

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز اریتروسیت در بیماران با نارسایی مزمن کلیوی

دکتر زینب هوذیاری^۱ - دکتر سمیه کنعانی^۱ - دکتر دردی قوجق^۲ - دکتر فرشید اولیایی^۳
دکتر کریم آقچه‌لی^۴

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز، دومین آنزیم در مسیر سنتز هم است. این آنزیم ترکیب آمینولولینیک اسید را به پورفوبیلینوژن تبدیل می‌کند. مطالعات کمی در مورد تغییرات آنزیمی در نارسایی مزمن کلیه صورت گرفته است؛ بررسی و مطالعه این تغییرات در درمان این دسته از بیماران می‌تواند مفید باشد؛ مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در بیماران با نارسایی مزمن کلیوی انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تحلیلی، خون وریدی از بیماران با نارسایی مزمن کلیه جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز از گروه مورد (بیماران) و شاهد تهیه شد؛ سپس اریتروسیت جدا گردید؛ فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز اریتروسیت بر اساس تبدیل آمینولولینیک اسید به پورفوبیلینوژن با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون t-student در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در گروه مورد، $634/7 \pm 21/2$ میکرومول در لیتر در دقیقه و در گروه شاهد $825/4 \pm 23/6$ میکرو مول در لیتر در دقیقه بود؛ این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).
نتیجه‌گیری: فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در بیماران با نارسایی مزمن کلیه در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت این آنزیم، ممکن است به علت مهار آنزیمی و یا نقض سنتز آنزیمی در بیماران با نارسایی مزمن کلیه باشد.

کلید واژه‌ها: ۵- آمینولولینات دهیدراتاز؛ پورفیرین؛ نارسایی مزمن کلیه

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ۱۳؛ شماره ۱؛ بهار سال ۱۳۸۶)

دریافت: ۱۳۸۶/۳/۱ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۸۶/۷/۱۰

^۱ پزشک عمومی

^۲ نویسنده مسؤل؛ دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
آدرس: بابل - خیابان گنج‌افروز - دانشگاه علوم پزشکی بابل - بخش بیوشیمی و بیوفیزیک کد پستی: ۴۷۷۴۵-۴۷۱۷۶
تلفن: ۰۱۱۱-۳۲۲۲۲۹۰ - نامبر: ۰۱۱۱-۲۲۲۶۱۰۹ - پست الکترونیکی: dqujeq@hotmail.com

^۳ متخصص بیماریهای داخلی؛ استادیار گروه آموزشی بیماریهای داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

^۴ متخصص بیماریهای داخلی و فلوشیب گوارش

مقدمه

بیماران با نارسایی مزمن کلیه، اختلالات متعددی در متابولیسم هم دارند؛ به طوری که کاهش فعالیت آنزیم آمینولولینیک اسید دهیدراتاز اریتروسیت و افزایش سطح پورفیرین پلاسما در این دسته از بیماران گزارش شده است (۱).

در پژوهشی که شاخصهای متابولیسم پورفیرین در مدل‌های تجربی نارسایی کلیه بررسی شد، به یازده خوکچه نر، دوزهای مختلف از سیکلوسپورین A داده شد. این دارو باعث کاهش فعالیت آمینولولینیک اسید دهیدراتاز اریتروسیت و افزایش پورفیرین خون گردید؛ همچنین اختلال بیوسنتز هم در بیماران نارسایی مزمن کلیه در مدل‌های تجربی نارسایی مزمن کلیه که با سیکلوسپورین ایجاد شده، نیز گزارش شده است (۲).

در بین اختلالات متابولیسم پورفیرین در بیماران با نارسایی کلیوی و همودیالیزی، کاهش فعالیت آنزیم آمینولولینیک اسید دهیدراتاز اریتروسیت گزارش شده است (۳). مطالعه بر روی بیماران با درجات مختلف اورمی نشان داده است که هرچه نارسایی کلیه شدیدتر باشد، مهارشدن آنزیم آمینولولینیک اسید دهیدراتاز بالاتر است (۴).

افزایش پورفیرین‌ها در این بیماران ممکن است در نتیجه افزایش فعالیت آمینولولینیک اسید سنتتاز باشد (۵). در تحقیقات اخیر محققان مراحل سنتز «هم» را بررسی کرده‌اند. در این پژوهشها، مسیرهای متابولیکی مهارشدن آنزیمی در پورفیری‌های مختلف توصیف شده است (۶).

در تحقیق دیگری فعالیت آمینولولینیک اسید دهیدراتاز و پورفیبیلینوژن دآمیناز در رتیکولوسیت‌های بیماران اورمیک، بیماران آمیک بدون اورمی و افراد نرمال اندازه‌گیری شد؛ یافته‌های این پژوهش نشان داد که فعالیت آمینولولینیک اسید دهیدراتاز اریتروسیت در بیماران اورمیک در مقایسه با افراد سالم کاهش یافته است (۷). سنجش سنتز «هم» در بیماران با نارسایی کلیوی ارتباط عمده با فعالیت آمینولولینات دهیدراتاز را نشان داد (۸).

مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵-آمینولولینیک اسید دهیدراتاز سرم در بیماران مزمن کلیوی و افراد شاهد بدون ابتلا به بیماری مزمن کلیوی انجام شد.

روش تحقیق

از این مطالعه تحلیلی، جهت انجام تحقیق، از تجهیزات اسپکتروفتومتر مدل سیسیل ۱۰۲۰ CE، سانتریفوژ کلمنت ۲۰۰۰، همزن مکانیکی، لوله آزمایش، بشر، تانک کرما توگرافی و پیت پاستور، استفاده شد.

همچنین اتانل و دلتا آمینولولینات، استات آمونیوم، متانول، سدیم کلراید از آزمایشگاه تهیه شدند. گروه بیمار شامل ۳۵ زن و ۲۵ مرد بیمار با نارسایی مزمن کلیوی و سن متوسط آنان $54/5 \pm 8/6$ سال بود. گروه شاهد نیز شامل ۴۵ زن و ۳۲ مرد و سن متوسط آنها $52/4 \pm 9/3$ سال بود.

بیماران دو گروه از نظر سن و جنس همسان بودند. جهت تهیه نمونه سرم، مقدار ۳-۲ میلی‌لیتر نمونه خون از بیماران هر دو گروه گرفته شد. لازم به ذکر است نمونه‌ها از بخش دیالیز بیمارستان شهید مطهری گنبد و از بخش دیالیز بیمارستان شهید بهشتی بابل با معرفی پزشکان متخصص داخلی تهیه گردید.

به منظور تهیه همولیزات خون، اریتروسیت پس از سانتریفوژ خون در دور ۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد و اریتروسیت‌ها دو بار با محلول $0/9\%$ کلرید سدیم شسته شد و مجدداً سانتریفوژ گردید؛ سپس اریتروسیت‌ها در محلول $0/15$ مولار کلرید سدیم، 10 میلی مول فسفات سدیم و $pH=7/4$ شسته شد و مجدداً سانتریفوژ گردید و تا زمان انجام آزمایشهای بعدی دردمای $20-20$ درجه سانتیگراد فریز شد.

روش اندازه‌گیری فعالیت ۵-آمینولولینیک اسید دهیدراتاز: آنزیم ۵-آمینولولینیک دهیدراتاز با کد آنزیمی EC.۴۰۲۰۱۰۲۴ آنزیمی است که واکنش تبدیل دلتا آمینولولینات را به پورفوبیلینوژن کاتالیز می‌کند. وزن مولکولی این آنزیم در حدود $252/000$ و به صورت اکتامر و نقطه ایزوالکتریک آن در حدود $4/9$ و حداکثر اندازه‌گیری pH آن حدود $6/4$ و میزان Km آن نیز $0/27$ است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵-آمینولولینات دهیدراتاز بر اساس روش Anderson (۵) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم ۵-آمینو لولینیک اسید با بافر همولیزات خون در $pH=6/4$ به مدت ۶۰ دقیقه در حرارت 37 درجه، شرایط

اسید دهیدراتاز را در رتیکولوسیت‌های بیماران اورمیک و بیماران کم خونی بدون اورمی و افراد نرمال اندازه‌گیری و گزارش کردند که فعالیت آمینولولینیک اسید دهیدراتاز در بیماران اورمیک در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد (۷).

مشابه یافته‌های این پژوهش محققان دیگر نیز گزارش کرده‌اند که نارسایی کلیه ایجادشده توسط سیکلوسپورین در خوکچه هندی باعث کاهش در فعالیت ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز می‌گردد (۲)؛ همچنین محققان کاهش فعالیت ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز در بیماران همودیالیزی را به وجود یک مهارکننده فعالیت آنزیم در بیماران اورمیک که ماهیت پپتیدی دارد، نسبت داده‌اند (۳).

در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است که فعالیت ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز در بیماران همودیالیزی و در بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیوی کاهش می‌یابد و بین تغییرات میزان هموگلوبین و فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز در بیماران همودیالیزی، رابطه مستقیمی وجود دارد (۱۱)؛ همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ویتامین E از آنزیم ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز در برابر آسیب و مهارکنندگان آن جلوگیری می‌کند (۱۲).

نتیجه این پژوهش در تحقیقات آینده برای بررسی فعالیت این آنزیم در بیماران همودیالیزی بسیار مفید خواهد بود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینیک اسید دهیدراتاز اریتروسیت در بیماران با نارسایی مزمن کلیوی کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

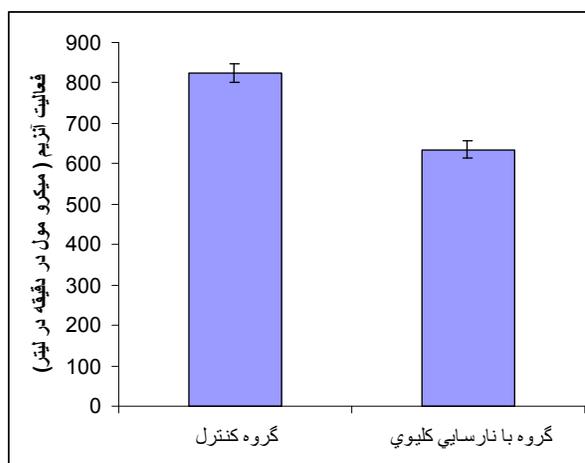
این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی اعلام می‌گردد؛ از بیمارانی که در تهیه نمونه همکاری صمیمانه داشتند، سپاسگزاری می‌گردد.

آزمایشگاه آنکوبه گردید. مقدار پورفوبیلینوژن تولید شده در طول موج ۵۵۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب مقدار میکرومول پورفوبیلینوژن تولید شده در هر دقیقه در هر لیتر اریتروسیت محاسبه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری Student t در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

مقدار فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در افراد گروه شاهد $825/4 \pm 23/6$ میکرومول در دقیقه در لیتر اریتروسیت و در افراد گروه مورد (با نارسایی کلیوی) $634/7 \pm 21/2$ میکرومول در دقیقه در لیتر اریتروسیت به دست آمد؛ این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در افراد نرمال و افراد مبتلا به نارسایی کلیوی؛ مقادیر بر حسب میانگین و انحراف معیار (سطح معنی‌داری $P < 0/05$)

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم ۵- آمینولولینات دهیدراتاز در افراد مبتلا به نارسایی کلیوی کاهش می‌یابد. این کاهش فعالیت آنزیم ممکن است به دلیل مهار فعالیت آنزیمی، به دلیل تخریب ساختمان آنزیم و یا به دلیل کاهش تولید مقدار mRNA این آنزیم باشد. این یافته با گزارش سایر مطالعات مشابه همخوانی دارد (۱۱ و ۹ و ۳).

در این مورد محققان در مطالعه‌ای فعالیت ۵- آمینولولینیک

منابع:

- 1- Fontanellas A, Torralbo A, Santos JL, Moran Arrientos A, Enriquez de Salamanca R. Reduced aminolevulinic dehydrase activity with increased blood porphyrins in experimental chronic renal failure. *Exp Nephrol.* 1997; 5 (1): 95-89.
- 2- Fontanellas A, Herrero JA, Enriquez de Salamanca R. Reduced aminolevulinic dehydrase activity in rats with functional renal failure induced by cyclosporin A. *Exp Nephrol.* 1997; 5 (4): 323-29.
- 3- Guolo M, Machalinski C, Biscoglio M, Stella AM, Franco C, Pa L, et al. Inhibition of erythrocyte aminolevulinic dehydratase by 56/2-KD peptide from uremic plasma. *Exp Nephrol.* 1999; 7 (3): 236-41.
- 4- Wallner SF, Vautrin RM. Evidence that inhibition of erythropoiesis is important in the anemia of chronic renal failure. *J Lab Clin Med.* 1981; 97 (2): 170-78.
- 5- Anderson CD, Rossi E, Garcia-Webb P. Porphyrin studies in chronic renal failure patients on maintenance hemodialysis. *Photodermatol.* 1987; 4 (1): 14-22.
- 6- Poh-Fitzpatrick MB, Sosin AE, Bemis J. Porphyrin levels in plasma and erythrocytes of chronic hemodialysis patients. *J Am Acad Dermatol.* 1982; 7 (1): 100-104.
- 7- Leber HW, Sinning P, Schuttele G. Porphobilinogen and porphyrin synthesis in reticulocytes from uraemic patients. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1975; 11: 383-90.
- 8- Fontanellas A, Navarro S, Moran-Jimenez MJ, Sanchez-Fruct AI, Vegh I, Barrientos A, et al. Erythrocyte aminolevulinic dehydratase activity as a marker in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2002; 40 (1): 43-50.
- 9- Gebril M, Weinkove C, Ead R, McDonald K, Morton R. Plasma porphyrins in chronic renal failure. *Nephron.* 1990; 55 (2): 159-63.
- 10- Hindmarsh T, Oliverasand L, Donald C, Way G. Plasma porphyrins in the porphyrias. *Clin Chem.* 1999; 45: 1070-76.
- 11- Da Silva Ac, Rocha JB, Morsch AL, Zanin RF, Kaizer R, Maldonado PA, Arantes LC, Silva LA, Morsch VM, Schetinger MR. Oxidative stress and delta AIA -D activity in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother.* 2007, 61: 180-85.
- 12- Rendon-Ramrez A, Maldonado -Vega M, Calderon-Salinas JV. Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol In-vitro.* 2007; 21: 1121-26.

Title: Assay of 5-aminolevalinate dehydratase in chronic renal failure patients

Authors: Z. Hoozyari¹, S. Kannai¹, D. Qujeq², F. Ouliaei³, K. Aghcheli⁴

Background and Aim: 5- aminolevulinic acid dehydratase is the second enzyme in the heme biosynthetic pathway. This enzyme catalyzes the delta-aminolevulinic acid to prophobilinogen. Because there have been few studies in chronic renal failure, we thought it useful in patients with chronic renal failure. Thus, the goal of this study is to measure 5- aminolevalinate dehydratase activity in patients with chronic renal failure.

Materials and Methods: Blood was obtained from patients with chronic renal failure for 5- aminolevulinic acid dehydratase activity determination in erythrocytes. Measurement was based upon the conversion of uminolevulinic acid to porphobilinogen, which is then measured spectrophotometrically.

Results: Our results showed that 5-aminolevulinic acid dehydratase activity was (634.7±21.2 micromol/L/min) in patient group and in control group was (825.4±23.6 micromole/L/min).

Conclusions: Our results showed that 5-aminolevulinic acid dehydratase activity was decreased in patients with chronic renal failure when compared to control group. These results showed that this enzyme may be inhibited in patients group.

Key Words: 5-aminolevulinic acid; Dehydratase (ALA-D); Porphyrin; Chronic; Renal failure (CRF)

¹ Physician

² Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences. Babol, Iran
dqjeq@hotmail.com

³ Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences. Babol, Iran

⁴ Physician of Internal Medicine