

ارتباط سطح نیتریک اکسید و دی متیل آرژنین نامتقارن با غلظت هموگلوبین در بیماران سیکل سل

چکیده

زمینه و هدف: اهمیت نیتریک اکسید (NO) و دی متیل آرژنین نامتقارن (ADMA)، در پاتوفیزیولوژی عوارض بیماری سیکل سل (SCD) به طور فزاینده ای در حال روشن شدن می باشد. با توجه به محدودیت مطالعات موجود در این زمینه و این که تاکنون مطالعه ای در ایران و به ویژه در استان خوزستان که یکی از کانون های بیماران سیکل سلی در سطح کشور می باشد، انجام نگرفته است، این مطالعه انجام شد.

روش بررسی: از 35 نفر از افراد سالم (Hb AA)، 35 بیمار هتروزیگوت (Hb AS) و 35 بیمار هموزیگوت (Hb SS) سیکل سل، نمونه خون وریدی روی ضد انعقاد EDTA تهیه شد. اندازه گیری NO به روش کالریمتریک و گریس و اندازه گیری ADMA با روش الیزا انجام شد. نتایج حاصل، با استفاده از آزمون *t-student* و ANOVA یک طرفه، مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: یک ارتباط معنی دار مثبت بین دو متغیر Hb و NO در گروه های SS ($r = 0/703$) و AS ($r = 0/366$)، مشاهده شد ($p < 0/05$). همچنین بین دو متغیر Hb و ADMA در گروه های SS ($r = - 0/786$) و AS ($r = - 0/478$)، یک ارتباط معنی دار معکوس به دست آمد ($p < 0/05$). ارتباطی بین پارامترهای مذکور در گروه AA مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با پیشگیری از کاهش سطح هموگلوبین و تجویز دهنده های NO و یا تجزیه کننده های ADMA می توان به بهبود علائم بالینی این بیماران کمک نمود.

واژه های کلیدی: نیتریک اکسید (NO)، دی متیل آرژنین نامتقارن (ADMA)، بیماری

سیکل سل (SCD)

منیژه کدخدایی الیادرائی

دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

مراد رستمی

کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

بیژن کیخایی

استادیار، هماتولوژی و انکولوژی کودکان، بیمارستان شفا و مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

محمد پدram

استاد، هماتولوژی و انکولوژی کودکان، بیمارستان شفا و مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده مسئول: منیژه کدخدایی الیادرائی

تلفن: 09161133638

پست الکترونیک:

Kakhodaeim@hotmail.com

آدرس: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

وصول مقاله: 89/9/27

اصلاح نهایی: 89/11/23

پذیرش مقاله: 90/1/24

مقدمه

بیماری سیکل سل (SCD)، در نتیجه یک موتاسیون منفرد در ژن زنجیره بتای گلوبین ایجاد می شود؛ به گونه ای که در جایگاه ششم این زنجیره، اسید آمینه والین جایگزین اسید آمینه گلوتامیک اسید شده و هموگلوبین S (HbS) را ایجاد نموده است. HbS در شرایط کمبود یا فقدان اکسیژن، تمایل به پلیمریزه شدن دارد و گلوبول های قرمز دارای این نوع هموگلوبین، منجر به ایجاد آنمی همولیتیک مزمن و انسداد عروق مختلف و آسیب ارگان های ایسکمیک و کاهش طول عمر فرد مبتلا می گردند (1). این انسدادهای عروقی به طور پیوسته رخ می دهد و با تشدید آنها معمولاً بیمار مجبور به مراجعه به بیمارستان و بخش اورژانس می گردد (2). نیتریک اکسید (NO) در بدن، از نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و از آرژنین ساخته می شود و دارای عملکردهای بسیار متنوعی است و نقش آن در پاتوفیزیولوژی عوارض مرتبط با SCD به طور فزاینده ای در حال روشن شدن می باشد (3). NO دارای ویژگی منبسط کنندگی عروقی بوده، با ویژگی تعدیل کنندگی سلول های اندوتلیال فعال می شود، مهار تکثیر و مهاجرت سلول های عضلات صاف، محدود کننده تجمع پلاکتی و ترمیم کننده آسیب بافتی ناشی از ایسکمیک، دارای نقشی محوری در هموستاز عروقی می باشد (4). در مرحله بدون علائم بالینی بیماران سیکل سل، میزان NO در نتیجه مصرف آن توسط هموگلوبین آزاد شده از گلوبول های قرمز، کاهش می یابد (5). نشان داده شده است که در طی کریزهای دردناک، میزان NO، کاهش بیشتری پیدا می نماید (6-7).

دی متیل آرژنین نامتقارن (ADMA) یک بازدارنده اندوژنوس NOS بوده (8) که در طی یک بررسی، میزان آن در مرحله بدون علائم بالینی بیماران سیکل سل، افزایش یافته است (9). ADMA به طور رقابتی موجب مهار NOS و در نتیجه، کاهش تولید NO می گردد. ADMA خود توسط دی متیل آرژنین دی متیل آمینو هیدرولاز (DDAH)، تجزیه و غیر فعال می شود. هیپوکسی و افزایش سطح سیتوکاین های پیش التهابی ممکن است منجر به مهار و یا تنظیم منفی DDAH گردند (10-11). از آن جایی که در طی انسداد

عروقی در بیماران سیکل سل، هیپوکسی و التهاب نیز رخ می دهد (12)، افزایش بیشتر سطح ADMA و در نتیجه، کاهش سطح NO در بیماران سیکل سل، قابل انتظار خواهد بود. با توجه به مطالعات بسیار محدود موجود در این زمینه و این که تاکنون مطالعه ای در ایران و به ویژه در استان خوزستان که یکی از کانون های بیماران سیکل سلی در سطح کشور می باشد، انجام نگرفته است و همچنین با هدف بررسی این فرضیه و روشن شدن بیشتر این ساز و کار، مطالعه حاضر انجام شد.

روش بررسی

از 35 بیمار هموزیگوت سیکل سل (Hb SS)، 35 بیمار هتروزیگوت سیکل سل (Hb AS) و 35 نفر از افراد سالم (Hb AA) به عنوان گروه کنترل، نمونه خون وریدی و بر روی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و پلاسماهای آنها بلافاصله جدا گردید. بیماران سیکل سلی در هنگام نمونه گیری در وضعیت بدون علائم بالینی بوده، در طی 4 ماه قبل از نمونه گیری، خون دریافت ننموده اند. نمونه گیری بیماران در حالت ناشتا صورت گرفت که در طی آن، همه بیماران به مدت 8-12 ساعت ناشتا بودند. نمونه ها بلافاصله در دور $1700 \times g$ و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شدند و پلاسماهای آنها جدا و تا روز انجام آزمایش، در دمای -70 درجه سانتیگراد، نگهداری گردیدند. میزان NO توسط کیت اندازه گیری NO از شرکت کال بیوکم (NO Assay Kit, Colorimetric, Cat. NO.482650) و به روش کالریمتریک و روش گریس انجام شد. غلظت پلاسمایی ADMA نیز با روش الیزا و توسط کیت شرکت DLD Diagnostica GmbH انجام گردید. ضریب تغییرات inter-assay و intra-assay برای هر دو مورد NO و ADMA، به ترتیب کمتر از 3 و 1/5 درصد بود. نتایج به صورت $\pm SD$ میانگین بیان شدند. نتایج بین گروه های مختلف، به وسیله آزمون t-student و ANOVA یک طرفه، مورد بررسی قرار گرفتند و با همدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

در این مطالعه، میزان NO در گروه های مختلف به صورت $SS > AS > AA$ به دست آمد که این اختلاف از نظر

بحث

مطالعات اخیر، نشان دهنده نقش احتمالی NO در پاتوفیزیولوژی SCD می باشند. هموگلوبین آزاد شده در نتیجه همولیز گلبول های قرمز در این بیماران، موجب مصرف NO و پروسه های مختلف متعاقب آن می گردند. نشان داده شده است که درمان های مبتنی بر افزایش تولید، کاهش تخریب و یا تقویت پاسخ های NO در این بیماران ممکن است مفید باشد (13).

نقش ADMA در بیماری های عروقی مختلف از جمله در بیماران با نارسایی کلیوی، آترواسکلروتیک، سکت و ... به اثبات رسیده است (9-10). ADMA در سلول های مختلف بدن و از جمله در سلول های اندوتلیال به طور پیوسته ساخته می شود (14). افزایش غلظت ADMA از طریق مهار آنزیم NOS موجب کاهش تولید NO می گردد (10). مسیر اصلی متابولیسم ADMA از طریق تجزیه توسط DDAH صورت گرفته (11) و مقدار ناچیزی از آن نیز از طریق کلیه ها دفع می گردد (14). از آن جایی که در طی پاسخ های التهابی، عملکرد DDAH مهار می گردد، بنابراین انتظار افزایش غلظت ADMA در طی پاسخ های التهابی و به ویژه در طی کریزهای دردناک خواهد رفت (12). هیپوکسی نیز از جمله علل تنظیم منفی سنتز DDAH به شمار رفته و در مواردی که بیماران سیکل سلی در شرایط هیپوکسی قرار بگیرند، احتمال افزایش در غلظت ADMA به ویژه در طی کریزهای دردناک خواهیم داشت (15).

در این مطالعه، کمترین مقدار NO و بیشترین مقدار ADMA در گروه SS مشاهده شد. همچنین در این مطالعه، بین جنسیت و متغیر NO در هیچ کدام از گروه ها ارتباطی به دست نیامد؛ در حالی که در گروه AS بین متغیر جنسیت و ADMA، یک ارتباط معنی دار معکوس به دست آمد و نشان داد که زن ها در مقایسه با مردان در این گروه، دارای غلظت بالاتری از ADMA می باشند. با توجه به این یافته، انتظار می رود که متابولیسم ADMA در خانم ها نسبت به آقایان کمتر باشد و این یافته ممکن است ناشی از بیان یا دفع کلیوی کمتر DDAH در خانم ها نسبت به آقایان باشد که با انجام مطالعات

آماری، معنی دار بود ($p < 0/05$). همچنین، غلظت ADMA به صورت $AA > AS > SS$ به دست آمد که اختلاف بین نتایج آنها نیز از لحاظ آماری، معنی دار بود ($p < 0/05$).

آزمون مقایسه میانگین متغیر F در دو گروه AS و SS نیز همراه با تفاوت معنی دار می باشد و بیان می کند که میانگین در گروه AS ($0/25 \pm 17$) می باشد که در مقایسه با گروه SS ($16/03 \pm 11/04$) کمتر می باشد. بین دو متغیر جنسیت و NO در هیچ کدام از سه گروه (AA، SS و AS) ارتباط معنی داری به دست نیامد ($p > 0/05$). در ارتباط با دو متغیر جنسیت و ADMA، نتایج، تنها بیانگر وجود یک ارتباط معنی دار منفی (معکوس) در گروه AS می باشند ($p < 0/05$) و نشان می دهد که زنها در مقایسه با مردها دارای ADMA بیشتری می باشند. مقدار ضریب همبستگی اسپیرمن برای این دو متغیر برابر با $r = -0/375$ می باشد.

ادامه بررسی ها نشان می دهد که بین دو متغیر سن افراد و NO در هر کدام از گروهها و همچنین بین دو متغیر سن و ADMA در هر یک از گروهها ارتباط معنی دار آماری وجود ندارد ($p > 0/05$). بررسی وجود ارتباط بین دو متغیر Hb و NO در هر یک از گروههای آزمایشی نشان می دهد که تنها برای دو گروه SS و AS ارتباط معنی داری مثبتی بین متغیرها وجود دارد ($p < 0/05$) که این ارتباط بیان می نماید که با افزایش مقدار Hb، میزان NO نیز افزایش پیدا می کند. میزان ضریب همبستگی پیرسون بین متغیرها در گروه های SS و AS به ترتیب $r = 0/703$ و $r = 0/366$ می باشد.

نتایج حاصل از بررسی وجود ارتباط بین دو متغیر Hb و ADMA در هر یک از گروههای آزمایشی نشان از وجود ارتباط معنی دار منفی (معکوس) در دو گروه SS و AS می باشد ($p < 0/05$) و بیان می نماید که با افزایش میزان Hb در هر یک از این گروهها، میزان ADMA کاهش پیدا می کند و بالعکس. میزان ضریب همبستگی پیرسون بین متغیرها در این دو گروه به ترتیب $r = -0/786$ و $r = -0/478$ می باشد. همچنین در ادامه بررسی ها، ارتباط بین متغیر F با هر یک از متغیرهای NO، Hb و ADMA در هر یک از دو گروه SS و AS هیچ گونه ارتباط معنی داری را بیان نمی نماید ($p > 0/05$) (جدول 1).

بیشتر به این یافته می توان پی برد.

بین متغیر سن و غلظت های NO و ADMA در هیچ کدام از گروه ها ارتباطی مشاهده نشد. بین میزان Hb و غلظت NO در گروه های SS و AS، یک ارتباط مستقیم به دست آمد که در آن با افزایش غلظت هموگلوبین، غلظت NO نیز افزایش می یابد. بنابراین در هر دو فرم هموزیگوت و هتروزیگوت سیکل سل، انتظار می رود که با بالا نگهداشتن سطح هموگلوبین و جلوگیری از کاهش سطح آن با تجویز به موقع و تجویز خون های تازه و با سازگاری بالا در این بیماران بتوان سطح NO را در این بیماران بالا نگه داشت و وقوع کریزهای دردناک و علائم بالینی را در این بیماران کاهش داد.

همچنین بین غلظت Hb و ADMA در گروه های SS و AS، یک ارتباط معنی دار معکوس مشاهده شد و همان طوری که در این پژوهش نیز مشخص شد، انتظار می رود که با افزایش غلظت ADMA، در این گروه ها از بیماران، شاهد کاهش NO باشیم.

در مطالعه Precious و همکاران، بیشترین و کمترین مقدار ADMA به ترتیب در گروه های SS و AA به دست آمده است (16) که با نتایج حاصل از مطالعه ما کاملاً همخوانی دارد. همچنین در مطالعه آنها، غلظت ADMA در وضعیت بدون علائم بالینی نسبت به مرحله کریزهای دردناک در گروه SS نسبت به گروه SC بالاتر بوده است؛ اگر چه این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبوده است (16).

در مطالعه Schnog و همکاران، غلظت ADMA در گروه های مختلف به ترتیب $SS > SC > AA$ بوده است که از نظر آماری نیز این اختلاف معنی دار بوده است و با نتایج حاصل از مطالعه ما همخوانی دارد. همچنین در مطالعه آنها غلظت NO نیز به ترتیب $SS > SC > AA$ بوده است و نشان دهنده افزایش هر چند غیر معنی دار غلظت NO در گروه SS نسبت به دو گروه دیگر می باشد (9) که با نتایج حاصل از مطالعه ما که در آن کمترین مقدار NO را در گروه SS داشتیم، کاملاً متناقض می باشد.

در مطالعه Landburg و همکاران، نتایج حاصل از غلظت ADMA در بیماران سیکل سل، همانند مطالعه Schnog و همکاران بوده؛ با این تفاوت که در مطالعه Landburg و همکاران، در طی کریزهای دردناک، افزایشی در غلظت ADMA مشاهده نشده است (12).

در سال های اخیر، کاهش سطح NO عاملی مهم در پاتوفیزیولوژی بیماران سیکل سل معرفی شده است (17). همچنین در این بیماران، افزایش غلظت ADMA مشاهده شده است که موجب کاهش هر چه بیشتر NO و ایجاد عوارض متعاقب کاهش سطح NO می گردد (2 و 18).

در این مطالعه، افزایش غلظت ADMA که یک بازدارنده رقابتی برای آنزیم NOS می باشد، در بیماران دارای آنمی سیکل سل به ویژه در گروه SS نسبت به گروه AS در وضعیت بدون علائم کلینیکی مشاهده شد. بیماران دارای سیکل سل همچنین دارای غلظت کمتری از NO در مقایسه با گروه AA می باشند. افزایش غلظت ADMA و همچنین کاهش سطح NO با اختلال وابسته به اندوتلیوم ناشی از منبسط کنندگی عروقی وابسته به NO، همراه می باشد. ADMA و NO ممکن است مسئول اصلی عملکرد نامطلوب منبسط شوندگی عروقی باشند و بتوانند به عنوان عاملی جدید در کاهش سطح NO در بیماران دارای آنمی سیکل سل مطرح گردند.

تشکر و قدردانی

این طرح در قالب طرح تحقیقاتی شماره TH 88/3 و با پشتیبانی مالی مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به انجام رسیده است که بدین وسیله قدردانی می گردد. همچنین از سرکار خانم صالحه شانه، سرپرستار بخش و درمانگاه تالاسمی بیمارستان شفا، جهت همکاری و معرفی بیماران و جناب آقای مجید صفایی، کارشناس آزمایشگاه بیمارستان شفا که در تهیه نمونه ها و نمونه گیری از بیماران همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می گردد.

جدول شماره 1: ویژگی های بیماران و افراد کنترل و نتایج یافته های آنها

P	Hb SS	Hb AS	Hb AA	عوامل مورد بررسی
	35	35	35	تعداد
	24 به 11	19 به 16	16 به 19	مرد به زن
	10 / 31±10/15	24/9 ±10/4	5 2± 5/23	سن (سال)
	(4-45)	(15-75)	*(17-41)	
	9/52 ±1/76	13 /69±1 /65	13/24± 0/91	Hb (mg/dl)
	(5/9-12/5)	(10/6-17)	(11/8-15/1)	
	29/2± 5/5	41/74± 7/45	40/22± 3/18	Hct (%)
	(16-39)	(10/3-50/4)	(16-39)	
<0.05	0 /16± 0/04	0/23±0 /04	0/32± 0/06	NO (µmole/l)
	(0/08-0/24)	(0/16-0/32)	(0/21-0/42)	
<0.05	0/64± 0/08	0/41 ± 0/ 06	0/32± 0/05	ADMA (µmole/l)
	(0/52-0/79)	(0/3-0/54)	(0/23-0/43)	
<0.05	16/ 03±11/04	0/25± 0/17	اندازه گیری نشد	Hb F
	(0-34/6)	(0/1-0/6)		

* دامنه تغییرات هر متغیر

References

1- Serjeant GR. Sickl cell disease. Lancet .1997; 350: 725-730.

2- Schnog JJ, Lard LR, Rojer RA, Van der Dijs FP, Muskiet FA, Duits AJ. *New concepts in assessing sickle cell disease severity*. Am J Hematol .1998;58(1):61-6.

3- Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor J 6th, Little J, Butman JA, etal. *Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension*. Am J Hematol . 2006;81(7):503-10.

4- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*. JAMA. 2005 ; 293(13):1653-62

5-Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP, Duits AJ, Moshage H, Muskiet FD, etal. *Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease*. Ann Hematol . 2004;83(6):371-5.

6-Stuart MJ, Setty BN. *Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment*. Blood . 1999; 94(5): 1555-60.

7-Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. *Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome*. J Pediatr Hematol Oncol . 2000;22(6):515-20.

8- Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H, etal. *Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood*. Metabolism . 2008 ;57(2):215-20.

9-Schnog JB, Teerlink T, van der Dijs FP, Duits AJ, Muskiet FA; CURAMA Study Group. *Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, are elevated in sickle cell disease*. Ann Hematol . 2005;84(5):282-6.

10- Siroen MP, Teerlink T, Nijveldt RJ, Prins HA, Richir MC, van Leeuwen PA. *The clinical significance of asymmetric dimethylarginine*. Annu Rev Nutr. 2006;26:203-28.

11-Wilcken DE, Sim AS, Wang J. *asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism*. Mol Genet Metab . 2007; 91: 309-317.

12- Landburg PP, Teerlink T, Muskiet FA, Duits AJ, Schnog JJ; CURAMA study group. *Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, are elevated in sickle cell patients but do not increase further during painful crisis*. Am J Hematol. 2008;83(7):577-9.

13- Mack AK, Kato GJ. *Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift?* Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(8):1237-43.

- 14- Nijveldt RJ, Teerlink T, van Leeuwen PA. *The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis*. Clin Nutr. 2003;22(1):99-104.
- 15- Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, et al. *Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation. 2003 ; 108(12): 1493-8.
- 16-Precious PL, Tom T, Frits AJM, Ashley JD , John-John BS. *Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, are elevated in sickle cell patients but don't increase further during painful crisis*. American J. of Hemotol. 2008; 83: 577-579.
- 17- Reiter CD, Gladwin MT. *An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy*. Curr Opin Hematol. 2003;10(2):99-107.
- 18- Landburg PP, Teerlink T, van Beers EJ, Muskiet FA, Kappers-Klunne MC, van Esser JW, et al. *Association of asymmetric dimethylarginine with sickle cell disease-related pulmonary hypertension*. Haematologica. 2008;93(9):1410-2