مجله دیابت و متابولیسم ایران. مرداد- شهریور ۱۳۹۶؛ دوره ۱۶ (شماره ۶) ۳۰۸-۲۹۳

مقاله پژوهشی

# بررسی پروفایل اسیدهای آمینه‌ی سرم در نفروپاتی دیابتی

علی جلیلی[۱]، فریده رضی[۲]، انسیه نسلی اصفهانی[۲]، مصطفی قربانی[۳و۱]، باقر لاریجانی[۱*]

## چکیده

**مقدمه:** نفروپاتی دیابتی یک بیماری مزمن کلیوی و یکی از شایع‌ترین عوارض دیابت نوع ۲ است. مارکرهای کنونی تشخیصی نفروپاتی 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 نفروپاتی دیابتی می‌باشد.

**روش‌ها:** این مطالعه مقطعی توصیفی- تحلیلی در سال ۹۵-۱۳۹٤ بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به نفروپاتی دیابتی متعاقب دیابت نوع ۲،۳۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ مراجعه کننده به کلینیک دیابت ۱ پژوهشگاه غدد و ۳۰ فرد غیردیابتی‌انجام شد. هموگلوبین، HbA1c و BUN خون و سطح سرمی آلبومین،اسیداوریک، آلبومین نمونه رندوم ادرار صبحگاهی و کراتینین ادرار با روش‌های استاندارد وسطح 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.

**یافته ها:** تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی هر ۸ اسیدهای‌آمینه ضروری، اسیدهای‌آمینه شاخه‌دار، اسیدهای‌آمینه آروماتیک و نیز ۸ اسیدهای‌آمینه غیرضروری آلانین، اسید آسپارتیک، سرین، گلوتامین، آرژینین، گلیسین، تیروزین و اورنی‌تین بین ۳ گروه مورد بررسی نفروپاتی دیابتی، دیابت و افراد غیردیابتی مشاهده شد. سطح سرمی آرژینین و ایزولوسین در گروه دیابت بالاتر از غیردیابتی بود. در حالی‌که، مقادیر اسیدهای‌آمینه سرین، گلوتامین، گلیسین، ترئونین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، اورنی‌تین و لیزین در ۲ گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت بالاتر از گروه غیردیابتی بود. به ازای هر انحراف معیار کاهش سطح سرمی اسیدهای‌آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نفروپاتی دیابتی به ترتیب ۳/۲۵۷ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۹٤- ۰/۱۰ و $P$=۰/۰۳۹)، ۲/۲۰۷ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۸۱- ۰/۱۸ و $P$=۰/۰۳۹) و ۲/٦۵۲ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۹٦- ۰/۲۱ و $P$=۰/۰۱۲) برابر شد.

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

**واژگان کلیدی:** نفروپاتی 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: ۱٤۱۱٤۱۳۱۳۷ تلفن: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۱ تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۶/۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۰۲**

Archive of SID
www.SID.ir

## 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 گلومرول‌ها اتفاق می‌افتد [٤]. 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 [٦]. آلبومینوری به‌خصوص در محدوده‌ی میکروآلبومینوری فاقد ویژگی[1] و حساسیت[2] 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 [۲۱-۱۰] 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 متابولیسمی لیپیدها (اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، کارنیتین ها و فسفولیپیدها)، اسیدهای‌آمینه (فنیل‌آلانین و تیروزین، ترپتوفان، والین، لوسین و ایزولوسین و سیکل اوره)، نوکلئوتیدها (پورین و پیریمیدین) و نیز چرخه‌ی اوره [۲۲]. متابولیت‌های متابولیسم لیپید مانند بوتنوئیل کارنیتین [۲۳]، اسیدهای چرب غیرضروری، فسفولیپیدها [٢٤]، سرامیدهای با زنجیره‌ی بسیار بلند [٢٤]، اسیل‌کارنیتین‌ها [٢٦] و اسیدهای‌آمینه مانند اسیدهای آمینه ضروری [٢٦]، هیستیدین، گلوتامین و تیروزین [۲۳] و متابولیت‌های متابولیسم 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 اسیدهای‌آمینه شاخه‌دار (والین، لوسین، ایزولوسین)، آروماتیک (فنیل‌آلانین، تیروزین)، آلانین، افزایش نسبت اورنی‌تین به سیترولین، افزایش نسبت اورنی‌تین به آرژینین، کاهس سطح سرمی هیستیدین، گلوتامین و متیونین را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نشان داده‌است [۳۷-۲۸]. در بیماری مزمن کلیوی افزایش سطح سرمی اورنی‌تین، سیترولین، سرین، گلیسین و آسپارژین [۳۹، ۳۸، ۱۷] و در نفروپاتی دیابتی کاهش سطح سرمی لوسین، گلوتامین، متیونین، آرژینین و افزایش دفع ادراری فنیل‌آلانین و تیروزین [٤١، ٤٠، ١٤، ١٢] 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 اسیدهای‌آمینه 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 ۹۵-۱۳۹٤ بر روی بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی متعاقب دیابت نوع دو (آلبومینوری و GFR بالاتر و یا مساوی ٦۰) 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 ٦۰،

[1] specificity
[2] sensitivity

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت آلبومین بـه کـراتینین نمونـه‌ی ادرار صـبحگاهی بیشـتر از ۳۰ میلی‌گرم به گرم در گروه نفروپاتی دیـابتی (تنهـا بیمـارانی کـه ۲ بـار البومینوری ثابت در طی ۳ تا ٦ ماه داشتند وارد مطالعه شـدند)، BMI بین ۱۸ تا ۳۵، فعالیت فیزیکی نرمال، عدم مصرف الکل، عدم سابقه‌ی آنژین صدری، انفارکتوس میوکارد یا سـکته‌ی مغـزی، سـکته قلبـی، نارسایی حاد و مزمن کبدی، بیماری‌های التهابی مزمن منجر به بستری در ٦ ماه اخیر و عدم مصرف سیگار و سایر دخانیات. معیارهای عدم ورود از مطالعه عبـارت بـود از افـراد تحـت درمـان بـا دیـالیز و یـا همودیالیز، افراد با کراتینین بـالا و کـاهش GFR، مصـرف داروهـای منجر به پروتئینوری، ابتلا به بیماری‌هـای فعـال تـب‌دار و بـدخیمی، پُرفشـاری خـون کنتـرل نشـده، ابـتلا بـه بیمـاری کلیـوی زمینـه‌ای (گلومرونفریت)، ابتلا به سوء تغذیه (آلبومین سرم کمتر از ۳/۵ گرم در دسی لیتر)، انجام ورزش‌های حرفه‌ای و بدنسازی، دریافت مکمل‌های پروتئینی، کراتین و مواد و مکمـل‌هـایی کـه مـی‌توانـد بـر پروفایـل اسیدهای امینه افراد تأثیر گذار باشد.

حجم نمونه براساس مطالعـه‌ی Xia و همکـاران [۱۸] و بـا در نظـر گرفتن $\alpha$ برابر ۰/۰۵ و $\beta$ برابر ۰/۲ طبق فرمول زیر حجم نمونه در هر گروه ۳۰ نفر تعیین شد.

$$N=\frac{(Z_1-\alpha/_3+Z_1-B)^2\delta_1{}^2+\delta_2{}^2}{\mu_2-\mu_1}$$

### نمونه گیری

در این مطالعه با بیماران مبتلا بـه نفروپـاتی دیـابتی، دیابـت نـوع دو مراجعه کننده به مرکز دیابت و بیماری‌های متابولیـک دانشـگاه علـوم پزشکی تهران که دارای پرونـده فعـال بودنـد و براسـاس اطلاعـات مندرج در پرونده واجد معیارهـای ورود بـه مطالعـه بودنـد پـس از توضیح اهداف و جزئیات طرح، از افرادی که تمایـل بـه شـرکت در طرح را داشتند نمونه‌گیری به‌عمل آمـد. تشـخیص نفروپـاتی دیـابتی براساس نسبت‌آلبومین بر کراتینین نمونه رندوم ادرار صبحگاهی (بیش از ۳۰ میلی‌گرم بـه ازای هـر گـرم کـراتینین ادرار) صـورت گرفـت. همچنین، افراد غیردیابتی از همراهان بیماران مراجعه کننده به کلینیـک دیابت انتخاب شدند. از افراد خواسته شـد تـا در روز مراجعـه از ۱۲ ساعت قبل ناشتا باشند. در ابتدا از افراد یک رضایت‌نامه‌ی کتبی گرفته شد. از شرکت‌کننـدگان در مـورد اطلاعـات عمـومی، دموگرافیـک، شیوه‌ی زندگی (مصرف مکمل و فعالیت فیزیکـی، مصـرف الکـل و دخانیات)، سابقه‌ی بیماری‌های مختلف و نیز مصرف دارو سؤال شد. در نهایت پس از بررسی نتایج بیوشیمیایی، ۹۰ نفر از کسانی که تمامی معیارهای ورود را داشتند، به روش نمونه‌گیری آسان انتخـاب 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 متـر نـواری بـا دقـت ۰/۱ سـانتی‌متـر در وضعیت ایستاده در کنار دیوار و بدون کفش در حالی‌که کتـف‌هـا در شرایط عادی قرار دارند اندازه‌گیری شد. نمایه‌ی توده‌ی بدن از تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر مربع) محاسبه شد. فشار خون نیـز 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 به‌مدت ٢٤ ساعت قبل از زمان آزمایش از انجام فعالیت ورزشی شدید بپرهیزند. نمونه‌ی خون وریدی بازویی به میزان ۱۰ سی‌سی در حالت ناشتایی ۱۲ ساعته بـا کمـک اسـکالپ وین در حالت نشسته بر روی صـندلی توسـط تکنسـین مـاهر اخـذ گردیـد. جهـت سـنجش هموگلـوبین، HbA1c و BUN میـزان ۱/۵ سی‌سی خون تام به ویال حاوی ضدانعقاد EDTA افزوده شد. مابقی نمونه‌ی خون جمع آوری شده در اسرع وقت با استفاده از سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شده و تمام سـرم‌هـا به‌منظور به حداقل رساندن ضریب تغییرات بین آزمایش تا روز انجام یک آزمایش واحد بر روی تمام نمونه‌ها، در فریـزر در دمـای ۷۰٤- نگهداری شد.

اندازه‌گیری هموگلوبین خون با دستگاه خودکـار شـمارنده‌ی سـلولی سیسمکس K21 N (Sysmex, Kobe, Japan) با حساسیت ۰/۱ گرم در دسی‌لیتـر، اوره‌ی خـون بـا روش فـرابنفش آنزیمـی اوره آز و بـا استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، کرج، ایـران) بـا حساسـیت ۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و هموگلوبین گلیکوزیله خون با حساسـیت بـا روش HPLC و سیسـتم G8 (TosohG8, Tosoh Bioscience) بـا حساسیت ۰/۱ درصد اندازه‌گیری شد.

سطح سرمی آلبومین با روش فتومتری و اسـتفاده از کیـت تجـاری (پارس آزمون، کرج، ایـران) بـا حساسـیت ۰/۱ گـرم در دسـی‌لیتـر، کره‌آتینین با روش Jaffe و بـا اسـتفاده از کیـت تجـاری ( Man Inc, Tehran, Iran) با حساسیت ۰/۰۱ میلـی‌گـرم در دسـی‌لیتـر و سـطح سرمی اسیداوریک بـا روش کلریمتـری و اوریکـاز و کیـت TOOS

Archive of SID

www.SID.ir

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

آلبومین ادرار با روش ایمونوتوربیدومتری 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 کاکروفت گالت[1] و براساس سن، جنس، وزن بدن و کراتینین سرم محاسبه شد.

### اندازه‌گیری سطح سرمی اسیدهای آمینه

به‌منظور آماده‌سازی سرم ابتدا ۲۵ میکرولیتر سرم با ٤۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۵ میکرولیتر نورلوسین (Nle[2]) به‌عنوان استاندارد داخلی رسوب‌دهی شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سطح رویی آن در یک بافر با ۲۰۰ میکرولیتر معرف مشتق‌ساز (derivatizing) اورتوفتالدهید (OPA[3]) واکنش داده شد تا ترکیبی فلوئورسنس را به‌وجود 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 به‌عنوان 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 به‌صورت شیمیایی به یک پایه سیلیس متصل شده بودند و اجازه می‌دادند که ترکیبات قطبی بیشتری در ابتدا جدا شوند. ستون مورد استفاده C18 (سیلیکاژلی که به کربن ۱۸ متصل شده است)، اندازه‌ی ذرات فاز ساکن ۵ میکرومتر، قطر ستون ٤/٦ میلی‌متر و طول آن ۲۵ سانتی‌متر بود. فاز متحرک قطبی متشکل بود از بافر استات با pH ٦/۹۵ به همراه متانول که به‌صورت گرادیانت کار شد. دتکتور[4] (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 به‌ترتیب ۳٤۰ و ٤۵۰ نانومتر بود. کروماتوگرام، نموداری از پاسخ آشکارساز بر حسب زمان، حجم فاز 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 جمع آوری شده و وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی۲۰ شد. برای متغیرهای کمی از میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی از تعداد و درصد استفاده شد. آزمون کولموگروف–اسمیرینوف به‌منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌های دموگرافیک، بالینی و بیوشیمیایی و نیز سطح سرمی اسیدهای‌آمینه در ۳ گروه مورد مطالعه استفاده شد. به‌منظور مقایسه‌ی متغیرهای دارای توزیع نرمال بین ۳ گروه مورد بررسی از آزمون ANOVA و آزمون Post Hoc توکی استفاده شد. آزمون t مستقل به‌منظور مقایسه‌ی میانگین مدت زمان ابتلا به دیابت در گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت به‌کار رفت. از آزمون مجذور خی به‌منظور مقایسه توزیع جنس در ۳ گروه مورد مطالعه استفاده شد. مقایسه‌ی اسیدهای‌آمینه دارای توزیع غیرنرمال بین ۳ گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال والیس انجام شد. از رگرسیون اسمی[5] خام و نیز تعدیل شده برای سن و BMI بر روی نمره‌ی Z[6] اسیدهای‌آمینه به‌منظور 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 ۰/۰۵و 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 به‌ترتیب در جداول ۱و ۲ آورده شده است.آزمون مجذور خی تفاوت آماری معنی‌داری را در توزیع جنس در ۳ گروه مورد مطالعه نشان نداد (P=۰/۱۵۸).

[1] Cockcroft – Gault formula
[2] Norleucine
[3] Ortho-phthalaldehyde
[4] Detector
[5] Nominal regression
[6] Z score

Archive of SID
www.SID.ir

**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) | ٦١ (٨)* | ٥٦ (٧)(**) | ٤٨ (١٠)*(**) |
| وزن (کیلوگرم) | ٨١/٦ (١٠/١)* | ٧٨/٨ (١١/٦)(**) | ٧٠/٩ (٩/٨)*(**) |
| قد (سانتی‌متر) | ١٦٦/٣ (٨/٥) | ١٦٧/٣ (٩/٦) | ١٦٥/٠ (٧/٠) |
| نمایه‌ی توده‌ی بدن (کیلوگرم بر متر مربع) | ٢٩/٦ (٣/٥)* | ٢٨/٢ (٣/٥)(**) | ٢٦/٠ (٣/٤)*(**) |
| مدت زمان ابتلا به دیابت (سال) | ١٢ (٦) | ٩ (٤) | – |
| فشار خون سیستولی (میلی‌متر جیوه) | ١٢٥ (١١)* | ١٢١ (١١) | ١١٦ (١٢)* |
| فشار خون دیاستولی (میلی‌متر جیوه) | ٨٠ (٨) | ٧٩ (٣) | ٧٩ (٤) |
| فشار خون | ١/٥٨ (٠/١٨)* | ١/٥٣ (٠/١٢) | ١/٤٨ (٠/١٠)* |

داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار) میانگین بیان شده است.

* $P<۰/۰۵$

**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 (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ١٤٠ (٦٥)* | ١٣٥ (٣٠)(**) | ٩٠ (١٠)*(**) |
| هموگلوبین گلیکوزیله (درصد) | ٧/١ (٠/٧)* | ٧/٢ (٠/٨)(**) | ٥/٦ (٠/٥)*(**) |
| اوره (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ٣٥ (١١) | ٣٤ (١٠) | ٣٠ (٦) |
| کره‌آتینین (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ١/٠٨ (٠/٢٣) | ١/٠١ (٠/١٥) | ٠/٩٨ (٠/١٢) |
| اسید اوریک (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ٤/٩ (١/٦) | ٤/٩ (١/١) | ٤/٦ (١/٤) |
| تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ١٤٣ (٧١) | ١٤٤ (٧٥) | ١٢١ (٦٠) |
| کلسترول تام (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ١٥٠ (٢٢)* | ١٥٨ (٤٠)(**) | ١٩٠ (٤٤)*(**) |
| کلسترول HDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ٤٦ (١٢) | ٤٨ (١٢) | ٥٢ (١٠) |
| کلسترول LDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) | ٧٥ (١٤)* | ٧٥ (٢٥)(**) | ٩٩ (٢٨)*(**) |
| ACR | ٩٤/٠٢ (٥٩/٦٧)*(**) | ٢٧/٣٤ (٣/٩٨)*(**) | ٢٧/٠٩ (٤/٩٧) |
| GFR | ٧٨/٥٨ (١٥/٠٤) | ٨٣/٨٨ (١٦/١٣) | ٨٢/٢٩ (١٦/٤٨) |
| آلبومین (گرم در دسی‌لیتر) | ٤/٧ (٠/٣) | ٤/٨ (٠/٣) | ٤/٧ (٠/٣) |
| هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) | ١٣/٨ (١/٦) | ١٤/٢ (١/٤) | ١٤/١ (١/٦) |

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

داده‌ها به‌صورت (انحراف معیار) میانگین بیان شده است.

* $P<۰/۰۵$

Archive of SID

www.SID.ir

**مقایسه‌ی سطح سرمی اسیدهای‌آمینه بین گروه‌های مورد بررسی**

آزمون کولموگروف-اسمیرینوف نرمال بودن توزیع سطح اسیدهای‌آمینه سرم را تنها برای اسیدهای‌آمینه آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین نشان داد (P>۰/۰۵) و سایر اسیدهای‌آمینه سرم از توزیع غیرنرمال برخوردار بودند (P<۰/۰۵). مقایسه‌ی سطح اسیدهای‌آمینه دارای توزیع نرمال آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام شد و سطح سرمی آن‌ها به‌صورت میانگین (انحراف معیار) گزارش شد. به‌منظور مقایسه سطح سرمی سایر اسیدهای‌آمینه دارای توزیع غیرنرمال از آزمون کروسکال‌والیس استفاده شد و مقادیر به‌صورت میانه (دامنه بین چارکی یا IQR[1]) بیان شد (داده‌ها نشان داده نشده‌است).

تفاوت آماری معنی‌داری در میانگین سطح سرمی هر سه اسیدآمینه دارای توزیع نرمال آلانین، فنیل‌آلانین و لوسین بین گروه‌های نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). میانگین سطح سرمی آلانین گروه دیابت فاقد نفروپاتی ۲۲ درصد بالاتر از گروه نفروپاتی دیابتی (P=۰/۰۴۹) و ۸۲ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی (P<۰/۰۰۱) بود. میانگین سطح سرمی آلانین گروه نفروپاتی دیابتی ۵۰ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (P=۰/۰۰۲). میانگین سطح سرمی فنیل‌آلانین گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت فاقد نفروپاتی به‌ترتیب ۳۳ و ۴۱ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (به‌ترتیب، P=۰/۰۰۱ و P<۰/۰۰۱). میانگین سطح سرمی لوسین گروه دیابت فاقد نفروپاتی ۲۳ درصد بالاتر از گروه نفروپاتی دیابتی و ۵۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (به‌ترتیب، P=۰/۰۰۶ و P<۰/۰۰۱). همچنین، میانگین سطح سرمی لوسین گروه نفروپاتی دیابتی ۲۶ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود (P=۰/۰۲۰).

مقایسه‌ی میانه اسیدهای‌آمینه دارای توزیع غیرنرمال بین ۳ گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال والیس تفاوت آماری معنی‌داری را برای اسیدهای‌آمینه آسپارتات (P=۰/۰۴۰)، سرین (P<۰/۰۰۱)، گلوتامین (P=۰/۰۱۳)، آرژینین (P=۰/۰۳۸)، گلیسین (P=۰/۰۰۱)، ترئونین (P=۰/۰۰۱)، تیروزین (P<۰/۰۰۱)، تریپتوفان (P<۰/۰۰۱)، متیونین (P<۰/۰۰۱)، والین (P=۰/۰۰۲)، ایزولوسین (P=۰/۰۳۱)، اورنی‌تین (P=۰/۰۰٤)، لیزین (P<۰/۰۰۱) و نیز مجموع اسیدهای‌آمینه (P<۰/۰۰۱) نشان داد.

**مقایسه‌ی نسبت برخی از اسیدهای آمینه بین افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی، دیابت بدون نفروپاتی و افراد غیردیابتی**

مقایسه‌ی نسبت اورنی‌تین به سیترولین، اورنی‌تین به آرژینین، آسپارتات به آسپارژین، گلوتامات به گلوتامین و تیروزین به فنیل‌آلانین تنها تفاوت آماری معنی‌داری در نسبت اورنی‌تین به سیترولین بین گروه‌های مورد بررسی مشاهده شد (P=۰/۰۲۷). مقایسه‌ی دو به دو با استفاده از آزمون من‌ویتنی نشان داد که نسبت اورنی‌تین به سیترولین در گروه دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود (P=۰/۰۰۷) (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 اسیدهای‌آمینه 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 سیترولین در مقایسه با افراد غیردیابتی خطر دیابت ۱/۹۴۷ برابر (فاصله اطمینان۹۵٪= ۳/٦٤- ۱/۰٤ و P=۰/۰۳۷) افزایش می‌یابد که پس از تعدیل برای سن و BMI این معنی‌داری از بین رفت (P=۰/۰۵۰).

[1] دامنه‌ی بین چارکی یا Interquartile range یکی از سنجش‌های پراکندگی است که برابر با فاصله‌ی بین چارک اول و سوم است. به‌عبارت دیگر: $IQR= 25^{th}-75^{th}$

Archive of SID
www.SID.ir

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

| اسید آمنه | | خام** | | تعدیل شده*** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | OR | ٪۹۵CI | OR | ٪۹۵CI |
| اسید آسپارتیک | DN/N | ۱/۳۰٤ | ۰/۷۸–۲/۱٦ | ۱/٤٤۳ | ۰/۷۱ –۲/۹۲ |
| | D/N | ۰/۷۷۳ | ۰/٤۱ –۱/٤۷ | ۰/۷۱۹ | ۰/۳۳ –۱/۵۵ |
| اسید گلوتامیک | DN/N | ۱/٤۰٦ | ۰/۸۲ –۲/٤۱ | ۱/٦۸۳ | ۰/۸۳ –۳/٤۱ |
| | D/N | ۱/۱۵۱ | ۰/٦٦ –۲/۰۲ | ۱/۲٦٦ | ۰/٦۸ –۲/۳٦ |
| آسپارژین | DN/N | ۱/۲۳۳ | ۰/۷٤ –۲/۰٤ | ۱/۵۰۰ | ۰/۷٦ –۲/۹٦ |
| | D/N | ۰/۹۷۷ | ۰/۵۷ –۱/٦۸ | ۱/۰۱۵ | ۰/۵٤ –۱/۸۹ |
| سرین | DN/N | ۱/۱۷۸ | ۰/٦۱ –۲/۲۸ | ۱/۰۰۳ | ۰/٤٤ –۲/۲۸ |
| | D/N | ۲/۰۸۰ | ۱/۰۹ –۳/۹۷ | ۱/۸۵۵ | ۱/۰۳ –۳/۳۲ |
| هیستیدین | DN/N | ۱/۷۵٦ | ۰/۹۹ –۳/۱۳ | ۲/۰۱۲ | ۰/۹۷ –٤/۱۸ |
| | D/N | ۱/۷۰٦ | ۰/۹٦ –۳/۰۳ | ۱/۷۹۸ | ۰/۹٦ –۳/۳۸ |
| گلوتامین | DN/N | ۱/۸٦۱ | ۰/۹٦ –۳/٦۰ | ۲/۲۳٦ | ۰/۹٤ –۵/۲۹ |
| | D/N | ۲/۳۷۷ | ۱/۲۲ –٤/٦۳ | ۱/۱۱۹ | ۱/۱۲ –۵/۸۳ |
| آرژینین | DN/N | ۱/۲۳٤ | ۰/٦۷ –۲/۲۷ | ۱/۳۷۸ | ۰/٦۸ –۲/۷۷ |
| | D/N | ۱/٤٤٦ | ۰/۸۱ –۲/۵۹ | ۱/٤٦۳ | ۰/۸۲ –۲/٦۰ |
| سیترولین | DN/N | ۱/۱۰٦ | ۰/۵۲ –۲/۳۳ | ۱/۲٤٦ | ۰/۵۵ –۲/۸۰ |
| | D/N | ۱/۲٤۳ | ۰/٦۳ –۲/٤۵ | ۱/۲۷۹ | ۰/٦۱ –۲/٦۷ |
| گلیسین | DN/N | ۱/۵۲٤ | ۰/۸٤ –۲/۷۷ | ۱/۵٤۸ | ۰/۷٦ –۳/۱۷ |
| | D/N | ۲/۰۸٦ | ۱/۱٤ –۳/۸۱ | ۱/۹٦۱ | ۱/۰۳ –۳/۷٤ |
| ترئونین | DN/N | ۲/۲۰۰ | ۱/۱۹ –٤/۰۷ | ۲/۹٤٦ | ۱/۳۲ –٦/۵۸ |
| | D/N | ۲/۳۸۰ | ۱/۲۸ –٤/٤۲ | ۲/۵٦٦ | ۱/۲٦ –۵/۲۱ |
| آلانین | DN/N | ۳/٦۳٦ | ۱/٦۹ –۷/۸٤ | ۳/۷۱۲ | ۱/۳۹ –۹/۹۳ |
| | D/N | ۷/۳۱۷ | ۳/۰۹ –۱۷/۳۵ | ۷/۸۲٤ | ۲/۷۷ –۲۲/۰٦ |
| تیروزین | DN/N | ۲/۷۷۰ | ۱/۳۱ –۵/۸٤ | ۲/۵۹۹ | ۱/۰٤ –٦/٤۸ |
| | D/N | ٤/۷۱۷ | ۲/۱۱ –۱۰/۵٦ | ٤/٤۲۷ | ۱/۷۵ –۱۱/۲۰ |
| تریپتوفان | DN/N | ۲/۲۰۲ | ۱/۱۵ –٤/۲۰ | ۲/٤۸۰ | ۱/۰۹ –۵/٦۳ |
| | D/N | ۳/۷۷٤ | ۱/۹۰ –۷/٤۸ | ٤/۱۵٦ | ۱/۸۷ –۹/۲۵ |
| متیونین | DN/N | ٤/۰٦۸ | ۱/۲۹ –۱۲/۸٤ | ٦/۹۹۵ | ۱/٤٤ –۳٤/۰۸ |
| | D/N | ۹/۹٦۹ | ۲/۹۰ –۳٤/۲۵ | ۱۵/٦۱۷ | ۳/۲۰ –۷٦/۲۹ |
| والین | DN/N | ۱/۹٦۰ | ۱/۰۸ –۳/۵۵ | ۱/٦۹۵ | ۰/۸۲ –۳/۵۰ |
| | D/N | ۲/۵۸۸ | ۱/۳۸ –٤/۸٤ | ۲/۳۹۰ | ۱/۱۹ –٤/۸۰ |
| فنیل‌آلانین | DN/N | ۳/۲۲۵ | ۱/٦۲ –٦/٤۳ | ۲/۸۵۵ | ۱/۲۸ –٦/۳۵ |
| | D/N | ٤/۲۰۷ | ۳/۰٤ –۸/٦۸ | ۳/۸۰٦ | ۱/۷۱ –۸/٤۹ |
| ایزولوسین | DN/N | ۱/٤۷٦ | ۰/۸۱ –۲/۷۰ | ۱/۷۹۵ | ۰/۷۹ –٤/۰۹ |
| | D/N | ۲/۰۹۵ | ۱/۱٤ –۳/۸٦ | ۲/۵۰۲ | ۱/۱۳ –۵/۵۲ |
| لوسین | DN/N | ۲/٤۸۰ | ۱/۲۵ –٤/۹۳ | ۲/٤٦٦ | ۱/۰۳ –۵/۸۹ |
| | D/N | ٦/۳۱۱ | ۲/۸۱ –۱٤/۱۵ | ٦/۵۸٤ | ۲/۵۸ –۱٦/۸۱ |
| اورنی‌تین | DN/N | ۲/۳۱۰ | ۱/۲۷ –٤/۱۹ | ۲/۰۳۱ | ۰/۹٦ –٤/۳۱ |
| | D/N | ۲/۰۷۵ | ۱/۱۵ –۳/۷۳ | ۲/۰۵٦ | ۱/۰۳ –٤/۱۰ |
| لیزین | DN/N | ۳/۰۰۵ | ۱/۳٦ –٦/٦۵ | ۲/۷۱٤ | ۰/۹۹ –۷/٤۳ |
| | D/N | ٤/٦۸٦ | ۲/۰۵ –۱۰/۷۰ | ٤/٤۲۳ | ۱/٦۲ –۱۲/۱۰ |
| جمع | DN/N | ۳/۰٤۳ | ۱/٤۸ –٦/۲٦ | ۳/۳۵۰ | ۱/۳٦ –۸/۲۵ |
| | D/N | ۵/۱۰۲ | ۲/۳٤ –۱۱/۱۳ | ۵/۳۰۷ | ۲/۱۳ –۱۳/۲۵ |

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

Archive of SID

www.SID.ir

**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 اسیدهای‌آمینه 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 اطمینان۹۵٪= ۵/۲۱- 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 ترپیتوفان در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت خطر نفروپاتی دیابتی ۱/۸۷۲ برابر (فاصله اطمینان۹۵٪= 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 اسیدهای‌آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نفروپاتی دیابتی به‌ترتیب ۳/۲۵۷ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۹٤- ۰/۱۰ و P=۰/۰۳۹)، ۲/۲۰۷ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۸۱- ۰/۱۸ و P=۰/۰۳۹) و ۲/٦۵۲ (فاصله اطمینان۹۵٪= ۰/۹٦- 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 به‌ترتیب ۸۲ و ٥٦ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود که با وجود کاهش معنی‌دار ۲۲ و ۲۳ درصدی در گروه نفروپاتی دیابتی همچنان ۵۰ و ٥٦ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی باقی ماند. میانگین سطح سرمی فنیل‌آلانین گروه نفروپاتی دیابتی و دیابت فاقد نفروپاتی به‌طور معنی‌دار و به‌ترتیب ۳۳ و ٤۱ درصد بالاتر از گروه غیردیابتی بود. کاهش ۳۳ درصدی سطح سرمی فنیل‌آلانین 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 اسیدهای‌آمینه دارای توزیع غیرنرمال آسپارتات، سرین، گلوتامین، آرژینین، گلیسین، ترئونین، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، والین، ایزولوسین، اورنی‌تین، لیزین و نیز مجموع اسیدهای‌آمینه مشاهده شد. مقایسه نسبت اورنی‌تین به سیترولین، اورنی‌تین به آرژینین، آسپارتات به آسپارژین، گلوتامات به گلوتامین و تیروزین به فنیل‌آلانین تنها تفاوت آماری معنی داری را در نسبت اورنی‌تین به سیترولین بین گروه‌های مورد بررسی نشان داد که این نسبت در گروه دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود.

به‌عبارت دیگر، تفاوت آماری معنی‌داری در سطح سرمی هر ۸ اسیدهای‌آمینه ضروری (والین، لوسین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین، ترئونین، تریپتوفان، متیونین و لیزین)، اسیدهای‌آمینه شاخه‌دار (والین، لوسین و لیزولوسین)، اسیدهای‌آمینه آروماتیک (فنیل‌آلانین، تیروزین) و نیز ۸ اسیدهای‌آمینه 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 آسپارتات 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 آمینه‌ی 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 اسیدهای‌آمینه سرین، گلوتامین، گلیسین، والین، ایزولوسین، اورنی‌تین و لیزین در مقایسه با افراد غیردیابتی خطر دیابت به‌ترتیب ۱/۸۵۵، ۱/۱۱۹، ۱/۹٦۱، ۲/۳۹۰، ۲/۵۰۲، ۲/۰۵٦ و ٤/٤۲۳ برابر افزایش یافت.

Archive of SID

www.SID.ir

به ازای هر انحراف معیار افزایش ترئونین سرم خطر دیابت ۲/۵٦٦ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۹٤٦ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش آلانین سرم خطر دیابت ۷/۸۲٤ و خطر نفروپاتی دیابتی ۳/۷۱۲ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش تیروزین سرم خطر دیابت ٤/٤۲۷ و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۵۹۹، به ازای هر انحراف معیار افزایش تریپتوفان سرم خطر دیابت ٤/۱۵٦ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/٤۸۰ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش متیونین سرم خطر دیابت ۱۵/٦۱۷ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ٦/۹۹۵ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش فنیل‌آلانین سرم خطر دیابت ۳/۸۰٦ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/۸۵۵ برابر، به ازای هر انحراف معیار افزایش لوسین سرم خطر دیابت ٦/۵۸٤ برابر و خطر نفروپاتی دیابتی ۲/٤٦٦ برابر و به ازای هر انحراف معیار افزایش مجموع اسیدهای‌آمینه اندازه‌گیری 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 می‌باشد. در مطالعات قبلی که پروفایل اسیدهای آمینه را در بیماری دیابت بررسی کرده‌اند، اسیدهای‌آمینه شاخه‌دار (والین، لوسین و ایزولوسین) و آروماتیک (فنیل‌آلانین و تیروزین) به‌عنوان عوامل پیشگویی‌کننده مقاومت به انسولین و بروز دیابت نوع دو گزارش شده‌است [۳٤-۲۸] و افزایش قند خون با افزایش سطوح این اسیدهای آمینه ارتباط داشته‌است [۳۵] در مقایسه با این مطالعات، در مطالعه‌ی ما نیز سطح سرمی فنیل‌آلانین و لوسین در هر دو گروه دیابتی (P۰/۰۰۱>) و نفروپاتی دیابتی نسبت به افراد غیردیابتی (به‌ترتیب، ۰/۰۰۱> و P=۰/۰۲) به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. سطح سرمی والین و تیروزین نیز در هر دو گروه نفروپاتی دیابتی و دیابتی بالاتر از افراد غیردیابتی بود (P<۰/۰۵) ولی در مورد ایزولوسین تنها در گروه دیابت به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه غیردیابتی بود. در مطالعه‌ی دیگری که در فنلاند انجام شد نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد اگرچه کاهش سطح هیستیدین و گلوتامین که در این مطالعه نشان داده‌شده بود در مطالعه ما به‌دست نیامد [۳۵].

در یک مطالعه کوهورت، سطوح بالای ۳ اسید آمینه ایزولوسین، فنیل‌آلانین و تیروزین با افزایش ۵ تا ۷ برابری خطر بروز دیابت ارتباط داشته‌است و به ازای افزایش هر واحد انحراف معیار ۵ اسیدآمینه BCAA و AAA خطر دیابت ۵۷ تا ۱۰۲ درصد افزایش یافته‌است [۳٤]. همچنین، سطوح بالای این اسیدهای‌آمینه حتی ۱۲ سال قبل از بروز دیابت نوع دو افزایش یافته‌است [۳٤]. در مطالعات مختلف، تغییرات و افزایش سطوح سرمی بعضی از اسیدهای آمینه مربوط به تغییرات احتمالی در ترکیب بدن و مرتبط با چاقی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین خطر فاکتورهای دیابت عنوان شده‌است که از این بین می‌توان به مطالعه‌ای که افزایش سطح سرمی آلانین، فنیل‌آلانین، تیروزین، نسبت گلوتامات به گلوتامین، نسبت آسپارتات به آسپارژین و آرژنین در چاقی گزارش کرده‌است اشاره نمود [۲۸]. مطالعه‌ی مشابهی در جمعیت ژاپنی نیز نشان داد که چاقی احشایی با سطح سرمی اسیدهای‌آمینه آلانین، گلوتامات، تریپتوفان، تیروزین و BCAA رابطه‌ی مستقیم و با گلیسین رابطه‌ی معکوس داشته‌است [٤۲].

در توجیه برخی از این تغییرات علاوه بر چاقی از کمبود انسولین و یا کاهش عملکرد آن که منجر به افزایش کاتابولیسم پروتئین می‌شود نیز نام برده شده‌است و ذکر شده‌است که در دیابت بسته به شدت و درجه‌ی کنترل قند خون میزان کاتابولیسم پروتئین در بدن و کاتابولیسم اسیدهای‌آمینه افزایش می‌یابد [٤۳]. 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 [٤٦-٤٤، ۲۸]، به سطوح اسیدهای‌آمینه شاخه‌دار به‌عنوان مارکر پیشگویی کننده بروز بیماری دیابت نوع دو نیز در تعدادی از مطالعات اشاره شده‌است [٤۸، ٤۷، ۳٤]. که البته این ارتباط به نقشی که افزایش اسیدهای آمینه در ایجاد اختلال در پیام‌رسانی انسولین می‌توانند داشته باشند نسبت داده شده‌است و به اوایل سال ۱۹۷۰ برمی‌گردد [٤۹]. اگرچه، مطالعات بر روی جمعیت آسیایی اسیدهای آمینه‌ی شاخه‌دار را ابزار مناسبی در تشخیص و پیشگویی مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو نشان داده‌است [۵۱، ۵۰، ٤۷، ۳۰]، مطالعه‌ای جدید بر روی افراد آمریکایی- هندی چنین رابطه‌ای را نشان نداد [۵۲]. در این ارتباط، مطالعه‌ی ما با توجه به این‌که در افراد مبتلا به دیابت و نفروپاتی دیابتی با حداقل ۵ سال سابقه‌ی بیماری انجام شد،

Archive of SID

www.SID.ir

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

در حال حاضر، در زمینه سازوکار ارتباط تغییرات اسیدهای‌آمینه 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[1] 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[2]) و دهیدروژناز کتواسید شاخه‌دار (BCKDH[3]) 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[4] BCKDH 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[5] به نام PGC −۱α[6] میزان بیان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم BCAA را تنظیم می‌کند. در عضلات اسکلتی دارای بیان بالای PGC −۱α 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 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 گلوکونئوژنز (سنتز گلوکز از ترکیبات غیرکربوهیدراته) و نقش مهمی که در هموستاز گلوکز دارد اشاره کرد. جایی که آلانین از مهم‌ترین پیش‌سازهای گلوکونئوژنز به‌شمار می‌رود و مسیرهای دوجانبه چرخه گلوکز آلانین را تشکیل می‌دهد و در مطالعه‌ای، 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 ناشتای 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<۰/۰۰۷). 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 توجیه 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

[1] Inflammatory tone
[2] Branched-chain aminotransferase
[3] Branched-chain keto acid dehydrogenase
[4] Downstream
[5] Transcription factor
[6] peroxisome proliferator-activated receptor gammacoactivator 1 alpha

Archive of SID

www.SID.ir

اورنی‌تین و اوره تبدیل می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم آرژیناز در رت‌های دیابتی گزارش شده است و میزان فعالیت آن با شدت دیابت ارتباط داشته‌است [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 داشته‌است [۵۵] و پیشگویی کننده IGT و دیابت نوع دو بوده است [۶۰] که این ارتباط ممکن است ناشی از نقش گلیسین به‌عنوان پیش‌ساز سنتز گلوتاتیون 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 گلوتاتیون و پاسخ آنتی‌اکسیدانی در بدن باشد. سطوح گلوتامین نیز در برخی مطالعات در مقاومت به انسولین کاهش یافته‌است [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 داشته‌است [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 گلوکونئوژنیک (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 با عث 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 داشته‌است [۳۵]، در پژوهش حاضر سطح سرمی هیستیدین در گروه دیابتی و نفروپاتی دیابتی بالاتر از گروه غیردیابتی بود ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار 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 اسیدهای‌آمینه سرین، آلانین و ایزولوسین در مقایسه با افراد دیابتی خطر نفروپاتی دیابتی به‌ترتیب 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 توجیه کننده نتایج متفاوت باشد.

کلیه نقش مهمی در هموستاز مخزن اسیدهای آمینه‌ی بدن دارد [۲۷] و ارگان مهمی برای برداشت، برخی از اسیدهای‌آمینه و ترشح خالص برخی دیگر از اسیدهای آمینه و سنتز تعدای 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 اسیدهای‌آمینه را تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی، همانطور که قبلاً اشاره شد تعدادی از اسیدهای آمینه از جمله سرین، گلیسین و اسیدهای آمینه‌ی شاخه‌دار از جمله

Archive of SID

www.SID.ir

اسیدهای آمینه‌ای هستند که به‌طور واضح تحت تأثیر تعادل اسید- باز کلیوی قرار دارند [٦٤] 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 [٦٥] و چنین بیان می‌شود که کلیه محل تبدیل گلیسین به سرین و تولید سرین در بدن انسان است [٦٦]. 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 [٦٥]. فرآیند تبدیل گلیسین به سرین در توبول پروگزیمال کلیه انجام می‌شود و این احتمال وجود دارد که در نفروپاتی دیابتی اختلال عملکرد توبول 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 نفروپاتی دیابتی باشد. چنانکه در مطالعه‌ی ما نیز کاهش سطح سرمی سرین مشاهده شد. نقش کلیه در متابولیسم BCAA به خوبی روشن نیست [٦٦]. در مورد متابولیسم کلیوی سایر اسیدهای آمینه نیز مانند آلانین، ترئونین، هیستیدین، تریپتوفان، آسپارژین، آسپارتات، 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 آسپارتات نیز نقش داشته باشد [٦٦]. 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 توبول‌های کلیوی باشد. به‌عنوان مثال، در توجیه کاهش ترشح تیروزین به خون در بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی [٦٧] 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 کلیه‌ی مبتلا به نفروپاتی دیابتی ترشح تیروزین به خون در افراد مبتلا کاهش می‌یابد [٦٧].

از سوی دیگر، این امکان وجود دارد که طبیعت بروز و پیشرفت نفروپاتی دیابتی با بیماری مزمن کلیوی با علل غیردیابتی متفاوت باشد. چنانچه در برخی مطالعات افزایش سطوح اورنی‌تین [۱۷]، سیترولین [۳۹ ،۳۸ ،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 نفروپاتی دیابتی و CKD می‌تواند منجر به شناسایی مسیرهای متابولیسمی دخیل در نفروپاتی دیابتی گردد.

**محدودیت‌های مطالعه**

طراحی این مطالعه به‌صورت مطالعه‌ی مقطعی و مشاهده‌ای بود که پی بردن به رابطه‌ی علت و معلولی بین متغیرها را امکان‌پذیر نمی‌سازد. همچنین، وجود مداخله گرهای احتمالی دیگر مانند میزان فشار خون و مدت زمان ابتلا به دیابت که به‌دلیل 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 ٦۰ از معیارهای ورود به مطالعه بود، با این حال، آلبومینوری به‌صورت بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم در ادرار ٢٤ ساعته در گروه نفروپاتی 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 [٦٨] 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. به‌عنوان مثال، کاهش سطوح BCAA و AAA در پی درمان با سولفونیل اوره [٦٩] و افزایش آن‌ها در درمان با متفورمین گزارش شده‌است [٦٨].

Archive of SID

www.SID.ir

## نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، علاوه بر تفاوت واضح پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه در ۳ گروه از بیماران ما و اثبات معنی‌داری 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 این‌که این مطالعه در افراد مبتلا به مراحل اولیه بیماری انجام شد، این تفاوت در سطوح سرمی اسیدهای آمینه می‌تواند از نشانه‌های اولیه ابتلا به نفروپاتی دیابتی و پیشرفت آن باشد. بنابراین، نفروپاتی دیابتی می‌تواند پروفایل متابولومیک اسیدهای آمینه بیماری را در مراحل اولیه بیماری تحت تأثیر قرار دهد و بررسی این پروفایل قادر خواهد بود اطلاعات 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، درمان‌های بالقوه‌ای چه در جهت پیشگیری و چه در جهت توقف و یا بهبود عملکرد کلیه ارائه دهند.

## سپاسگزاری

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

## 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, Soininen 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.


Archive of SID

www.SID.ir

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, GangoitiJA, 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, Orho-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, Muhlenbruch 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 anddiabetes risk in Chinese populations. *Scientific reports* 2016; 6:20594.
34. Wang TJ, Larson MG, Vasan 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. Aminoacid 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

Archive of SID

www.SID.ir

potential biomarkers in pediatric chronic kidney disease. Analytical and bioanalytical chemistry. 2016;408(3):747-60.
39. Duranton F, Lundin U, Gayrard 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-oaTOF-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 profileis 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, NagaoK, 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 betweeninsulin 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, Soininen 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 Scotlandcoronary 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 therapiesfor 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

Archive of SID

www.SID.ir

# EVALUATION OF SERUM AMINO ACIDS PROFILE IN DIABETIC NEPHROPATHY

Ali Jalili[1], Farideh Razi[2], Ensieh Nasli-Esfahani[2], 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

Archive of SID

www.SID.ir