

نسبت‌های فعالیت آنزیم آرژیناز به فاکتورهای بیوشیمیایی سرم بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز به عنوان شاخص‌های بالینی جدید

دکتر نعمت الله رزمی^{۱*}، دکتر سعید نظیفی^۲، دکتر حمید درازهی^۳

۱- استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

۲- استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

چکیده

مقدمه: یافتن شاخص‌های پیش‌آگهی دهنده می‌تواند در جهت تشخیص سریع‌تر و تصمیم‌گیری بهتر در روند درمان بیماران همودیالیزی، پزشک را یاری دهد. در این پژوهش، به عنوان یک پیشنهاد جدید، نسبت‌های فعالیت آنزیم آرژیناز سرمی به سایر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز و افراد سالم بررسی و مقایسه گردیده و در نهایت به‌عنوان شاخص‌های بالینی جدید در تشخیص میزان پیشرفت بیماری و همچنین بررسی روند درمان اندازه‌گیری و مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش بر روی ۲۸۶ نمونه سرم خون انسان انجام شد. ۲۰۶ نمونه سرم متعلق به بیماران همودیالیزی (۱۰۳ نمونه قبل و ۱۰۳ نمونه بعد از دیالیز) و ۸۰ نمونه متعلق به افراد سالم بود. فعالیت آرژیناز به روش اوره، ازت اوره خون به روش اوره‌آز، اسیداوریک به روش اصلاح شده فولین، کراتینین به روش ژافه و پروتئین تام به روش بیوره اندازه‌گیری شد.

نتایج: فعالیت آرژیناز سرم بین بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز و بعد از دیالیز با افراد سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$). همچنین فعالیت این آنزیم بین بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$). به این معنی که عمل دیالیز در کاهش فعالیت آنزیم آرژیناز مؤثر نبوده است. نسبت فعالیت آرژیناز سرمی به ازت اوره خون، کراتینین و اسیداوریک سرم بین بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز با افراد سالم و همچنین این نسبت‌ها بین بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$). به دلیل اختلاف معنی‌داری که بین میزان پروتئین تام سرم هر دو گروه سالم و نمونه‌های بعد از دیالیز، با نمونه‌های قبل از دیالیز وجود داشت، بین فعالیت ویژه آنزیم آرژیناز (نسبت فعالیت آرژیناز به پروتئین تام) گروه‌های سالم، قبل و بعد از دیالیز تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: این پژوهش پیشنهاد می‌نماید که نسبت‌های فعالیت آرژیناز سرم بیماران همودیالیزی به سایر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم به غیر از پروتئین تام می‌تواند به عنوان شاخص‌های پیش‌آگهی دهنده در روند بهبود و درمان بیماران همودیالیزی به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آرژیناز، بیماران همودیالیزی، نارسایی کلیه، همودیالیز

مقدمه

نسبت آن به برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم، نظیر ازت اوره، کراتینین و اسید اوریک در جهت به دست آوردن شاخص بالینی جدید، سنجیده و مقایسه گردد و در صورت به دست آمدن تفاوت‌های معنی‌دار بین نسبت‌ها در بین گروه بیمار قبل و بعد از دیالیز با گروه سالم، این نسبت‌ها به عنوان شاخص‌های بالینی جدید معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی ۲۸۶ نمونه سرم انسانی آزمایش شد. از این تعداد ۲۰۶ نمونه مربوط به بیماران همودیالیزی بود که در دو مرحله قبل و بعد از همودیالیز تهیه گردید و ۸۰ نمونه مربوط به افراد سالم بود. نمونه‌های سرم مربوط به افراد داوطلب سالم (گروه شاهد) با همکاری سازمان انتقال خون شیراز تهیه شد. داوطلبان از نظر بالینی و آزمایشگاهی سالم بودند. نمونه‌گیری از بیماران همودیالیزی در دو مرحله یکی قبل و دیگری در فاصله ۱/۵ تا ۳ ساعت بعد از همودیالیز در بخش همودیالیز بیمارستان شهید بهشتی شیراز انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و پس از لخته شدن در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم‌های جدا شده تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نمونه‌های سرم افراد سالم و بیماران همودیالیزی، ازت اوره خون به روش آنزیمی اوره‌آز، اسید اوریک به روش اصلاح شده فولین (۶)، پروتئین تام به روش بیوره و کراتینین به روش ژافه اندازه‌گیری شد (۷ و ۸). برای سنجش فعالیت آنزیم آرژیناز از روش اوره استفاده شد که بر اساس مقدار اوره تولید شده در خلال واکنش تعیین می‌گردد (۹، ۱۰ و ۱۱). برای مقایسه پارامترهای بیوشیمیایی و همچنین نسبت‌های آرژیناز به هر یک از پارامترها در سرم افراد سالم و بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز پس از اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها (با استفاده از آزمون کولمورگروف اسمیرنوف) از آزمون‌های آماری پارامتریک آنالیز واریانس و دانکن در نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

میانگین غلظت ازت اوره، کراتینین، اسید اوریک، پروتئین تام و فعالیت آرژیناز سرم خون بیماران همودیالیزی قبل و

هدف از درمان نارسایی کلیه، رهایی بدن از سموم تجمع یافته و برقراری تعادل اسید و باز و مایعات بدن در بهترین شرایط می‌باشد. فناوری همودیالیز با عبور دادن خون و مایع دیالیز در طرفین یک غشاء، این مهم را به انجام می‌رساند (۱). هر چند که امروزه اوره به عنوان یک سم خیلی مهم در جریان اورمی تلقی نمی‌شود، اما از آن به عنوان نشان‌های از وجود تجمع مواد سمی استفاده می‌شود. پس از درمان، غلظت اوره خون با تغییرات بالینی بیمار در ارتباط است و بیانگر وجود یا عدم وجود سموم در خون می‌باشد (۱ و ۲). آرژیناز در فرآیند تبدیل آمونیاک به اوره در کبد، نقش سم-زدایی خود را ایفا می‌کند. علیرغم اینکه منبع اصلی آرژیناز سرم، کبد است و فعالیت آن به طور چشمگیری در آسیب‌های کبدی افزایش می‌یابد، اما آرژیناز در بافت کلیه انسان و پستانداران نیز وجود دارد و می‌توان در آسیب‌های کلیوی نیز انتظار افزایش فعالیت سرمی آن را داشت. آرژیناز در بافت کلیه دارای ایزوآنزیم A_2 است که به وسیله پرولین مهار می‌شود (۳، ۴ و ۵). به دلیل نقش این آنزیم در تولید اوره توسط کبد این سؤال مطرح می‌شود که آیا بین فعالیت آرژیناز سرم و اوره در حالت سلامت و در بیماران مبتلا به نارسایی کلیوی رابطه معنی‌داری وجود دارد یا خیر؟ آیا در بیماران همودیالیزی که بیمار نمی‌تواند اوره، کراتینین و اسید اوریک را به طور مطلوب دفع نماید و این فاکتورها در سرم خون افزایش می‌یابند، آرژیناز سرم نیز افزایش می‌یابد؟ نسبت تغییرات آرژیناز با تغییرات فاکتورهای مذکور تناسبی دارد؟ و آیا آرژیناز می‌تواند به جای اوره، کراتینین، اسید اوریک و پروتئین تام به کار رود و یا با تعریف شاخص‌های نسبی جدید بین آرژیناز و سایر فاکتورها، اندازه‌گیری آرژیناز نیز به عنوان یک آزمون مفید کاربردی شود. نسبت‌های فعالیت آرژیناز سرم به غلظت ازت اوره خون، کراتینین و اسید اوریک سرم با دیگر نتایج بیوشیمیایی همودیالیز چه ارتباطی می‌تواند داشته باشد؟

برای پاسخ به این سؤالات، تحقیق حاضر به این ترتیب طراحی شد که فعالیت آرژیناز سرم در افراد سالم و بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز مورد سنجش قرارگیرد و

نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز این فاکتور به ترتیب ۷۷ و ۶۵ درصد نسبت به همین فاکتور در نمونه‌های افراد سالم افزایش نشان داد ($P < 0/01$).

نتایج مقایسه نسبت‌های آرژیناز به چهار فاکتور بیوشیمیایی دیگر در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نسبت آرژیناز به ازت اوره خون در افراد سالم به ترتیب ۲/۵ و ۱/۵ برابر همین نسبت در نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز می‌باشد. نسبت آرژیناز به کراتینین سرم در افراد سالم به ترتیب ۵/۵ و ۳ برابر همین نسبت در نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز می‌باشد. نسبت آرژیناز به اسید اوریک سرم در افراد سالم به ترتیب ۵۰ و ۲۰۰ درصد نسبت به نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز افزایش داشته است. ملاحظه می‌گردد که این نسبت‌ها در نمونه‌های بعد از دیالیز نزدیک به ۲ برابر قبل از دیالیز می‌باشد. در مقایسه فعالیت ویژه آرژیناز میان سه گروه مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P < 0/01$).

بحث

در این پژوهش، در مقایسه با افراد سالم، افزایش معنی‌داری در غلظت ازت اوره خون، اسید اوریک و کراتینین سرم بیماران همودیالیزی دیده شد. با توجه به پالایش و دفع این ترکیبات از راه کلیه، انتظار طبیعی این است که در نارسایی‌های کلیوی و بیماران همودیالیزی غلظت این پارامترها در

بعد از دیالیز، در کنار نتایج نمونه‌های سالم در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در مقایسه ازت اوره خون، اختلاف معنی‌دار بین سه گروه مورد آزمایش وجود داشت، به نحوی که در نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز این فاکتور به ترتیب ۴/۵ و ۲/۵ برابر همین فاکتور در نمونه‌های افراد سالم اندازه‌گیری شد ($P < 0/01$).

در مقایسه کراتینین سرم، اختلاف معنی‌دار بین سه گروه مورد آزمایش وجود داشت، به نحوی که در نمونه‌های قبل و بعد از دیالیز این فاکتور به ترتیب ۱۰ و ۵ برابر همین فاکتور در نمونه‌های افراد سالم، اندازه‌گیری شد ($P < 0/01$).

در مقایسه اسید اوریک سرم نیز اختلاف معنی‌دار بین سه گروه مورد آزمایش وجود داشت، به نحوی که در نمونه‌های قبل از دیالیز این فاکتور ۲۵ درصد بیش‌تر از همین فاکتور در نمونه‌های افراد سالم اندازه‌گیری شد، در حالی که در نمونه‌های بعد از دیالیز به نصف میزان همین فاکتور در نمونه‌های افراد سالم رسید ($P < 0/01$).

در مقایسه پروتئین تام سرم اختلاف معنی‌دار بین گروه قبل از دیالیز با دو گروه دیگر وجود داشت ($P < 0/01$)، در حالی که تفاوت معنی‌دار بین گروه سالم و بعد از دیالیز وجود نداشت ($P < 0/01$).

در مقایسه میزان فعالیت آرژیناز سرم، بین سه گروه مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود داشت، به نحوی که در

جدول ۱- نمایش (میانگین \pm انحراف استاندارد) غلظت ازت اوره، کراتینین، اسید اوریک، پروتئین تام و فعالیت آرژیناز سرم خون بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز در مقایسه با افراد سالم.

پارامتر بیوشیمیایی گروه‌های مورد آزمایش	ازت اوره خون (mg/l)	کراتینین (mg/l)	اسید اوریک (mg/l)	پروتئین تام (g/l)	آرژیناز (IU/L)
افراد سالم	۱۴۵/۲۰ \pm ۱۳/۱۰ ^a	۹/۳۱ \pm ۰/۷۲ ^a	۶۲/۵۱ \pm ۱۲/۲۳ ^a	۶۸/۱۲ \pm ۱۱/۹۲ ^a	۹۰/۵۳ \pm ۵/۷۲ ^a
بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز	۶۶۸/۷۰ \pm ۲۲/۲۰ ^b	۹۷/۴۱ \pm ۲/۷۳ ^b	۸۰/۸۳ \pm ۲/۰۶ ^b	۹۶/۷۸ \pm ۱/۳۳ ^b	۱۶۷/۹۸ \pm ۱/۷۶ ^b
بیماران همودیالیزی بعد از دیالیز	۳۵۸/۸۹ \pm ۲۴/۲۰ ^c	۴۶/۷۸ \pm ۱/۵۴ ^c	۳۷/۷۸ \pm ۱/۱۱ ^c	۷۴/۳۲ \pm ۲/۱۴ ^a	۱۵۵/۱۷ \pm ۱/۸۹ ^c

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف لاتین نامتشابه هستند دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($P < 0/01$).

جدول ۲- مقایسه (میانگین \pm انحراف استاندارد) نسبت‌های میان فعالیت آرژیناز سرم به ازت اوره، کراتینین، اسید اوریک و پروتئین تام سرم خون بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز ۸۰ با افراد سالم.

نسبت‌ها گروه‌های مورد آزمایش	آرژیناز به ازت اوره خون IU/mg	آرژیناز به کراتینین IU/mg	آرژیناز به اسید اوریک IU/mg	آرژیناز به پروتئین تام $X10^{-3}$ IU/mg
افراد سالم	۰/۶۴ \pm ۰/۰۳ ^a	۹/۸۶ \pm ۰/۶۷ ^a	۱/۴۷ \pm ۰/۲۸ ^a	۱/۳۸ \pm ۰/۳۷
بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز	۰/۲۵ \pm ۰/۰۲ ^b	۱/۷۳ \pm ۰/۱۶ ^b	۲/۰۸ \pm ۰/۲۲ ^a	۱/۷۴ \pm ۰/۳۴
بیماران همودیالیزی بعد از دیالیز	۰/۴۳ \pm ۰/۰۲ ^c	۳/۳۲ \pm ۰/۳۲ ^c	۴/۱۰ \pm ۰/۴۳ ^c	۲/۰۹ \pm ۰/۲۳

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف لاتین نامتشابه هستند دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($P < 0/01$).

سرم خون افزایش یابد (۱ و ۱۲). بعد از دیالیز از غلظت این ترکیبات در سرم خون بیماران همودیالیزی کاسته شده است ولی مقادیر آن‌ها به استثناء اسید اوریک و پروتئین تام، همچنان بالاتر از میزان طبیعی است. با عمل همودیالیز مواد سمی با وزن مولکولی کم که در بدن تجمع یافته‌اند، خارج می‌شوند و به همین دلیل همودیالیز تمام عوارض اورمی را در بیمار برطرف نمی‌کند ولی باعث جلوگیری از مرگ می‌شود. به هر صورت همودیالیز قادر نیست کارهای کلیه را به عنوان یک غده مترشحه داخلی جبران نماید (۱، ۷ و ۱۳). مکانیسم عمل دستگاه همودیالیز بر این پایه استوار است که خون بیمار از داخل لوله‌های نیمه تراوی موجود در دستگاه عبور کرده و مواد قابل دیالیز از خون وارد محلول دیالیز شده و به عکس، مواد ضروری از محلول دیالیز وارد خون می‌شوند و خون تصفیه شده بعد از این تبادلات به بدن بیمار باز می‌گردد و در داخل بدن نیز همین پدیده بین خون و سلول‌های بدن انجام گرفته و دوباره خون سموم را از سلول‌ها گرفته و وارد دستگاه کلیه مصنوعی می‌نماید (۱، ۷ و ۱۴).

آنزیم آرژیناز در بافت کلیه وجود دارد و از اینرو در آسیب‌های کلیوی این آنزیم از سلول‌های کلیوی آزاد شده و جذب خون می‌شود. بنا بر این افزایش کاملاً مشخصی در فعالیت سرمی آنزیم آرژیناز دیده می‌شود (۴، ۷ و ۱۵). در این پژوهش، در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آرژیناز سرم بیماران همودیالیزی دیده شد. پس از عمل دیالیز اگر چه از فعالیت سرمی آرژیناز کاسته شده ولی همچنان بالاتر از فعالیت طبیعی آن بوده و این نشان می‌دهد که عمل دیالیز در کاهش فعالیت سرمی آرژیناز چندان مؤثر نیست.

نکته بسیار مهم و جالب در پژوهش حاضر این است که ازت اوره خون در بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز بالا بوده است ($22/20 \pm 668/70$ میلی گرم در لیتر) اما بعد از دیالیز کاهش چشمگیری یافته است ($358/89 \pm 24/20$ میلی گرم در دسی لیتر). در مقایسه با ازت اوره خون، فعالیت آرژیناز سرم در بیماران همودیالیزی قبل از دیالیز بالاست ($167/98 \pm 1/76$ IU/L) اما بعد از دیالیز کاهش معنی‌داری نداشته است و همچنان بالا مانده است (IU/L).

در این پژوهش نسبت فعالیت آنزیم آرژیناز سرم به هر یک از فاکتورهای سه گانه‌ی ازت اوره خون، کراتینین، اسید اوریک سرم در افراد سالم و بیماران همودیالیزی قبل و بعد از دیالیز، به عنوان یک شاخص بالینی جدید، مقایسه شده است که این نسبت‌ها، تفاوت‌های بارزتری را بین سه گروه مورد آزمایش به نمایش گذاشته است. این شاخص‌ها تعداد واحدهای بین المللی آنزیم به ازای هر میلی گرم از فاکتورهای سه گانه‌ی فوق یا توزیع فعالیت این آنزیم بر میزان فاکتورهای سه گانه را در هر سه گروه مورد آزمایش

3. Meyer DJ, Harvey JW, editors. Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis. 2nd ed. WB Saunders Co; 1998.
4. Kaneko JJ, editors. Clinical biochemistry of domestic animals. 4th ed. New York :Academic Press Inc; 1989.
5. Duncan JR, Prasse KW, editors. Veterinary laboratory medicine clinical pathology. 3rd ed. Iowa State University Press: Ames Iowa; 1994.
6. Folin O. An improved method for the determination of uric acid in blood. J Biol Chem 1930; 86: 179-187.
7. Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994.
8. Gopalakrishna R, Nagarajan B. A simplified procedure for the estimation of arginase in plasma and urine using arginine. Clin Chemic Acta 1980; 106: 333- 337.
9. Natelson S, editor. Techniques of clinical chemistry. 3rd ed. USA: Thomas Publisher; 1971.
10. Cornelius CE, Freedland RA. The determination of arginase activity in serum by means of gel filtration. Cornell Vet 1961; 52: 344- 360.
11. Baranczyk K, Iwonaskrzypek O. Arginase from human blood serum. Biochemi Med 1981; 26: 174-184.
12. Bishop ML, Duben- Engelkirk JL, editors. Clinical chemistry. Principle, procedures, correlations. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott; 1996.
13. Rac RM, Mishra OP. Dermal wound healing in experimentally injured rats: Role of arginase. Nutr Rep Int 1980; 22: 167- 172.
14. Grody W. Differential expression of the two human arginase gene in hyperargininemia. J Clin Invest 1989; 83: 602- 609.
15. Pelkin V, Kalub M. Determination of arginase activity in blood in epidemic hepatitis. Clin Chem Acta 1984; 9: 141- 147.
16. Lehninger AL, Nelson DL, editors. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York: Worth Publishers; 1993.
17. Maning RT, Grisolia A. Serum arginase activity. Exp Biol Med 1954; 95: 225- 235.

به نمایش و مقایسه گذاشته است. این شاخص نوعی فعالیت ویژه‌ی جدید را تعریف نموده است، بدین معنی که علاوه بر توزیع فعالیت آنزیم بر مقدار پروتئین موجود در هر نمونه، این توزیع را بر مقدار فاکتورهای دیگر موجود در آن نمونه نیز تعیین نموده است. ملاحظه می‌گردد که میان هر سه گروه مورد آزمایش، نسبت‌های مربوط به فاکتورهای ازت اوره خون و کراتینین سرم، دارای اختلاف معنی‌دار بوده‌اند و با توجه به معنی‌دار بودن اختلاف در مقادیر هر یک از فاکتورهای صورت و مخرج این نسبت‌ها، و این که این شاخص جدید، منحصر به مقایسه‌ی خود فاکتورها در هر سه گروه نمی‌شود بلکه مقدار این شاخص نسبت عکس با مقدار هر یک از فاکتورها دارد. با توجه به بالا بودن غلظت ازت اوره خون، کراتینین، اسید اوریک و فعالیت آرژیناز سرم در بیماران همودیالیزی، قبل و بعد از عمل دیالیز و با توجه به اینکه کلیه‌ها کاملاً نارسا و دچار اختلال هستند. با توجه به ارتباط تنگاتنگ اوره و آرژیناز، به دست آوردن چنین ارتباطی در افراد سالم دور از انتظار نیست، زیرا در چرخه اوره یکی از آنزیم‌های مهم مشارکت کننده آرژیناز است (۱۶ و ۱۷).

پیشنهاد می‌شود در کنار سنجش ازت اوره خون، کراتینین و اسید اوریک سرم، فعالیت آرژیناز سرم بیماران همودیالیزی نیز اندازه‌گیری شود و تغییرات نسبت آن به هر یک از این فاکتورهای سه‌گانه به عنوان یک شاخص بالینی، در طول دوران دیالیز و نارسایی کلیوی مورد توجه و سنجش قرار گیرد. چرا که با بررسی دقیق این شاخص، می‌توان به پیشرفت بیماری یا روند بهبود آن در بیمار تا حد زیادی پی‌برد.

منابع

1. Isselbacher KJ, Braunwald E, editors. Harrison's principles of internal medicine. 13th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994.
2. Bach JS, Killip M. Purification and crystalization of arginase. Biochem Biophys Acta 1958; 29: 273-280.