Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
Winter 2011; 13(53): 44-52

Isolation, detection, and quantification of aflatoxin-albumin adducts in serum of rats treated with aflatoxin B1

Faraji F(PhD)[1], Sahebghadam Lotfi A(PhD)[1*], Falamaki K(PhD)[2], Alameh A(PhD)[1], Mohseni Far A(PhD)[3], Etemadi Kia B(BSc)[1], Mata A(PhD)[1]

1- Department of Clinical Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Amir kabir University, Tehran, Iran
3- Department of Toxicology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received 15 Jun 2010 Accepted 28 Jul 2010

Abstract

Background: Aflatoxins, especially aflatoxin B1, have lethal effects on human and animal health. This study is intended to present a specific, sensitive, and relatively fast method for measurement, detection, and isolation of aflatoxin-albumin (Af-Alb) adducts in serum.

Materials and Methods: In this experimental-trial, three groups of rats were selected and used as positive control (treated with aflatoxin B1), negative control (without treatment) and standard (treated with radioactive aflatoxin B1). After drawing blood samples from the rats, blood serum and then, serum albumin were isolated. Albumin was hydrolyzed by pronase and eventually, was injected into HPLC system. The sample was then identified and measured by fluorescence detector.

Results: Electrophoresis on PAGE revealed albumin isolated from serum to be perfectly pure. In HPLC method, detection limit for the measurement of Af-Alb adduct was determined to be 60 pg/ml. The mean of aflatoxin positive control rats serum was 19.2 ng/mg albumin. In inter- and intra-group experiments, a remarkable level of reproducibility was seen for this method.

Conclusion: The amount of Af-Alb adduct is proportionate to the amount of aflatoxin received. This project was conducted with rat serum sample, but since albumin is hydrolyzed and can be isolated from aflatoxin, this method is applicable to the measurement of Af-Alb adducts in human serum samples.

Keywords: Aflatoxin, Aflatoxin B1, Albumin, HPLC

*Corresponding author:
Address: Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: lotfi_as@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 13، شماره 4 (شماره پیاپی 53)، زمستان 1389، 52-44

جداسازی، شناسایی و اندازه گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم رات های تیمار شده با افلاتوکسین B1

فریبا فرجی[1]، دکتر عباس صاحبقدم لطفی[2]*، دکتر کاووس فلامکی[3]، دکتر عبدالامیر علامه[2]، دکتر افشین محسنی فر[4]، بتول اعتمادی کیا[5]، علی مطاع[1]

1- دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- استاد، دکترای تخصصی بیوشیمی،گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- دانشیار، دکترای تخصصی شیمی، گروه شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

4- استادیار، دکترای تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

5- کارشناس، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت 89/3/25، تاریخ پذیرش 89/5/6

چکیده

زمینه و هدف: افلاتوکسین‌ها و به خصوص افلاتوکسین B1، اثرات مرگ بار و جبران ناپذیری روی سلامت انسان و حیوانات دارند. هدف از انجام این تحقیق، ارایه یک روش حساس، اختصاصی و نسبتاً سریع برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی سه گروه رات انتخاب و به عنوان کنترل مثبت (تیمار شده با افلاتوکسین B1)، منفی (بدون تیمار خاص) و استاندارد (تیمار شده با افلاتوکسین B1 رادیواکتیو) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از خون‌گیری از رات‌ها، سرم خون و سپس آلبومین سرم جداسازی شد. آلبومین توسط پروناز هیدرولیز گردید و در نهایت افلاتوکسین جدا شده از آلبومین به سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق و با آشکارگر فلورسانس مورد شناسایی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: به کمک الکتروفورز روی ژل پلی اکریلامید نشان داده شد که آلبومین جدا شده از سرم کاملا خالص می‌باشد. در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کمترین میزان اندازه‌گیری برای افلاتوکسین متصل به آلبومین 60 پیکوگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. میانگین میزان افلاتوکسین در سرم رات‌های کنترل مثبت، 19/2 نانوگرم بر میلی‌گرم آلبومین محاسبه شد. طی آزمایشات درون-سنجشی و بین سنجشی تکرار پذیری بسیار خوبی برای این روش مشاهده گردید.

نتیجه گیری: میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین با میزان دریافت افلاتوکسین متناسب است. این تحقیق با استفاده از نمونه سرم رات طراحی شده اما از آنجایی که آلبومین هیدرولیز شده و از افلاتوکسین جدا می‌شود روش فوق قابل استفاده برای اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین در نمونه سرم انسانی نیز می‌باشد.

واژگان کلیدی: افلاتوکسین، افلاتوکسین B1، آلبومین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، صندوق پستی: 331-14115

Email: Lotfi_ab@ modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

افلاتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که برای انسان و حیوانات سمی و سرطان‌زا می‌باشند(1). این سموم می‌توانند گستره وسیعی از مواد غذایی از جمله غلات، دانه‌های روغنی، خشکبار، شیر، گوشت و میوه‌های خشک را آلوده کنند(2). بررسی‌ها نشان داده است سیستم‌های کنترل مواد غذایی در کشورهای در حال توسعه قادر به کنترل آلودگی مواد غذایی با افلاتوکسین نبوده(3) و بیش از 5 میلیارد انسانی که در این کشورها زندگی می‌کنند در معرض مقادیر زیاد و کنترل نشده این سموم می‌باشند(2). مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط مواجهه با افلاتوکسین و افزایش خطر ابتلا به سرطان کبد از نوع هپاتوسلولار را به اثبات رسانده است(4، 5). همچنین مطالعات روی حیوانات و کشت سلول‌های انسانی و حیوانی نشان داده است که افلاتوکسین سبب سرکوب سیستم ایمنی به ویژه پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود(6). افلاتوکسین B1، بیشترین و سمی ترین افلاتوکسین هاست(3، 7) و به عنوان سرطانزای کلاس 1 شناخته شده است(8). پس از ورود این ماده به دستگاه گوارش ابتدا توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450 کبدی متابولیزه می‌شود که نتیجه آن تولید افلاتوکسین B1-۸،۹-اپوکسید است که قابلیت واکنش و اتصال به DNA و ایجاد افلاتوکسین-گوانین را دارد. ترکیب اخیر می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم میزان مواجهه با افلاتوکسین مورد استفاده قرار گیرد(7، 8) اما استفاده از آن به دلیل نیاز به نمونه‌برداری بافتی با محدودیت روبروست. بخشی از افلاتوکسین-گوانین نیز در هنگام ترمیم نوسازی و یا هیدرولیز شیمیایی از DNA و RNA جدا شده و به درون ادرار ترشح می‌شود. همچنین متابولیسم افلاتوکسین B1 منجر به تولید متابولیت‌هایی می‌شود که آنها هم از طریق ادرار دفع می‌شوند. آزمایش ادرار می‌تواند برای بررسی میزان مواجهه با افلاتوکسین به صورت حاد مورد استفاده قرار گیرد اما وضعیت در معرض بودن به صورت مزمن را منعکس نمی‌کند. افلاتوکسین B1-۸،۹-اپوکسید پس از تبدیل به افلاتوکسین B1-۸،۹-دی هیدرودیول قابلیت اتصال به DNA را دارد(8). مهم‌ترین پروتئین خون که افلاتوکسین B1 به آن متصل می‌شود، آلبومین است(10-8) که از طریق پیوند کووالان با واحدهای لیزین آلبومین صورت می‌گیرد(11). مطالعات نشان داده است که در انسان و رات حدود 3-1 درصد افلاتوکسین B1 خورده شده به آلبومین خون اتصال می‌یابد(8، 11). از آنجایی که نیمه عمر آلبومین حدود 20 روز است، شناسایی و اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین شاخص خوبی برای میزان مواجهه با افلاتوکسین به صورت مزمن است (8، 9، 11).

مردم کشورهای در حال توسعه به صورت مزمن در معرض مقادیر زیاد افلاتوکسین می‌باشند و کشور ما نیز از این معضل مستثنی نیست، به خصوص در برخی از مناطق کشور که خشکبار مصرف بالایی دارد. با توجه به اثرات کشنده افلاتوکسین بر سلامت انسان، در این تحقیق یک روش حساس، اختصاصی و در عین حال سریع برای شناسایی و اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین، به عنوان یک شاخص مهم در معرض بودن به افلاتوکسین ارایه شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که انجام آن به تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است. در این مطالعه از 30 رات ویستار نر با وزن تقریبی 200 تا 250 گرم استفاده شد. این رات‌ها به 3 گروه تقسیم شدند. گروه اول رات‌های کنترل مثبت، گروه دوم رات‌های کنترل منفی و گروه سوم رات هایی که برای تهیه استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند.

به گروه اول رات‌ها، افلاتوکسین B_1 (شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان) به میزان 0/5 میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت محلول در 0/5 میلی لیتر دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide-DMSO) از طریق داخل صفاقی تزریق شد.

www.SID.ir

Archive of SID

گروه دوم رات‌ها هیچ افلاتوکسینی دریافت نکردند و به گروه سوم به رات‌ها، افلاتوکسین B_1 رادیولیبل با ترتیتوم (شرکت موراوک، کالیفرنیا، آمریکا) به میزان 0/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم به شکل محلول در DMSO و داخل صفاقی تزریق گردید به طوری‌که هررات حدود 10 میکروکوری، افلاتوکسین B_1 رادیواکتیو دریافت کرد. علت تیمار گروه اخیر با افلاتوکسین B_1 رادیواکتیو، تهیه استاندارد برای روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) می‌باشد. همه رات‌ها در شرایط یکسان از نظر محل نگهداری، آب و غذای مصرفی نگهداری شدند.

پس از مدت 24 ساعت از تمامی رات‌ها خون‌گیری شد و با سانتریفوژ سرم آنها جداسازی گردید. از آنجایی که حجم خونی که از هر رات به دست می‌آید محدود است، در هر گروه از چندین رات استفاده شد و سپس سرم رات‌های هر گروه با هم مخلوط و در میکروتیوب‌های 0/5 میلی لیتری تقسیم و در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

ابتدا سرم‌ها به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس به هر 0/5 میلی‌لیتر سرم، 750 میکرولیتر محلول آمونیوم سولفات اشباع اضافه و خوب مخلوط شد و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه در 9000g سانتریفوژ گردید. محلول رویی که حاوی آلبومین بود جدا شد و رسوب که عمدتاً حاوی گاماگلبولین‌هاست، دور ریخته شد. سپس به محلول رویی 100 میکرولیتر اسید استیک یک مولار اضافه شد و پس از مخلوط شدن، در دمای37 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 دقیقه و در 9000g سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب آلبومین در 0/5 میلی لیتر بافر PBS (pH برابر 7/4) مجدداً حل گردید.

برای اطمینان از خلوص آلبومین جدا شده از سرم، الکتروفوزر (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophrosis-SDS-PAGE) انجام گردید.

غلظت آلبومین جدا شده به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که به 100 میکرولیتر سرم با رقت 1 به 50، 5 میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و مخلوط گردید و پس از نیم ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد نیز با (Bovine Serum Albumin-BSA) در غلظت‌های 0/06، 0/12، 0/25، 0/5 و 1 میلی‌گرم در میلی لیتر رسم و به کمک آن غلظت آلبومین جدا شده از سرم سه گروه رات محاسبه گردید.

به منظور هیدرولیز آلبومین آنزیم پروناز (شرکت روش، آلمان) به نسبت پروتئین به آنزیم 2 به 1 به کار گرفته شد. به 2 میلی گرم آلبومین، 100 میکرولیتر از محلول 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم اضافه شد. هیدرولیز به مدت 16 ساعت در دمای37 درجه سانتی‌گراد و همراه با هم زدن (250 دور در دقیقه) انجام گردید. آنزیم پروناز سبب هیدرولیز آلبومین شده و فقط یک اسید امینه لیزین به صورت متصل به افلاتوکسین باقی می‌ماند. پس از سانتریفوژ در 10000g محلول رویی جدا شد.

به منظور جداسازی افلاتوکسین متصل به لیزین از مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین و آنزیم پروناز به یک حجم از نمونه حاصل از مرحله 6، دو حجم استن اضافه و 2 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرارداده شده و سپس سانتریفوژ در 1000g انجام گرفت؛ در این حالت آنزیم پروناز و مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین ته نشین شد و محلول رویی که حاوی افلاتوکسین-لیزین بود جدا گردید؛ آنگاه نمونه در دستگاه فریز درایر کاملاً خشک و در 0/2 میلی‌لیتر (مخلوط یک به یک آب مقطر و متانل) مجدداً حل شد.

جهت اندازه گیری افلاتوکسین پس از جداسازی از آلبومین، از دستگاه HPLC (شیمادزو، LC-4A) به روش کروماتوگرافی فاز معکوس و با استفاده از ستون C18 استفاده شد و آشکارگر مورد استفاده جهت شناسایی و اندازه‌گیری نوع فلورسانس بود. در این آزمون تهییج در طول موج 405 نانومتر انجام و نشر درطول موج 470 نانومتر اندازه‌گیری شد. فاز متحرک حاوی 40 درصد متانل و 60 درصد بافر سدیم فسفات 5 میلی مولار و pH برابر 7/2 بود که به صورت ایزوکراتیک و به مدت 15 دقیقه و با سرعت

www.SID.ir

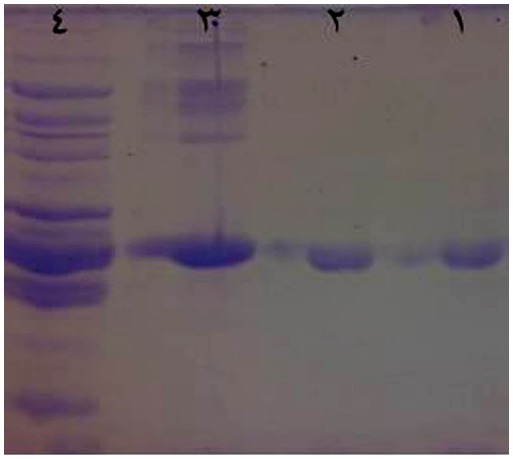
Archive of SID

جریان 0/9 میلی لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.10 میکرولیتر از نمونه به دستگاه HPLC تزریق و پس از مدت زمان حدود 11 دقیقه افلاتوکسین متصل به لیزین از ستون خارج و شناسایی شد.

در روشHPLC به استاندارد نیاز است. در نمونه سرم پس از تخلیص آلبومین وهیدرولیز آن، یک لیزین به افلاتوکسین متصل باقی می‌ماند و در واقع ماده مورد اندازه‌گیری ما افلاتوکسین متصل به لیزین است. از آنجایی که این کمپلکس به صورت تجاری و آماده موجود نمی‌باشد، به ناچار باید استاندارد تهیه می‌شد. به این منظور، به تعدادی رات، افلاتوکسین رادیواکتیو تزریق شد که پس از خون‌گیری وجداسازی سرم آنها، آلبومین سرم تخلیص و سپس هیدرولیز شد و پس از رسوب مخلوط حاصل از هیدرولیز آلبومین، افلاتوکسین رادیواکتیو متصل به لیزین به دست آمد که به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین غلظت این استاندارد که خود آن را تهیه نمودیم و همچنین رسم منحنی استاندارد، ابتدا غلظت‌های مختلفی از افلاتوکسین لیبل شده با ترتیتوم تهیه و با دستگاه بتاکانتر، مورد شمارش قرار گرفت و نتایج آن جهت رسم منحنی استاندارد 1 (غلظت در برابر شمارش در دقیقه) مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه نمونه حاوی افلاتوکسین متصل به لیزین تهیه شده از سرم راتهایی که افلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند در رقتهای مختلف، با دستگاه مذکور شمارش شد و غلظت آنها با استفاده از منحنی استاندارد 1 محاسبه گردید. همین نمونه‌ها به روش HPLC نیز آنالیز و سطح زیر منحنی مربوط به پیک افلاتوکسین محاسبه شد. با استفاده از نتایج اخیر، منحنی استاندارد 2 (سطح زیر منحنی در برابر غلظت) رسم گردید که به کمک آن غلظت افلاتوکسین در نمونه مثبت پس از تزریق به سیستم HPLC و محاسبه سطح زیرمنحنی پیک مربوطه به دست آمد.

یافته ها

با روش الکتروفوزر (SDS-PAGE) نشان داده شد که آلبومین تخلیص شده از سرم رات‌ها کاملاً خالص می‌باشد(شکل1).



شکل 1. الکتروفورز SDS-PAGE قبل و بعد از تخلیص آلبومین سرم، برای مقایسه از سرم البومین گاوی تجاری نیز استفاده شده است. 1 و 2 آلبومین تخلیص شده از سرم راتها، 3: آلبومین سرم گاوی(تجاری) و 4: پروتئینهای سرم راتها

بر اساس روش برادفورد، غلظت آلبومین تخلیص شده از سرم رات‌های کنترل مثبت، منفی و استاندارد به ترتیب 9/1 و9/2 و 9 میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.

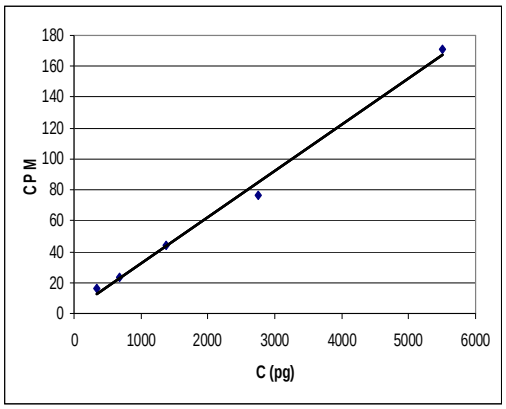
در اندازه گیری میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین، پس از هیدرولیز آلبومین و با استفاده از روش HPLC و با آشکارگر فلورسانس، درمورد نمونه منفی پس از تزریق به دستگاه HPLC 2-6 دقیقه پیک‌هایی مشاهده شدکه مربوط به اسیدهای آمینه و پپتیدهای باقیمانده حاصل از هیدرولیز آلبومین است. در مورد نمونه مثبت علاوه بر پیک‌های مذکور در زمان حدود 11 دقیقه پیک مربوط به افلاتوکسین متصل به لیزین مشاهده شد که این پیک پس از بارها تکرار همواره در نمونه مثبت مشاهده گردید درحالی که در نمونه منفی هیچگاه این پیک وجود نداشت. در مورد نمونه استاندارد حاصل از رات‌هایی که افلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند نیز علاوه برپیک‌هایی 2-6 دقیقه، پیک مربوط به افلاتوکسین- لیزین با همان زمان بازداری 11 دقیقه مشاهده شد.

میانگین میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین در رات‌های کنترل مثبت، در مقایسه با منحنی استاندارد (نمودارهای 1و2) که با استفاده از نمونه رات‌هایی که افلاتوکسین رادیواکتیو دریافت کرده بودند رسم شده

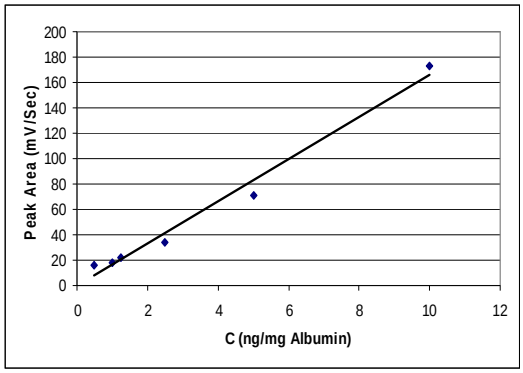
www.SID.ir

Archive of SID

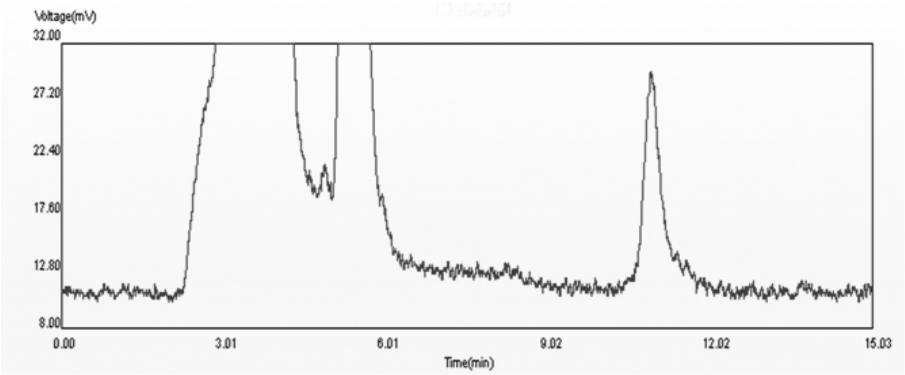
بود،19/2 نانوگرم بر میلی‌گرم آلبومین تعیین گردید (شکل 2)



نمودار 1. منحنی استاندارد (شمارش در دقیقه در برابر غلظت AFB1 نشاندار با تریتیوم)



نمودار 2. منحنی استاندارد (سطح زیر منحنی در کروماتوگرام HPLCدر برابر غلظت AFB1)



شکل 2. کروماتوگرام HPLC (پیک مربوط به افلاتوکسین-لیزین در نمونه کنترل مثبت با زمان بازداری 11 دقیقه). باقیمانده مخلوط حاصل از هیدرولیز البومین در زمان 2-6 دقیقه از ستون خارج می شوند.

حساسیت روش 100 درصد ، اختصاصیت 92 درصد و حد تشخیص 60 پیکوگرم بر میلی لیتر معادل 20 پیکوگرم بر میلی گرم آلبومین تعیین شد؛ همچنین با 4 بار آزمایش طی یک روز و در 4 روز متوالی، تکرارپذیری خوبی برای این روش مشاهده گردید.

بحث

از آنجایی که در کشورهای در حال توسعه، کنترل مطلوبی روی مواد غذایی از نظر وجود افلاتوکسین اعمال نمی‌شود(2) و در کشورهای توسعه یافته نیز این کنترل‌ها تنها روی برخی از مواد غذایی خاص مثل دانه‌ها و مغزهای خوراکی صورت می‌گیرد، همواره برخی از مواد غذایی دیگر وجود دارند که آلوده‌اند و تحت کنترل نیستند(8). اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین در نمونه سرم، نه تنها وضعیت افراد را از نظر میزان دریافت افلاتوکسین مشخص می‌کند بلکه امکان انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد نقش این ماده در ایجاد بیماری‌هایی چون سرطان کبد را فراهم می‌سازد. همچنان که از این شاخص در بسیاری از تحقیقات اپیدمیولوژیک به خصوص در کشورهای آفریقایی و آسیایی استفاده شده است(6، 8، 9، 12، 13). روش آزمایشگاهی که برای اندازه‌گیری یک شاخص در این گونه مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرد

www.SID.ir

Archive of SID

باید چندین ویژگی داشته باشد؛ ازجمله حساسیت (تعداد کم موارد منفی کاذب)، اختصاصیت (تعداد کم موارد مثبت کاذب)، تکرار پذیری، دادن اطلاعات در مورد وضعیت فرد برای مدت نسبتاً طولانی، نمونه‌گیری غیر تهاجمی، مقرون به صرفه بودن و ساده بودن انجام روش(8). تاکنون از روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری این شاخص مهم در سرم استفاده شده است از جمله الایزا، رادیوایمونوآسی و HPLC . در میان روش‌های مختلف HPLC به عنوان استاندارد طلایی مورد توجه است. طی تحقیقاتی که تا به حال در این زمینه برای اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین به روش HPLC صورت گرفته است، ابتدا آلبومین سرم خون جداسازی و سپس توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود. آنگاه مخلوط حاصل از ستون ایمنوافینیتی عبور داده شده و افلاتوکسین موجود در آن تخلیص می‌گردد و سپس به سیستم HPLC تزریق و با آشکارساز فلورسانس ویا آشکارساز اسپکترومتری جرمی شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود(1، 4، 5، 13، 14). در این مطالعه روش HPLC جهت اندازه‌گیری این شاخص مهم بهینه سازی شده و با سرعت و سهولت بیشتر و هزینه کمتر قابل انجام گردیده است. اختصاصیت روش HPLC فلورسانس بیش از 90 درصد، حساسیت 100 درصد و حد تشخیص، 20 پیکوگرم بر میلی گرم آلبومین معادل 60 پیکوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که می‌توان با افزایش مقدار آلبومین، مقادیر کمتر افلاتوکسین متصل به آلبومین را نیز در نمونه سرم شناسایی و بدین ترتیب حساسیت را افزایش داد.

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد، میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین با میزان دوز دریافتی افلاتوکسین توسط رات‌ها رابطه مستقیم دارد. سطح زیر منحنی پیک HPLC مربوط به نمونه حاصل از رات‌های کنترل مثبت که 0/5 میلی‌گرم بر کیلوگرم افلاتوکسین B1 دریافت کرده بودند، به همان نسبت بیشتر از سطح زیر منحنی پیک HPLC نمونه رات‌های استاندارد بود که با 0/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم افلاتوکسینB1 رادیواکتیو تیمار شده بودند. این یافته در تایید تحقیقات قبلی است که در این زمینه انجام شده و نشان داده است نمودار میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین در مقابل دوز دریافتی افلاتوکسین توسط رات‌ها کاملا خطی می‌باشد(1)؛ همچنین در مطالعه دیگری که در آن رات‌ها با 10 تا 1000 نانوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شده بودند، مشاهده شد که میزان اتصال افلاتوکسین به ماکرومولکول‌های کبدی از جمله پروتئین، DNA و RNA رابطه مستقیم با دوز دریافت افلاتوکسین داشته و نمودار حاصل کاملا خطی است(15). در مطالعه حاضر برای جداسازی آلبومین از نمونه سرم، از روش رسوبی (به کمک محلول سولفات آمونیوم اشباع و اسید استیک) استفاده شده است. در این روش گرچه مقدار آلبومین حاصل از تخلیص نسبت به روش‌های دیگر قدری کمتر است اما در نهایت آلبومین کاملاً خاص به دست می‌آید (الکتروفوزر SDS-PAGE). در دیگر مطالعات که آلبومین با استفاده از ستون‌های میل ترکیبی ازقبیل Reactive Blue-2 Sepharose جداسازی شده، علاوه بر داشتن هزینه بیشتر نسبت به روش رسوبی می‌تواند به ناپایداری کمپلکس افلاتوکسین-آلبومین هم منتهی گردد (1، 11)؛ همچنین برای هیدرولیزآلبومین و جدا کردن افلاتوکسین متصل به آن آنزیم پروناز به کار گرفته شد. در برخی مطالعات برای هیدرولیز آلبومین از پروتئیناز K استفاده شده است. مشخص گردیده است که این آنزیم به اندازه پروناز (مخلوطی از پروتئازها) در هیدرولیز آلبومین، مؤثر نیست(1). در این تحقیق، قبل از اندازه‌گیری افلاتوکسین به روشHPLC فلورسانس، به جای استفاده از ستون‌های گران قیمت ایمنوافینیتی، جداسازی آنزیم و مخلوط هیدرولیز شده آلبومین از افلاتوکسین به کمک استن در سرما صورت گرفت. در این حالت علاوه بر پیک مربوط به افلاتوکسین- لیزین با زمان بازداری حدود 11 دقیقه، پیک‌های دیگری که مربوط به پپتیدها و اسیدهای امینه باقیمانده حاصل از آلبومین هیدرولیز شده می‌باشد، طی زمان 2 تا 6 دقیقه ابتدای هر آزمایش مشاهده می‌شود که تداخلی در اندازه‌گیری افلاتوکسین- لیزین به دلیل فاصله زیاد پیک‌ها و اختلاف زمان بازداری ایجاد نمی‌کند؛ بنابراین

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان برای سرعت و سهولت بیشتر و صرفه جویی 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 فلورسانس، همواره تخلیص با کروماتوگرافی میل ترکیبی صورت گرفته است(1، 5، 8، 14) که علاوه بر مشکلات پرهزینه و وقت گیر بودن می‌تواند به از دست رفتن مقداری از افلاتوکسین منتهی شده و میزان افلاتوکسین متصل به آلبومین با روش HPLC به طور کاذب، پایین‌تر از مقدار واقعی برآورد گردد(8). در این مطالعه جهت اندازه‌گیری افلاتوکسین به روش HPLC فلورسانس، از فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک استفاده شد و زمان لازم برای انجام هر آزمایش 15 دقیقه بود؛ این در حالی است که در مطالعات قبلی از سیستم گرادیان و با درصدهای مختلف بافر و حلال به عنوان فاز متحرک استفاده شده و زمان انجام هر آزمایش 20 تا 50 دقیقه بوده است(1، 5، 8، 14).

نتیجه گیری

با بهینه سازی روش HPLC فلورسانس جهت اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین و تغییرات ایجاد شده از جمله حذف کروماتوگرافی ایمنوافینیتی قبل از HPLC و جایگزین کردن روش رسوبی به جای آن، استفاده از سیستم ایزوکراتیک به جای سیستم گرادیان و همچنین کاهش زمان هر آزمایش، روش با سرعت و سهولت بیشتری قابل انجام است ضمن این که هزینه انجام آن نیز تا حدود زیادی کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر، اندازه‌گیری‌ها با استفاده از سرم رات انجام شده اما از آنجا که در این روش اندازه‌گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین پس از هیدرولیز آلبومین انجام می‌گیرد، بنابراین می‌تواند به خوبی برای اندازه گیری افلاتوکسین متصل به آلبومین در سرم انسان مورد استفاده قرار گیرد.

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

این مطالعه قسمتی از رساله دکتری بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. بدینوسیله از همکاری اساتید و کارشناسان گروه بیوشیمی بالینی این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Wild C, Jiang Y, 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 Jan; 50(2): 245-51.
2. Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, Bhat R, Breiman R, Brune M, et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environ Health Perspect. 2006 Dec; 114(12): 1898-903.
3. Williams J, Phillips T, Jolly P, Stiles J, Jolly C, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr. 2004 Nov; 80(5): 1106-22.
4. Scholl P, Turner P, Sutcliffe A, Sylla A, Diallo M, Friesen M, et al. Quantitative comparison of aflatoxin B1 serum albumin adducts in humans by isotope dilution mass spectrometry and ELISA. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Apr;15(4):823-6.
5. McCoy L, Scholl P, Sutcliffe A, Kieszak S, Powers C, Rogers H, et al. Human aflatoxin albumin adducts quantitatively compared by ELISA, HPLC with fluorescence detection, and HPLC with isotope dilution mass spectrometry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Jul; 17(7): 1653-7.
6. Jiang Y, Jolly P, Preko P, Wang J, Ellis W, Phillips T, et al. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. Clin Dev Immunol. 2008; 2008:790309.
7. Wild C, Turner P. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis. 2002 Nov;17(6):471-81.
8. Turner P, Dingley K, Coxhead J, Russell S, Garner C. Detectable levels of serum aflatoxin

Archive of SID

B1-albumin adducts in the United Kingdom population: implications for aflatoxin-B1 exposure in the United Kingdom. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1998 May; 7(5): 441-7.

9. Chen C, Yu M, Liaw Y, Wang L, Chiamprasert S, Matin F, et al. 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 Jul; 59(1): 128-34.

10. Sabbioni G, Skipper P, Büchi G, Tannenbaum S. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. Carcinogenesis. 1987 Jun; 8(6):819-24.

11. Chapot B, Wild C. ELISA for Quantification of Aflatoxin-Albumin Adducts and their Application to Human Exposure Assessment. Techniques in diagnostic pathology. New York: Academic Press; 1991. p. 135-55.

12. Ahsan H, Wang L, Chen C, Tsai W, Santella R. 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 Aug;109(8):833-7.

13. Wild C, Hudson G, Sabbioni G, Chapot B, Hall A, Wogan G, et al. Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1992 Mar-Apr;1(3):229-34.

14. Sabbioni G, Ambs S, Wogan G, Groopman J. The aflatoxin-lysine adduct quantified by high-performance liquid chromatography from human serum albumin samples. Carcinogenesis. 1990 Nov; 11(11):2063-6.

15. Appleton B, Goetchius M, Campbell T. Linear dose-response curve for the hepatic macromolecular binding of aflatoxin B1 in rats at very low exposures. Cancer Res. 1982 Sep; 42(9): 3659-62.

www.SID.ir