● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال هفتم، شمارهٔ ۲ (پی‌درپی ۲۶)، صفحه ۱۸ الی ۲۳، بهار ۱۳۸۴
دریافت: ۸۳/۲/۲۳ پذیرش: ۸۳/۹/۱۱

اندازه گیری هوموسیستئین تام پلاسما به روش کروماتوگرافی معکوس با کارائی بالا (RP-HPLC) بدون استفاده از استاندارد داخلی

فرامرز دارابی[۱*]، دکتر بمانعلی جلالی[۲]، دکتر منصور رفیعی[۳]، دکتر علی بابائی[۳]، سیدمجید مهدوی[۵]
۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی ۲- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی یزد ۳- دانشیار گروه داخلی دانشگاه علوم پزشکی یزد
۴- استادیار گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی یزد ۵- کارشناس ارشد شیمی

سابقه و هدف: هوموسیستئین اسیدآمینه‌ای با گروه آزاد تیولی است و به عنوان یک واسطه طی متابولیسم متیونین به سیستئین تشکیل می‌گردد. اندازه‌گیری هوموسیستئین تام پلاسما ممکن است در شرایط کلینیکی مختلفی از قبیل هوموسیستئین اوری، آتروواسکلروز، ترومبوفیلی و کمبود ویتامینهای B_{12} و اسیدفولیک مفید و ارزشمند باشد. هدف از این مطالعه بررسی قابلیتهای روش HPLC فاز معکوس با دتکتور فلورسانس جهت سنجش هوموسیستئین بوده است.

مواد و روشها: هوموسیستئین تام پلاسما بوسیله روش کروماتوگرافی با کارائی بالا (HPLC) با دتکتور فلورسانس بعد از احیاء انواع هوموسیستئین پلاسما بوسیله تریس (۲- کاربوکسی اتیل) فسفین(TCEP) و مشتق سازی با آمونیوم ۷- فلورو بنزو ۲- اکسا ۱ و۳- دیازول ۴- سولفونات (SBD-F) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: حساسیت روشHPLC جهت سنجش هوموسیستئین در حد ۰/۲ µ mol/L، دقت روش (ضریب تغییراتCV) در یک مرحله بین۲/۶۷ تا ۴/۵۶درصد و در بین مراحل و روزهای مختلف ۵/۴۳ تا ۸/۱۷ درصد و صحت (بازیابی) روش بین ۹۳ تا ۱۰۳/۴درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشانگر آن است که روش HPLC با دتکتور فلورسانس برای سنجش هوموسیستئین روشی حساس (حد پایین ۰/۲µmol/L) و دقیق (ضریب تغییرات بین۲/۶۷ تا۸/۱۷ درصد) است و دارای صحت مناسبی (بازیابی بین۹۳ تا ۱۰۳/۴درصد) می‌باشد و لذا روشی قابل اطمینان بخصوص در کارهای تحقیقاتی است. با توجه به آنکه هوموسیستئین یک عامل خطرزا برای بیماری عروق کرونر می‌باشد، راه‌اندازی روش فوق از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

واژه های کلیدی: *هوموسیستئین، آتروواسکلروز، HPLC، پلاسما.*

مقدمه

هوموسیستئین نوعی اسیدآمینه است که به عنوان یک ترکیب واسط در متابولیسم اسیدهای‌آمینه گوگرددار شرکت دارد(۱). ارتباط بین غلظت پلاسمائی هوموسیستئین و بیماری عروق کرونر اولین بار در سال ۱۹۶۰ میلادی مورد توجه قرار گرفت(۲). در سالهای اخیر مطالعات اپیدمیولوژیکی زیادی در ارتباط با هوموسیستئین تام پلاسما و بروز بیماریهای عروق کرونر صورت گرفته است، که اغلب رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت این ترکیب در پلاسما و بروز بیماریهای قلبی- عروقی را نشان داده‌اند(۵-۳). امروزه غلظت بالای هوموسیستئین در پلاسما (بیشتر از ۱۵ میکرومول بر لیتر)، به عنوان یک عامل خطرزای مهم و مستقل برای بیماریهای قلبی- عروقی مطرح است(۵-۳). روشHPLC با دتکتور فلورسانس توسط محققین مختلف برای سنجش هوموسیتئین بکار رفته است(۹-۶)،

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]

اما در ایران کمتر مورد توجه بوده است. غلظت هوموسیستئین در پلاسما تحت تأثیر عوامل ژنتیکی، شیوه زندگی، رژیم غذائی و بویژه میزان ویتامینهای B_6، B_{12} واسیدفولیک قرار می‌گیرد(۱۰). در مناطق مختلف کشور ایران بیماریهای قلبی- عروقی شیوع بالایی دارد(۱۱). شیوع بیماریهای فوق بعضا" با عوامل خطرساز سنتی نظیر لیپیدها قابل توجیه نیست، ودخالت عوامل خطرساز جدید از جمله هوموسیستئین دور از انتظار نمی‌باشد. مناطق مختلف ایران از نظر تنوع نژادی، شیوه زندگی، رژیمها و عادات غذائی، با یکدیگر و همچنین با سایر نقاط جهان متفاوت است. اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با عوامل خطرساز سنتی در نواحی مختلف کشور صورت گرفته است، ولی عوامل خطرساز جدید از جمله هوموسیستئین کمتر مورد توجه بوده، و این امکان وجود دارد که یکی از دلایل شیوع بالای بیماریهای قلبی- عروقی، افزایش غلظت پلاسمائی این ترکیب در افراد جامعه باشد. شاید یکی از دلایلی که هوموسیستئین کمتر مورد توجه قرار گرفته است، عدم دسترسی به یک روش مطمئن برای اندازه‌گیری آن باشد. سنجش پلاسمائی این ترکیب به روشهای ایمونوشیمیائی، و کروماتوگرافی با کارائی بالا (HPLC) صورت می‌گیرد(۱۲و۱). اما روشHPLC دقیقتر بوده و در کارهای تحقیقاتی اهمیت بیشتری دارد. هدف اصلی از انجام این مطالعه، راه‌اندازی و ارزیابی قابلیتهای یک نوع روش HPLC برای تعیین مقدار هوموسیستئین تام در پلاسما بوده است.

مواد و روشها

D و L- هوموسیستئین، تریس (۲- کاربوکسی اتیل) فسفین (TCEP)، آمونیوم ۷- فلورو بنزو ۲- اکسا-۱ و ۳- دیازول ۴-سولفونات(SBD-F) و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید(EDTA) از شرکت سیگما و متانل، اسیدبوریک و سایر مواد شیمیائی از نوع آنالیتیکال از شرکت مرک خریداری شد. ستون آنالیتیکال (150x6 mm, ODS-2) از شرکت شیمادسو تهیه گردید. برای تهیه محلولها از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد. محلول استاندارد ذخیره از D و L- هوموسیستئین (960 µmol/L) بوسیله حل کردن ۰/۰۱۳۵ گرم از استاندارد هوموسیستئین (۹۵٪) در۱۰۰mL بافر بورات (۰/۱۲۵ mol/L) تهیه گردید. با رقیق کردن محلول ذخیره، محلول کار با غلظتهای مختلف (µ mol/L ۹۶، ۴۸،۲۴،۱۲،۶ ، ۳) تهیه شد. محلولها تا زمان استفاده در ^{o}C ۴ نگهداری شد.

سنجش هوموسیستئین تام پلاسما مطابق روش Gilfix و همکاران(۱۳) با تغییرات اندک به صورت زیر انجام شد. ابتدا ۱۰µL از محلول TCEP، ۱۰۰ گرم بر لیتر در آب مقطر را به ۵۰µL پلاسما یا محلول استاندارد و ۵۰ µL بافر فسفات (pH=7.5) اضافه کردیم و پس از مخلوط کردن اجازه دادیم تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بماند، این کار باعث می‌شود که عمل احیاء صورت گیرد (باندهای دی سولفیدی احیاء شوند و هوموسیستئین از پروتئین آزاد شود). سپس۹۰µL از محلول تری کلرواستیک ۱۰۰ گرم بر لیتر حاوی ۱m mol/L از EDTA را به آن اضافه نمودیم، بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g، ۵۰µL از محلول روئی آن را به یک لوله حاوی ۱۰µL محلول ۱/۵۵ mol/L از NaOH، ۱۲۵µL بافر بورات ۰/۱۲۵mol/L حاوی ۴mmol/L از EDTA (PH=9.5) و ۵۰µL محلول ۱g/L از محلولSBD-F در بافر بورات اضافه کردیم. بعد از مخلوط کردن آنها، محلول حاصل را به مدت ۶۰ دقیقه در ^{o}C ۶۰ انکوبه کردیم تا عمل مشتق سازی صورت گیرد. سپس اجازه دادیم تا در دمای اتاق سرد شود. هربار ۱۰µ L از هر نمونه به ستون تزریق شد. در این مطالعه از دستگاه HPLC، ساخت شرکت Shimadzu مدلSPD-6AV که با یک پمپ مدل LC-6A و یک سیستم کنترل کننده حلال و فاز متحرک با درجه کاهش فشار مدل FCV-3AL و دتکتور فلورسانس (UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC) استفاده شد. دستگاه فوق دارای یک سیستم تزریق کننده از نوع دریچه و حلقه (LOOP VALVE) است که دو حالت بارگیری و تزریق دارد. در حالت بارگیری تمام حجم حلقه از نمونه پر می‌شود و در حالت تزریق، با انجام کار مکانیکی (چرخش حلقه) نمونه به ستون تزریق می‌شود. آمینو تیولها و از جمله هوموسیستئین در یک ستون (C:18) ODS-2 به ابعاد 100x6mm جداسازی شدند. بافر شوینده شامل بافر استات ۰/۱moL/L با pH=۵/۵ حاوی ۳۰mL/L متانل بود. محلول فوق به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. شستن ستون کروماتوگرافی به روش ایزوکراتیک و با سرعت ۰/۷mL/min

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]

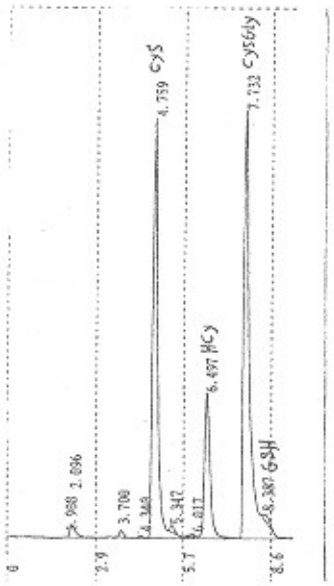
انجام گرفت. طول موج تحریکی ۳۸۵nm و طول موج نشری ۵۱۵nm برای سنجش با دتکتور فلورسانس بود. برای محاسبه غلظت هوموسیستئین ما ابتدا غلظت‌های مشخصی (شش غلظت ۹۶، ۴۸، ۲۴، ۱۲، ۶، ۳ µmol/L) از استاندارد هوموسیستئین را بوسیله دستگاه مورد سنجش قرار دادیم و سطح زیر منحنی را از دستگاه گرفتیم و بوسیله آن یک منحنی استاندارد رسم کردیم، سپس هوموسیستئین نمونه‌ها را مورد سنجش قرار دادیم و سطح زیر نمودار را از دستگاهHPLC گرفتیم و در روی نمودار غلظت مربوطه را بدست آوردیم. برای تعیین ضریب تغییرات (CV) در یک مرحله ۲۰ بار سنجش آنالیت مورد نظر (هوموسیستئین) در یک روز انجام شد و پس از تعیین میانگین و انحراف معیارجوابها، از فرمول (۱۰۰×میانگین/انحراف معیار=CV) ضریب تغییرات محاسبه گردید. برای تعیین ضریب تغییرات (CV) در بین مراحل ۲۰ بار سنجش آنالیت مورد نظر (هوموسیستئین) در۲۰ روز مختلف انجام شد و پس از تعیین میانگین و انحراف معیارجوابها، از فرمول مذکور ضریب تغییرات محاسبه گردید.

در بررسی صحت روش (بازیابی روش) به نمونه‌هایی از پلاسما که مقدار هوموسیستئین آنها تعیین شده بود(۱۲µmol/L، ۱۴،۲۴/۵)، مقدار مشخصی هوموسیستئین خالص اضافه شد و سپس مقدار هوموسیستئین آنها به روش مورد نظر (روش HPLC) مورد سنجش قرار گرفت و از فرمول زیر درصد بازیابی روش محاسبه گردید(۱۰۰× غلظت محاسبه شده/ غلظت سنجش شده =R%).

برای تعیین حد تشخیص روش، غلظتهای مختلفی از استاندارد هوموسیستئین (از صفر تا ۲۰۰ میکرومول بر لیتر) تهیه شد و سپس با روشHPLC مورد سنجش قرار گرفتند. کمترین مقداری که با روش فوق قابل اندازه‌گیری بود به عنوان حد تشخیص روش در نظر گرفته شد.

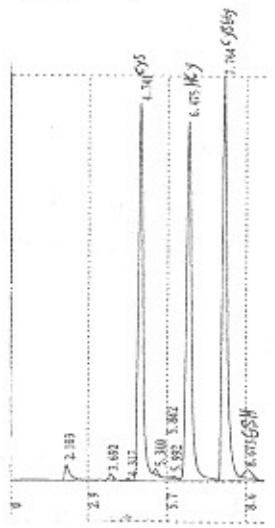
یافته‌ها

تحت شرایط کروماتوگرافی که توضیح داده شد، زمان جداسازی برای تمام تیولها خیلی پایدار بود. در۵/۵=pH، هوموسیستئین و سیستئین به صورت واضح از همدیگر و از سیستئینیل گلایسین و گلوتاتیون جدا شدند. پیک مربوط به هوموسیستئین بعداز ۶/۳۲ دقیقه(Retrntion Time) ظاهر می‌شود. در شکل(۱) کروماتوگرام هوموسیستئین در یک فرد با غلظت طبیعی هوموسیستئین و در شکل(۲) کروماتوگرام هوموسیستئین در یک فرد با غلظت زیاد هوموسیستئین نشان داده شده است.



شکل ۱. کروماتوگرام یک نمونه پلاسما با غلظت طبیعی هوموسیستئین (۱۰µ mol/L)

cys= cysteine, Hcy=homocysteine, Cys Gly= cysteinyl glycine, GSH = glutatione



شکل ۲. کروماتوگرام یک نمونه پلاسما با غلظت زیاد هوموسیستئین (۳۵ µ mol/L)

cys= cysteine, Hcy=homocysteine, Cys Gly= cysteinyl glycine, GSH = glutatione

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]

منحنی مربوط به نمونه‌های استاندارد که درPBS آماده شده بودند تا غلظت بیشتر از ۲۰۰ µmol/L خطی بودند(r=۰/۰۰۱) وحد پائین سنجش برای هوموسیستئین تام پلاسما ۰/۲µmol/L بود. ضریب تغییرات برای سنجشهای در یک روز (Intra assay CV) بدون استفاده از استاندارد داخلی برای پلاسمای با غلظت کم هوموسیستئین (۷µmol/L) برابر ۴/۵۶٪ (n=۱۰) و برای پلاسمای با غلظت زیاد هوموسیستئین (۲۴µmol/L) برابر ۲/۶۷٪ بود. ضریب تغییرات برای سنجشهای در بین روزها (Inter assay CV) بدون استفاده از استاندارد داخلی برای پلاسمای با غلظت کم هوموسیستئین (۶µmol/L) برابر ۵/۴۳٪ (n=۱۰) و برای پلاسمای با غلظت زیاد هوموسیستئین (۲۴µmol/L) برابر ۵/۶٪ بود. درصد بازیابی روشHPLC برای سنجش هوموسیستئین در سه نمونه پلاسما(۱۲µmol/L، ۱۴/۵، ۲۴) بعد از افزودن هوموسیستئین خالص ۹۴/۹۳،۳ و ۱۰۳/۴٪ بدست آمد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که روشHPLC با دتکتور فلورسانس، روشی حساس(حد تعیین ۰/۲µ mol/L)، دقیق (ضریب تغییرات بین ۲/۶۷ و ۸/۱۷٪) و با صحت بالا (بازیابی روش بین ۹۳ تا ۱۰۳/۴٪) برای سنجش هوموسیستئین تام پلاسما می‌باشد.

اهمیت سنجش هوموسیستئین در مطالعات مختلف به خوبی روشن شده است. مطالعات مورد- شاهد و آینده‌نگر نشان می‌دهند که افزایش غلظت هوموسیستئین تام پلاسما یک عامل خطرزای مهم و قوی برای آترواسکلروز و بیماریهای قلبی- عروقی است (۱۶-۱۴). به خوبی مشخص شده است که عوامل خطرزای مهم (از قبیل افزایش غلظت کلسترول ،فشار خون، مصرف سیگار) تنها ۵۰٪ از حوادث مربوط به بیماریهای کرونر قلب را ایجاد می‌کنند(۱۹-۱۷). پیشنهاد شده است تا میزان هوموسیستئین تام پلاسما همراه با سایر عوامل خطرزای بیماریهای قلبی- عروقی در اشخاص مبتلا به آترواسکلروز مورد سنجش قرار گیرد(۵-۳).

ما در این مطالعه روشGilfix و همکاران را با تغییراتی بکار بردیم، از جمله اینکه ما از استاندارد داخلی استفاده نکردیم. در مطالعه ما حساسیت، دقت و صحت روش مشابه مطالعاتی که از استاندارد داخلی استفاده کرده بودند(۲۰و۱۹) بدست آمد و بنابراین استفاده از استاندارد داخلی تأثیر چندانی در دقت و صحت روش ندارد. در مطالعه Accini و همکاران که سنجش هوموسیستئین با استفاده از استاندارد داخلی و بدون استفاده از استاندارد داخلی انجام و مورد مقایسه قرار گرفته است نتایجی مشابه نتایج مطالعهٔ ما بدست آمده است، این محققین استفاده از استاندارد داخلی در افزایش دقت و بازیابی روش را بی‌تأثیر دانسته‌اند(۲۱). از طرف دیگرKhim kuo و همکاران تأثیر استاندارد داخلی بر صحت و دقت روش را بسیار محسوس دانسته و استفاده از آنرا توصیه نموده‌اند(۲۲). به هر حال نظرات ضد و نقیضی در این رابطه وجود دارد، اما آنچه مهم است این است که در مطالعه ما دقت، صحت و حساسیت روش در حد بسیار خوبی بدست آمد و لذا نتیجه‌گیری ما آن است که روش فوق روشی قابل اطمینان است و بکارگیری این روش برای سنجش هوموسیستئین بخصوص در کارهای تحقیقاتی توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

از پرسنل مرکز قلب بیمارستان افشار یزد و مسئولین آزمایشگاه تخصصی دانشکده پزشکی، که ما را در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

****

References

1. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. Ann Clin Biochem 2000; 37: 627-48.

2. Mc Cully K. Pioneer of the homocysteine theory. Lancet 1998; 352: 9137-8.

3. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. J Clin Invest 1976; 58: 731-41.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]

4. Gibson JB, Carson NAJ, Neill DW. Pathological findings in homocystinuria. J Clin Pathol 1964; 17: 427-37.

5. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation 1989; 79: 1180-8.

6. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr 1987; 422: 43– 52.

7. Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. J Chromatogr B 1995; 664: 421-5.

8. Accini R, Campulu J, Bartesaghi S, et al. High performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. J Chromatoger A 1998; 828 (1-2): 397-400.

9. Wiliams RH, Maggiore JA, Reynolds RD, Helgason CM. Novel Approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. Clinical Chemistry 2001; 47: 1031-9.

10. Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, et al. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology; 17: 989-95.

11. Sarraf Zadegan N, Sayed tabatabaei FA, bashardoost N, et al. The prevalence coronary artery disease in an unban population in Isfahan, Iran Acta Cardiol 1999; 54; 257-63.

12. Suormala T, Gamse G, Fowler B. 5,10-Methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) assay in the forward direction: Residual activity in MTHFR deficiency. Clinical Chemistry 2002; 48: 835-43.

13. Gilfix BM, Blank DW, Rosenblatt DS. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. Clin Chem 1997; 43: 687-8.

14. Clark R, Robinson K, Vaughten E, Cahalanc S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor vascular disease. N Engi J Med 1991; 324: 1149-55.

15. Arnoson E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. INT J Epidemiol 1995; 24: 704-9.

16. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk factor of myocardial infarction in united stats physicians. JAMA 1992; 268: 877-81.

17. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. J Clin Invest 1976; 57: 1079-82.

18. Kang SS, Wong PWK, Malinnow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor occlusive vascular disease. Anna Rev Nutr 1992; 12: 279-98.

19. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. Thromb Res 1980; 18: 113-21.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]

20. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. Eur J Chem 1992; 29: 549-54.

21. Accini R, Campulu J, Bartesaghi S, et al. High performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. J Chromatoger A 1998; 828 (1-2): 397-400.

22. Kuo K, Still R, Cale S, et al. Standardrization (External and internal) of HPLC assay for plasma homocysteine. Clinical Chemistry 1997; 43: 1653-5.

* آدرس نویسنده مسئول: اراک، بیمارستان ولی عصر، آزمایشگاه، تلفن:۰۸۶۱-۲۲۲۲۰۰۳.

faramarzdarabi@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.2.3.2]