

بررسی ارتباط سطح گلوکاتایون پراکسیداز سرم و گلبول های قرمز با سطح هوموسیستئین سرم بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد

حمید رضا جوشقانی^۱ (Ph.D)، احمد رضا بندگی*^۲ (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی گلستان-آموزشکده پیرایشکی - گروه علوم آزمایشگاهی

۲- دانشگاه علوم پزشکی سمنان- دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی

چکیده

سابقه و هدف: علی‌رغم موفقیت‌هایی که در درمان‌های دارویی و غیر دارویی به منظور کاهش خطر بیماری‌های کرونری قلب صورت گرفته است هنوز این بیماری‌ها و انفارکتوس میوکارد علت عمده مرگ و میر در بیشتر کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شوند. گزارشات فراوانی در خصوص احتمال ارتباط بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش هوموسیستئین با پاتوژنز آترواسکلروز منتشر شده‌اند. هدف این تحقیق بررسی ارتباط افزایش هوموسیستئین سرم با تغییرات سطح آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) پس از سکته قلبی بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع توصیفی-تحلیلی و مقطعی بود که در سال ۱۳۸۵ بر روی ۴۸ بیمار و ۴۸ فرد سالم کمتر از ۷۶ سال انجام پذیرفت. از هر دو گروه در شرایط ناشتا خون گرفته شد. بر روی نمونه‌ها آزمایش هوموسیستئین به روش ELISA توسط کیت IBL و میزان فعالیت GPx توسط کیت راندوکس انجام شد.

یافته‌ها: از ۴۸ بیماری که در این مطالعه شرکت داشتند ۳۶ نفر مرد و ۱۲ نفر زن بودند. در گروه شاهد ۲۹ نفر مرد و ۱۹ نفر زن حضور داشتند. میانگین غلظت هوموسیستئین در گروه بیمار $5/3 \pm 30/3$ میکرومول بر لیتر و در گروه شاهد $3/1 \pm 11/1$ میکرومول بر لیتر بود که بیانگر تفاوت معنی داری بین دو گروه است ($P < 0/001$). میانگین فعالیت GPx گلبول های قرمز بیماران $40/0 \pm 20/5$ U/g Hb و گروه شاهد $37/1 \pm 20/3$ U/g Hb بدست آمد که بین دو گروه از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین میانگین فعالیت GPx سرم بیماران $464/8 \pm 90/0$ U/L و گروه شاهد $423/3 \pm 97/1$ U/L بدست آمد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: در این مطالعه افزایش سطح هوموسیستئین سرم و GPx سرم و گلبول های قرمز در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد افزایش GPx بعلت آسیب سلولی است و به دنبال آن این آنزیم موجب مهار رادیکال‌های آزاد و آسیب های وارده به سلول می‌گردد.

واژه های کلیدی: سکته قلبی، گلوکاتایون پراکسیداز، هوموسیستئین، آنتی اکسیدان

مقدمه

انفارکتوس میوکارد علت عمده مرگ و میر در بیشتر کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود [۱]. انفارکتوس میوکارد زمانی روی می‌دهد که جریان خون کرونری در اثر انسداد یک سرخرگ کرونری (که از قبل به علت آترواسکلروز

علی‌رغم تلاش‌ها و موفقیت‌هایی که در درمان‌های دارویی و غیر دارویی به منظور کاهش خطر بیماری‌های کرونری قلب صورت گرفته است هنوز بیماری‌های کرونری قلب و

را در بیماران مبتلا به انفکتوس حاد میوکارد و افراد سالم به عنوان گروه کنترل مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی-تحلیلی است که بر روی ۴۸ بیمار بستری در بخش CCU بیمارستان پنجم آذر گرگان انجام پذیرفت. از بیمارانی که حداکثر ۲۴ ساعت از زمان بستری شدن آنها می‌گذشت و سابقه مصرف فولات، B12 و ویتامین E را به عنوان مکمل در سال‌های اخیر نداشتند، پس از معاینات بالینی توسط پزشک متخصص قلب و انجام آزمایشات روتین شامل نوار قلبی و آنزیم‌های کراتین فسفوکیناز و لاکتات دهیدروژناز در شرایط ناشتا ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته شد. نمونه‌ها هر روز به آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه منتقل و پس از جدا سازی سرم‌ها در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین ۴۸ فرد سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیمار همتراز شده بودند. پس از اخذ شرح حال مبنی بر نداشتن هیچ‌گونه سابقه MI، فشارخون بالا و هیپرلیپیدمی در شرایط ناشتا خون‌گیری بعمل آمد. مراحل ابتدایی بر روی نمونه‌ها همانند گروه بیمار اعمال گردید.

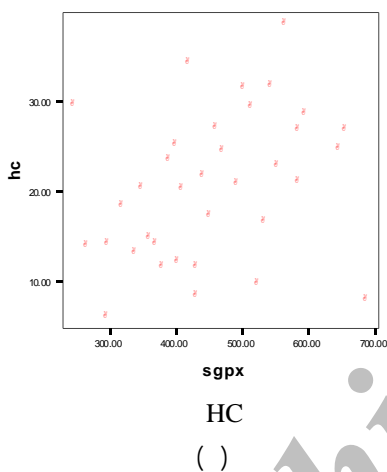
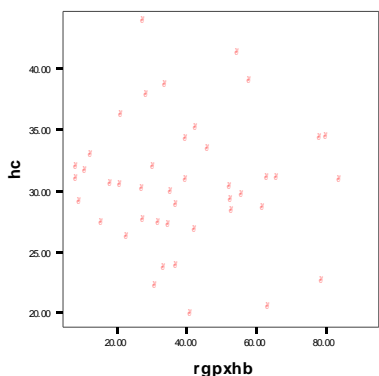
پس از جدا سازی سرم و پلاسما بر روی نمونه‌ها آزمایشات هوموسیستئین به روش ELISA، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز گلوبول‌های قرمز (rGPx) توسط کیت راندوکس به صورت دوپلیکیت و میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز سرم (sGPx) با استفاده از کیت راندوکس بدون رقیق سازی انجام شد. در این روش GPx، گلوتاتیون احیاء را در مجاورت Cumene hydroperoxide اکسید می‌نماید. در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسید شده به شکل احیاء و NADPH به NADP تبدیل می‌گردد. این واکنش همراه با کاهش جذب نوری در ۳۴۰ nm می‌باشد. همچنین بر روی افراد همتراز شده با گروه بیماران که توسط پزشک متخصص معاینه شده و از نظر بیماری قلبی عروقی سالم تشخیص داده شدند و بیماری زمینه‌ای مانند

تنگ شده) ناگهان کاهش یابد [۱]. رادیکال‌های آزاد به میزان اندک طی فرایند متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند در حالی که در شرایط پاتولوژی مقدار زیادی از این مولکول‌ها در سلول‌ها می‌گردند [۲]. در بدن دوسیستم آنزیمی و غیر آنزیمی جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد وجود دارد [۳]. سیستم جذب اکسیژن از آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx, EC 1.11.1.9) تشکیل شده است [۴]. مطالعه بر روی میزان آنتی‌اکسیدان‌ها تحت شرایط پاتولوژی ممکن است منجر به فهم بهتر نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در حفظ و حمایت میوکارد شود [۵]. GPx یک نقش بسیار مهم در حمایت از سلول‌های قلبی در برابر صدمات ایسکمیک به عهده دارد [۶].

یکی دیگر از عوامل خطر بیماری‌های کرونری قلب که مورد بررسی قرار گرفته است هوموسیستئین (HC) سرم بیماران در معرض خطر می‌باشد. Wilson و Mcully برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ تئوری ارتباط بین آترواسکلروزیس و HC را مطرح نمودند [۷]. در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی بر روی ارتباط افزایش هوموسیستئین با بیماری قلبی عروقی انجام گردیده است [۸]. Schwartz و همکارانش نشان داده‌اند که سطوح بالای هوموسیستئین به طور قابل توجهی با خطر انفارکتوس میوکارد و مرگ ناشی از بیماری‌های کرونری قلب ارتباط دارد [۹]. نتایج مطالعات روی بیماران قلبی عروقی نشان می‌دهند که سطوح بالاتر هوموسیستئین با ضخامت و پلاک دیواره انتیمای میانی شریان کاروتید مرتبط است. اگرچه در مطالعات اخیر رابطه علیتی بین افزایش متوسط هوموسیستئین و خطر بیماری‌های عروقی و آترواسکلروز دیده نشده است. هوموسیستئین نه تنها در تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS, reactive oxygen species) نقش دارد بلکه گزارشات اخیر نشان می‌دهد که این آمینو اسید موجب مهار بیان GPx نیز می‌گردد [۱۰].

با توجه به موارد فوق بر آن شدیم تا میزان گلوتاتیون پراکسیداز را در سرم و گلوبول‌های قرمز و هوموسیستئین سرم

بین افزایش هموسیستئین با تغییرات GPx سرم و گلبول‌های قرمز ارتباط معنی داری دیده نشد (شکل ۱). همچنین بین افزایش سن با تغییرات GPx ارتباط معنی دار آماری مشاهده نشد.



HC () ()

بحث

در این مطالعه مشاهده شد که فعالیت GPx بیماران هم در سرم و هم در گلبول‌های قرمز در گروه بیمار بیشتر از گروه شاهد است. در حالی که در گزارش Muzakova و همکاران میزان فعالیت rGPx در بیماران پس از AMI (acute myocardial infarction) نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ($38/5 \pm 13/4$ U/g Hb در برابر $10/3$ $\pm 41/8$ U/g Hb) هر چند که این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود [۲].

برخی از محققین معتقدند که در حین ایسکمی قلبی سطوح قابل سنجش آنتی‌اکسیدان‌ها سرکوب می‌گردند [۷ و ۱۱]. در این صورت انتظار می‌رود سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یابد.

چاقی، افزایش کلسترول و تری‌گلیسرید خون و دیابت نداشتند به عنوان گروه شاهد آزمایشات فوق نیز انجام شد. جهت محاسبات آماری از نرم افزار SPSS11.5/Win کمک گرفته شد. از آزمون‌های آماری t- student و Chi-square برای محاسبه اختلاف آماری بین پارامترهای خون و ارتباط آنها با هم استفاده گردید. سطح اطمینان برای کلیه آزمون‌های آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

از ۴۸ بیماری که در این مطالعه شرکت داشتند ۳۶ نفر مرد و ۱۲ نفر زن بودند. در گروه شاهد ۲۹ نفر مرد و ۱۹ نفر زن حضور داشتند. میانگین سنی گروه بیماران $52/5 \pm 9/1$ سال و گروه شاهد $48/6 \pm 6/8$ سال بود، که از نظر سن و جنس اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه وجود نداشت. میانگین سنی مردان بیمار و زنان بیمار به ترتیب $51/5 \pm 9/3$ و $55/5 \pm 8/1$ سال بود.

میانگین غلظت HC در گروه بیمار $30/3 \pm 5/3$ میکرومول بر لیتر و در گروه شاهد $11/1 \pm 3/1$ میکرومول بر لیتر بود که بیانگر تفاوت معنی دار بین دو گروه است ($p < 0/001$). میانگین فعالیت rGPx بیماران U/g Hb $37/1 \pm 20/3$ و گروه شاهد $40/0 \pm 20/5$ U/g Hb بدست آمد که بین دو گروه از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین میانگین فعالیت sGPx بیماران U/L $423/3 \pm 97/1$ و گروه شاهد $464/8 \pm 90/0$ U/L بدست آمد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/05$).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار غلظت HC, sGPx, rGPx در

جامعه مورد مطالعه

sGPx (U/L)	rGPx (U/g Hb)	HC ($\mu\text{mol/L}$)		
466 ± 94	$36/3 \pm 20/2$	$31/3 \pm 5/0$	مرد	مورد
460 ± 81	$50/9 \pm 18/1$	$27/1 \pm 5/1$	زن	
421 ± 104	$33/9 \pm 18/0$	$11/9 \pm 3/1$	مرد	شاهد
425 ± 88	$41/9 \pm 23/1$	$10/7 \pm 2/7$	زن	

۴۹/۳ در برابر ۴۶/۰). این محققین معتقدند که کاهش rGPx همراه با افزایش خطر بیماری قلبی-عروقی است [۱۶]. در مطالعه‌ای بر روی بیماران (coronary heart CHD disease) کاهش معنی دار GPx خون تام ($\mu\text{mol NADPH/g Hb} \pm 4/0$ در برابر $24/7 \pm 3/1$) و افزایش معنی دار هوموسیستئین سرم ($\pm 7/4 \mu\text{mol/L}$) در برابر $3/1 \pm 13/4$) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد [۱۷].

با توجه به اینکه فاصله زمانی نمونه‌گیری از شروع علائم در میزان GPx پلازما تاثیر دارد شاید یکی از علل مهم اختلاف در گزارشات زمان نمونه‌گیری باشد. در مطالعه حاضر به علت این که تمام نمونه‌ها در کمتر از ۴ روز پس از شروع علائم گرفته شده‌اند شاید علت افزایش فعالیت GPx در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد نیز همین باشد.

از مطالعات انجام شده در ایران می‌توان به گزارش دکتر قوجق و همکاران در بابل اشاره کرد که در آن مطالعه افزایش معنی دار HC در بیماران قلبی با سابقه سکته قلبی نشان داده شده است ($25/05 \pm 2/44$ در گروه بیماران در برابر $1/26 \pm 12/75$ در گروه شاهد) [۱۸]. در این تحقیق نیز میانگین غلظت HC در گروه بیمار بطور واضحی بیشتر از گروه شاهد می‌باشد و این نشانگر تاثیر HC در بروز عوارض قلبی عروقی و سکته قلبی است.

در یک مطالعه انجام شده در سنگاپور توسط Ng و همکاران نتایج بدست آمده عکس مطالعه حاضر است. در آن مطالعه که بر روی ۱۶۸ بیمار انجام شده است ارتباط معنی‌داری بین AMI و غلظت HC مشاهده نشد [۱۹].

با توجه به گزارش‌های متعددی که در خصوص ارتباط بین افزایش HC با AMI وجود دارد، تناقض در نتایج مطالعه Ng و همکاران می‌تواند به نحوه انتخاب بیماران و یا روش انجام آزمایش مرتبط باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه با فرضیه مهار بیان GPx توسط HC در تناقض است. هر چند پس از AMI به علت گستردگی آسیب سلولی می‌توان افزایش sGPx را به آسیب

در یک مطالعه کوهورت مشاهده شد که میزان هوموسیستئین در افرادی که مشکلات قلبی-عروقی دارند بطور محسوسی بالاتر از سایرین است و در همین افراد فعالیت rGPx کاهش نشان می‌دهد [۱۰].

Altekin و همکاران میزان sGPx را در بیماران با سندرم حاد عروقی اندازه‌گیری کردند. مشاهده شد که بین سایر مارکرهای قلبی (مانند تروپونین و CK) و sGPx همبستگی منفی وجود دارد. بطوری که میزان sGPx در گروهی که مارکرهای قلبی آنها افزایش شدیدی داشته است نسبت به گروهی که این مارکرها افزایش خفیفی داشته‌اند بطور محسوسی کاهش داشته است [۱۲].

در مطالعه Bor و همکاران از ۲۷ بیمار مبتلا به سکته قلبی حاد طی ۲۴ ساعت اول پس از شروع درد قفسه سینه نمونه‌گیری بعمل آمد که بین فعالیت sGPx گروه بیمار و شاهد تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد. در حالی که فعالیت rGPx در گروه بیمار بیش از گروه شاهد بود [۱۳].

ک نتایج آن مشابه تحقیق حاضر می‌باشد. در مطالعه Akyol و همکاران میزان فعالیت sGPx در بیماران AMI بیش از بیماران مبتلا به (unstable UAP) (angina pectoris) بود ($0/992 \pm 0/071$ IU/ml) در برابر $0/683 \pm 0/110$). این محققین پیشنهاد نمودند که از این تست به همراه سنجش سایر آنزیم‌ها برای افتراق AMI از UAP استفاده گردد [۱۴].

در یک مطالعه در بیماران دیابتی ارتباط بین فعالیت rGPx با سطح هوموسیستئین سرم مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که با افزایش هوموسیستئین بطور معنی‌داری از فعالیت rGPx کاسته می‌شود ($r = -0/385$, $p < 0/01$). این محققین معتقدند که این تغییرات ممکن است به علت بیماری‌های عروقی به دنبال دیابت باشد [۱۵].

در یک مطالعه بر روی بیماران قلبی مشاهده شد که فعالیت rGPx در افرادی که دارای علائم بالینی تصلب شرایین هستند پایین‌تر از بیماران بدون علامت است (U/g Hb)

hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Mol Biol Int*. 1997; Dec; 43(6):1253-1263.

[5] Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2001; 89(2):187-206.

[6] Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Magnenat JL, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, Das DK. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*. 1997; Nov 4; 96(9supl): II-216-220

[7] McCully KS, Wilson RB. Homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22:215-227

[8] Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly*. 2006; 136 (47-48):745-756

[9] Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, Rosendaal FR, Beverly RK, Hess DL, Psaty BM, Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Raghunathan TE, Reitsma PH. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation*. 1997 ;96(2):412-417.

[10] Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T, Blankenberg S. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: results from the AtheroGene study. *Am Coll Cardiol*. 2005; May 17; 45(10): 1631-1637.

[11] Chandra M, Chandra N, Agrawal R, Kumar A, Ghatak A, Pandey VC. The free radical system in ischemic heart disease. *Int J. Cardiol*. 1994 Feb; 43(2):121-125.

[12] Altekin E, Coker C, Sisman AR, Onvural B, Kuralay F, Kirimli O. The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes. *J. Trace Elem Med Biol*. 2005;18(3): 235-242.

[13] Bor MV, Cevik C, Uslu I, Guler F, Duzgun E. Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*. 1999; Oct;54 (5):271-276.

[14] Akyol O, Sencan O, Buyukberber S, Canbolat O, Durak I. Glutathione peroxidase activity in serum during acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Jpn Heart J*. 1993; Sep; 34(5): 551-555.

[15] Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann Clin Biochem*. 2005; Mar; 42(Pt 2): 99-104.

[16] Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Schnabel R, Genth-Zotz S, Torzewski M, Lackner K, Munzel T, Blankenberg S; AtheroGene Investigators. Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. *Am J. Cardiol*. 2007; Mar 15; 99(6):808-812. Epub 2007 Jan 30.

[17] PWronska-Nofer T, Nofer JR, Stetkiewicz J, Wierzbicka M, Bolinska H, Fobker M, Schulte H, Assmann G, von Eckardstein AP. Evidence for oxidative stress at elevated plasma thiol levels in chronic exposure to carbon disulfide (CS₂) and coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; Jul 7; [Epub ahead of print]

[18] Qujeq D, Omran TS, Hosini L. Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction. *Clin Biochemistry* 2001; 34:97-101.

[19] Ng KC, Yong QW, Chan SP, Cheng A. Homocysteine, folate and vitamin B12 as risk factors for acute myocardial infarction in a Southeast Asian population. *Ann Acad Med Singapore*. 2002; 31(5):636-640.

سلولی نسبت داد. اما افزایش rGPx را می توان پاسخی به افزایش رادیکال های آزاد پس از سکتة قلبی برای کاهش سطح آسیب های سلولی دانست. به نظر می رسد آنچه رخ می دهد مجموعه ای از هر دو دلیل فوق باشد. به عبارت دیگر افزایش اولیه sGPx بعلت آسیب سلولی است و به دنبال آن افزایش rGPx موجب مهار رادیکال های آزاد و آسیب های وارده به سلول می گردد.

از نتایج این مطالعه چنین بر می آید که افزایش بارز HC در بیماران مبتلا به سکتة قلبی همراه با افزایش نسبی GPx در بیماران است. هر چند از نظر آماری همبستگی خطی بین این دو عامل در بیماران مشاهده نشد، اما افزایش هر دو عامل در بیماران نسبت به گروه شاهد مؤید مکانیسم متفاوت در افزایش این عوامل در بیماران پس از سکتة قلبی است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، بخش CCU بیمارستان پنجم آذر گرگان و آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بالینی آموزشکده پیراپزشکی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

منابع

[1] Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL. *Harrison's Principles of internal medicine*. Edition 15th, 2005. vol. 1, part eight, section 4 (vascular disease), McGraw-Hill, New York.

[2] Muzakova V, Kandar R, Vojtisek P, Skalicky J, Vankova R, Cegan A, Cervinkova Z. Antioxidant vitamin levels and glutathione peroxidase activity during ischemia/reperfusion in myocardial infarction. *Physiol. Res*. 2001; 50(4):389-396.

[3] Ferns GA, Konneh M, Anggard EE. Vitamin E. the evidence for an anti-atherogenic role. *Artery*. 1993; 20(2):61-94.

[4] Lin CS, Liu CY, Sun YL, Chang LC, Chiu YT, Huang SY, Lin JH, Yang PC, Chu R, Huang MC, Mao SJ. Alteration of endogenous antioxidant enzymes in naturally occurring

Archive of SID