپاتی دیابتی کاهش سطح سرمی لوسین، گلوتامین، متیونین، آرژینین و افزایش دفع ادراری فنیل‌آلانین و تیروزین [۴۱، ۴۰، ۱۴، ۱۲] گزارش شده‌است.

از آنجا که در حال حاضر، آلبومین ادرار اولین نشانه‌ی نفروپاتی دیابتی و تنها شاخص تشخیص این عارضه است، در این مطالعه سعی شد با بررسی متابولومیک تغییرات اسیدهای آمینه در سرم افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی را نسبت به افراد غیردیابتی و افراد دیابتی بدون آلبومینوری بررسی کنیم تا از این طریق بتوانیم سایر مسیرهای احتمالی متابولیک درگیر در بروز این عارضه را نیز تا حدودی مشخص نماییم و بر این اساس در آینده بتوان با شناسایی بهتر این مسیرها در خصوص مداخلات پیشگیرانه و یا درمان این عارضه اقدامات مؤثرتری را انجام داد. بنابراین، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی و مقایسه‌ی مارکرها‌ی متابولومیک اسیدهای آمینه در سه گروه مبتلا به دیابت نوع دو، نفروپاتی دیابتی و افراد غیردیابتی می‌باشد.

روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی توصیفی-تحلیلی در سال ۹۵-۱۳۹۴ بر روی بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی متعاقب دیابت نوع دو (آلبومینوری و GFR بالاتر و یا مساوی ۶۰) و دیابت نوع دو مراجعه کننده به کلینیک شماره یک دیابت پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. افراد غیردیابتی از همراهان بیماران انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بود از تمایل به همکاری با طرح، محدوده‌ی سنی ۳۰ تا ۷۵ سال، تشخیص دیابت به‌مدت حداقل ۵ سال در گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) کمتر از ۸/۵٪ GFR بالاتر و یا مساوی ۶۰،

¹ specificity

² sensitivity

معیارهای ورود را داشتند، به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب و وارد مطالعه شدند.

گردآوری داده‌های تن‌سنجی و فشار خون

وزن با حداقل پوشش با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۱۰۰ گرم و قد افراد با استفاده از متر نواری با دقت ۰/۱ سانتی‌متر در وضعیت ایستاده در کنار دیوار و بدون کفش در حالی که کتف‌ها در شرایط عادی قرار دارند اندازه‌گیری شد. نمایه‌ی توده‌ی بدن از تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر مربع) محاسبه شد. فشار خون نیز با استفاده از فشار سنج جیوه و با دقت ۱ میلی‌متر جیوه توسط پزشک اندازه‌گیری شد.

خونگیری و آزمایشات بیوشیمیایی

به بیماران آموزش داده شد که به مدت ۲۴ ساعت قبل از زمان آزمایش از انجام فعالیت ورزشی شدید بپرهیزند. نمونه‌ی خون وریدی بازویی به میزان ۱۰ سی‌سی در حالت ناشتایی ۱۲ ساعته با کمک اسکالپ وین در حالت نشسته بر روی صندلی توسط تکنسین ماهر اخذ گردید. جهت سنجش هموگلوبین، HbA1c و BUN میزان ۱/۵ سی‌سی خون تام به ویال حاوی ضدانعقاد EDTA افزوده شد. مابقی نمونه‌ی خون جمع‌آوری شده در اسرع وقت با استفاده از سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شده و تمام سرم‌ها به‌منظور به حداقل رساندن ضریب تغییرات بین آزمایش تا روز انجام یک آزمایش واحد بر روی تمام نمونه‌ها، در فریزر در دمای ۷۰°C- نگهداری شد.

اندازه‌گیری هموگلوبین خون با دستگاه خودکار شمارنده‌ی سلولی سیمکس K21 N (Sysmex, Kobe, Japan) با حساسیت ۰/۱ گرم در دسی‌لیتر، اوره‌ی خون با روش فرابنفش آنزیمی اوره‌آز و با استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، کرج، ایران) با حساسیت ۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و هموگلوبین گلیکوزیله خون با حساسیت با روش HPLC و سیستم G8 (TosohG8, Tosoh Bioscience) با حساسیت ۰/۱ درصد اندازه‌گیری شد.

سطح سرمی آلبومین با روش فتومتری و استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، کرج، ایران) با حساسیت ۰/۱ گرم در دسی‌لیتر، کره‌آنتینین با روش Jaffe و با استفاده از کیت تجاری (Man Inc, Tehran, Iran) با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و سطح سرمی اسیداوریک با روش کلریمتری و اوریکاز و کیت TOOS

نسبت آلبومین به کراتینین نمونه‌ی ادرار صبحگاهی بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم به گرم در گروه نفروپاتی دیابتی (تنها بیماران که ۲ بار البومینوری ثابت در طی ۳ تا ۶ ماه داشتند وارد مطالعه شدند)، BMI بین ۱۸ تا ۳۵، فعالیت فیزیکی نرمال، عدم مصرف الکل، عدم سابقه‌ی آرتزین صدری، انفارکتوس میوکارد یا سکته‌ی مغزی، سکته قلبی، نارسایی حاد و مزمن کبدی، بیماری‌های التهابی مزمن منجر به بستری در ۶ ماه اخیر و عدم مصرف سیگار و سایر دخانیات. معیارهای عدم ورود از مطالعه عبارت بود از افراد تحت درمان با دیالیز و یا همودیالیز، افراد با کراتینین بالا و کاهش GFR، مصرف داروهای منجر به پروتئینوری، ابتلا به بیماری‌های فعال تبار و بدخیمی، پُرفشاری خون کنترل نشده، ابتلا به بیماری کلیوی زمینه‌ای (گلوومرفریت)، ابتلا به سوء تغذیه (آلبومین سرم کمتر از ۳/۵ گرم در دسی‌لیتر)، انجام ورزش‌های حرفه‌ای و بدنسازی، دریافت مکمل‌های پروتئینی، کراتین و مواد و مکمل‌هایی که می‌تواند بر پروفایل اسیدهای امینه افراد تأثیر گذار باشد.

حجم نمونه براساس مطالعه‌ی Xia و همکاران [۱۸] و با در نظر گرفتن α برابر ۰/۰۵ و β برابر ۰/۲ طبق فرمول زیر حجم نمونه در هر گروه ۳۰ نفر تعیین شد.

$$N = \frac{(Z_1 - \alpha/3 + Z_1 - B)^2 \delta_1^2 + \delta_2^2}{\mu_2 - \mu_1}$$

نمونه‌گیری

در این مطالعه با بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی، دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به مرکز دیابت و بیماری‌های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی تهران که دارای پرونده فعال بودند و براساس اطلاعات مندرج در پرونده واجد معیارهای ورود به مطالعه بودند پس از توضیح اهداف و جزئیات طرح، از افرادی که تمایل به شرکت در طرح را داشتند نمونه‌گیری به‌عمل آمد. تشخیص نفروپاتی دیابتی براساس نسبت آلبومین بر کراتینین نمونه رندوم ادرار صبحگاهی (بیش از ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم کراتینین ادرار) صورت گرفت. همچنین، افراد غیردیابتی از همراهان بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک دیابت انتخاب شدند. از افراد خواسته شد تا در روز مراجعه از ۱۲ ساعت قبل ناشتا باشند. در ابتدا از افراد یک رضایت‌نامه‌ی کتبی گرفته شد. از شرکت‌کنندگان در مورد اطلاعات عمومی، دموگرافیک، شیوه‌ی زندگی (مصرف مکمل و فعالیت فیزیکی، مصرف الکل و دخانیات)، سابقه‌ی بیماری‌های مختلف و نیز مصرف دارو سؤال شد. در نهایت پس از بررسی نتایج بیوشیمیایی، ۹۰ نفر از کسانی که تمامی

متحرک یا فاصله است. در اثر حرکات قلم پیک هائی رسم می‌شود که به مجموعه آنها کروماتوگرام می‌گویند. به طریق کیفی پیک‌ها را براساس زمان بازداری می‌شناسند. زمان بازداری فاصله زمانی از لحظه تزریق تا رسیدن به نقطه اوج یک پیک است. مقدار هر اسید آمینه با استفاده از مساحت نوار جذبی اسید آمینه مورد اندازه‌گیری، استاندارد داخلی و کنترل محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

اطلاعات جمع‌آوری شده و وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ شد. برای متغیرهای کمی از میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی از تعداد و درصد استفاده شد. آزمون کولموگروف-اسمیرنوف به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌های دموگرافیک، بالینی و بیوشیمیایی و نیز سطح سرمی اسیدهای آمینه در ۳ گروه مورد مطالعه استفاده شد. به منظور مقایسه‌ی متغیرهای دارای توزیع نرمال بین ۳ گروه مورد بررسی از آزمون ANOVA و آزمون Post Hoc توکی استفاده شد. آزمون t مستقل به منظور مقایسه‌ی میانگین مدت زمان ابتلا به دیابت در گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت به کار رفت. از آزمون مجذور خی به منظور مقایسه توزیع جنس در ۳ گروه مورد مطالعه استفاده شد. مقایسه‌ی اسیدهای آمینه دارای توزیع غیرنرمال بین ۳ گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال وایس انجام شد. از رگرسیون اسمی^۵ خام و نیز تعدیل شده برای سن و BMI بر روی نمره‌ی Z^۶ اسیدهای آمینه به منظور مقایسه‌ی گروه‌های نفروپاتی دیابتی و دیابت با گروه غیردیابتی و نیز مقایسه‌ی گروه نفروپاتی دیابتی با گروه دیابتی استفاده شد. در تمامی آنالیزهای آماری، سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و کمتر در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات دموگرافیک و بالینی و بیوشیمیایی سه گروه نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی و مقایسه آنها به ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. آزمون مجذور خی تفاوت آماری معنی‌داری را در توزیع جنس در ۳ گروه مورد مطالعه نشان نداد (P=۰/۱۵۸).

(پارس آزمون، کرج، ایران) با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

آلبومین ادرار با روش ایمونوتوریدومتري و استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، تهران، ایران) با حساسیت ۱ میلی‌گرم در ادرار رندوم صبحگاهی اندازه‌گیری شد. سرعت فیلتراسیون گلومرولی نیز با استفاده از فرمول کاکروفیت گالت^۱ و براساس سن، جنس، وزن بدن و کراتینین سرم محاسبه شد.

اندازه‌گیری سطح سرمی اسیدهای آمینه

به منظور آماده‌سازی سرم ابتدا ۲۵ میکرولیتر سرم با ۴۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۵ میکرولیتر نورلوسین (Nle^۲) به عنوان استاندارد داخلی رسوب‌دهی شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سطح رویی آن در یک بافر با ۲۰۰ میکرولیتر معرف مشتق‌ساز (derivatizing) اورتوفتالدهید (OPA^۳) واکنش داده شد تا ترکیبی فلوروسنس را به وجود آورد. نمونه از طریق تزریق کننده وارد ستون شد. حجم نمونه تزریقی ۲۵ میکرولیتر و سرعت جریان، ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. کنترل سطح ۱ و ۲ نیز همان recipe آلمانی مورد استفاده به عنوان کالیبراتور بود. دستگاه HPLC مورد استفاده در این مطالعه Agilent Technologies infinity series 1260 ساخت کشور آمریکا بود که با کالیبراتور recipe آلمانی برای آنالیز اسیدآمینه با آب مقطر حل شده و مثل نمونه با آن رفتار شد. فاز متحرک، قطبی و فاز ساکن غیرقطبی بود. فاز ساکن غیرقطبی سیلیکاژل یعنی هیدروکربن‌هایی بودند که به صورت شیمیایی به یک پایه سیلیس متصل شده بودند و اجازه می‌دادند که ترکیبات قطبی بیشتری در ابتدا جدا شوند. ستون مورد استفاده C18 (سیلیکاژل) که به کربن ۱۸ متصل شده است)، اندازه‌ی ذرات فاز ساکن ۵ میکرومتر، قطر ستون ۴/۶ میلی‌متر و طول آن ۲۵ سانتی‌متر بود. فاز متحرک قطبی متشکل بود از بافر استات با pH ۶/۹۵ به همراه متانول که به صورت گرادینت کار شد. دتکتور^۴ (آشکارساز) فلئورومتر مورد استفاده در این مطالعه حساسیت بالائی نسبت به ترکیبات فلئورسنت دارد و با تکیه بر تغییر در خاصیت فلورسانس فاز متحرک و اجزای نمونه ترکیبات را در حال شسته شدن از ستون اندازه‌گیری می‌کند. طول موج تهییج و نشر دتکتور به ترتیب ۳۴۰ و ۴۵۰ نانومتر بود. کروماتوگرام، نموداری از پاسخ آشکارساز بر حسب زمان، حجم فاز

¹ Cockcroft – Gault formula

² Norleucine

³ Ortho-phthalaldehyde

⁴ Detector

⁵ Nominal regression

⁶ Z score

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی و مقایسه آنها

متغیر	نفروپاتی دیابتی (تعداد = ۳۰)	دیابت (تعداد = ۳۱)	غیردیابتی (تعداد = ۳۰)
سن (سال)	۶۱ (۸)*	۵۶ (۷)**	۴۸ (۱۰)**
وزن (کیلوگرم)	۸۱/۶ (۱۰/۱)*	۷۸/۸ (۱۱/۶)**	۷۰/۹ (۹/۸)**
قد (سانتی متر)	۱۶۶/۳ (۸/۵)	۱۶۷/۳ (۹/۶)	۱۶۵/۰ (۷/۰)
نمایه ی توده ی بدن (کیلوگرم بر متر مربع)	۲۹/۶ (۳/۵)*	۲۸/۲ (۳/۵)**	۲۶/۰ (۳/۴)**
مدت زمان ابتلا به دیابت (سال)	۱۲ (۶)	۹ (۴)	-
فشار خون سیستولی (میلی متر جیوه)	۱۲۵ (۱۱)*	۱۲۱ (۱۱)	۱۱۶ (۱۲)*
فشار خون دیاستولی (میلی متر جیوه)	۸۰ (۸)	۷۹ (۳)	۷۹ (۴)
فشار خون	۱/۵۸ (۰/۱۸)*	۱/۵۳ (۰/۱۲)	۱/۴۸ (۰/۱۰)*

داده‌ها به صورت (انحراف معیار) میانگین بیان شده است.

* $P < 0.05$

جدول ۲- مشخصات بیوشیمیایی افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی و مقایسه آنها

متغیر	نفروپاتی دیابتی (تعداد = ۳۰)	دیابت (تعداد = ۳۱)	غیردیابتی (تعداد = ۳۰)
قند ناشتای سرم (میلی گرم در دسی لیتر)	۱۴۰ (۶۵)*	۱۳۵ (۳۰)**	۹۰ (۱۰)**
هموگلوبین گلیکوزیله (درصد)	۷/۱ (۰/۷)*	۷/۲ (۰/۸)**	۵/۶ (۰/۵)**
اوره (میلی گرم در دسی لیتر)	۳۵ (۱۱)	۳۴ (۱۰)	۳۰ (۶)
کره آنتینن (میلی گرم در دسی لیتر)	۱/۰۸ (۰/۲۳)	۱/۰۱ (۰/۱۵)	۰/۹۸ (۰/۱۲)
اسید اوریک (میلی گرم در دسی لیتر)	۴/۹ (۱/۶)	۴/۹ (۱/۱)	۴/۶ (۱/۴)
تری گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر)	۱۴۳ (۷۱)	۱۴۴ (۷۵)	۱۲۱ (۶۰)
کلسترول تام (میلی گرم در دسی لیتر)	۱۵۰ (۲۲)*	۱۵۸ (۴۰)**	۱۹۰ (۴۴)**
کلسترول HDL (میلی گرم در دسی لیتر)	۴۶ (۱۲)	۴۸ (۱۲)	۵۲ (۱۰)
کلسترول LDL (میلی گرم در دسی لیتر)	۷۵ (۱۴)*	۷۵ (۲۵)**	۹۹ (۲۸)**
ACR	۹۴/۰۲ (۵۹/۶۷)**	۲۷/۳۴ (۳/۹۸)**	۲۷/۰۹ (۴/۹۷)
GFR	۷۸/۵۸ (۱۵/۰۴)	۸۳/۸۸ (۱۶/۱۳)	۸۲/۲۹ (۱۶/۴۸)
آلبومین (گرم در دسی لیتر)	۴/۷ (۰/۳)	۴/۸ (۰/۳)	۴/۷ (۰/۳)
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۱۳/۸ (۱/۶)	۱۴/۲ (۱/۴)	۱۴/۱ (۱/۶)

HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, ACR albumin creatinin ratio, GFR glomerular filtration rate

داده‌ها به صورت (انحراف معیار) میانگین بیان شده است.

* $P < 0.05$

سیرین ($P < 0/001$)، گلوتامین ($P = 0/013$)، آرژینین ($P = 0/038$)، گلیسین ($P = 0/001$)، ترئونین ($P = 0/001$)، تیروزین ($P < 0/001$)، تربیتوفان ($P < 0/001$)، متیونین ($P < 0/001$)، والین ($P = 0/002$)، ایزولوسین ($P = 0/031$)، اورنی‌تین ($P = 0/004$)، لیزین ($P < 0/001$) و نیز مجموع اسیدهای آمینه ($P < 0/001$) نشان داد.

مقایسه‌ی نسبت برخی از اسیدهای آمینه بین افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی
مقایسه‌ی نسبت اورنی‌تین به سیترویلین، اورنی‌تین به آرژینین، آسپاراتات به آسپارژین، گلوتامات به گلوتامین و تیروزین به فنیل‌آلانین تنها تفاوت آماری معنی‌داری در نسبت اورنی‌تین به سیترویلین بین گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد ($P = 0/027$). مقایسه‌ی دو به دو با استفاده از آزمون من‌ویتنی نشان داد که نسبت اورنی‌تین به سیترویلین در گروه دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود ($P = 0/007$) (داده‌ها نشان داده نشده‌است).

آنالیز رگرسیون اسمی خطر دیابت و نفروپاتی دیابتی در مقایسه با افراد غیردیابتی
آنالیز خام و نیز تعدیل شده برای سن و BMI رگرسیون اسمی بر روی نمره‌ی Z اسیدهای آمینه و مقایسه‌ی گروه‌های نفروپاتی دیابتی و دیابت با گروه مرجع غیردیابتی در جدول ۳ نشان داده شده‌است. آنالیز خام و نیز تعدیل شده برای سن و BMI رگرسیون اسمی بر روی نمره‌ی Z نسبت اسیدهای آمینه و مقایسه‌ی گروه‌های نفروپاتی دیابتی و دیابت با گروه مرجع غیردیابتی نشان داد که به ازای هر انحراف معیار افزایش نسبت اورنی‌تین به سیترویلین در مقایسه با افراد غیردیابتی خطر دیابت $1/947$ برابر (فاصله اطمینان $3/66 - 1/04$ و $P = 0/037$) افزایش می‌یابد که پس از تعدیل برای سن و BMI این معنی‌داری از بین رفت ($P = 0/050$).

مقایسه‌ی سطح سرمی اسیدهای آمینه بین گروه‌های مورد بررسی

آزمون کولموگروف-اسمیرینوف نرمال بودن توزیع سطح اسیدهای آمینه سرم را تنها برای اسیدهای آمینه آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین نشان داد ($P > 0/05$) و سایر اسیدهای آمینه سرم از توزیع غیرنرمال برخوردار بودند ($P < 0/05$). مقایسه‌ی سطح اسیدهای آمینه دارای توزیع نرمال آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام شد و سطح سرمی آن‌ها به صورت میانگین (انحراف معیار) گزارش شد. به منظور مقایسه سطح سرمی سایر اسیدهای آمینه دارای توزیع غیرنرمال از آزمون کروسکال‌والیس استفاده شد و مقادیر به صورت میانه (دامنه بین چارکی یا IQR^۱) بیان شد (داده‌ها نشان داده نشده‌است).

تفاوت آماری معنی‌داری در میانگین سطح سرمی هر سه اسید آمینه دارای توزیع نرمال آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین بین گروه‌های نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی مشاهده شد ($P < 0/001$). میانگین سطح سرمی آلانین گروه دیابت فاقد نفروپاتی ۲۲ درصد بالاتر از گروه نفروپاتی دیابتی ($P = 0/049$) و ۸۲ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی ($P < 0/001$) بود. میانگین سطح سرمی آلانین گروه نفروپاتی دیابتی ۵۰ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود ($P = 0/002$). میانگین سطح سرمی فنیل‌آلانین گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت فاقد نفروپاتی به ترتیب ۳۳ و ۴۱ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (به ترتیب، $P = 0/001$ و $P < 0/001$). میانگین سطح سرمی لوسین گروه دیابت فاقد نفروپاتی ۲۳ درصد بالاتر از گروه نفروپاتی دیابتی و ۵۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (به ترتیب، $P = 0/006$ و $P < 0/001$). همچنین، میانگین سطح سرمی لوسین گروه نفروپاتی دیابتی ۲۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود ($P = 0/020$).

مقایسه‌ی میانه اسیدهای آمینه دارای توزیع غیرنرمال بین ۳ گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال‌والیس تفاوت آماری معنی‌داری را برای اسیدهای آمینه آسپاراتات ($P = 0/040$),

^۱ دامنه‌ی بین چارکی یا Interquartile range یکی از سنجش‌های پراکندگی است که برابر با فاصله‌ی بین چارک اول و سوم است.

به عبارت دیگر: $IQR = 25^{th} - 75^{th}$

جدول ۳- رابطه‌ی سطح اسیدهای آمینه‌ی سرم با دیابت و نفروپاتی دیابتی در مقایسه با افراد غیردیابتی*

تعدیل شده***		خام**		اسید آمینه	
%۹۵CI	OR	%۹۵CI	OR		
۰/۷۱ - ۲/۹۲	۱/۴۴۳	۰/۷۸ - ۲/۱۶	۱/۳۰۴	DN/N	اسید آسپارتیک
۰/۳۳ - ۱/۵۵	۰/۷۱۹	۰/۴۱ - ۱/۴۷	۰/۷۷۳	D/N	
۰/۸۳ - ۳/۴۱	۱/۶۸۳	۰/۸۲ - ۲/۴۱	۱/۴۰۶	DN/N	اسید گلوتامیک
۰/۶۸ - ۲/۳۶	۱/۲۶۶	۰/۶۶ - ۲/۰۲	۱/۱۵۱	D/N	
۰/۷۶ - ۲/۹۶	۱/۵۰۰	۰/۷۴ - ۲/۰۴	۱/۲۳۳	DN/N	آسپارژین
۰/۵۴ - ۱/۸۹	۱/۰۱۵	۰/۵۷ - ۱/۶۸	۰/۹۷۷	D/N	
۰/۴۴ - ۲/۲۸	۱/۰۰۳	۰/۶۱ - ۲/۲۸	۱/۱۷۸	DN/N	سرین
۱/۰۳ - ۳/۳۲	۱/۸۵۵	۱/۰۹ - ۳/۹۷	۲/۰۸۰	D/N	
۰/۹۷ - ۴/۱۸	۲/۰۱۲	۰/۹۹ - ۳/۱۳	۱/۷۵۶	DN/N	هیستیدین
۰/۹۶ - ۳/۳۸	۱/۷۹۸	۰/۹۶ - ۳/۰۳	۱/۷۰۶	D/N	
۰/۹۴ - ۵/۲۹	۲/۲۳۶	۰/۹۶ - ۳/۶۰	۱/۸۶۱	DN/N	گلوتامین
۱/۱۲ - ۵/۸۳	۱/۱۱۹	۱/۲۲ - ۴/۶۳	۲/۳۷۷	D/N	
۰/۶۸ - ۲/۷۷	۱/۳۷۸	۰/۶۷ - ۲/۲۷	۱/۲۳۴	DN/N	آرژنین
۰/۸۲ - ۲/۶۰	۱/۴۶۳	۰/۸۱ - ۲/۵۹	۱/۴۴۶	D/N	
۰/۵۵ - ۲/۸۰	۱/۲۴۶	۰/۵۲ - ۲/۳۳	۱/۱۰۶	DN/N	سیترویلین
۰/۶۱ - ۲/۶۷	۱/۲۷۹	۰/۶۳ - ۲/۴۵	۱/۲۴۳	D/N	
۰/۷۶ - ۳/۱۷	۱/۵۴۸	۰/۸۴ - ۲/۷۷	۱/۵۲۴	DN/N	گلیسین
۱/۰۳ - ۳/۷۴	۱/۹۶۱	۱/۱۴ - ۳/۸۱	۲/۰۸۶	D/N	
۱/۳۲ - ۶/۵۸	۲/۹۴۶	۱/۱۹ - ۴/۰۷	۲/۲۰۰	DN/N	ترئونین
۱/۲۶ - ۵/۲۱	۲/۵۶۶	۱/۲۸ - ۴/۴۲	۲/۳۸۰	D/N	
۱/۳۹ - ۹/۹۳	۳/۷۱۲	۱/۶۹ - ۷/۸۴	۳/۶۳۶	DN/N	آلانین
۲/۷۷ - ۲۲/۰۶	۷/۸۲۴	۳/۰۹ - ۱۷/۳۵	۷/۳۱۷	D/N	
۱/۰۴ - ۶/۴۸	۲/۵۹۹	۱/۳۱ - ۵/۸۴	۲/۷۷۰	DN/N	تیروزین
۱/۷۵ - ۱۱/۲۰	۴/۴۳۷	۲/۱۱ - ۱۰/۵۶	۴/۷۱۷	D/N	
۱/۰۹ - ۵/۶۳	۲/۴۸۰	۱/۱۵ - ۴/۲۰	۲/۲۰۲	DN/N	تریپتوفان
۱/۸۷ - ۹/۲۵	۴/۱۵۶	۱/۹۰ - ۷/۴۸	۳/۷۷۴	D/N	
۱/۴۴ - ۳۴/۰۸	۶/۹۹۵	۱/۲۹ - ۱۲/۸۴	۴/۰۶۸	DN/N	متیونین
۳/۲۰ - ۷۶/۲۹	۱۵/۶۱۷	۲/۹۰ - ۳۴/۲۵	۹/۹۶۹	D/N	
۰/۸۲ - ۳/۵۰	۱/۶۹۵	۱/۰۸ - ۳/۵۵	۱/۹۶۰	DN/N	والین
۱/۱۹ - ۴/۸۰	۲/۳۹۰	۱/۳۸ - ۴/۸۴	۲/۵۸۸	D/N	
۱/۲۸ - ۶/۳۵	۲/۸۵۵	۱/۶۲ - ۶/۴۳	۳/۲۲۵	DN/N	فنیل آلانین
۱/۷۱ - ۸/۴۹	۳/۸۰۶	۳/۰۴ - ۸/۶۸	۴/۲۰۷	D/N	
۰/۷۹ - ۴/۰۹	۱/۷۹۵	۰/۸۱ - ۲/۷۰	۱/۴۷۶	DN/N	ایزولوسین
۱/۱۳ - ۵/۵۲	۲/۵۰۲	۱/۱۴ - ۳/۸۶	۲/۰۹۵	D/N	
۱/۰۳ - ۵/۸۹	۲/۴۶۶	۱/۲۵ - ۴/۹۳	۲/۴۸۰	DN/N	لوسین
۲/۵۸ - ۱۶/۸۱	۶/۵۸۴	۲/۸۱ - ۱۴/۱۵	۶/۳۱۱	D/N	
۰/۹۶ - ۴/۳۱	۲/۰۳۱	۱/۲۷ - ۴/۱۹	۲/۳۱۰	DN/N	اورنی تین
۱/۰۳ - ۴/۱۰	۲/۰۵۶	۱/۱۵ - ۳/۷۳	۲/۰۷۵	D/N	
۰/۹۹ - ۷/۴۳	۲/۷۱۴	۱/۳۶ - ۶/۶۵	۳/۰۰۵	DN/N	لیزین
۱/۶۲ - ۱۲/۱۰	۴/۴۲۳	۲/۰۵ - ۱۰/۷۰	۴/۶۸۶	D/N	
۱/۳۶ - ۸/۲۵	۳/۳۵۰	۱/۴۸ - ۶/۲۶	۳/۰۴۳	DN/N	جمع
۲/۱۳ - ۱۳/۲۵	۵/۳۰۷	۲/۳۴ - ۱۱/۱۳	۵/۱۰۲	D/N	

DN diabetic nephropathy, D diabetic, N normal

*نسبت شانس نفروپاتی دیابتی و دیابت در مقایسه با گروه غیردیابتی محاسبه شده‌است.

**multinomial logistic regression

***age and BMI adjusted multinomial logistic regression

آنالیز رگرسیون اسمی خطر نفروپاتی دیابتی در مقایسه با

افراد دیابتی

آنالیز خام و نیز تعدیل شده برای سن و BMI رگرسیون اسمی بر روی نمره‌ی Z اسیدهای آمینه و نسبت آن‌ها و مقایسه‌ی گروه‌های نفروپاتی دیابتی با گروه دیابتی نشان داد که به ازای هر انحراف معیار افزایش سطح سرمی اسید آسپارتیک در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۲۹۱ برابر (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۲۱ - ۰/۰۱ و P=۰/۰۴۸) افزایش می‌یابد که این معنی‌داری پس از تعدیل برای سن و BMI از بین رفت. همچنین، به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی تریپتوفان در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت خطر نفروپاتی دیابتی ۱/۸۷۲ برابر (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۹۸ - ۰/۲۹ و P=۰/۰۴۲) شد که این معنی‌داری پس از تعدیل برای سن و BMI از بین رفت. آنالیز رگرسیون اسمی تعدیل شده برای سن و BMI نشان داد که به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی اسیدهای آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نفروپاتی دیابتی به ترتیب ۳/۲۵۷ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۹۴ - ۰/۱۰ و P=۰/۰۳۹)، ۲/۲۰۷ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۸۱ - ۰/۱۸ و P=۰/۰۳۹) و ۲/۶۵۲ (فاصله اطمینان ۹۵٪ = ۰/۹۶ - ۰/۲۱ و P=۰/۰۱۲) برابر می‌شود. رابطه‌ای بین نسبت اسیدهای آمینه‌ی سرم با نفروپاتی دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده‌است).

بحث

هدف کلی از این مطالعه بررسی تغییرات پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه‌ی سرم در افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی بدون نفروپاتی و غیردیابتی بود. در این مطالعه، میانگین سطح سرمی آلانین و لوسین در گروه دیابت فاقد نفروپاتی به ترتیب ۸۲ و ۵۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود که با وجود کاهش معنی‌دار ۲۲ و ۲۳ درصدی در گروه نفروپاتی دیابتی همچنان ۵۰ و ۵۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی باقی ماند. میانگین سطح سرمی فنیل آلانین در گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت فاقد نفروپاتی به طور معنی‌دار و به ترتیب ۳۳ و ۴۱ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود. کاهش ۳۳ درصدی سطح سرمی فنیل آلانین در گروه نفروپاتی دیابتی

در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده شد که این کاهش از لحاظ آماری به حد معنی‌داری نرسید. تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد بررسی برای اسیدهای آمینه دارای توزیع غیرنرمال آسپاراتات، سرین، گلوتامین، آرژینین، گلیسین، ترئونین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، ایزولوسین، اورنی‌تین، لیزین و نیز مجموع اسیدهای آمینه مشاهده شد. مقایسه نسبت اورنی‌تین به سیترولین، اورنی‌تین به آرژینین، آسپاراتات به آسپارژین، گلوتامات به گلوتامین و تیروزین به فنیل آلانین تنها تفاوت آماری معنی‌داری را در نسبت اورنی‌تین به سیترولین بین گروه‌های مورد بررسی نشان داد که این نسبت در گروه دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود.

به عبارت دیگر، تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی هر ۸ اسیدهای آمینه ضروری (والین، لوسین، ایزولوسین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان، متیونین و لیزین)، اسیدهای آمینه شاخه‌دار (والین، لوسین و لیزولوسین)، اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین، تیروزین) و نیز ۸ اسیدهای آمینه غیرضروری آلانین، اسید آسپارتیک، سرین، گلوتامین، آرژینین، گلیسین، تیروزین و اورنی‌تین (از واسطه‌های سیکل اوره و متابولیسم آرژینین) بین ۳ گروه مورد بررسی نفروپاتی دیابتی، دیابت و افراد غیردیابتی مشاهده شد که از این میان سطح سرمی آسپاراتات در گروه نفروپاتی دیابتی بالاتر از دیابت و گروه غیردیابتی و سطح سرمی آرژینین و ایزولوسین در گروه دیابت بالاتر از غیردیابتی بود. درحالی‌که، مقادیر اسیدهای آمینه سرین، گلوتامین، گلیسین، ترئونین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، اورنی‌تین و لیزین در ۲ گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت بالاتر از گروه غیردیابتی بود.

تغییرات پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه‌ی در افراد مبتلا به دیابت بدون نفروپاتی و نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد غیردیابتی

در پژوهش حاضر، به ازای هر انحراف معیار افزایش سطح سرمی اسیدهای آمینه سرین، گلوتامین، گلیسین، والین، ایزولوسین، اورنی‌تین و لیزین در مقایسه با افراد غیردیابتی خطر دیابت به ترتیب ۱/۸۵۵، ۱/۱۱۹، ۱/۹۶۱، ۲/۳۹۰، ۲/۵۰۲، ۲/۰۵۶ و ۴/۴۲۳ برابر افزایش یافت.

انحراف معیار ۵ اسیدآمین BCAA و AAA خطر دیابت ۵۷ تا ۱۰۲ درصد افزایش یافته است [۳۴]. همچنین، سطوح بالای این اسیدهای آمینه حتی ۱۲ سال قبل از بروز دیابت نوع دو افزایش یافته است [۳۴]. در مطالعات مختلف، تغییرات و افزایش سطوح سرمی بعضی از اسیدهای آمینه مربوط به تغییرات احتمالی در ترکیب بدن و مرتبط با چاقی به عنوان یکی از مهم ترین خطر فاکتورهای دیابت عنوان شده است که از این بین می توان به مطالعه ای که افزایش سطح سرمی آلانین، فنیل آلانین، تیروزین، نسبت گلوتامات به گلوتامین، نسبت آسپاراتات به آسپارژین و آرژینین در چاقی گزارش کرده است اشاره نمود [۲۸]. مطالعه ای مشابهی در جمعیت ژاپنی نیز نشان داد که چاقی احشایی با سطح سرمی اسیدهای آمینه آلانین، گلوتامات، تریپتوفان، تیروزین و BCAA رابطه ای مستقیم و با گلیسین رابطه ای معکوس داشته است [۴۲].

در توجیه برخی از این تغییرات علاوه بر چاقی از کمبود انسولین و یا کاهش عملکرد آن که منجر به افزایش کاتابولیسم پروتئین می شود نیز نام برده شده است و ذکر شده است که در دیابت بسته به شدت و درجه ی کنترل قند خون میزان کاتابولیسم پروتئین در بدن و کاتابولیسم اسیدهای آمینه افزایش می یابد [۴۳]. بنابراین، ممکن است بخش زیادی از تغییرات سطح اسیدهای آمینه در دیابت ناشی از این سازوکار باشد.

علاوه بر ارتباط اسیدهای آمینه شاخه دار با چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو [۴۶-۴۸، ۲۸]، به سطوح اسیدهای آمینه شاخه دار به عنوان مارکر پیشگویی کننده بروز بیماری دیابت نوع دو نیز در تعدادی از مطالعات اشاره شده است [۴۸، ۴۷، ۳۴]. که البته این ارتباط به نقشی که افزایش اسیدهای آمینه در ایجاد اختلال در پیام رسانی انسولین می تواند داشته باشند نسبت داده شده است و به اوایل سال ۱۹۷۰ برمی گردد [۴۹]. اگرچه، مطالعات بر روی جمعیت آسیایی اسیدهای آمینه شاخه دار را ابزار مناسبی در تشخیص و پیشگویی مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو نشان داده است [۵۱، ۵۰، ۴۷، ۳۰]، مطالعه ای جدید بر روی افراد آمریکایی - هندی چنین رابطه ای را نشان نداد [۵۲]. در این ارتباط، مطالعه ای ما با توجه به این که در افراد مبتلا به دیابت و نفروپاتی دیابتی با حداقل ۵ سال سابقه ی بیماری انجام شد،

به ازای هر انحراف معیار افزایش ترئونین سرم خطر دیابت ۲/۵۶۶ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۹۴۶ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش آلانین سرم خطر دیابت ۷/۸۲۴ و خطر نفروپاتی دیابتی ۳/۷۱۲ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش تیروزین سرم خطر دیابت ۴/۴۲۷ و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۵۹۹، به ازای هر انحراف معیار افزایش تریپتوفان سرم خطر دیابت ۴/۱۵۶ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۴۸۰ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش متیونین سرم خطر دیابت ۱۵/۶۱۷ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۶/۹۹۵ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش فنیل آلانین سرم خطر دیابت ۳/۸۰۶ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۸۵۵ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش لوسین سرم خطر دیابت ۶/۵۸۴ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۴۶۶ برابر و به ازای هر انحراف معیار افزایش مجموع اسیدهای آمینه اندازه گیری شده سرم خطر دیابت ۵/۳۰۷ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۳/۳۵۰ برابر شد.

نتایج این مطالعه تا حدود زیادی همسو با نتایج سایر مطالعات انجام شده در این زمینه می باشد. در مطالعات قبلی که پروفایل اسیدهای آمینه را در بیماری دیابت بررسی کرده اند، اسیدهای آمینه شاخه دار (والین، لوسین و ایزولوسین) و آروماتیک (فنیل آلانین و تیروزین) به عنوان عوامل پیشگویی کننده مقاومت به انسولین و بروز دیابت نوع دو گزارش شده است [۳۴-۲۸] و افزایش قند خون با افزایش سطوح این اسیدهای آمینه ارتباط داشته است [۳۵] در مقایسه با این مطالعات، در مطالعه ای ما نیز سطح سرمی فنیل آلانین و لوسین در هر دو گروه دیابتی ($P < 0.001$) و نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد غیردیابتی (به ترتیب، < 0.001 و $P = 0.02$) به طور معنی داری بالاتر بود. سطح سرمی والین و تیروزین نیز در هر دو گروه نفروپاتی دیابتی و دیابتی بالاتر از افراد غیردیابتی بود ($P < 0.05$) ولی در مورد ایزولوسین تنها در گروه دیابت به طور معنی داری بالاتر از گروه غیردیابتی بود. در مطالعه ای دیگری که در فنلاند انجام شد نیز نتایج مشابهی به دست آمد اگرچه کاهش سطح هیستیدین و گلوتامین که در این مطالعه نشان داده شده بود در مطالعه ما به دست نیامد [۳۵].

در یک مطالعه کوهورت، سطوح بالای ۳ اسید آمینه ایزولوسین، فنیل آلانین و تیروزین با افزایش ۵ تا ۷ برابری خطر بروز دیابت ارتباط داشته است و به ازای افزایش هر واحد

کاهش حساسیت بافت‌ها در برابر انسولین، تجزیه پروتئین تا حدودی افزایش می‌یابد و منجر به آزاد شدن اسیدهای آمینه به داخل گردش خون می‌شود [۴۹].

سازوکار احتمالی دیگر تغییر پروفایل اسیدهای آمینه‌ی افراد دیابتی گونه‌های مختلف باکتریایی است که در سنتز BCAA و تجزیه اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک نقش دارند [۵۴]. بنابراین، تغییر میکروبیوم می‌تواند سازوکاری برای تغییرات سطوح سرمی اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک باشد.

در خصوص افزایش آلانین و ارتباط آن با هیپرگلیسمی که هم در این مطالعه و هم در مطالعات دیگر [۵۶، ۵۵، ۳۵] نشان داده شده است باید به گلوکونئوز (سنتز گلوکز از ترکیبات غیرکربوهیدراته) و نقش مهمی که در هموستاز گلوکز دارد اشاره کرد. جایی که آلانین از مهم‌ترین پیش‌سازهای گلوکونئوز به‌شمار می‌رود و مسیرهای دوجانبه چرخه گلوکز آلانین را تشکیل می‌دهد و در مطالعه‌ی، افزایش سطح آلانین با تحمل غیرطبیعی گلوکز ۶/۵ سال قبل از بروز دیابت ارتباط داشته‌است [۵۶]. البته سازوکارهای مولکولی چگونگی ارتباط سطح سرمی آلانین با نتایج تست تحمل گلوکز به‌طور واضح روشن نیست. از طرفی، سطوح ناشی آلانین همبستگی قوی با پیرووات دارد و پیرووات نیز در مسیرهای مختلف گلیکولیتیک دخالت دارد [۵۷] و تبدیل این دو به یکدیگر توسط آنزیم کبدی آلانین آمینوترانسفراز صورت می‌گیرد که سطح پلاسمایی آن در چاقی، کبدچرب و دیابت تغییر می‌یابد [۵۸]. از این‌رو، ارتباطات فوق همگی می‌توانند در تغییر پروفایل آلانین به نحوی مؤثر واقع شود و مطرح کننده سازوکارهای دیگری در ارتباط با تغییر اسیدهای آمینه باشد.

نتیجه‌ی مشابه دیگری که در مطالعه ما و سایر مطالعات نیز گزارش شده‌است، افزایش نسبت اورنی‌تین به سیترولین در گروه دیابتی نسبت به گروه غیردیابتی بود ($P < 0/007$). در مطالعه‌ی Kovamees این نسبت در افراد دیابتی ۶۰ درصد بالاتر بوده‌است. همچنین، افزایش نسبت پلاسمایی اورنی‌تین به آرژینین نیز در بیماران دیابتی گزارش شده است [۳۶] که این افزایش نسبت اورنی‌تین به آرژینین در مطالعه‌ی ما مشاهده نشد. در توجهیه این تغییر می‌توان به نقش آنزیم آرژیناز که واکنش‌های مرحله‌ی پنجم و آخر چرخه‌ی اوره را کاتالیز می‌کند اشاره کرد، این آنزیم اسید آمینه‌ی آرژینین را به

نمی‌تواند پیشگویی کننده‌ی ارتباط تغییرات سطح اسیدهای آمینه با بروز دیابت باشد.

در حال حاضر، در زمینه سازوکار ارتباط تغییرات اسیدهای آمینه شاخه‌دار سرم و مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو دانش اندکی وجود دارد. با این حال، از سازوکارهای دیگر پیشنهادی برای ارتباط تغییرات اسیدهای آمینه‌ی شاخه‌دار با مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو به نقش برجسته بافت چربی در متابولیسم اسیدهای آمینه‌ی شاخه‌دار اشاره شده‌است. به‌طوری‌که، گسترش بافت چربی به همراه تغییر ترشح هورمون‌ها و سیتوکین‌ها، افزایش تون التهابی^۱ و تهاجم ماکروفاژها از وقایع اولیه مقاومت به انسولین ناشی از چاقی شناخته شده‌است [۵۳]. مطالعات بر روی بافت چربی انسانی و حیوانی کاهش بیان و فعالیت آنزیم آمینوترانسفراز شاخه‌دار (BCATm^۲) و دهیدروژناز کتواسید شاخه‌دار (BCKDH^۳) را در چاقی و دیابت نشان داده است. این آنزیم‌ها اولین آنزیم‌هایی هستند که توسط آن‌ها این اسیدهای آمینه ترانس آمینه، دکربوکسیله و دهیدراته می‌شوند. کاهش بیان ژن‌های کاتابولیک پایین دست BCKDH^۴ نیز نشان داده شده است که با افزایش بیان سیتوکین‌های التهابی مانند TNF- α ارتباط دارد. کاهش تجزیه اسید آمینه‌ی لوسین در آدیپوسیت‌های مواجهه یافته با سیتوکین‌های پیش‌التهابی مختل شدن تجزیه میتوکندریایی BCAA را در شرایط التهابی تأیید می‌کند [۴۹]. یک فاکتور رونویسی^۵ به نام PGC-1 α میزان بیان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم BCAA را تنظیم می‌کند. در عضلات اسکلتی دارای بیان بالای PGC-1 α میزان بیان BCATm و BCKDH افزایش می‌یابد ولی BCKDH کیناز بدون تغییر باقی می‌ماند. این امر منجر به کاهش سطوح BCAA بافت عضلانی می‌شود [۴۹]. از طرفی همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، انسولین نیز با اثر مهاری بر روی تجزیه پروتئین و کاهش آزاد شدن اسیدهای آمینه به سیستم گردش خون، سطح سرمی اسیدهای آمینه‌ی شاخه‌دار را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با

^۱ Inflammatory tone

^۲ Branched-chain aminotransferase

^۳ Branched-chain keto acid dehydrogenase

^۴ Downstream

^۵ Transcription factor

^۶ peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha

گروه دیابتی و نفروپاتی دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود.

علاوه بر موارد ذکر شده افزایش سطح سرمی ترئونین، تریپتوفان و لیزین نیز در افراد دیابتی در مطالعه ما مشاهده شد. در مجموع، سطح سرمی اکثر اسیدهای آمینه در بیماران دیابتی و نیز نفروپاتی دیابتی بالاتر از افراد غیردیابتی بود که می‌تواند به دلیل افزایش واضح کاتابولیسم پروتئین در بیماران دیابتی مورد مطالعه باشد.

پروفایل اسیدهای آمینه در نفروپاتی دیابتی در مقایسه با دیابت

در این مطالعه، کاهش معنی‌دار اسیدهای آمینه آلانین، لوسین، ایزولوسین و سرین در نفروپاتی دیابتی در مقایسه با افراد مبتلا به دیابت فاقد نفروپاتی دیابتی مشاهده شد که در آنالیز رگرسیون تعدیل شده برای سن و BMI به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی اسیدهای آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نفروپاتی دیابتی به ترتیب ۳/۲۵۷، ۲/۲۰۷ و ۲/۶۵۲ برابر شد. ولی افزایش خطر نفروپاتی دیابتی به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی لوسین به حد معنی‌داری نرسید.

به‌طور کلی، در نفروپاتی دیابتی در مطالعات مشابه کاهش سطح سرمی لوسین، گلوتامین، متیونین، آرژینین [۴۱، ۴۰، ۱۴، ۱۲] گزارش شده است. در مطالعه‌ی ما نیز سطح لوسین در نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد دیابتی کاهش نشان داد ولی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای بین مطالعه ما و این مطالعات وجود داشت که می‌تواند توجیه‌کننده نتایج متفاوت باشد.

کلیه نقش مهمی در هموستاز مخزن اسیدهای آمینه بدن دارد [۲۷] و ارگان مهمی برای برداشت، برخی از اسیدهای آمینه و ترشح خالص برخی دیگر از اسیدهای آمینه و سنتز تعدادی از آن‌ها برای انتقال به بافت‌های دیگر است [۶۳، ۲۷] و هرگونه تغییری در عملکرد کلیوی ممکن است براساس محل متابولیسم اسیدهای آمینه (به‌عنوان مثال، محل ترشح و بازجذب در قسمت‌های مختلف توبول‌های کلیوی)، سطح سرمی و یا دفع ادراری اسیدهای آمینه را تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی، همانطور که قبلاً اشاره شد تعدادی از اسیدهای آمینه از جمله سرین، گلیسین و اسیدهای آمینه شاخه‌دار از جمله

اورنی‌تین و اوره تبدیل می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم آرژیناز در رت‌های دیابتی گزارش شده است و میزان فعالیت آن با شدت دیابت ارتباط داشته است [۵۹]. بنابراین، به‌نظر می‌رسد مقاومت به انسولین می‌تواند واکنش‌های سیکل اوره را نیز تحت تأثیر قرار داده و منجر به تغییرات سطح سرمی واسطه‌های سیکل اوره گردد.

این مطالعه در چند مورد نیز تفاوت‌هایی با مطالعات قبلی داشت که در ذیل به آن اشاره می‌شود. در یک مطالعه کاهش سطوح برخی اسیدهای آمینه نیز در مقاومت به انسولین مشاهده شده است. سطوح پایین گلیسین با مقاومت به انسولین ارتباط داشته است [۵۵] و پیشگویی‌کننده IGT و دیابت نوع دو بوده است [۶۰] که این ارتباط ممکن است ناشی از نقش گلیسین به‌عنوان پیش‌ساز سنتز گلوکوتایون و پاسخ آنتی‌اکسیدانی باشد [۶۱]. با این حال در مطالعه حاضر، سطوح سرمی گلیسین در افراد دیابتی افزایش یافته بود. این تناقض ممکن است ناشی از تفاوت در وضعیت آنتی‌اکسیدانی افراد مورد بررسی و نیاز به تولید گلوکوتایون و پاسخ آنتی‌اکسیدانی در بدن باشد. سطوح گلوتامین نیز در برخی مطالعات در مقاومت به انسولین کاهش یافته است [۳۵] و سطوح بالای گلوتامین و یا نسبت گلوتامین به گلوتامات با خطر پایین بروز دیابت حتی پس از تعدیل برای BMI و BCAA ارتباط داشته است [۵۶، ۵۶]. در پژوهش حاضر، سطح سرمی گلوتامین برخلاف مطالعه‌ی Stancakova در گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت بالاتر از گروه غیردیابتی بود. در توجیه این تفاوت می‌توان اشاره کرد که گلوتامین فراوان‌ترین اسید آمینه‌ی آزاد سرم است و علاوه بر نقش در سنتز پروتئین‌ها عملکردهای گوناگونی دارد از جمله این‌که اسیدهای آمینه‌ی گلوکوئوژنیک (عمدتاً آلانین و گلوتامین) می‌توانند تولید کبدی گلوکز را افزایش داده و منجر به هیپرگلیسمی شوند [۶۲]. از طرفی نشان داده شده است که اکسیداسیون BCAA در افراد مبتلا به دیابت نوع دو افزایش می‌یابد [۳۵] و این اکسیداسیون باعث تبدیل BCAA به آلانین و گلوتامین در عضلات اسکلتی می‌شود. بنابراین، افزایش سطح سرمی گلوتامین مانند آلانین در مطالعه‌ی حاضر ممکن است ناشی از این سازوکارهای بیوشیمیایی باشد.

گرچه، افزایش قند خون با کاهش سطوح هیستیدین نیز ارتباط داشته است [۳۵]، در پژوهش حاضر سطح سرمی هیستیدین در

کلیه‌ی مبتلا به نروپاتی دیابتی ترشح تیروزین به خون در افراد مبتلا کاهش می‌یابد [۶۷].

از سوی دیگر، این امکان وجود دارد که طبیعت بروز و پیشرفت نروپاتی دیابتی با بیماری مزمن کلیوی با علل غیردیابتی متفاوت باشد. چنانچه در برخی مطالعات افزایش سطوح اورنی‌تین [۱۷]، سیترولین [۳۸، ۳۹، ۱۷]، سرین [۱۷]، گلیسین [۳۸] و آسپارژین [۳۹] در بیماری مزمن کلیوی غیردیالیزی گزارش شده است. بنابراین، انجام مطالعاتی در جهت شناسایی تفاوت‌های متابولومیکس اسیدهای آمینه بین نروپاتی دیابتی و CKD می‌تواند منجر به شناسایی مسیرهای متابولیسمی دخیل در نروپاتی دیابتی گردد.

محدودیت‌های مطالعه

طراحی این مطالعه به صورت مطالعه‌ی مقطعی و مشاهده‌ای بود که پی بردن به رابطه‌ی علت و معلولی بین متغیرها را امکان‌پذیر نمی‌سازد. همچنین، وجود مداخله‌گرهای احتمالی دیگر مانند میزان فشار خون و مدت زمان ابتلا به دیابت که به دلیل حجم نمونه مورد بررسی در تعدیل آنالیزهای آماری دخالت داده نشدند ممکن است نتایج مطالعه را تحت تأثیر قرار داده باشند. اگرچه در این مطالعه، GFR بالاتر و یا مساوی ۶۰ از معیارهای ورود به مطالعه بود، با این حال، آلبومینوری به صورت بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته در گروه نروپاتی دیابتی تعریف شد که محدوده‌ی بالایی برای آن در نظر گرفته نشد و وجود محدوده‌ی وسیعی از مقادیر آن ممکن است بر نتایج مطالعه مؤثر باشد. همچنین، با توجه به این‌که انواع درمان‌های دیابت ممکن است اثرات متفاوتی بر سطوح سرمی اسیدهای آمینه داشته باشد [۶۸] و در طراحی این مطالعه نوع داروهای مصرفی بیماران جزو معیارهای مورد نظر در انتخاب بیماران نبوده است، وجود چنین ناهمگونی ممکن است نتایج مطالعه را تحت تأثیر قرار داده باشد. به عنوان مثال، کاهش سطوح BCAA و AAA در پی درمان با سولفونیل اوره [۶۹] و افزایش آن‌ها در درمان با متفورمین گزارش شده است [۶۸].

اسیدهای آمینه‌ای هستند که به طور واضح تحت تأثیر تعادل اسید-باز کلیوی قرار دارند [۶۴] و بنابراین، قابل انتظار است که به هم خوردن این تعادل در بیماری‌های مختلف کلیه سطوح سرمی این اسیدهای آمینه را تحت تأثیر قرار دهد. از نظر فیزیولوژیک در کلیه سالم گلیسین برداشت و سرین به خون ترشح می‌شود [۶۵] و چنین بیان می‌شود که کلیه محل تبدیل گلیسین به سرین و تولید سرین در بدن انسان است [۶۶]. تبدیل دو مولکول گلیسین به یک مولکول سرین سبب تولید یک بی‌کربنات و یک آمونیاک می‌شود که این فرآیند در حدود ۱۰ درصد تولید کلیوی آمونیاک را برعهده دارد [۶۵]. فرآیند تبدیل گلیسین به سرین در توپول پروگزیمال کلیه انجام می‌شود و این احتمال وجود دارد که در نروپاتی دیابتی اختلال عملکرد توپول پروگزیمال و تغییر سطح سرمی سرین از اولین تغییرات متابولیسم اسیدهای آمینه باشد و اندازه‌گیری سطح سرمی سرین ممکن است ابزار مفیدی در تشخیص زورس نروپاتی دیابتی باشد. چنانکه در مطالعه‌ی ما نیز کاهش سطح سرمی سرین مشاهده شد. نقش کلیه در متابولیسم BCAA به خوبی روشن نیست [۶۶]. در مورد متابولیسم کلیوی سایر اسیدهای آمینه نیز مانند آلانین، ترئونین، هیستیدین، تریپتوفان، آسپارژین، آسپاراتات، لیزین، متیونین، پرولین، اورنی‌تین و سیترولین اطلاعات دقیقی در دسترس نیست. با این حال، ترشح اندکی از آلانین در کلیه‌ی انسان گزارش شده است. به نظر می‌رسد کلیه در ترشح ترئونین، اورنی‌تین و احتمالاً لیزین و آسپاراتات نیز نقش داشته باشد [۶۶]. چنانچه در مطالعه‌ی حاضر نیز کاهش هرچند غیرمعنی‌دار اسیدهای آمینه‌ی ترئونین، لیزین و نیز گلیسین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، گلوتامین و فنیل‌آلانین در مقایسه با افراد دیابتی مشاهده شد که این کاهش اندک سطح سرمی می‌تواند در ارتباط با پیشگویی پیشرفت بیماری کلیوی و دفع اسیدهای آمینه و پروتئین و یا تغییرات اولیه‌ی متابولیسم آن‌ها در توپول‌های کلیوی باشد. به عنوان مثال، در توجیه کاهش ترشح تیروزین به خون در بیماران مبتلا به نروپاتی دیابتی [۶۷] گفته شده است که از آنجا که میزان کل هیدروکسیلاسیون فنیل‌آلانین در نارسایی کلیوی ممکن است کاهش یابد و حدود ۵۰ درصد تبدیل فنیل‌آلانین به تیروزین در کلیه اتفاق می‌افتد، در نتیجه این تغییرات در سنتز پروتئین در

نتیجه گیری

مهمی در مورد تغییر متابولیسم اسیدهای آمینه در بیماران مبتلا به دیابت و بخصوص نفروپاتی دیابتی را در اختیار محققین و پزشکان قرار دهد تا با تکیه بر آن بتوانند به شاخص های جدیدی برای تشخیص نفروپاتی دیابتی در مراحل زودرس و حتی قبل از بروز آلبومینوری دست پیدا کنند و همچنین، با توجه به نقش این تغییرات در پیشرفت بیماری، درمان های بالقوه ای چه در جهت پیشگیری و چه در جهت توقف و یا بهبود عملکرد کلیه ارائه دهند.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم مرکز دیابت و بیماری های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی تهران، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

به طور خلاصه، علاوه بر تفاوت واضح پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه در ۳ گروه از بیماران ما و اثبات معنی داری این تفاوت در تعداد زیادی از اسیدهای آمینه در افراد دیابتی و نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد غیردیابتی در نهایت و با توجه به هدف اصلی این مطالعه نتایج این مطالعه نشان دهنده کاهش سطوح سرمی اسیدهای آمینه سرین، لوسین و آلانین در نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد دیابتی بود. بنابراین، با توجه به این که این مطالعه در افراد مبتلا به مراحل اولیه بیماری انجام شد، این تفاوت در سطوح سرمی اسیدهای آمینه می تواند از نشانه های اولیه ابتلا به نفروپاتی دیابتی و پیشرفت آن باشد. بنابراین، نفروپاتی دیابتی می تواند پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه بیماری را در مراحل اولیه بیماری تحت تأثیر قرار دهد و بررسی این پروفایل قادر خواهد بود اطلاعات

مآخذ

1. Afkarian M, Sachs MC, Kestenbaum B, Hirsch IB, Tuttle KR, Himmelfarb J, et al. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2013; 24(2):302-8.
2. McBrien KA, Manns BJ, Chui B, Klarenbach SW, Rabi D, Ravani P, et al. Health care costs in people with diabetes and their association with glycemic control and kidney function. *Diabetes Care* 2013; 36(5):1172-80.
3. Cea Soriano L, Johansson S, Stefansson B, Rodriguez LA. Cardiovascular events and all-cause mortality in a cohort of 57,946 patients with type 2 diabetes: associations with renal function and cardiovascular risk factors. *Cardiovascular diabetology*. 2015;14:38.
4. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca VA. Oxidants in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2007; 18(1):16-28.
5. Jha JC, Jandeleit-Dahm KA, Cooper ME. New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. *Advances in chronic kidney disease* 2014; 21(3):318-26.
6. Star R, Hostetter T, Hortin GL. New markers for kidney disease. *Clinical chemistry*. 2002;48(9):1375-6.
7. Macisaac RJ, Ekinci EI, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *American journal of kidneydiseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 2014; 63(2 Suppl 2):S39-62.
8. Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander? *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2:S194-201.
9. Sas KM, Karnovsky A, Michailidis G, Pennathur S. Metabolomics and diabetes: analytical and computational approaches. *Diabetes* 2015; 64(3):718-32.
10. Han LD, Xia JF, Liang QL, Wang Y, Wang YM, Hu P, et al. Plasma esterified and non-esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography-mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy. *Analytica chimica acta* 2011; 689(1):85-91.
11. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, et al. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2012; 404(10):3101-9.
12. Jiang Z, Liang Q, Luo G, Hu P, Li P, Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols: application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta* 2009; 77(4):1279-84.
13. Makinen VP, Tynkkynen T, Soyninen P, Forsblom C, Peltola T, Kangas AJ, et al. Sphingomyelin is associated with kidney disease in type 1 diabetes (The FinnDiane Study). *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* 2012; 8(3):369-75.

14. Ng DP, Salim A, Liu Y, Zou L, Xu FG, Huang S, et al. A metabolomic study of low estimated GFR in non-proteinuric type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2012; 55(2):499-508.
15. Pang LQ, Liang QL, Wang YM, Ping L, Luo GA. Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2008; 869(1-2):118-25.
16. Sharma K, Karl B, Mathew AV, GangoiitiJA, Wassel CL, Saito R, et al. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2013; 24(11):1901-12.
17. Sirolli V, Rossi C, Di Castelnuovo A, Felaco P, Amoroso L, Zucchelli M, et al. Toward personalized hemodialysis by low molecular weight amino-containing compounds: *future perspective of patient metabolic fingerprint*. Blood transfusion= Trasfusione del sangue 2012; 10 Suppl 2:s78-88.
18. Xia JF, Liang QL, Liang XP, Wang YM, Hu P, Li P, et al. Ultraviolet and tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 21 pivotal metabolites in plasma from patients with diabetic nephropathy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(20-21):1930-6.
19. Xia JF, Hu P, Liang QL, Zou TT, Wang YM, Luo GA. Correlations of creatine and six related pyrimidine metabolites and diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Clinical biochemistry* 2010; 43(12):957-62.
20. Zhang X, Wang Y, Hao F, Zhou X, Han X, Tang H, et al. Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses. *Journal of proteome research* 2009; 8(11):5188-95.
21. Zhu C, Liang QL, Hu P, Wang YM, Luo GA. Phospholipidomic identification of potential plasma biomarkers associated with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Talanta* 2011; 85(4):1711-20.
22. Zhang Y, Zhang S, Wang G. Metabolomic biomarkers in diabetic kidney diseases-A systematic review. *Journal of diabetes and its complications* 2015; 29(8):1345-51
23. Pena MJ, Lambers Heerspink HJ, Hellemons ME, Friedrich T, Dallmann G, Lajer M, et al. Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2014; 31(9):1138-47.
24. Makinen VP, Tynkkynen T, Soininen P, Peltola T, Kangas AJ, Forsblom C, et al. Metabolic diversity of progressive kidney disease in 325 patients with type 1 diabetes (the FinnDiane Study). *Journal of proteome research* 2012; 11(3):1782-90.
25. Van der Kloet FM, Tempels FW, Ismail N, van der Heijden R, Kasper PT, Rojas-Cherto M, et al. Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society* 2012; 8(1):109-19.
26. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohney RP, Warram JH, et al. Uremic solutes and risk of end-stagerenal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney international* 2014; 85(5):1214-24.
27. Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Bonanni A, Mannucci I, Verzola D. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin Nutr* 2010; 29(4):424-33.
28. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism* 2009; 9(4):311-26.
29. Magnusson M, Lewis GD, Ericson U, Orholm-Melander M, Hedblad B, Engstrom G, et al. A diabetes-predictive amino acid score and future cardiovascular disease. *European heart journal* 2013; 34(26):1982-9.
30. Tai ES, Tan ML, Stevens RD, Low YL, Muehlbauer MJ, Goh DL, et al. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* 2010; 53(4):757-67.
31. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013; 62(2):639-48.
32. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, et al. Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care* 2009; 32(9):1678-83.
33. Chen T, Ni Y, Ma X, Bao Y, Liu J, Huang F, et al. Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations. *Scientific reports* 2016; 6:20594.
34. Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine* 2011; 17(4):448-53.
35. Stancakova A, Civelek M, Saleem NK, Soininen P, Kangas AJ, Cederberg H, et al. Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. *Diabetes* 2012; 61(7):1895-902.
36. Kovamees O, Shemyakin A, Pernow J. Amino acid metabolism reflecting arginase activity is increased in patients with type 2 diabetes and associated with endothelial dysfunction. *Diabetes & vascular disease research*. 2016;13(5):354-360
37. Manna P, Das J, Sil PC. Role of sulfur containing amino acids as an adjuvant therapy in the prevention of diabetes and its associated complications. *Current diabetes reviews*. 2013;9(3):237-48.
38. Benito S, Sanchez A, Unceta N, Andrade F, Aldamiz-Echevarria L, Goicolea MA, et al. LC-QTOF-MS-based targeted metabolomics of arginine-creatine metabolic pathway-related compounds in plasma: application to identify

- potential biomarkers in pediatric chronic kidney disease. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016;408(3):747-60.
39. Duranton F, Lundin U, Gayraud N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(1):37-45.
 40. Zhang J, Yan L, Chen W, Lin L, Song X, Yan X, et al. Metabonomics research of diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus based on UPLC-oeTOF-MS system. *Analytica chimica acta*. 2009;650(1):16-22.
 41. Lee J, Choi JY, Kwon YK, Lee D, Jung HY, Ryu HM, et al. Changes in serum metabolites with the stage of chronic kidney disease: Comparison of diabetes and non-diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;459(5):123-131
 42. Yamakado M, Tanaka T, Nagao K, Ishizaka Y, Mitushima T, Tani M, et al. Plasma amino acid profiles associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects. *Clinical obesity*. 2012;2(1-2):29-40.
 43. Abu-Lebdeh HS, Nair KS. Protein metabolism in diabetes mellitus. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. 1996;10(4):589-601.
 44. Batch BC, Shah SH, Newgard CB, Turer CB, Haynes C, Bain JR, et al. Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness. *Metabolism: clinical and experimental*. 2013;62(7):961-9.
 45. Yousri NA, Mook-Kanamori DO, Selim MM, Takiddin AH, Al-Homsi H, Al-Mahmoud KA, et al. A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control. *Diabetologia* 2015; 58(8):1855-67.
 46. Nakamura H, Jinzu H, Nagao K, Noguchi Y, Shimba N, Miyano H, et al. Plasma amino acid profiles are associated with insulin, C-peptide and adiponectin levels in type 2 diabetic patients. *Nutrition & diabetes* 2014; 4:e133.
 47. Yamakado M, Nagao K, Imaizumi A, Tani M, Toda A, Tanaka T, et al. Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. *Scientific reports* 2015; 5:11918.
 48. McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, et al. Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents. *Pediatric obesity* 2013; 8(1):52-61.
 49. Giesbertz P, Daniel H. Branched-chain amino acids as biomarkers in diabetes. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic Care* 2016; 19(1):48-54.
 50. Tillin T, Hughes AD, Wang Q, Wurtz P, Ala-Korpela M, Sattar N, et al. Diabetes risk and amino acid profiles: cross-sectional and prospective analyses of ethnicity, amino acids and diabetes in a South Asian and European cohort from the SABRE (Southall And Brent REvisited) Study. *Diabetologia* 2015;58(5):968-79.
 51. Yamada C, Kondo M, Kishimoto N, Shibata T, Nagai Y, Imanishi T, et al. Association between insulin resistance and plasma amino acid profile in non-diabetic Japanese subjects. *Journal of diabetes investigation* 2015; 6(4):408-15.
 52. Zhao J, Zhu Y, Hyun N, Zeng D, Uppal K, Tran VT, et al. Novel metabolic markers for the risk of diabetes development in American Indians. *Diabetes Care* 2015; 38(2):220-7.
 53. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, Shah J, Zafar N, et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2014; 307(3):E262-77.
 54. Park JH, Lee SY. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Applied microbiology and biotechnology* 2010; 85(3):491-506.
 55. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, Lewis GD, McCabe EL, Shen D, et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 2012; 125(18):2222-31.
 56. Wurtz P, Tiainen M, Makinen VP, Kangas AJ, Soinen P, Saltevo J, et al. Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women. *Diabetes Care* 2012; 35(8):1749-56.
 57. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; 9(3):193-205.
 58. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E, et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004; 53(11):2855-60.
 59. Ramirez-Zamora S, Mendez-Rodriguez ML, Olguin-Martinez M, Sanchez-Sevilla L, Quintana-Quintana M, Garcia-Garcia N, et al. Increased erythrocytes by-products of arginine catabolism are associated with hyperglycemia and could be involved in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *PloS one* 2013; 8(6):e66823.
 60. Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, Messias AC, Floegel A, He Y, et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Molecular systems biology* 2012;8:615.
 61. Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, et al. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care* 2011; 34(1):162-7.
 62. Krebs M, Brehm A, Krssak M, Anderwald C, Bernroider E, Nowotny P, et al. Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 2003; 46(7):917-25.

63. Kopple JD. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *The Journal of nutrition* 2007;137(6 Suppl 1):1586S-90S; discussion 97S-98S.
64. Patience JF. A review of the role of acid-base balance in amino acid nutrition. *Journal of animal science* 1990; 68(2):398-408.
65. Lowry M, Hall DE, Hall MS, Brosnan JT. Renal metabolism of amino acids in vivo: studies on serine and glycine fluxes. *The American journal of physiology* 1987; 252(2 Pt 2):F304-9.
66. Van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *The American journal of clinical nutrition* 2004; 79(2):185-97.
67. Boirie Y, Albright R, Bigelow M, Nair KS. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency. *Kidney international* 2004; 66(2):591-6.
68. Walford GA, Davis J, Warner AS, Ackerman RJ, Billings LK, Chamarthi B, et al. Branched chain and aromatic amino acids change acutely following two medical therapies for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental* 2013; 62(12):1772-8.
69. Laferrere B, Reilly D, Arias S, Swerdlow N, Gorroochurn P, Bawa B, et al. Differential metabolic impact of gastric bypass surgery versus dietary intervention in obese diabetic subjects despite identical weight loss. *Science translational medicine* 2011; 3(80):80re

EVALUATION OF SERUM AMINO ACIDS PROFILE IN DIABETIC NEPHROPATHY

Ali Jalili¹, Farideh Razi², Ensieh Nasli-Esfahani², Mostafa Qorbani^{1,3}, Bagher Larijani^{1*}

1. Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Diabetes Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Community Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

ABSTRACT

Background: Diabetic nephropathy is a chronic kidney disease and of more common complications of type 2 diabetes mellitus. The current diagnostic markers of diabetic nephropathy, albumin and creatinine, are only able to catch the disease in the stage of renal damage. The aim of this study is evaluation of targeted metabolomics of serum amino acids to identify the association of the changes of serum amino acid profile with diabetes and diabetic nephropathy.

Methods: This cross-sectional study was conducted in 2015-2016 on thirty patients with type 2 diabetes subsequent diabetic nephropathy and thirty type 2 diabetic patients without nephropathy attending diabetes clinic of endocrinology and metabolism institute and thirty non diabetic persons. Blood hemoglobin, HbA1c and BUN and also, serum albumin, uric acid and the albumin/creatinine ratio from a random urine specimen were measured by standard methods and serum amino acids level were identified using high performance liquid chromatography (HPLC). Statistical analysis ANOVA, Kruskal-Wallis, and nominal regression were used for the comparison of the investigated groups.

Results: significant differences were seen in serum levels of 8 essential, branched-chains, aromatic and 8 non-essential amino acids alanine, aspartic acid, serine, glutamine, arginine, glycine, tyrosine and ornithine between three groups. Serum levels of arginine and isoleucine were higher in the diabetic group than non-diabetics. However, Levels of amino acids serine, glutamine, glycine, threonine, tyrosine, tryptophan, methionine, valine, ornithine, and lysine in 2 groups of diabetic nephropathy and diabetes were higher than non-diabetic patients.

For every standard deviation decrease in serum levels of amino acids serine, alanine and isoleucine, in comparison to diabetic patients, the risk of diabetic nephropathy were increased 3.257 (95%CI: 0.10- 0.94, $P=0.039$), 2.207 (95%CI: 0.18- 0.81, $P=0.039$) and 2.652 (0.21- 0.96, $P=0.012$), respectively.

Conclusion: Since this study was conducted in patients in the early stages of the disease, reduced serum levels of the amino acids serine, leucine and alanine may be associated with development and progression of diabetic nephropathy. and in the future with more studies in this field can be used in metabolic control and improvement of the prognosis of patients with diabetic nephropathy.

Keywords: Diabetic nephropathy, Targeted metabolomics, Aminoacids, Type 2 diabetes mellitus

* Floor 5th, Shariati Hospital, North Karegar St., Tehran, Iran, Postal Code: 1411413137, Tel: +982188220037, Fax: +982188220052, E-mail: emrc@tums.ac.ir