در
امور دام و آبزیان شماره ۷۳، زمستان ۱۳۸۵
پژوهش و سازندگی

اندازه‌گیری هیدروکسی پرولین تاندون اسب با استفاده از یک روش اسپکتروفوتومتری اصلاح شده

• **علی رسولی** و • **غلامرضا شمس**،
گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی- دانشکده دامپزشکی, دانشگاه تهران
• **داود شریفی**،
گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۴

ras4163@yahoo.com

چکیده

تعیین مقدار هیدروکسی پرولین به عنوان یک شاخص جهت اندازه گیری میزان کلاژن در بافت‌های همبند و در مطالعات متابولیسم کلاژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش پس از هیدرولیز نمونه بافت تاندون با اسید هیدروکلریک ۶ مولار به مدت ۱۶-۱۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه‌سانتیگراد، هیدروکسی پرولین با معرف کلرآمین T اکسیده شد. بعد با افزودن معرف ارلیخ[1] و قراردادن در دمای ۶۰ درجه‌سانتیگراد، محصول رنگی بدست آمد. جهت حذف مواد رنگی مزاحم، محصول رنگی در محیط قلیایی توسط تولوئن استخراج شد و در مرحله بعد ماده رنگی وارد فاز اسیدی گردید. میزان جذب محصول رنگی در فاز اسیدی در طول موج ۵۴۳ نانومتر قرائت شد و مقدار هیدروکسی پرولین نمونه بر اساس منحنی کالیبراسیون[2] محلولهای استاندارد که همه مراحل فوق را گذرانده بودند، محاسبه گردید. منحنی کالیبراسیون در دامنه غلظت ۱۶۰-۱۰ µg/ml خطی بود R^2=۰/۹۹۷. دقت روش با شاخص تغییرات[3] (CV٪) بین روزها و درون روزها کمتر از ۷٪ به‌دست آمد. با آزمایش شش نمونه تاندون اسب، میزان هیدروکسی پرولین آنها برحسب ماده خشک تاندون ۱۲۱mg/g- ۹۵ (۹/۰± ۱۰۹/۵) به‌دست آمد. این روش آسان، اختصاصی و تکرار پذیر برای تعیین مقدار هیدروکسی پرولین تاندون و بافت‌های کلاژنی دیگر مانند پوست قابل استفاده است.

کلمات کلیدی: هیدروکسی پرولین، کلاژن، تاندون، اسب

Pajouhesh & Sazandegi No 73 pp: 114-119

Determination of hydroxyproline in equine tendon using a modified spectrophotometric method

By: A. Rassouli, G.R. Shams D. Pharmacology and Tocicology Dept, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. Sharifi. D. Dept of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine. University of Tehran.

Determination of hydroxyproline (OH-Pro) is used as an index for assaying collagen content in connective tissues and in collagen metabolism studies. In this method, tendon samples were hydrolyzed in 6 m HCl, at 105 °C for 14-16 hrs and OH-Pro was oxidized by Chloramine T. Then by adding Ehrlich`s reagent and incubating at 60 °C, a chromophore was

formed. To remove interfering chromophores, OH-Pro product in alkaline media was extracted into toluene and then into acid phase. The absorbance of acid phase was read at 543nm and OH-Pro content was calculated from a calibration curve based on standard solutions run as the same as samples. Calibration curve was linear at 10-160 µg/ml (R^2=0.997). The precision of the method defined by CV% of intra- and inter-day variations was less than 7%. Six equine tendon samples were analyzed and their OH-Pro contents were 95-121 mg/g dry weight (109.5 ± 9.0). This easy, specific and reproducible method can be used practically for determination OH-Pro content in tendon as well as other collageneous tissues like skin.

Key words: Hydroxyproline, Collagen, Tendon, Equine

مقدمه

تاندون بافت رشته‌ای کلاژنی است که عضله را به استخوان متصل می‌نماید. کلاژن حدود ۳۰٪ وزن‌تر تاندون و بیش از ۷۰٪ وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد (۵). حضور منحصر به فرد و خیلی بالای هیدروکسی پرولین در پروتئین کلاژن، سبب شده که این ترکیب به عنوان شاخص جهت اندازه‌گیری میزان کلاژن در بافت‌های همبند به‌کار رود و در مطالعات متابولیسم کلاژن مورد استفاده قرار گیرد (۳). واکنش هیدروکسیلاسیون پرولین پس از تشکیل رشته پلی پپتیدی کلاژن رخ می‌دهد (۸) و هیدروکسی پرولین بین ۱۲٪ تا ۱۴٪ وزن کلاژن را تشکیل می‌دهد (۸، ۱۱).

تاکنون برای اندازه گیری هیدروکسی پرولین در بافت‌های مختلف و مایعات بیولوژیک، روش‌های مختلف اسپکتروفوتومتری یا کروماتوگرافی با حساسیت و ویژگی‌های متفاوت شرح داده شده است (۱، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱). در این روش‌ها از هیدرولیز اسیدی (۱، ۸، ۱۰) یا قلیایی (۷) بافت همبند یا رشته‌های پپتیدی جهت ایجاد فرم آزاد هیدروکسی پرولین و سپس با ایجاد یک مشتق رنگی و سنجش آن به طرق مختلف استفاده شده است. در ضمن یک سری آزمایشات جهت بهینه سازی روش سنجش هیدروکسی پرولین در نمونه‌های ادرار و پوست توسط نگارنده انجام شده است (۴، ۹، ۱۰). در اینجا یک روش اصلاح شده، همراه با تغییرات لازم و انجام آزمایشات ضروری جهت معتبر سازی[۴] و بهینه‌سازی روش بمنظور تعیین مقدار هیدروکسی پرولین در تاندون اسب شرح داده می‌شود. همچنین یافته‌های حاصل از اندازه گیری هیدروکسی پرولین در شش نمونه تاندون خم کننده سطحی بند انگشتی[۵] اسب ارائه می‌گردد.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل لازم

پارادی متیل آمینو بنزآلدئید (معرف ارلیخ)- استات سدیم - سیترات تری سدیم – کلرآمین T – استاندارد ۴- هیدروکسی پرولین- تولوئن- ایزوپروپانول - اسید هیدروکلریک- هیدروکسید سدیم- فنل فتالئین الکلی یک درصد (تمام مواد شیمیایی مورد استفاده ساخت شرکت Merck) - نمونه‌های بافت تاندون اسب (تاندون خم کننده سطحی بند انگشتی) و دستگاه اسپکتروفوتومتر (۶۰۰ -Beckman DU ساخت آمریکا).

– نحوه تهیه بافر استات- سیترات (pH =۶/۰): ۵/۷ گرم استات سدیم را با ۳/۷۵ گرم سیترات تری سدیم و ۰/۵۵ گرم اسید سیتریک در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و مقدار ۲۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و بعد ۳۸/۵ میلی لیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و پس از مخلوط کردن، با آب مقطر به حجم بالن می‌رسد. این محلول تا چند هفته پایدار است.

– نحوه تهیه معرف کلرآمین T : ۰/۱۴ گرم کلرآمین T را در ۲ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و به آن ۸ میلی لیتر از بافر استات سیترات فوق اضافه می‌شود.

– نحوه تهیه معرف ارلیخ: ۲/۵ گرم از پارا دی متیل آمینو بنز آلدئید را در ۲/۷ میلی لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ حل کرده و به آن ۱۶ میلی لیتر ایزوپروپانول اضافه می‌شود این محلول باید بصورت تازه برای همان روز تهیه شود.

– نحوه جمع آوری و نگهداری نمونه‌های بافت تاندون: نمونه‌های مورد استفاده از تعدادی اسب که در یک پروژه تحقیقاتی بمنظور بررسی اثرات لیزر درمانی روی ترمیم و التیام تاندون مورد استفاده قرار گرفته بودند و برخی از تاندون‌هاکه در آن مطالعه به عنوان شاهد بدون مداخله درمانی بودند، در این تحقیق جهت اندازه گیری هیدروکسی پرولین آنها مورد استفاده قرار گرفته اند. نمونه‌های بافت تاندون اسب (تاندون خم کننده سطحی بند انگشتی) جمع آوری شده تا هنگام آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش کار

۵۰ میلی‌گرم از بافت تاندون را درون لوله آزمایشگاهی شیشه ای در پیچدار قرار داده و به آن، ۵ ml محلول HCl ۶ مولار افزوده و لوله در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶-۱۴ ساعت (Overnight) در داخل آون[۶] قرار داده شد. سپس حجم نمونه را پس از سرد شدن لوله به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و ۱ میلی‌لیتر از نمونه رقیق شده را در لوله دیگری ریخته و به آن ۵۰ میکرو لیتر معرف فنل فتالئین اضافه کرده و ورتکس گردید. با افزودن تدریجی ۶NaOH مولار همراه با ورتکس محلول نمونه ارغوانی شده و با افزودن تدریجی HCl ۱ مولار نمونه بی رنگ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف کلرآمین T به نمونه اضافه شده و بعد از ورتکس، بمدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد با افزودن ml ۱ معرف ارلیخ و ورتکس ورتکس‌کردن نمونه و قرار دادن لوله در دمای ۶۰ درجه‌سانتیگراد به‌مدت

۲۰-۲۵ دقیقه، یک محصول رنگی قرمز بدست آمد. سپس از یک روش پاکسازی اسید- باز جهت حذف مواد رنگی مزاحم استفاده شد. بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر محلول NaOH ۶ مولار جهت قلیایی کردن محیط به نمونه افزوده و پس از ورتکس به آن ۳ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن چرخان[۷] محتویات لوله با دور ۶۰ بار در دقیقه، سر و ته گردید. بعد از ۵ دقیقه سانتریفوژ ۱۰۰۰ دور در دقیقه ۲ میلی‌لیتر از فاز تولوئن به داخل یک لوله حاوی ۳ میلی‌لیتر محلول HCl ۰/۰۳ مولار اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. مجددا بعد از ۵ دقیقه سانتریفوژ ۱۰۰۰ دور در دقیقه، با پمپ مکش فاز تولوئن خارج گردید و فاز اسیدی (محصول رنگی) به داخل کووت ریخته و میزان جذب محصول رنگی توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۳ نانومتر قرائت شد. آزمایشات ۳ بار و با فاصله زمانی ۲ هفته انجام شدند.

منحنی کالیبراسیون استاندارد هیدروکسی پرولین (۱۰-۱۶۰ µg/ml) با استفاده از غلظت‌های مختلف استاندارد که همانند نمونه بافت تاندون، همه مراحل فوق به جز هیدرولیز را گذرانده بودند، به دست آمد. و بر اساس آن و با در نظر گرفتن ضرایب رقت، مقدار هیدروکسی پرولین نمونه بافت تاندون محاسبه گردید.

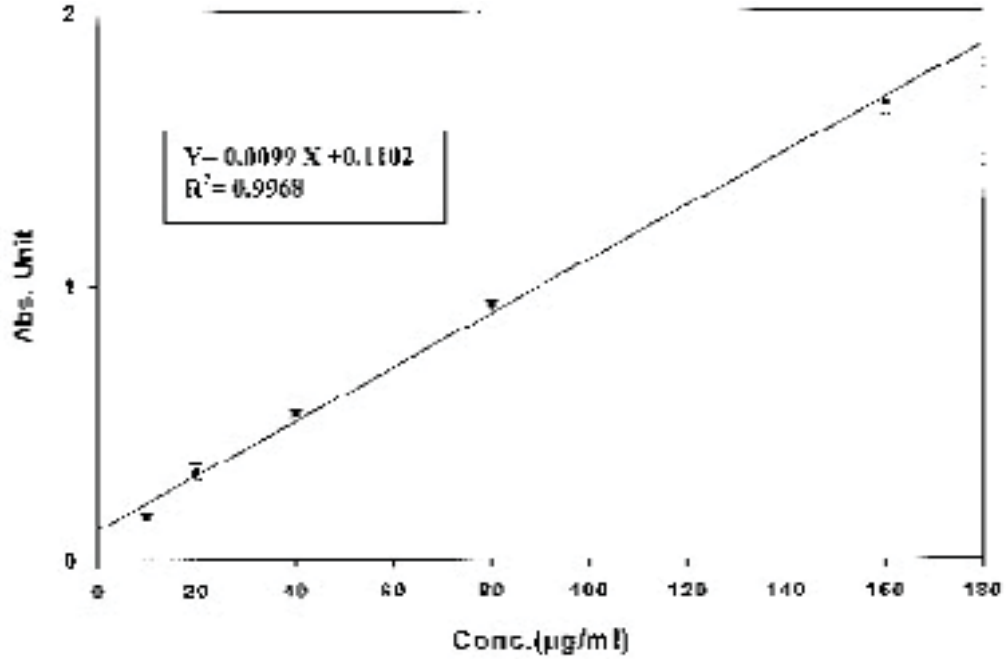
به منظور محاسبه درصد رطوبت نمونه‌های تاندون، همزمان با برداشت و توزین هر نمونه بافتی برای اندازه گیری هیدروکسی پرولین، ۱۰۰- ۵۰ میلیگرم از همان نمونه بافت روی یک لام قرار داده شد و توزین گردید. جهت خشک شدن نمونه، لام بمدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در آون قرار داده شد. از نتایج محاسبه درصد رطوبت نمونه‌ها، در مراحل بعدی جهت ارائه مقادیر هیدروکسی پرولین بر حسب ماده خشک تاندون استفاده گردید.

جهت یافتن طول موج حداکثر جذب[۸] محصول رنگی حاصل از فرآوری نمونه‌های بافت تاندون و نمونه‌های استاندارد و همچنین اطمینان از عدم وجود مواد رنگی مداخله گر احتمالی، فاز اسیدی حاصل از نمونه‌های استاندارد هیدروکسی پرولین و بافت تاندون در دامنه ۴۰۰ تا ۶۰۰nm طیف سنجی[۹] گردید. از طول موج حداکثر جذب بدست آمده جهت قرائت محصول رنگی نمونه‌ها و برای محاسبه حساسیت روش از فرمول مقاله Podenphant و همکاران استفاده گردید (۷).

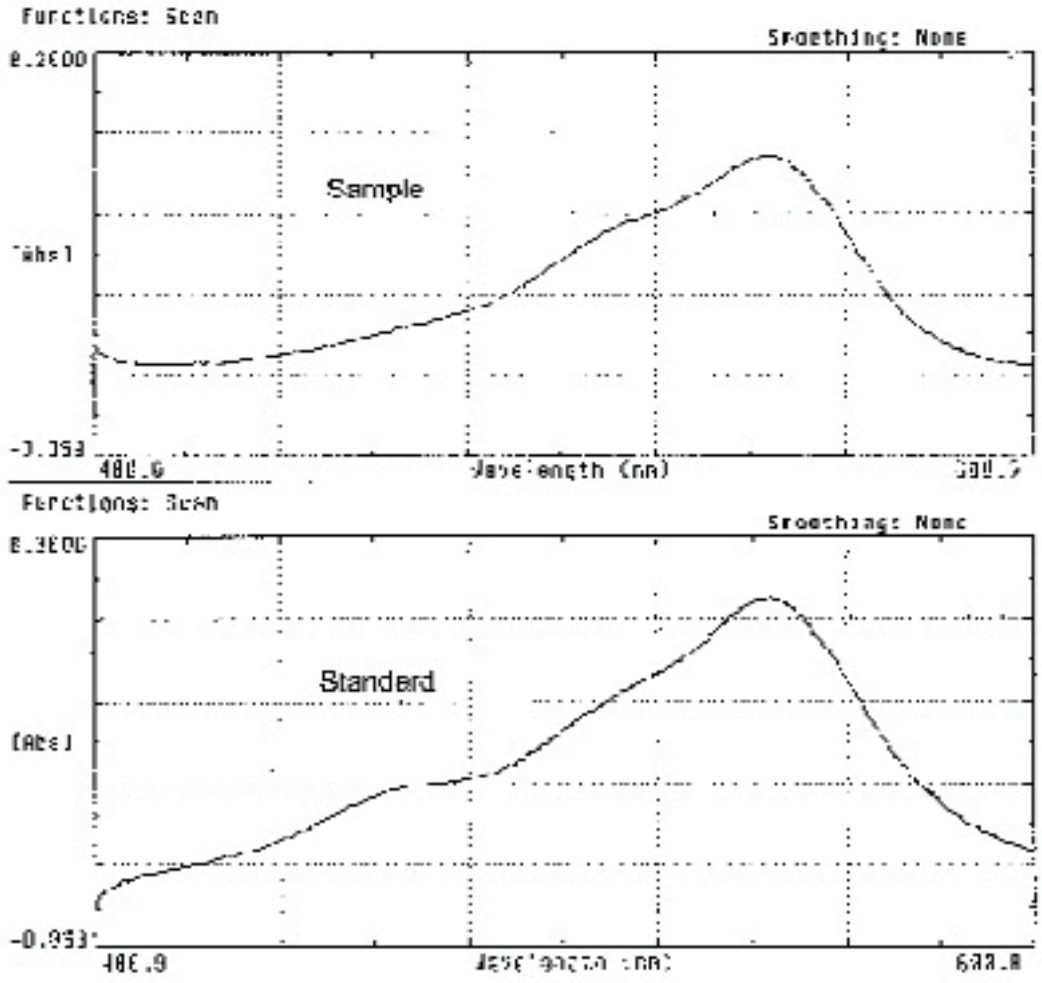
از آمار توصیفی برای ارائه داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار و از برنامه‌های Excel و Sigma Plot ۲۰۰۰ برای محاسبات و رسم نمودار استفاده گردید.

نتایج

منحنی کالیبراسیون استاندارد هیدروکسی پرولین در دامنه غلظت ۱۰-۱۶۰ µg/ml، خطی بود (نگاره ۱). حساسیت روش (۵ µg/ml) بسیار بالاتر از حد مورد نیاز بود بطوری که محلول نمونه بافت (۱۰۰ بار) رقیق می‌شد. تکرار پذیری روش با شاخص ضریب تغییرات بین روز و درون روز، کمتر از ۷٪ بود (جدول ۱). مقایسه نتایج طیف سنجی محصول رنگی حاصل از نمونه‌های بافت تاندون و نمونه‌های استاندارد در نگاره ۲ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود حداکثر جذب در طول موج ۵۴۳ نانومتر بدست آمد. با آزمایش شش نمونه تاندون اسب، میزان هیدروکسی پرولین برحسب ماده خشک تاندون بین ۹۵ تا ۱۲۱mg/g و با میانگین و انحراف معیار ۹/۰۵ ± ۱۰۹/۵ بدست آمد. (جدول ۲)



نگاره ۱- منحنی کالیبراسیون استاندارد هیدروکسی پرولین، معادله خط و ضریب رگرسیون



نگاره ۲- مقایسه نتایج طیف سنجی محصول رنگی حاصل از نمونه‌های بافت تاندون و نمونه‌های استاندارد

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون چندین روش مستقل یا اصلاح شده روش، برای سنجش هیدروکسی پرولین در ماتریکس‌های مختلف منتشر شده است که شامل روش‌های ساده و سریع تا خیلی پیچیده و اختصاصی‌تر است (۱، ۳، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱). در این روش‌ها از مواد مختلف جهت هیدرولیز پپتیدها و ایجاد فرم آزاد هیدروکسی پرولین، جهت اکسیداسیون آن و ایجاد محصول رنگی جهت ردیابی و تعیین مقدار آن و همچنین پاکسازی محصول بدست آمده از مواد مداخله‌گر رنگی دیگر استفاده شده است.

روش حاضر که از طریق برخی اصلاحات و بهره گیری از روش‌های قبلی تکوین یافته است همانطوری که ملاحظه می‌شود روشی آسان، اختصاصی و تکرار پذیر است.

در مورد نتایج بدست آمده در این مطالعه در زمینه مقدار هیدروکسی پرولین نمونه‌های تاندون مورد آزمایش، همخوانی مناسبی با نتایج مطالعه Dahlgren و همکاران (۲) مشاهده می‌شود. در آن مطالعه تاندون خم کننده بند انگشتی اسب بطور تجربی با کلاژناز دچار تورم شده و با استفاده از سالین (گروه شاهد) و یا IGF-۱ ۱۰ (گروه تیمار) درمان شده بودند. مقدار هیدروکسی پرولین نمونه‌های تاندون اندازه‌گیری شده با سیستم HPLC[11] در گروه شاهد mg/g ۶/۱± ۹۴/۶ و در گروه تیمار mg/g ۶/۲±۱۰۳/۹ گزارش شده است که با نتایج این مطالعه یعنی mg/g ۱۲۱-۹۵ (۹/۰± ۱۰۹/۵) همخوانی دارد.

با توجه به مقادیر بسیار بالای کلاژن و هیدروکسی پرولین در تاندون نیازی به استفاده از روش‌های حساس و دقیق‌تر اما پیچیده تر و به مراتب گران‌تر مانند روش‌های HPLC (۶) احساس نمی‌شود. با اینحال در مواردی که مقدار هیدروکسی پرولین نمونه خیلی اندک و در حد پیکومول باشد مانند نمونه‌های کشت سلولی و یا مواردی که نیاز به سنجش ایزومرهای مختلف هیدروکسی پرولین مانند ۳- هیدروکسی پرولین و یا جداسازی ایزومرهای سیس و ترانس هیدروکسی پرولین باشد روش‌های دقیق و پیچیده HPLC ضروری خواهد بود.

جدول۱- میزان تغییرات درون روز (Intra-day variations) و تغییرات بین روز (Inter-day variations) مقادیر قرائت شده محصول رنگی مربوط به هیدروکسی پرولین اندازه گیری شده در روش حاضر

هیدروکسی پرولین (µg/ml)	تعداد تکرار	تغییرات درون روز		تغییرات بین روز	
		میانگین و انحراف معیار(۰/۰۰۱ × واحد جذب)	ضریب تغییرات (٪ CV)	میانگین و انحراف معیار(۰/۰۰۱ × واحد جذب)	ضریب تغییرات (٪ CV)
۱۰	۳	۱۵۵/۳ ± ۷/۵	۴/۸	۱۴۸ ± ۸/۶	۵/۸
۲۰	۳	۳۲۵ ± ۱۵/۱	۴/۶	۳۴۲ ± ۲۳/۵	۶/۹
۴۰	۳	۵۳۷/۶ ± ۱۹/۸	۳/۷	۵۴۳ ± ۳۰	۵/۵
۸۰	۳	۹۵۵/۶ ± ۴۷	۴/۹	۸۹۹ ± ۴۸/۷	۵/۴
۱۶۰	۳	۱۶۴۹/۶ ± ۵۸	۳/۵	۱۵۹۲ ± ۶۳/۹	۴/۰

جدول ۲- میزان هیدروکسی پرولین شش نمونه تاندون اسب بر حسب ماده خشک

شماره نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	میانگین	انحراف معیار
میزان هیدروکسی پرولین (mg/g DW)	۱۰۹/۶	۱۰۸/۴	۱۱۵/۴	۱۰۶/۵	۹۵/۰	۱۲۱/۱	۱۰۹/۵	۹/۰۵

با توجه به تجارب قبلی که با استفاده از روش Podenphant و همکاران (۷) از هیدرولیز قلیایی (هیدروکسید باریوم اشباع) در نمونه‌های ادراری استفاده شده بود و تکرار پذیری مناسبی نداشت و در ضمن لوله‌های آزمایش دچار خوردگی می‌شدند لذا در این مطالعه از روش هیدرولیز اسیدی بهره گیری شد.

در این مطالعه همچنین از روش پاکسازی اسید – باز شرح داده شده توسط Podenphant و همکاران (۷) استفاده شد که سبب جلوگیری از تداخل و تاثیر عوامل مداخله گر رنگی دیگر از جمله تاثیر برخی از آمینواسیدهای دیگر موجود در نمونه می‌شود. البته این مرحله از روش در مواردی که درصد هیدروکسی پرولین در نمونه در مقایسه با اسیدهای آمینه دیگر خیلی اندک باشد از اهمیت بیشتری برخوردار است. همانطور که ملاحظه می‌شود مواد مداخله‌گر رنگی احتمالی، کاملاً جداسازی و حذف شده است بطوری که طیف سنجی محصول رنگی بدست آمده، طول موج حداکثر جذب و طیف جذبی مشابهی را برای نمونه‌های بافت تاندون و نمونه‌های استاندارد نشان می‌دهد.

در روش حاضر از بافت تر تاندون و همراه با آن از خشک کردن نمونه‌ها با استفاده از آون، جهت محاسبه درصد رطوبت و مقدار هیدروکسی پرولین برحسب ماده خشک تاندون استفاده گردید، در حالی که اگر بتوان ابتدا نمونه ها را با استفاده از فریز درایر[۱۲] خشک نمود و از آن‌ها نمونه برداری شود، به‌نظر می‌رسد نتایج بهتری به همراه داشته باشد.

بنابراین روش حاضر برای تعیین مقدار هیدروکسی پرولین و در نتیجه میزان کلاژن تاندون و بافت‌های کلاژنی دیگر مانند پوست که قبلاً توسط نگارنده بکار گرفته شده (۴)، به خوبی قابل توصیه و در مطالعات مرتبط با بیوسنتز و متابولیسم کلاژن قابل استفاده است (۹).

پاورقی‌ها

1. Ehrlich's reagent
2. Calibration curve
3. Coefficient of variation
4. Validation
5. Superficial digital flexor tendon
6. Oven
7. Rotary mixer
8. λ max
9. Scan
10. High performance liquid chromatography
11. Insulin-like growth Factor-1

hydroxyproline isomers in acid hydrolysates by high performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, 138: 390-395.
7. Podenphant, J.; Larsen, N.E. and Christiansen, C., 1984; An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline. Clinica Chimica Acta, 142: 145-148.
8. Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I., 1968; Hydroxyproline and metabolism of collagen. In: Treatise on collagen, Vol. 2, Biology of collagen, Part A, Edited by: Gould BS, Academic Press Inc., London. pp: 215-246.
9. Rassouli, A., 2001; Determination of vitamin D status in early postmenopausal Iranian women: Relations to bone mineral density and urinary hydroxyproline. PhD thesis. Department of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences. Tehran, Iran, pp: 72-75.
10. Rassouli, A., Milanian, I. and Mahmoudian, M., 2000; A modified and reliable spectrophotometric method for determination of urinary hydroxyproline. Proceeding of 1st Iranian Congress of Veterinary Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran. pp: 213
11. Regassa, F. and Noakes, D.E., 2001; Changes in the weight, collagen concentration and content of the uterus and cervix of the ewe during pregnancy. Research in Veterinary Science, 70: 61-66.
12. Freeze dryer

منابع مورد استفاده

1. Bergman, I. and Loxley, R., 1970; The determination of hydroxyproline in urine hydrolysate. Clinica Chimica Acta, 27: 347-349
2. Dahlgren, L.A.; Meulen, M.C.H.; Bertram J.E.A.; Starrak, G. S., and Nixon, A.J., 2002; Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendonitis. Journal of Orthopaedic Research. 20 (5): 910-919.
3. Eastoe, J.E., 1967; Composition of collagen and allied protein. In: Treatise on collagen, Vol. 1, Chemistry of collagen, Edited by: Ramachandran GN, Academic Press Inc., London, pp: 1-55
4. Ghamsari, M.; Dehghan, M.M.; Rassouli, A. and Nowrouzian, I., 2001; Effects of chitin and chitosan in experimental wound healing in horse. Journal of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, 56 (2): 1-7.
5. Harkness, R.D., 1968; Mechanical properties of collagenous tissues. In: Treatise on collagen, Vol. 2, Biology of collagen, Part A, Edited by: Gould, B.S., Academic Press Inc., London, pp: 254-257.
6. Lindblad, W.J. and Diegelmann, R.F., 1984; Quantitation of