

# ارتباط میزان مس با مقدار سرلو پلاسمین در خون افراد سالم

عبدالرضا ایرج منصوری<sup>۱</sup> - دکتر ابراهیم نوروزیان<sup>۲</sup> - دکتر احمد غلامحسینیان<sup>۳</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** مس موجود در خون انسان عمدتاً در ساختمان پروتئینی به نام سرلوپلاسمین به کار رفته است و فقط جزء کوچکی از آن به صورت آزاد دیده می‌شود. بدون شک اندازه‌گیری جداگانه هر یک از این دو مستلزم استفاده از روشی ساده، دقیق و قابل اعتماد است. از این رو، در پژوهش حاضر اندازه‌گیری سرلوپلاسمین و بررسی رابطه آن با غلظت کل مس با انتخاب و بررسی روش اندازه‌گیری از نظر دقت و صحت مورد مطالعه قرار گرفت. **روش بررسی:** در این تحقیق ۹۰ نمونه سرم که ۴۳ عدد آنها متعلق به مردان و ۴۷ عدد دیگر مربوط به زنان بود، از مراجعه‌کنندگان به اورژانس بیمارستان شماره یک دانشگاه علوم پزشکی کرمان که بیماری زمینه‌ای خاصی نداشتند، تهیه و مقادیر مس کل و سرلوپلاسمین آنها تعیین گردید. برای تعیین غلظت کل مس از روش اسپکتروسکوپی جذب اتمی (AAS) استفاده شد و غلظت سرلوپلاسمین با استفاده از روش آنزیمی پارافیلین دی‌آمین به دست آمد.

**یافته‌ها:** غلظت مس در سرم خون مردان و زنان به ترتیب برابر  $119 \pm 40 \mu\text{g/dl}$  و  $129 \pm 39 \mu\text{g/dl}$  و غلظت سرلوپلاسمین در سرم خون گروه‌های فوق به ترتیب  $36 \pm 11 \text{ mg/dl}$  و  $37 \pm 11 \text{ mg/dl}$  بود. بدون توجه به جنسیت افراد مورد مطالعه، میانگین غلظت‌های کل مس و سرلوپلاسمین به ترتیب  $124 \pm 38 \mu\text{g/dl}$  و  $36 \pm 11 \text{ mg/dl}$  تعیین گردید. بررسی اثر دو عامل دما و زمان نگهداری سرم بر میزان سرلوپلاسمین نشان داد که نگهداری سرم در دمای معمولی و به مدتی طولانی اثر قابل ملاحظه‌ای بر میزان سرلوپلاسمین ندارد. رابطه خطی بین غلظت سرلوپلاسمین و میزان کل مس موجود در سرم به صورت ذیل به دست آمد:

$$\text{غلظت سرلوپلاسمین (mg/dl)} = 2/73 + 3/34 (\mu\text{g/dl}) \text{ غلظت مس}$$

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد با اندازه‌گیری غلظت سرلوپلاسمین و مراجعه به رابطه خطی فوق، بتوان مقدار مس را محاسبه کرد و ذخیره کردن طولانی سرم اثری در اندازه‌گیری مقدار آنزیم ندارد.

**کلید واژه‌ها:** سرلوپلاسمین، مس، رابطه خطی

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۱؛ شماره ۱؛ سال ۱۳۸۴)

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول: مربی پژوهشی گروه مواد نو پژوهشکده مواد، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی (کرمان - ماهان)

آدرس: کرمان انتهای جاده هفت باغ پردیس دانش ماهان

تلفن: ۰۳۴۲۶۲۶۶۱۱-۱۳؛ شماره: ۰۳۴۲۶۲۶۶۱۷؛ پست الکترونیکی: mansori@icst.ac.ir

<sup>۲</sup> دانشیار بخش شیمی دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان

<sup>۳</sup> دانشیار گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

## مقدمه

تقریباً در اواسط قرن نوزدهم دانشمندان پی بردند که وجود بعضی از عناصر معدنی در بدن برای ادامه حیات و سلامتی انسان به مقدار مشخصی ضروری است. تعدادی از این عناصر برای حفظ حیات، بعضی برای رشد و گروهی برای اعمال مهم سلولی لازم هستند. به طور کلی می‌توان مواد معدنی ضروری بدن را به دو دسته عناصر پرمقدار<sup>۱</sup> و کم‌مقدار<sup>۲</sup> دسته‌بندی کرد که از آنها به عنوان Macroelement و Microelement نیز یاد شده است. عناصر پرمقدار به عناصری نظیر کلسیم و فسفر گفته می‌شود که بیشتر از ۰.۰۵٪ وزن بدن را تشکیل می‌دهند. عناصر کم مقدار که به Trace Elements نیز معروف می‌باشند، به عناصری نظیر آهن و مس اطلاق می‌شود که کمتر از ۰.۰۵٪ وزن بدن را تشکیل می‌دهند (۱).

مس در گروه عناصر کم‌مقدار جای می‌گیرد و مقدار مورد نیاز آن برای انسان از ۱-۳ میلی‌گرم در روز می‌باشد. این عنصر فعالیتهای بیولوژیکی متعددی را در بدن انجام می‌دهد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

الف- کمک به جذب آهن

ب- فعال کردن عمل سنتز اجزای Heme و گلوبین در

هموگلوبین

ج- آزاد کردن آهن ذخیره شده در کبد

علاوه بر آن، وجود مس برای سنتز فسفو لیپیدها الزامی است (۱). مس یکی از فلزاتی است که در تشکیل اریتروسیت‌ها نقش دارد و وجود آن برای تعدادی از آنزیم‌های اکسیدکننده مانند سوپراکسیددیس موتاز، کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز ضروری است (۲).

حدود ۹۵٪ از مس موجود در خون با پروتئینی به نام سرلوپلاسمین همراه است و بقیه آن به صورت مس آزاد وجود دارد. سرلوپلاسمین پروتئینی از نوع  $\alpha_2$  گلوبین و یک گلیکو پروتئین است که ۷/۵٪ آن کربوهیدرات بوده و وزن مولکولی آن حدود ۱۵۱۰۰۰ دالتون می‌باشد. هر مولکول سرلوپلاسمین شامل

۸ اتم مس است. مقدار سرلوپلاسمین در سرم خون برای زنان حدود  $40/9 \pm 6/8$  mg/dl و برای مردها حدود  $36/0 \pm 5/6$  mg/dl گزارش شده است (۳). هرچند مقدار طبیعی مس در خون، در منابع مختلف متفاوت ذکر شده است ولی به طور کلی می‌توان آن را حدود  $100-200$   $\mu$ g/dl در نظر گرفت (۴). کاهش مقدار مس در خون که اغلب همراه با پایین آمدن میزان سرلو پلاسمین است، در بیماریهایی نظیر Menkes و Wilsonis گزارش شده است (۳).

اندازه‌گیری مس در خون از دیرباز و به طرق مختلف انجام شده است. به عنوان مثال روشهای انتشار اشعه ایکس پروتونی<sup>۳</sup> (PIXE) (۵) روشهای دیگر پرتونگاری (X-ray) از قبیل EDXRF<sup>۴</sup> (۶) و همچنین اسپکتروسکوپی جرمی<sup>۵</sup> (۷)، اسپکتروسکوپی نثری<sup>۶</sup> (۸) و بسیاری از روشهای دیگر از جمله اسپکتروسکوپی جذب اتمی (شعله و کوره) که از رایجترین روشهای اندازه‌گیری مس در مایعات بدن می‌باشد (۹، ۱۰) مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از دستگاههای فوق نیازمند تبحر و تجهیزات مخصوصی است که در همه آزمایشگاههای تشخیص طبی فراهم نیست؛ به همین دلیل استفاده از روشهای ساده‌تر و مقرون به صرفه مورد نیاز خواهد بود.

## تجهیزات و مواد مورد استفاده:

- ۱- دستگاه طیف‌سنج اتمی ساخت کارخانه Shimadzu مدل AA-670 و مجهز به چاپگر گرافیک مدل PR-4
- ۲- دستگاه طیف‌سنج مرئی- ماوراء بنفش، ساخت کارخانه Perkin-Elmer مدل S-550 مجهز به دستگاه ثبات مدل R100 A
- ۳- مس خالص (۹۹/۹۹۵٪) برای تهیه استانداردها از شرکت Aldrich
- ۴- اسیداستیک و استات سدیم خالص از شرکت Merck
- ۵- پارافنیلین دی آمین از شرکت Fluka

<sup>3</sup> Proton Induced X-ray Emission: PIXE

<sup>4</sup> Energy Dispersive X-ray Fluorescence: EDXF

<sup>5</sup> Mass Spectrometry

<sup>6</sup> Emission Spectroscopy

<sup>1</sup> Macronutrient

<sup>2</sup> Micronutrient

سنجش قرار گرفت و بر اساس نتایج به دست آمده، انحراف معیار و انحراف معیار نسبی (CV) روش محاسبه گردید.

در این تحقیق علاوه بر اندازه‌گیری مس در سرم خون، اثرات درجه حرارت و زمان نگهداری سرم بر میزان سرولوپلاسمین نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر درجه حرارت مقدار مشخصی از یک سرم ترکیبی در هفت لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۴-، ۴، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس میزان سرولوپلاسمین آنها به غیر از لوله آزمایشی که در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سرم آن منعقد شده بود، اندازه‌گیری شد. برای بررسی اثر زمان، نمونه‌ای از یک سرم ترکیبی در فریزر و در دمای ۱۴- درجه سانتیگراد نگهداری شد و مقدار سرولوپلاسمین آن، در فواصل زمانی مختلف (صفر، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ...، ۳۲۶) ساعت اندازه‌گیری شد.

### یافته‌ها و بحث

صحت روش، نشان‌دهنده درصد بازیابی ۱۰۰/۲-۱۰۱/۹ بود که حاکی از صحت مناسب روش مورد استفاده است. همچنین انحراف معیار (SD=۰/۱۵) و انحراف معیار نسبی (CV=۷/۱۱۴) که با استفاده از نتایج مربوط به مطالعه دقت روش محاسبه شدند، تاییدی بر دقت مناسب روش مورد استفاده هستند.

بر اساس نتایج آنالیز نمونه‌های سرم، میانگین غلظت سرولوپلاسمین در سرم خون مردان، زنان و جمع مردان و زنان به ترتیب برابر با  $۳۶ \pm ۱۱$ ،  $۳۷ \pm ۱۱$  و  $۳۶ \pm ۱۱$  میلی گرم بر دسی لیتر و میانگین غلظت مس کل در سرم خون این افراد به ترتیب  $۱۱۹ \pm ۴۰$ ،  $۱۲۹ \pm ۳۹$  و  $۱۲۴ \pm ۳۸$  میکروگرم بر دسی لیتر بود. مقایسه این نتایج با مقادیر مذکور در مراجع مختلف (جدول ۱) تاییدی بر نتایج حاصل از کار حاضر است.

بین غلظت مس و سرولوپلاسمین در سرم خون افراد مورد مطالعه رابطه‌ای خطی وجود داشت. این مطلب از نمودار (شکل ۱) که در آن غلظت مس کل بر حسب  $\mu\text{g/dl}$  بر علیه غلظت سرولوپلاسمین بر حسب  $\text{mg/dl}$  ترسیم شده است، آشکار می‌شود (خطوط ممتد در این نمودار). همان طور که مشاهده می‌گردد، ضریب همبستگی (r) برای نمودار فوق برابر با ۰/۹۳۴۹ است و

در پژوهش حاضر اندازه‌گیری سرولوپلاسمین و بررسی رابطه آن با غلظت کل مس با انتخاب روش اندازه‌گیری مناسب از نظر دقت و صحت مورد مطالعه قرار گرفت.

### روش بررسی

در این تحقیق ۹۰ نمونه سرم خون از مراجعه‌کنندگان به اورژانس بیمارستان شماره یک دانشگاه علوم پزشکی کرمان که بیماری زمینه‌ای خاصی نداشتند، تهیه گردید. از این تعداد ۴۷ نفر زن و ۴۳ نفر مرد بودند. اندازه‌گیری سرولوپلاسمین با روش آنزیمی و با استفاده از نقش سرولوپلاسمین به عنوان اکسیداز در واکنش اکسیداسیون پارافینیلن دی‌آمین در محیط اسیدی صورت گرفت (۱۱). مقدار مس کل سرم توسط روش طیف‌سنجی جذب اتمی با دو روش افزایش استاندارد<sup>۱</sup> و کالیبراسیون تعیین گردید. با وجود ساده‌تر بودن روش کالیبراسیون و صحت مطلوب این روش، به علت گرانبوی (ویسکوزیته) بالای نمونه‌ها و در نتیجه مسدود شدن مجاری مهپاش<sup>۲</sup>، دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی مورد استفاده قرار نگرفت و به همین دلیل برای اندازه‌گیری نمونه‌ها، روش افزایش استاندارد انتخاب شد. بدین ترتیب که در شش لوله آزمایش جداگانه حجم‌های مساوی سرم وارد و سپس مقادیر متفاوتی از یک محلول استاندارد یون مس به آنها افزوده و با افزایش آب مقطر حجم نهایی تمام لوله‌ها به مقدار مساوی رسانده شد. پس از اختلاط کامل محلول‌ها، با وارد نمودن هر یک از محلول‌های حاصل به درون شعله، شدت جذب هر یک از آنها در طول موج ۳۲۴/۸ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. با ترسیم شدت جذب محلول در مقابل غلظت نهایی استاندارد، غلظت مس موجود در سرم رقیق شده به دست آمد و با احتساب ضریب رقیق شدن در لوله‌ها، غلظت مس موجود در سرم اولیه محاسبه گردید. برای مطالعه صحت روش نیز از روش افزایش استاندارد و بازیابی مس استفاده شد. این روش از نظر تکرارپذیری نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌ای ترکیبی (Pool Serum) که از اختلاط چندین سرم تهیه شده بود، هشت بار مورد

<sup>۱</sup> Standard Addition Method

<sup>۲</sup> Nebulizer

درصد مس غیر ترکیبی با سرلوپلاسمین در مراجع (۱۳،۳) در حدود ۵٪ ذکر شده است. بررسیهای انجام یافته در مورد اثر زمان و دمای نگهداری سرم بر غلظت سرلوپلاسمین چنین نشان می‌دهد که دو عامل مذکور حداقل تا ۱۲ روز و دمای محیط حداکثر تا ۵۰ درجه سانتیگراد اثر چندانی بر فعالیت سرلوپلاسمین نداشته و می‌توان اندازه‌گیریها را در شرایط عادی انجام داد. این امر را می‌توان از شکلهای ۲ و ۳ که در آنها غلظت سرلوپلاسمین نمونه‌ای ترکیبی در مقابل دو عامل دما و زمان نگهداری ترسیم شده است، بخوبی دریافت.

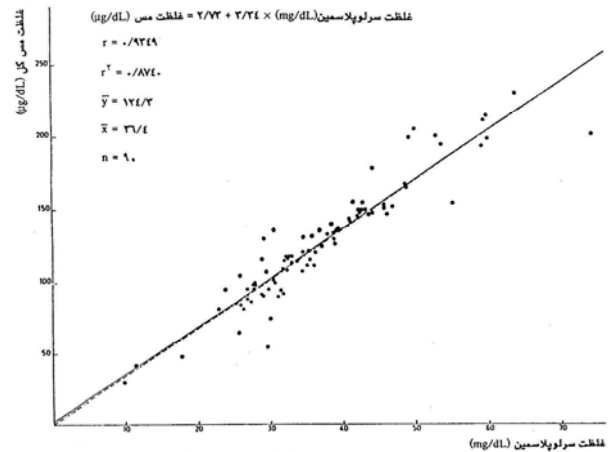
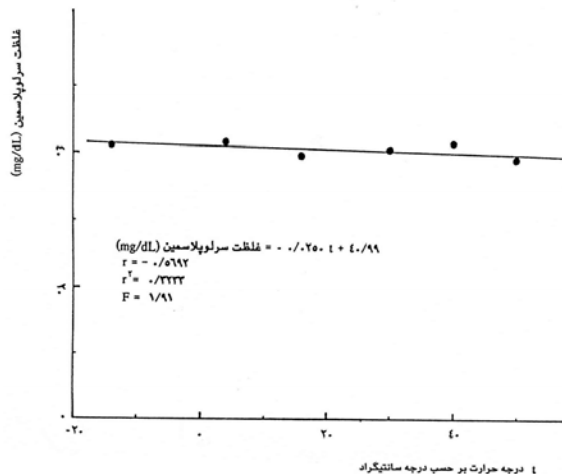
معادلات محاسبه شده از طریق روش کمترین مربعات، دارای شیبی بسیار کم بوده و به علاوه شاخصهای آماری  $r$  و  $F$  بخوبی نشانگر عدم وجود هر گونه ارتباط بین غلظت سرلوپلاسمین و دو عامل دما و زمان نگهداری سرم می‌باشد.

مجذور این ضریب (۲۲) نیز برابر با ۰/۸۷۴۰ می‌باشد. در نمودار فوق معادله تجربی زیر (۱۵)، به منظور مقایسه و به صورت خطوط غیر پیوسته ترسیم شده است:

غلظت سرلوپلاسمین  $\text{mg/dl} = ۳/۴۰ * (\mu\text{g/dl})$  غلظت مس  
شکل ۱ رابطه فوق را با کمتر از ۱٪ تفاوت در شیب، تایید می‌نماید. رابطه خطی به دست آمده در کار حاضر (خط ممتد) بر خلاف رابطه تجربی گرفته شده از مرجع (۱۵) دارای عرض از مبدأ معادل  $۲/۷۳ \mu\text{g/dl}$  بود که خود نشانگر مقداری هر چند کم مس به صورت غیر ترکیبی با سرلوپلاسمین است. از مقایسه عرض از مبدأ با میانگین مس موجود در سرم خون افراد مورد مطالعه چنین به نظر می‌رسد که  $۱۰۰ * (۲/۷۳ \div ۱۲۴/۳) = ۲/۲$ ٪ از کل مس موجود در سرم به صورت غیر ترکیبی با سرلوپلاسمین وجود دارد.

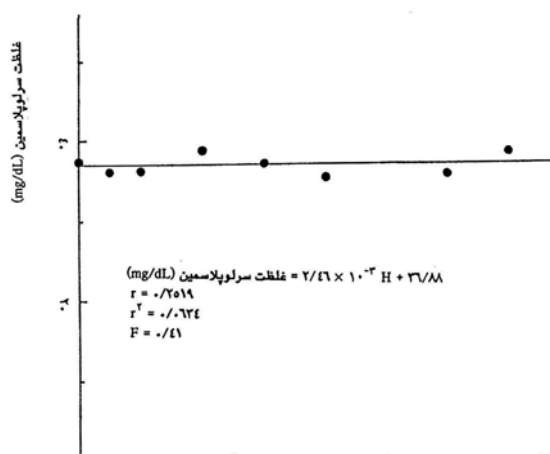
جدول ۱- مقایسه غلظت سرلوپلاسمین و مس سرم افراد مورد مطالعه با مقادیر ذکر شده در مراجع

مرجع	غلظت سرلوپلاسمین (mg/dl)	مرجع	غلظت مس ( $\mu\text{g/dl}$ )
(۱۲)	۳۰	(۱۳)	۱۰۰-۲۰۰
(۱۱)	۲۲-۲۴	(۱۴)	۱۱۴
(۳)	مردان $۳۶/۰ \pm ۵/۶$	کار حاضر	مردان $۱۱۹ \pm ۴۰$
(۳)	زنان $۴۰/۹ \pm ۶/۸$	کار حاضر	زنان $۱۲۹ \pm ۳۹$
کار حاضر	مردان $۳۶ \pm ۱۱$	کار حاضر	مردان و زنان $۱۲۴ \pm ۳۸$
کار حاضر	زنان $۳۷ \pm ۱۱$		
کار حاضر	مردان و زنان $۳۶ \pm ۱۱$		



شکل ۲- نمودار غلظت سرلوپلاسمین نسبت به دما

شکل ۱- رابطه بین غلظت مس کل و سرلوپلاسمین در سرم خون کل افراد مورد مطالعه



شکل ۳- نمودار غلظت سرولوپلاسمین نسبت به زمان

#### منابع:

- 1- Gutbrie, H. Introductory Nutrition. 6<sup>th</sup> ed. USA: Mosby; 1986: 184-87.
- ۲- ثنائی غ. سم‌شناسی صنعتی جلد ۱: تهران: انتشارات دانشگاه تهران؛ ۱۳۵۸، ۲۴۵.
- 3- Raphael SS. Lynches Medical Laboratory Technology. Philadelphia: WB Saunders: 1983.267.
- 4- Oretion JM, Neuhaus WO. Human Biochemistry. 10<sup>th</sup> ed. USA: Mosby; 1982.439.
- 5- Meretoja O, Jalonen J, Laaksonen V, Nanto V, Inberg M. Serum oncocity and myocardial oxygen balance during haemodilution in open-heart surgery. Ann Clin Res. 1981; 13 Suppl 33: 65-71.
- 6- Suri J, Guo Y, Coad C, Danielson T, Elbakri I, Janer R. Image quality assessment via segmentation of breast lesion in X-ray and ultrasound phantom images from Fischer's full field digital mammography and ultrasound (FFDMUS) system. Technol Cancer Res Treat. 2005; 4 (1): 83-92.
- 7- Buckley WT, Huckin SN, Budac JJ, Eigendorf GK. Mass spectrometric determination of a stable isotope tracer for copper in biological materials. Anal Chem. 1982; 54 (3): 504-10.
- 8- Karyakin AV; Starshinova NP. Zh. Anal. Khim. 1981, 36(9), 1696-9.
- 8- Archakov AI, Karyakin AV, Skulachev VP. Intermembrane electron transport in the absence of added water-soluble carriers. Biochim Biophys Acta. 1975; 408 (2):93-100.
- 9- Sun Y, Wada M, Kuroda N, Hirayama K, Nakazawa H, Nakashima K. Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Anal Sci. 2001; 17 (6): 697-702.
- 10- Zendelovska D, Stafilov T. Sample preparation and RPHPLC determination of diuretics in human body fluids. Acta Pharm. 2006; 56 (2): 115-42.
- 11- Sonnenwirth A, Jarett L. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. St.Louis: Mosby; 1980.
- 12- Lehninger AL. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. St.Louis: Mosby; 1975.
- 13- David W, Martin PA, MV, Rodwell W, Daryl K. Harper's Review of Biochemistry. 20<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1985.
- ۱۴- رشید یاسمی ه. مسمومیت‌ها. تهران: انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۵۴، ۱۲۱.
- ۱۵- ملک‌پور، ا. اصول بیوشیمی بالینی. تهران: انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. ۱۳۶۲، ۴۸۶.