

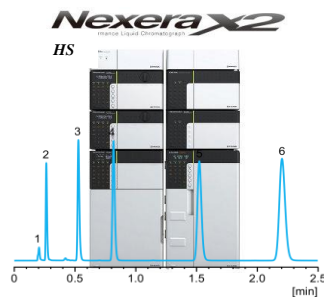
HPLC Department

بخش کروماتوگرافی

یکی از ملزومات پیشرفت در تشخیص و درمان در سه دهه‌ی گذشته توسعه تکنیک‌ها، روش‌های جداسازی و تخلیص ماکرومولکول‌های حیاتی (نظیر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) است. یکی از تکنیک‌های عمده‌ای که برای استخراج و تخلیص این ماکرومولکول‌های حیاتی کاربرد زیادی دارد، کروماتوگرافی است.

کروماتوگرافی chromatography، در زبان یونانی chroma یعنی رنگ و grophein یعنی نوشتن است. کروماتوگرافی کاربردهای زیادی در تمام شاخه‌های علوم و علوم پزشکی دارد و گروه متنوعی از روش‌های جداسازی مواد را شامل می‌شود که بسیاری از این جداسازی‌ها به روش‌های دیگر ناممکن است. اولین روش‌های کروماتوگرافی در سال ۱۹۰۳ بوسیله میخائیل سوئت ابداع و نامگذاری شد که او از این روش برای جداسازی مواد رنگی استفاده کرد. مارتین و سینج در سال ۱۹۵۲ به پاس اکتشافاتشان در زمینه کروماتوگرافی جایزه نوبل را دریافت کردند. مهمترین پیشرفتی که از سال ۱۹۶۶ در کروماتوگرافی ایجاد شد ابداع روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC(High Performance Liquid Chromatography)) می‌باشد. این روش نسبتاً جدید است و تحقیقات مربوط به آن به سال‌های ۱۹۷۰ و بعد از آن بر می‌گردد. HPLC یکی از روش‌های ظریف کروماتوگرافی امروزی می‌باشد که با استفاده از پمپ‌های فشار بالا (که سرعت حرکت مولکول‌ها را افزایش می‌دهد) به انجام می‌رسد. همچنین مواد به کار رفته در HPLC دارای کیفیت بالایی بوده که می‌توانند در برابر نیروی فشارنده جریان مقاومت نمایند. با کاهش زمان عبور از ستون، HPLC میتواند از طریق محدود نمودن توزیع انتشاری، قدرت تفکیک را به میزان زیادی افزایش دهد. با پیشرفت‌های بسیار زیاد در زمینه دستگاه‌های HPLC امروزه نسل جدید این دستگاه‌ها با عنوان کروماتوگرافی مایع با کارایی فوق العاده بالا (UHPLC(Ultra High Performance Liquid Chromatography)) بوجود آمده‌است.

دستگاه UHPLC مدل Shimadzu Nexera X2 در میان تمامی انواع مدل‌های UHPLC، پیشرفته‌ترین و مجهزترین سیستم HPLC می‌باشد. این دستگاه با پمپ با فشار فوق العاده بالا (تا 130Mpa) طراحی شده‌است که باعث می‌شود کمترین اختلال و حجم از دست رفته در سیستم ایجاد شده و آنالیز با سرعت بسیار بالا و تفکیک با کیفیت عالی انجام گیرد. همچنین این پمپ باعث می‌گردد پالس‌های اضافی به طور معنی‌داری کاهش یافته و به کمترین حد خود برسد که این کاهش پالس دستیابی به آنالیز با حساسیت فوق العاده بالا را فراهم می‌نماید. همچنین در این مدل UHPLC اتوسمپلری طراحی شده‌است که تکرارپذیری و پایداری بی‌نظیری را ایجاد می‌کند. محدوده ظرفیت تزریق این اتوسمپلر به ستون جداسازی دستگاه از حجم 1µl تا 2000µl متغیر می‌باشد که در چنین سیستم‌هایی، تزریق با این حجم بسیار ناچیز و فوق العاده کم تا حجم بالا یک نوآوری مافوق عالی می‌باشد. همچنین این اتوسمپلر مجهز به یک سیستم خنک‌کننده نمونه بوده که توانایی کنترل دمای نمونه را در محدوده بین ۴ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد دارا می‌باشد که این ویژگی برای انجام آنالیز متوالی که بایستی نمونه در شرایط سرد و قابل قبول بوده و امکان از بین رفتن آن در دمای محیط و اتاق وجود دارد بسیار حائز اهمیت است. از سوی دیگر Shimadzu Column Oven در این دستگاه UHPLC برای فراهم نمودن دمای



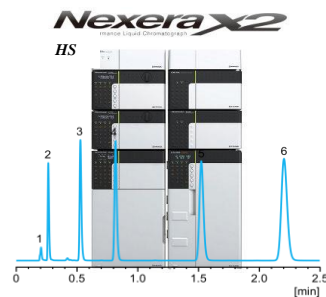
HPLC Department

مورد نظر ستون کروماتوگرافی و جریان های خطی در یک دمای ثابت که آنالیز با قابلیت انجام مجدد و جداسازی با کیفیت بالا را فراهم می کند، وجود دارد. دتکتورهای متعددی جهت این دستگاه وجود دارد که از جمله این دتکتورها، دتکتور UV و RF می باشد که دتکتور RF یک Spectrofluorometric بوده و قابلیت اندازه گیری به روش های تک طول موجی، دو طول موجی، Spectrum Scanning و... را دارا می باشد. دتکتور UV آن یک Ultra-Violet Visible Spectrophotometric دتکتور می باشد که از یک لامپ دوتریومی بعنوان منبع نوری خود استفاده می کند که بهترین دتکتور برای آنالیز مواد در ناحیه فرابنفش می باشد. این دتکتور نیز دارای روش های اندازه گیری همانند تک طول موجی، دو طول موجی، Wavelength Scanning می باشد.

بیماری های متابولیک مادرزادی - اختلالات اسیدهای آمینه

بیماری های متابولیکی (وابسته به سوخت و ساز بدن) و ژنتیکی (ارثی) یا مادر زادی، به طور معمول به عنوان بیماری های نادر در جامعه مطرح می شدند. اما امروزه با پیشرفت در شناخت بهتر علائم بالینی و همچنین روش های پاراکلینیک، هر روز شیوع بیشتری از این بیماری ها در جامعه مطرح می شود. در حال حاضر بعضی از منابع، شیوع بیماری های متابولیک ارثی (فقط بیماری های قابل تشخیص) را بیشتر از یک فرد مبتلا در هر ۴۰۰۰ تولد می دانند. با توجه به ارثی بودن این بیماری ها، بدیهی است که ازدواج های فامیلی می تواند تاثیر به سزایی در افزایش شیوع این بیماری ها داشته باشد که در جامعه ما به خاطر زیر بنای فرهنگی حدود ۳۰ برابر بیشتر از جوامع غربی است. نکته حائز اهمیت در مورد بیماری های متابولیک مادرزادی این است که در بسیاری از این بیماری ها، میزان پاسخ به درمان ارتباط مستقیم با زمان تشخیص بیماری دارد بدین معنی که هر چه بیماری زودتر تشخیص داده شود، شانس بیشتری برای جلوگیری از بروز عوارض یا محدود نمودن آن ها وجود دارد. اغلب علائم بیماری های متابولیک در ابتدای تولد یا قابل تشخیص نیستند، یا اینکه به سادگی با علائم سایر بیماری های رایج اشتباه می شوند یا با توجه به اینکه این بیماری ها، به عنوان بیماری های نادر در جامعه مطرح می شوند بطور منطقی ظن آخر پزشک، ابتلا به بیماری متابولیک خواهد بود. اما نظر به اینکه حتی شناخت گروه پزشکی از این بیماریها محدود می باشد، گاهی برای رسیدن به تشخیص قطعی برای یک بیمار، مراجعات قابل توجه به پزشکان با تخصص های مختلف و حتی بستری های متعدد در بیمارستان را به دنبال دارد، که این خود باعث تاخیر چشم گیری در تشخیص و درمان این بیماران می شود. نکات فوق الذکر اهمیت دو نکته را بیش از پیش مطرح می کند؛ از یک طرف آشنا شدن هر چه بیشتر پزشکان و گروه پزشکی، بصورت عام، با این بیماریها که واقعا نادر هم نیستند، و از طرف دیگر فراهم نمودن سیستم های غربالگری برای این بیماری ها که بهترین زمان انجام آن در بدو تولد خواهد بود.

اسیدهای آمینه واحدهای تشکیل دهنده ساختمان پروتئین ها بوده و کارهای متنوعی را در بدن انجام می دهند و بعد از اوره دومین جزء مهم ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی پلازما محسوب می شوند. وقتی بدن یک نوزاد نتواند اسید آمینه ای را مصرف کند، این امر چندین پیامد خواهد داشت: اولاً اسیدهای آمینه قبل از این فرآیند افزایش یافته و به ترکیبات دیگری که می تواند توکسیک (سمی)

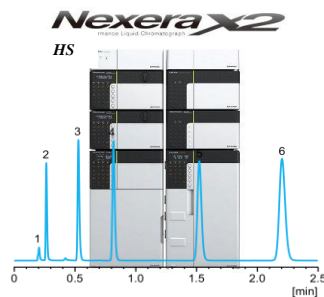


HPLC Department

باشد تبدیل شده و ثانیا کمبود تولید بعضی از ترکیبات (حاصل از اسیدهای آمینه) بوجود می آید که بخصوص بعضی از آنها برای عملکرد مغز بسیار مهم و حیاتی می باشند. بسیاری از اختلالات متابولیک ارثی ناشی از افزایش اسیدهای آمینه در خون هستند. معمولاً اختلال ارثی یک اسید آمینه، مستقیماً به فقدان یک آنزیم دخیل در متابولیسم یک یا چند اسید آمینه مربوط می شود بطوری که پرو سه تخریب آن دچار مشکل شده و در نتیجه غلظت پلاسمایی این اسیدهای آمینه و میزان دفع ادراری آنها بسیار بالا می رود. گاهی این اختلالات ناشی از ناتوانی بدن در انتقال اسیدهای آمینه به داخل سلولها می باشد. در این موارد غلظت اسیدهای آمینه بطور مشخص ۳ تا ۴ برابر حد طبیعی است اما ممکن است تا میزان ۱۰ برابر طبیعی نیز افزایش یابد. افزایش میزان اسیدهای آمینه در آمینواسیدوپاتی های (اختلالات اسیدهای آمینه) خاص مثل فنیل کتونوری (PKU)، بیماری ادرار شربت افرا (MSUD) و آمینواسیدمی های خاص مثل گلو تاریک اسید اوری دیده می شود. کاهش میزان اسیدهای آمینه نیز در نفریت، سندرم های نفروتیک و بیماری Hartnup (اختلال در انتقال اسید آمینه خنثی) دیده می شود. چهارده بیماری در این گروه قرار گرفته اند.

علائم بالینی

بطور کلی سن شروع علائم و نوع علائم بسته به نوع بیماری بسیار متغیر است. اکثر نوزادان دارای این اختلالات در بدو تولد سالم بوده و هیچ علامتی ندارند. بعضی از بچه ها در صورت عدم درمان، به ناتوانی جسمی و عقب ماندگی ذهنی دچار می شوند. بعضی هم علائمی نظیر خواب آلودگی، نق زدن، خوب شیر نخوردن، استفراغ و تحریک پذیری دارند. در صورت عدم درمان مشکلات شدیدتری نظیر مشکلات تنفسی، تشنج، ورم مغزی، کما و مرگ نیز رخ می دهد. اکثر اختلالات اسیدهای آمینه با یک سری تغییرات پاتولوژیک در غشاء میلین سیستم عصبی مرکزی همراه هستند که به آن Myelinopathy = SM Spongy می گویند. برای این اختلالات درمان صد در صد وجود ندارد و فقط باید سعی نمود با استفاده از رژیم های غذایی مخصوص، از ایجاد عوارض این بیماری ها تا حد ممکن پیشگیری شود. هدف اصلی درمان در اختلالات اسیدهای آمینه رسیدن مقدار کافی اسیدهای آمینه و یا پروتئین برای حفظ فرآیند رشد می باشد ولی نباید از آن حد فراتر رود که موجب آسیب به بدن در اثر افزایش اسیدهای آمینه می گردد. رژیم های غذایی در هر یک از این اختلالات به نحوی طراحی می شود که حاوی مقدار مورد نیاز از آن اسید آمینه خاص می باشد، که در آن بیماری افزایش می یابد و در نتیجه از رسیدن مقدار زیاد اسید آمینه که موجب سمیت در بدن می شود، جلوگیری می شود. به همین دلیل در اکثر این اختلالات از شیر خشک های مخصوصی استفاده می شود. البته بدلیل آنکه این شیر خشک های مخصوص درمان کاملی محسوب نمی شوند، باید سطح این اسیدهای آمینه، طی پروسه درمان به شدت تحت کنترل باشد. همینطور باید علائم عصبی ناشی از کمبود و یا افزایش مواد توکسیک نیز بطور دائم پایش شود.



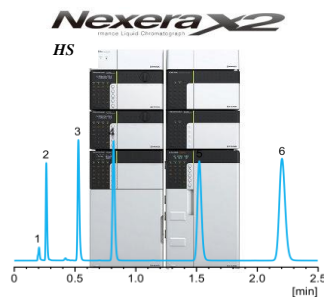
HPLC Department

غربالگری و اندازه گیری اسیدهای آمینه

در حال حاضر روند رو به افزایش نوزادان مبتلا به بیماری‌های متابولیک مادرزادی وجود دارد. منشأ برخی از این بیماری‌ها، اسیدهای آمینه است که وقتی بدن یک نوزاد نتواند اسید آمینه‌ای را مصرف کند، اسیدهای آمینه در خون افزایش یافته و به ترکیبات سمی تبدیل شده و نیز کمبود تولید بعضی از ترکیبات حاصل از اسیدهای آمینه سبب اختلالاتی در رشد و عملکرد مغز همانند عقب ماندگی ذهنی، کند ذهنی و غیره می‌شود. هرچقدر این بیماری‌ها زودتر تشخیص داده شود درمان آن‌ها اثربخش‌تر خواهد بود و شانس بیشتری برای جلوگیری از عوارض و یا محدود نمودن آن‌ها وجود دارد. روش‌های نوین کمک زیادی در تشخیص هرچه سریع‌تر این اختلالات می‌کند. نکات فوق الذکر اهمیت فراهم نمودن سیستم‌های غربالگری برای این بیماری‌ها که بهترین زمان انجام آن در بدو تولد خواهد بود را نشان می‌دهد که سیستم غربالگری اسیدهای آمینه مطابق موارد زیر در مرکز تشخیص طبی مهدیه احمدآباد راه اندازی گردیده است.

Plasma Amino acids (UHPLC): Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Histidine, Glycine, Citrulline, Arginine, β - Alanine, Alanine, Taurine, Tyrosine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Isoleucine, Leucine, Ornithine, Asparagine, Glutamine, Threonine, Cystine, Lysine, Proline, 4-Aminobenzoic acid, Theanine, Tryptophan.

Urine Amino acids (UHPLC): Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Histidine, Glycine, Citrulline, Arginine, β - Alanine, Alanine, Taurine, Tyrosine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Isoleucine, Leucine, Ornithine, Asparagine, Glutamine, Threonine, Cystine, Lysine, Proline, 4-Aminobenzoic acid, Theanine, Tryptophan.

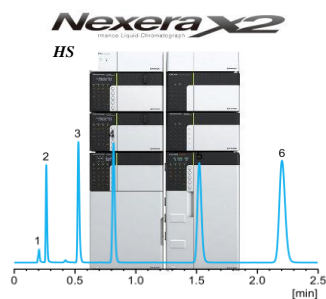


HPLC Department

Congenital disorders of amino acid metabolism

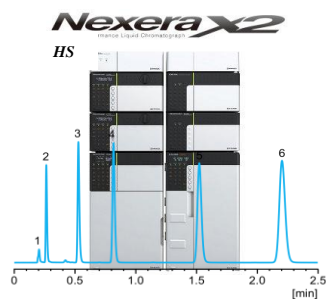
(Inborn errors of amino acid metabolism)

| Disorder | Types | Primary Metabolic indicator |
|--|--|---|
| <p>Phenylketonuria (فنیل کتونوری)</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی که باعث تجمع اسید آمینه فنیل آلانین در مایعات و سیستم عصبی بدن می شود که این تجمع به دلیل عدم وجود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز مورد نیاز برای تبدیل فنیل آلانین به تیروزین است.</p> | | <p>Phenylalanine</p> <p>Tyrosine</p> |
| <p>Nonketotic hyperglycinemia or Glycine encephalopathy</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی متابولیسم اسید آمینه گلیسین است. بعد از فنیل کتونوری دومین اختلال متداول متابولسمی اسید آمینه بوده و نقص در سیستم تجزیه کننده گلیسین بعنوان آنزیم مسئول کاتابولیسم گلیسین ایجاد می شود.</p> | | <p>Glycine</p> |
| <p>Maple syrup urine disease (MSUD), or branched-chain ketoaciduria (بیماری ادرار شربت افرا)</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی که اختلال در تجزیه اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی شاخه دار شامل لوسین، ایزولوسین و والین ایجاد می شود. علت نامگذاری آن وجود بوی شربت افرا در ادرار، عرق و مجرای گوش افراد مبتلا است.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Classic Severe MSUD ✓ Intermediate MSUD ✓ Intermittent MSUD ✓ Thiamine-responsive MSUD ✓ E3-Deficient MSUD with Lactic Acidosis | <p>Valine</p> <p>Leucine</p> <p>Isoleucine</p> |



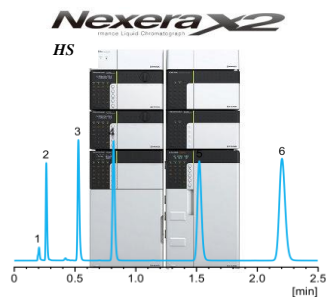
HPLC Department

| | | |
|--|--|---|
| <p>Classical homocystinuria, or cystathionine beta synthase deficiency or CBS deficiency</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی متابولیسم اسید آمینه متیونین است که بعلت نقص cystathionine beta synthase می باشد.</p> | | <p>Methionine</p> |
| <p>Tyrosinemia</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی است که بدن نمی تواند اسید آمینه تیروزین را بشکند. علائم آن بصورت ناراحتی های کلیه و کبد و کندذهنی بروز و در صورت عدم درمان می تواند کشنده باشد.</p> | <p>Tyrosinemia type 1</p> <p>Tyrosinemia type 2</p> <p>Tyrosinemia type 3</p> | <p>Tyrosine</p> |
| <p>Hartnup disease</p> <p>بعنوان Pellagra-like dermatosis نیز شناخته می شود و یک اختلال متابولیکی است که جذب آمینواسیدهای غیرقطبی (بویژه تریپتوفان که به سروتونین و ملاتونین و نیاسین تبدیل می شود) را تحت تاثیر قرار می دهد.</p> | | <p>Plasma amino acid</p> |
| <p>Ornithine transcarbamylase deficiency</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی که مهمترین اختلال چرخه اوره در انسان می باشد. این اختلال در یکی از آنزیم های چرخه اوره که باعث تبدیل کرباموئیل فسفات و اورنیتین به سیتروئین می شود رخ می دهد.</p> | | <p>Citrulline</p> <p>Arginine</p> |



HPLC Department

| | | |
|---|---|--------------------------|
| <p>Hypermethioninemia</p> <p>این نقص متابولیکی مادرزادی زمانی رخ می دهد که آمینواسید متیونین بطور مناسب در بدن شکسته نشود و افزایش بیش از حد این آمینواسید در خون ایجاد می شود.</p> | <p>Methionine</p> | |
| <p>Hyperlysinemia</p> <p>این نقص متابولیکی مادرزادی بواسطه افزایش غیر نرمال اسید آمینه لیزین در خون مشخص و شناسایی می شود.</p> | <p>Lysine</p> | |
| <p>Citrullinemia</p> <p>این نقص متابولیکی مادرزادی یکی از اختلالات سیکل اوره است که منجر به تولید و انباشته شدن آمونیاک و دیگر ترکیبات سمی در خون می شود. همچنین زمانی که این ترکیبات وارد ادرار می شود به این اختلال citrullinuria نیز می گویند.</p> | <p>Citrullinemia Type 1</p> <p>Citrullinemia Type 2</p> | <p>Citrulline</p> |
| <p>Hyperprolinemia</p> <p>به نقص متابولیکی مادرزادی prolinemia or prolinuria نیز می گویند. موقعی که اسید آمینه پرولین بطور معمول نتواند بواسطه آنزیم های پرولین اکسیداز و پیرولین ۵- کربوکسیلات دهیدروژناز شکسته شود افزایش بسیار زیاد در پرولین خون و ادرار ایجاد می شود.</p> | <p>Hyperprolinemia type 1</p> <p>Hyperprolinemia type 2</p> | <p>Proline</p> |



HPLC Department

| | |
|---|---|
| <p>Cystinuria</p> <p>این نقص متابولیکی مادرزادی بو سیله غلظت بالای آمینواسید سیستین در ادرار مشخص و شناسایی می شود که منجر به شکل گیری سنگ های سیستینی در کلیه ها و مجاری ادرار و مثانه می شود.</p> | <p>Cystine</p> |
| <p>Dicarboxylic aminoaciduria</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی آمینواسیدوری (۱:۳۵۰۰۰ تولد) است که اختلال ادراری آمینواسید گلوتامات و آسپارات ایجاد می شود که بعلت اختلالات ژنتیکی مرتبط با ترانسپورتر این اسیدهای آمینه می باشد.</p> | <p>Glutamic acid</p> <p>Aspartic acid</p> |
| <p>Argininemia or arginase deficiency</p> <p>یک نقص متابولیکی مادرزادی اختلال سیکل اوره است که کمبود و نقص آنزیم آرژیناز منجر به افزایش بیش از حد آمینواسید آرژنین و همچنین آمونیاک در خون می شود.</p> | <p>Arginine</p> |

بخش کروماتوگرافی
مسئول بخش: حسین سلمانی زاده

