مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۳: از ۴۱-۴۹
پاییز ۱۳۸۸

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین متصل به آلبومین در نمونه سرم با استفاده از روش بهینه شده کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارگر فلورسانس

فریبا فرجی[۱]، عباس صاحبقدم‌لطفی[۲*]، عبدالامیر علامه[۲]، افشین محسنی‌فر[۳]، بتول اعتمادی‌کیا[۴]، علی مطاع[۱]

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- کارشناس، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۵/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۷/۲۸

چکیده

هدف: با توجه به آثار مرگ‌بار آفلاتوکسین‌ها و به‌خصوص آفلاتوکسین B_1 بر سلامتی انسان، اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین، به‌عنوان یک شاخص مهم میزان در معرض بودن به آفلاتوکسین ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارگر فلورسانس به‌منظور اندازه‌گیری این شاخص در خون است.

مواد وروش‌ها: در این مطالعه، از نمونه سرم خون سه گروه رت به‌عنوان کنترل مثبت (تیمار شده با آفلاتوکسین B_1)، کنترل (بدون تیمار خاص) و استاندارد (تیمار شده با میزان معینی آفلاتوکسین B_1 نشان‌دار با تریتیوم) استفاده شد. پس از جداسازی آلبومین از نمونه سرم با استفاده از آمونیوم سولفات و اسید استیک، خلوص آلبومین با الکتروفورز SDS-PAGE بررسی و غلظت آن به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. سپس آلبومین تحت تأثیر پروناز هیدرولیز شد تا آفلاتوکسین متصل به آلبومین به‌صورت آفلاتوکسین- لیزین آزاد شود. سپس آنزیم پروناز و باقیمانده حاصل از هیدرولیز آلبومین توسط استون در سرما رسوب داده و جدا شد. حجم محلول رویی را با دستگاه فریز- درایر تقلیل داده و سپس نمونه تغلیظ شده به دستگاه HPLC تزریق و مقدار آفلاتوکسین موجود در آن در مقایسه با نمونه مشابه حاصل از رت‌های گروه استاندارد، اندازه‌گیری شد.

نتایج: با الکتروفورز SDS-PAGE، خلوص آلبومین جدا شده اثبات شد و غلظت آن در نمونه‌های کنترل مثبت، منفی و استاندارد به‌ترتیب ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. در روش HPLC حداقل میزان تشخیص (Detection limit) برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین، ۲۰ پیکوگرم در هر میلی‌گرم آلبومین، اختصاصیت روش، ۹۲ درصد و حساسیت آن، ۱۰۰ درصد تعیین شد. میانگین میزان آفلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم رت‌های کنترل مثبت، ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌گرم آلبومین محاسبه شد و تکرارپذیری روش طی بارها تکرار، بسیار خوب ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین به روش HPLC تغییراتی در فاز متحرک، درصد حلال‌ها و زمان هر آزمایش ایجاد شد و همچنین کروماتوگرافی میل ترکیبی قبل از انجام HPLC حذف شد. بر این اساس HPLC-Fluorescence به‌عنوان یک روش دقیق، حساس و اختصاصی و با بهینه‌سازی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
Email: lotfi_as@yahoo.com

ایجاد شده با سرعت و سهولت بیشتر، تکرارپذیری بالاتر و هزینه کمتر می‌تواند برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین B_1 در سرم استفاده شود.

کلیدواژگان: آفلاتوکسین- آلبومین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارگر فلورسانس، آفلاتوکسین B_1

۱- مقدمه

آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxins) گروهی از مایکوتوکسین‌ها (Mycotoxins) هستند که اغلب توسط دو گونه قارچی آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و آسپرژیلوس پاراسیتیکوس (*A. parasticus*) تولید می‌شوند [۱، ۲] این متابولیت‌های ثانویه قارچی از آلوده کننده‌های معمول مواد غذایی هستند و عموماً در شرایط دمای ۲٤ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۷ درصد تولید می‌شوند. بنابراین آفلاتوکسین‌ها ممکن است هنگام تولید، برداشت، ذخیره یا به‌عمل آوردن محصولات کشاورزی آن‌ها را آلوده کنند [۱، ۳]. محصولاتی مثل برنج، ذرت، انواع مغزهای خوراکی مثل پسته و فندق، بادام زمینی، فلفل و ادویه‌جات می‌توانند به این مایکوتوکسین‌ها آلوده باشند [۱]. همچنین شیر انسان و دام‌های در معرض آفلاتوکسین نیز می‌تواند به مشتقات این سم آلوده باشد [٤]. آفلاتوکسین‌ها شامل AFB_1 (Aflatoxin B_1)، AFB_2 و AFG_1 و AFG_2 هستند آفلاتوکسین‌های گروه B در زیر نور فرابنفش دارای فلورسنت آبی (Blue) و گروه G در زیر نور فرابنفش فلورسنت سبز (Green) دارند [۵]. AFB_1 بیشترین و سمی‌ترین آفلاتوکسین‌هاست که آثار مرگ‌بار آن برای انسان به اثبات رسیده است که مهم‌ترین آن‌ها ایجاد سرطان کبد، تضعیف سیستم ایمنی و ایجاد اشکالاتی در جذب برخی از مواد غذایی است [۱]. با توجه به آثار مهمی که آفلاتوکسین‌ها و به‌خصوص AFB_1 بر سلامتی انسان دارد، تعیین میزان در معرض قرار گرفتن انسان به این سم اهمیت زیادی پیدا می‌کند.

به این منظور از نشانگرهای زیستی (Biomarkers) برای بررسی میزان در معرض بودن به این سم استفاده می‌شود:

۱) آفلاتوکسین B_1 متصل به فرم‌آمیدوپریمیدین (AFB_1–formamidopyrmidine adducts): پس از تبدیل AFB_1 به آفلاتوکسین B_1–۸، ۹- اپوکسید (AFB_1-8,9-epoxide) در کبد، این ترکیب می‌تواند به ازت ۷-گوانین اتصال یابد و بنابراین AFB_1 متصل به فرم‌آمیدوپریمیدین به‌عنوان یک شاخص در معرض بودن AFB_1 مطرح است. اما به هر حال استفاده از آن به دلیل مشکلات نمونه‌برداری بافتی محدودیت دارد.

۲) آفلاتوکسین B_1 متصل به گوانین (AFB_1–Guanine adducts) و متابولیت‌های AFB_1 در ادرار: بخشی از AFB_1 متصل به DNA به‌صورت AFB_1 متصل به گوانین (AFB_1–Guanine adducts) هنگام ترمیم، نوسازی و ... از DNA و RNA آزاد شده و درون ادرار ترشح می‌شود. همچنین متابولیت‌های دیگری از AFB_1 نیز از طریق ادرار دفع می‌شوند که همه آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای در معرض AFB_1 بودن مطرح هستند. این نشانگرها می‌توانند وضعیت میزان در معرض بودن فرد را طی چند روز قبل از نمونه‌گیری نشان دهند اما به هیچ وجه میزان مسمومیت به‌صورت مزمن را منعکس نمی‌کنند.

۳) AFB_1 متصل به آلبومین: آفلاتوکسین B_1–۸، ۹- اپوکسید پس از تبدیل به آفلاتوکسین B_1–۸، ۹- دی‌هیدرودیول (AFB_1–8,9-dihydrodiol) می‌تواند به پروتئین‌ها اتصال یابد. مهم‌ترین پروتئینی که AFB_1 در خون به آن متصل می‌شود آلبومین است [٦، ۷].

اندازه‌گیری AFB_1 متصل به آلبومین خون به‌عنوان یک نشانگر زیستی در معرض بودن به آفلاتوکسین به دلایل زیر بسیار ارزشمند است [۱، ٦- ۱۰]:

الف– در انسان و رت درصد مهمی از AFB_1 خورده شده (۱– ۳ درصد) به‌طور کووالان به آلبومین خون متصل می‌شود [۹، ۱۰].

ب– نیمه‌عمر آلبومین انسان حدود ۲۰ روز است که منجر به افزایش تجمعی آفلاتوکسین B_1 متصل به آلبومین (AFB_1–Alb adducts) به دنبال در معرض قرار گرفتن مزمن به AFB_1، می‌شود. استفاده از این نشانگر زیستی می‌تواند وضعیت در معرض آفلاتوکسین بودن فرد را طی ۲– ۳ ماه اخیر نشان دهد.

ج– مطالعات نشان می‌دهد میزان AFB_1 متصل به آلبومین خون منعکس کننده سطح AFB_1 متصل به DNA سلول‌های کبدی و میزان آسیب وارده به هپاتوسیت‌هاست [٦، ۷، ۹، ۱۰].

اندازه‌گیری این شاخص مهم در سرم با روش‌های مختلف قابل انجام است مانند روش‌های رادیوایمنواسی (Radio Immuno Assay: RIA)، IDMS (Isotope Dilution Mass Spectrometry)، الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) و همچنین کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارگر فلورسانس (High Performance Liquid Chromatography- fluorescence: HPLC-fluorescence) که در بین این روش‌ها HPLC-fluorescence به‌عنوان روش مرجع مورد توجه است [۹، ۱۱–۱۳].

در این تحقیق برای اندازه‌گیری این شاخص مهم از روش HPLC- fluorescence استفاده شده است و تلاش بر این بوده که این روش، بهینه شده و با سرعت و سهولت بیشتر و هزینه کمتر قابل انجام باشد.

۲– مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۱۲ رت ویستار (Wistar) نر با وزن تقریبی ۲۰۰–۲۵۰ گرم استفاده شد. این رت‌ها به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه اول: رت‌های کنترل مثبت، گروه دوم: رت‌های کنترل منفی و گروه سوم: رت‌هایی که برای تهیه استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند. مراحل انجام تحقیق شامل **۱) تیمار:** به گروه اول رت‌ها، AFB_1 (خریداری شده از شرکت Sigma) به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌صورت محلول در ۰/۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) از طریق داخل صفاقی تزریق شد.

گروه دوم رت‌ها هیچ آفلاتوکسینی دریافت نکردند و به گروه سوم رت‌ها، AFB_1 نشان‌دار (Radio label AFB_1) با تریتیوم (خریداری شده از شرکت Moravek) به میزان ۰/٤ میلی‌گرم در کیلوگرم به همان شکل محلول در DMSO و داخل صفاقی تزریق شد به طوری‌که هر رت حدود ۱۰ میکروکوری، AFB_1 رادیواکتیو دریافت کرد. علت تیمار گروه اخیر با AFB_1 رادیواکتیو، تهیه استاندارد برای روش HPLC است.

همه رت‌ها در شرایط یکسان از نظر محل نگهداری، آب و غذای مصرفی نگهداری شدند.

۲) خونگیری: پس از مدت ٢٤ ساعت از تمامی رت‌ها خونگیری شد و سرم آن‌ها با سانتریفوژ، جداسازی شد. سپس سرم رت‌های هر گروه با هم مخلوط و در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تقسیم و در فریزر ۷۰– درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

۳) جداسازی آلبومین: ابتدا سرم‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند و سپس به هر ۰/۵ سی‌سی سرم، ۷۵۰ میکرولیتر محلول آمونیوم سولفات اشباع اضافه و خوب مخلوط شد و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در g ۹۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی که حاوی آلبومین بود، جدا و رسوب که اغلب حاوی گاماگلبولین‌هاست دور ریخته شد. سپس به محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک یک مولار اضافه شد و پس از مخلوط شدن، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲ دقیقه و در g ۹۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب (آلبومین) در ۰/۵ سی‌سی بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH=۷/٤) مجدداً حل شد.

٤) برای اطمینان از خلوص آلبومین جدا شده از سرم، الکتروفوزر (SDS-PAGE) انجام شد.

۵) اندازه‌گیری غلظت آلبومین جدا شده از سرم: غلظت آلبومین جدا شده به روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد [برای تهیه معرف برادفورد از رنگ کوماسی بریلیانت بلو G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) استفاده شد]. به این ترتیب که به ۱۰۰ میکرولیتر سرم با رقت ۱/۵۰، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و مخلوط شد و پس از نیم ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد نیز با BSA (Bovine Serum Albumin) در غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسم و به کمک آن غلظت آلبومین جدا شده از سرم سه گروه رت محاسبه شد.

٦) هیدرولیز آلبومین: به این منظور از آنزیم پروناز (Pronase) (خریداری شده از شرکت Roche) به نسبت پروتئین به آنزیم ۱:۲ استفاده شد. به ۲ میلی‌گرم آلبومین، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم اضافه شد. هیدرولیز به‌مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همراه با لرزش (Shaking) (۲۵۰ دور در دقیقه) انجام شد (آنزیم پروناز سبب هیدرولیز آلبومین شده و فقط یک اسید آمینه لیزین به‌صورت متصل به آفلاتوکسین باقی می‌ماند). محلول رویی پس از سانتریفوژ در g ۱۰۰۰۰ جدا شد.

۷) جداسازی آفلاتوکسین متصل به لیزین از مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین و آنزیم پروناز: به این منظور به یک حجم از نمونه حاصل از مرحله ٦، دو حجم استون اضافه و ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سانتریفوژ در g ۱۰۰۰ انجام گرفت. در این حالت آنزیم پروناز و مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین ته‌نشین شد و محلول رویی که حاوی آفلاتوکسین- لیزین بود، جدا شد. آن‌گاه نمونه در دستگاه فریز- درایر (Freeze-dryer) کاملاً خشک شد و مجدداً در ۰/۲ میلی‌لیتر مخلوط آب مقطر و متانول حل شد.

۸) HPLC: برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین پس از جداسازی از آلبومین، از دستگاه HPLC (Shimadzu) (کروماتوگرافی فاز معکوس و ستون C18) استفاده شد و آشکارگر مورد استفاده برای شناسایی و اندازه‌گیری، آشکارگر فلورسانس بود (تهییج (Excitation): ٤٠٥ نانومتر، نشر (Emision): ٤٧٠ نانومتر). فاز متحرک حاوی (٤٠ درصد متانول و ٦٠ درصد بافر سدیم فسفات ۵ میلی‌مولار و pH=۷/۲ و به‌صورت ایزوکراتیک (Isocreatic) بود و به‌مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت جریان (Flow rate) ۰/۹ میلی‌لیتر در هر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه HPLC تزریق شد و پس از مدت زمان حدود ۱۱/۹ دقیقه آفلاتوکسین متصل به لیزین از ستون خارج و شناسایی شد.

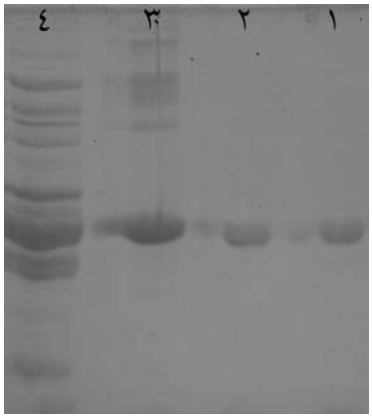
۹) شمارش تشعشعات بتا با دستگاه شمارش‌گر بتا (Beta counter):

از آن‌جایی‌که در روش HPLC به استاندارد نیاز داریم و از طرفی در نمونه سرم پس از تخلیص آلبومین و هیدرولیز آن، یک لیزین به آفلاتوکسین متصل باقی می‌ماند و در واقع ماده مورد اندازه‌گیری ما آفلاتوکسین متصل به لیزین است و این کمپلکس به‌صورت تجاری و آماده موجود نیست، به ناچار باید در آزمایشگاه استاندارد تهیه شود. به این منظور، همان‌طور که در مورد شماره ۱ مواد و روش‌ها نیز اشاره شد، آفلاتوکسین رادیواکتیو به تعدادی رت تزریق شد که پس از خونگیری و جداسازی سرم آن‌ها، آلبومین سرم تخلیص و سپس هیدرولیز شد؛ پس از رسوب مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین، آفلاتوکسین رادیواکتیو متصل به لیزین به‌دست آمد که به‌عنوان استاندارد استفاده شد. برای تعیین غلظت استاندارد شده و همچنین رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلفی از آفلاتوکسین نشان‌دار با ترتیتوم (خریداری شده از شرکت Moravek) تهیه و با دستگاه شمارش‌گر بتا، شمارش شد و نتایج آن برای رسم منحنی استاندارد ۱ (غلظت در برابر شمارش در دقیقه) استفاده شد. آنگاه نمونه حاوی آفلاتوکسین متصل به لیزین تهیه شده از سرم رت‌هایی که آفلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند، در رقت‌های مختلف با دستگاه مذکور شمارش و با استفاده از منحنی استاندارد ۱ غلظت آن‌ها

محاسبه شد. همین نمونه‌ها به روش HPLC نیز آنالیز و سطح زیر منحنی مربوط به پیک (Peak) آفلاتوکسین آن‌ها محاسبه شد. با استفاده از نتایج اخیر و منحنی استاندارد ۲ (سطح زیر منحنی در برابر غلظت) رسم شد که به کمک آن غلظت آفلاتوکسین در نمونه مثبت پس ازتزریق به سیستم HPLC و محاسبه سطح زیر منحنی پیک مربوط به‌دست آمد.

۳- نتایج

با روش الکتروفوزر (SDS-PAGE) نشان داده شد که آلبومین تخلیص شده از سرم رت‌ها کاملاً خالص است (شکل ۱).

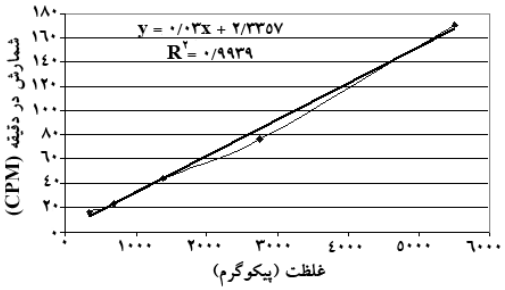


شکل ۱ الکتروفورز SDS-PAGE قبل و بعد از تخلیص آلبومین سرم؛ برای مقایسه از سرم آلبومین گاوی تجاری نیز استفاده شده است. **۱، ۲)** آلبومین تخلیص شده از سرم رت‌ها، **۳)** آلبومین سرم گاوی(تجاری)، **٤)** پروتئین‌های سرم رت‌ها

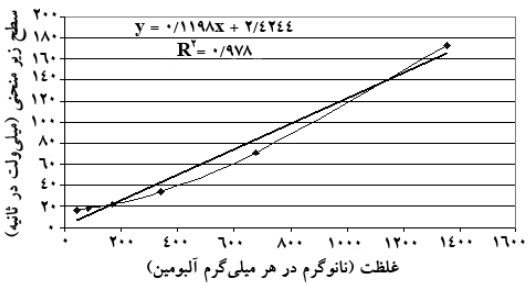
براساس روش برادفورد، غلظت آلبومین تخلیص شده از سرم رت‌های کنترل مثبت، منفی و استاندارد به‌ترتیب ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

در اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین متصل به آلبومین، پس از هیدرولیز آلبومین و با استفاده از روش HPLC و با آشکارگر فلورسانس، در نمونه منفی پس از تزریق به دستگاه HPLC بین زمان ۲-٦ دقیقه پیک‌هایی مشاهده شد که مربوط به اسیدهای آمینه و پپتیدهای باقیمانده حاصل از هیدرولیز آلبومین است. در نمونه مثبت علاوه بر پیک‌های مذکور در زمان حدود ۱۱/۹ دقیقه، پیک مربوط به آفلاتوکسین متصل به لیزین مشاهده شد که این پیک پس از بارها تکرار همواره در نمونه مثبت مشاهده شد در حالی‌که هیچ‌گاه این پیک در نمونه منفی وجود نداشت. در مورد نمونه استاندارد (حاصل از رت‌هایی که آفلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند) نیز علاوه برپیک‌هایی بین زمان ۲-٦ دقیقه، پیک مربوط به آفلاتوکسین- لیزین با همان زمان بازداری ۱۱/۹ دقیقه مشاهده شد.

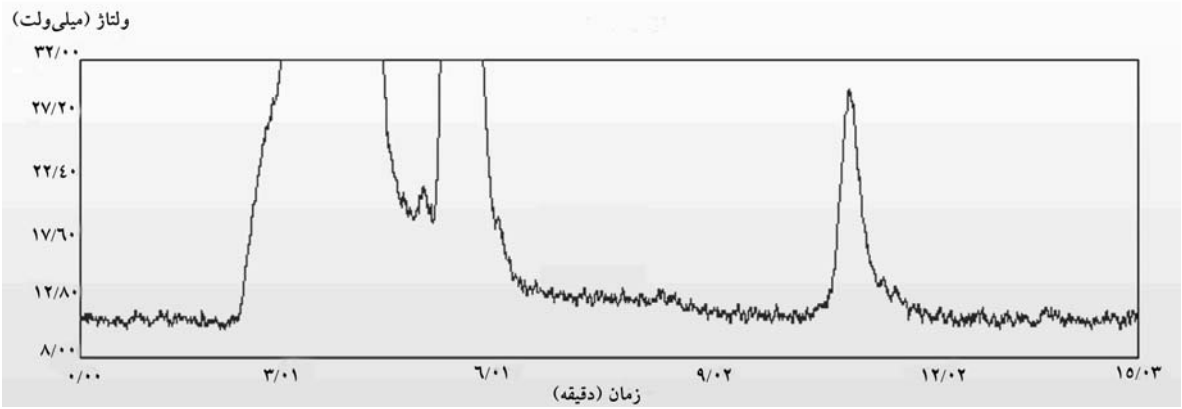
میانگین میزان آفلاتوکسین متصل به آلبومین در رت‌های کنترل مثبت در مقایسه با منحنی استاندارد (نمودارهای ۱ و ۲) که با استفاده از نمونه رت‌هایی که آفلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند، رسم شده بود، ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌گرم آلبومین تعیین شد (شکل ۲؛ کروماتوگرام).



نمودار ۱ منحنی استاندارد (شمارش در دقیقه در برابر غلظت AFB_1 نشان‌دار با تریتیوم)



نمودار ۲ منحنی استاندارد (سطح زیر منحنی در کروماتوگرام HPLC در برابر غلظت AFB_1)



شکل ۲ کروماتوگرام HPLC (پیک مربوط به آفلاتوکسین- لیزین در نمونه کنترل مثبت با زمان بازداری ۱۱/۹ دقیقه)؛ باقیمانده مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین در زمان ۲ تا ٦ دقیقه از ستون خارج می شوند.

حساسیت روش ۱۰۰ درصد، اختصاصیت، ۹۲ درصد و حداقل میزان تشخیص (Detection limit)، ۲۰ پیکوگرم در میلی‌گرم تعیین شد.

همچنین با ۵ بار آزمایش طی یک روز و در ٤ روز متوالی، تکرارپذیری خوبی برای این روش مشاهده شد.

٤- بحث

با توجه به آثار مرگ‌بار آفلاتوکسین بر سلامتی انسان و احتمال آلودگی انواع محصولات کشاورزی به‌خصوص خشکبار طی مراحل تولید، برداشت و ذخیره‌سازی و ... و نظر به مصرف بالای خشکبار در بعضی استان‌های کشور، اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین به‌عنوان یک شاخص که می‌تواند وضعیت در معرض سم آفلاتوکسین بودن افراد را نشان دهد، اهمیت زیادی دارد. همچنین تحقیقات نشان داده است که یک ویژگی هم‌افزایی بین AFB_1 و ویروس‌های هپاتیت B و C در ایجاد سرطان کبد وجود دارد به‌طوری که در افراد HBS-Ag مثبت (Positive Hepatitis B Surface-Antigen) نسبت به سایر افراد، AFB_1 در سرطان‌زایی ۳۰ بار قوی‌تر عمل می‌کند [۱]. بنابراین با شناسایی روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم که به دلیل نیمه‌عمر نسبتاً طولانی آلبومین، شاخص خوبی برای روشن ساختن وضعیت افراد از نظر میزان در معرض بودن نسبت به سم آفلاتوکسین طی ۲-۳ ماه اخیر است، می‌توان اقدامات پیشگیرانه برای کاهش آثار و تبعات سم از جمله توصیه به کاهش مصرف مواد غذایی که احتمال آلودگی به این سم را دارند و استفاده از مواد غذایی و داروهایی که می‌تواند در متابولیزه کردن و دفع سم آفلاتوکسین مؤثر باشد، انجام داد. برای اندازه‌گیری این شاخص مهم در سرم، تاکنون روش‌های مختلفی توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته است. برای بررسی مناسب بودن یک روش اندازه‌گیری، چندین ویژگی باید مورد توجه قرار گیرد: حساس بودن، اختصاصی بودن، تکرارپذیری، دادن اطلاعات کافی در مورد وضعیت فرد به‌مدت نسبتاً طولانی، غیرتهاجمی بودن نمونه‌گیری، مقرون به صرفه بودن و آسان بودن انجام آن.

از جمله روش‌هایی که در مطالعات مختلف برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین مورد استفاده قرار گرفته است؛ روش RIA، IDMS، ELISA و همچنین HPLC-fluorescence بوده است [۹، ۱۱-۱۳].

روش RIA با وجود دقت خوب و قابل قبول به دلیل خطراتی که فرد آزمایش‌کننده را تهدید می‌کند، نمی‌تواند روش مناسبی باشد. روش IDMS نیز روش دقیقی است اما به تجهیزات زیاد و بسیار پرهزینه‌ای نیاز دارد. روش ELISA که

در سال‌های اخیر به دلیل سادگی و کم هزینه بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته است، فاقد اختصاصیت و حساسیت لازم (در مقایسه با روش HPLC-fluorescence) بوده و میزان نتایج مثبت کاذب در این روش قابل توجه است [۱۰].

گرچه روش HPLC-fluorescence، روش نسبتاً پرهزینه‌ای است و انجام آن به کارشناس مجرب نیاز دارد، اما در صورت امکان انجام، نتایج آن قابل اطمینان و دارای اختصاصیت و حساسیت و تکرارپذیری بسیار خوبی است و به‌عنوان استاندارد طلایی (Gold Standard) در بین روش‌های مختلف اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین، مورد توجه است [۷، ۱۰، ۱۱].

در این تحقیق، اختصاصیت روش HPLC-fluorescence بیش از ۹۰ درصد، حساسیت ۱۰۰ درصد و حداقل میزان تشخیص، ۲۰ پیکوگرم در هر میلی‌گرم آلبومین محاسبه شد که می‌توان با افزایش مقدار آلبومین، مقادیر کمتر آفلاتوکسین متصل به آلبومین را نیز در نمونه سرم شناسایی و بدین ترتیب حساسیت را افزایش داد.

در مطالعه حاضر، برای جداسازی آلبومین از نمونه سرم، از روش رسوبی (به کمک محلول سولفات آمونیوم اشباع و اسید استیک یک مولار) استفاده شد. در این روش گرچه مقدار آلبومین حاصل از تخلیص نسبت به روش‌های دیگر قدری کمتر است اما در نهایت آلبومین کاملاً خالص (تأیید توسط الکتروفورز SDS-PAGE) به‌دست می‌آید. در دیگرمطالعات که آلبومین با استفاده از ستون‌های میل ترکیبی از قبیل Reactive Blue-2 Sepharose جداسازی شده، علاوه بر داشتن هزینه بیشتر نسبت به روش رسوبی می‌تواند به ناپایداری کمپلکس آفلاتوکسین- آلبومین هم منتهی شود [۹، ۱۰].

همچنین برای هیدرولیز آلبومین و جدا کردن آفلاتوکسین متصل به آن از آنزیم پروناز استفاده شد. در برخی مطالعات برای هیدرولیز آلبومین از پروتئیناز K استفاده و مشخص شده که این آنزیم به اندازه پروناز (مخلوطی از پروتئازها) در هیدرولیز آلبومین، مؤثر نیست [۱۰].

در این تحقیق، قبل از اندازه‌گیری آفلاتوکسین به روش HPLC-fluorescence، به‌جای استفاده از ستون‌های گران‌قیمت ایمنوافینیتی (Immunoaffinity)، جداسازی آنزیم و مخلوط هیدرولیز شده آلبومین از آفلاتوکسین به کمک استون در سرما صورت گرفت. در این حالت در کروماتوگرام HPLC علاوه بر پیک مربوط به آفلاتوکسین- لیزین با زمان بازداری حدود ۱۱/۹ دقیقه، پیک‌های دیگری که مربوط به پپتیدها و اسیدهای آمینه باقیمانده حاصل از آلبومین هیدرولیز شده است، طی زمان ۲ تا ٦ دقیقه ابتدای هر آزمایش مشاهده می‌شود که به دلیل فاصله زیاد پیک‌ها و اختلاف زمان بازداری، تداخلی در اندازه‌گیری آفلاتوکسین- لیزین، ایجاد نمی‌کند. بنابراین می‌توان برای سرعت و سهولت بیشتر و صرفه‌جویی در هزینه، در اندازه‌گیری، مرحله تخلیص با ستون ایمنوافینیتی را حذف نمود. این در حالی است که در مطالعات قبلی برای اندازه‌گیری این کونژوگه قبل از انجام روش HPLC-fluorescence، همواره تخلیص با کروماتوگرافی میل ترکیبی صورت گرفته است [۷، ۱۰، ۱۱] که علاوه بر مشکلات پرهزینه و وقت‌گیر بودن می‌تواند به از دست رفتن مقداری از آفلاتوکسین منتهی شود و میزان آفلاتوکسین متصل به آلبومین با روش HPLC به‌طور کاذب، پایین‌تر از مقدار واقعی برآورد شود [۷] در این مطالعه، برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین به روش HPLC-fluorescence، از فاز متحرک به‌صورت ایزوکراتیک استفاده شد و زمان لازم برای انجام هر آزمایش ۱۵ دقیقه بود. این در حالی است که در مطالعات قبلی از سیستم گرادیان و با درصدهای مختلف بافر و حلال به‌عنوان فاز متحرک استفاده شده و زمان انجام هر آزمایش ۲۰ تا ۵۰ دقیقه بوده است [۷، ۱۰، ۱۱].

بنابراین با بهینه‌سازی روش HPLC-fluorescence برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین، ایجاد تغییراتی از جمله حذف کروماتوگرافی ایمنوافینیتی قبل از HPLC و جایگزین کردن روش رسوبی به جای آن، استفاده از سیستم ایزوکراتیک به‌جای سیستم گرادیان و همچنین کاهش زمان هر آزمایش، روش با سرعت و سهولت بیشتری قابل انجام است؛ ضمن این‌که هزینه انجام آن نیز تا حدود زیادی کاهش می‌یابد.

در مطالعه حاضر، اندازه‌گیری‌ها با استفاده از سرم رت انجام شده اما از آن‌جا که در این روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین پس از هیدرولیز آلبومین انجام می‌گیرد، بنابراین می‌تواند به‌خوبی برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم انسان مورد استفاده قرار گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه اعضا و کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr 2004; 80(5): 1106-22.

[2] Saha D, Acharya D, Roy D, Shrestha D, Dhar TK. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B1 and ochratoxin A in chili samples. Anal Chim Acta 2007; 584(2): 343-9.

[3] Ahsan H, Wang LY, Chen CJ, Tsai WY, Santella RM. Variability in aflatoxin-albumin adduct levels and effects of hepatitis B and C virus infection and glutathione S-transferase M1 and T1 genotype. Environ Health Perspect 2001; 109(8): 833-7.

[4] Wild CP, Pionneau FA, Montesano R, Mutiro CF, Chetsanga CJ. Aflatoxin detected in human breast milk by immunoassay. Int J Cancer 1987; 40(3): 328-33.

[5] Aflatoxins: Occurrence and HealthRisks. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html

[6] Chen CJ, Yu MW, Liaw YF, Wang LW, Chiamprasert S, Matin F, Hirvonen A, Bell DA, Santella RM. Chronic hepatitis B carriers with null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms who are exposed to aflatoxin are at increased risk of hepatocellular carcinoma. Am J Hum Genet 1996; 59(1): 128-34.

[7] Turner PC, Dingley KH, Coxhead J, Russell S, Garner CR. Detectable levels of serum aflatoxin B1-albumin adducts in the United Kingdom population: implications for aflatoxin-B1 exposure in the United Kingdom. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7(5): 441-7.

[8] Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis 2002; 17(6): 471-81.

[9] Chapot B, Wild CP. ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. In: Van Warhol M, Velzen D, Bullock GR, editors. Techniques in diagnostic pathology. Vol. 2, New York, N.Y: Academic Press, Inc.; 1991; p: 135-55.

[10] Wild CP, Jiang YZ, Sabbioni G, Chapot B, Montesano R. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. Cancer Res 1990; 50(2): 245-51.

[11] Sabbioni G, Ambs S, Wogan GN, Groopman JD. The aflatoxin-lysine adduct quantified by high-performance liquid chromatography from

Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15(4): 823-6.

[13] Wang JS, Qian GS, Zarba A, HE X. Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen-negative residents of Daxin, qidong country, peoples Republic of China. http://cebp.aacrjournals.org/content/5/4/253.abstract

human serum albumin samples. Carcinogenesis 1990; 11(11): 2063-6.

[12] Scholl PF, Turner PC, Sutcliffe AE, Sylla A, Diallo MS, Friesen MD, Groopman JD, Wild CP. Quantitative comparison of aflatoxin B1 serum albumin adducts in humans by isotope dilution mass spectrometry and ELISA. Cancer