بهینه سازی روش فلوریمتری جهت اندازه گیری هیستامین به شکلی ساده،سریع و کم هزینه

دکتر زهرا پورپاک(Ph.D)، بخش ایمونولوژی و آلرژی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر پریسا گازرانی(Pharm.D)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر ابوالحسن احمدیانی(Ph.D)، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر انوشیروان کاظم نژاد(Ph.D)، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

A Simple, low Cost and Fast Improved Fluorimetric Method for Histamine Measurement

ABSTRACT

The well-known fluorimetric method for histamine measurement which is one of the common methods in diagnostic laboratories was modified to accelerate and facilitate measurement of serum histamine levels and decrease the costs and restrictions.

The modified method needs only 1 ml of whole blood (or serum) instead of about 10 ml in original method which is difficult almost or impossible specially for children. In addition, very small amounts of the expensive materials are needed and the samples are saved for about 15 days in - 20°C which makes no significant changes.

Because in most cases, sample can not be read at sampling day, the saving possibility is an advantage for improved method.

Key Words: **Histamine, Serum, Fluorimetric method.**

چکیده

به منظور دستیابی به روندی سریعتر، آسانتر، کاهش هزینه ها و محدودیت ها، روش فلوریمتری که از دیرباز به عنوان یکی از روشهای متداول در آزمایشگاههای تشخیص طبی بکار برده می شود، بهینه سازی شد.

در روش اصلاح شده، تنها به 1ml خون کامل و یا سرم به جای حدود 10 ml خون کامل روش اصلی نیاز است که، تهیه آن اگر ناممکن نباشد، دست کم و بویژه برای کودکان، دشوار و آزار دهنده است. از طرفی به موازات کاهش حجم خون مورد نیاز، به مقادیر بسیار کمتری مواد پر هزینه نیاز است و بعلاوه از آنجا که در بسیاری از موارد، امکان قرائت نمونه ها در روز نمونه گیری وجود ندارد، در روش اصلاح شده، امکان نگهداری نمونه ها، حداقل برای مدت 15 روز در دمای 20°C- فراهم شده است.

بنابر این با بهینه سازی این روش، اندازه گیری هیستامین در مقادیر اندک سرم و پس از حدود ۱۵ روز نگهداری در دمای 20°C- با روشی ساده، سریع و کم هزینه که در عین حال از دقت و حساسیت بالایی برخوردارست، قابل انجام می شود که به منظور بررسی نقشهای فیزیولوژیک و فارماکولوژیک هیستامین می تواند مفید واقع گردد.

مقدمه

بیش از نیم قرن است که نقش هیستامین در سلامت و بیماری مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. هیستامین یکی از آمین های بیوژنیک است که نقش مهمی در گشادی عروق، تنگی نفس، ترشح اسید معدی و واکنشهای آنافیلاکتیک بر عهده دارد و بعنوان یک واسطه عصبی و یا تعدیل کننده عصبی در سیستم عصبی مرکزی پستانداران عمل می کند. اندازه گیری هیستامین در مایعات بیولوژیک، ابزاری مهم جهت بررسی اعمال هیستامین و پرده برداری از اسرار ناشناخته این ملکول است(۱).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

در طول سالهای متمادی روشهای متعددی از جمله بیواسی (٢)، روشهای فلوریمتری(٣و٤)، روشهای رادیو انزیماتیک(٧-٥)، ایمونوآنالیز(٨)، کروماتوگرافی گازی(GC) و کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) (٩و١٠و١١)، برای اندازه گیری هیستامین معرفی و بکار گرفته شده اند که در هر یک، جهت افزایش میزان حساسیت و اختصاصی شدن روش اصلاحاتی صورت گرفته است.

بیواسی در ایلئوم خوکچه هندی، فاقد حساسیت، دقت و اختصاصی بودن است و امروزه بندرت بکار میرود(٥). روشهای HPLC ,GC با آنکه دارای حساسیت و اختصاصی بودن بالایی جهت اندازه گیری هیستامین می باشند(١٠و١١) ولی به دلیل نیاز به حجم بالایی از نمونه، مواد پرهزینه، ستونها و آشکارسازهای ویژه و کاربر آزموده، در آزمایشگاههای تشخیص طبی متداول نمی باشند.

اگرچه روشهای رادیوانزیماتیک هم فوایدی همچون روشهای ذکر شده دارند(٦و٧)، بعلت محدودیتهایی در کاربرد و دفع بهداشتی باقیمانده های مواد نشاندار، معمولا مورد استفاده قرار نمی‌گیرند.

روشهای فلوریمتری که در بسیاری از مطالعات با موفقیت بکار برده شده اند، بعنوان یکی از روشهای استاندارد برای اندازه گیری هیستامین شناخته شده اند(٧-٥). اما در این روش نیز محدودیتهایی از قبیل نیاز به حجم بالایی از نمونه، هزینه زیاد تهیه مواد مورد نیاز با حجم بالا و عدم امکان نگهداری نمونه ها برای مدت طولانی وجود دارد. بنابراین تصمیم گرفته شد که با بهینه سازی این روش، با کاهش حجم نمونه به تنها 1 ml از خون کامل و یا سرم و نگهداری نمونه ها حداقل به مدت ١٥ روز پس از نمونه گیری، با روشی ساده، کم هزینه و سریع، قابل اجرا گردد.

از آنجایی که ادعا شده بود که دقت، درستی و حساسیت روش فلوریمتری کافی نیست (٦و٨)، به استاندارد سازی روش اصلاح شده نیز پرداخته شد، تا دقت، درستی و حساسیت آن برای اندازه گیری هیستامین بررسی شود.

در گزارشاتی توصیه شده بود که نمونه گیری جهت اندازه گیری هیستامین باید بدون استفاده از رگ بند باشد و یا 5 ml اول خون گرفته شده، دور ریخته شود(١٠و١٢). بنابراین تصمیم گرفته شد که تاثیر بسته شدن رگ بر میزان هیستامین سرمی نیز بررسی گردد.

از طرفی برای یافتن روندی استاندارد جهت آماده سازی نمونه، به بررسی تاثیر دما و زمان بر میزان هیستامین سرمی که در روش اصلی ذکر نشده است(١٣) نیز پرداخته شد.

مواد و روشها

مواد:

١-بوتانول، n – هپتان، پرکلریک اسید 60%، هیدروکسید سدیم، ارتوفتالدئید (جهت فلوریمتری)، فلورید سدیم، اکسالات سدیم و متانول از Merck ، کلرید سدیم و اسید کلریدریک از شیمی ناب و هیستامین دی هیدروکلرید Sigma هدیه مرکز طبی کودکان.

دستگاه:

دستگاه فلوریمتر Perkin-Elmer _ میکروکووت.

روشها:

روش ساخت محلولها و شرایط نگهداری آنها:

١) ارتوفتالدئید(OPA) : در هنگام مصرف 100 mg از آن در متانول حل شده، به حجم 10 ml رسانده می شود. شکل جامد و محلول تهیه شده آن در یخچال 4°C در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ نگهداری می شود.

٢) هیدروکسید سدیم (5 M) : 20 g هیدروکسید سدیم جامد در آب مقطر حل شده، به حجم 100 ml رسانده می شود.

٣) هیدروکسید سدیم(1 M) : از هیدروکسید سدیم 5 M ، 50 ml برداشته، با آب مقطر به حجم 250 ml رسانده می شود.

٤) هیدروکسید سدیم (0.1 M) که با NaCl اشباع شده است: 10 ml از هیدروکسید سدیم 1 M با آب مقطر تا حجم 100 ml رقیق می شود(آب جهت اشباع شدن حاوی مقدار کافی NaClدر حدود (35 g/dl) است.)

کلیه محلولهای هیدروکسید سدیم تهیه شده، در دمای آزمایشگاه (25 °C-21) در ظروف شیشه ای تیره رنگ، به دور از نور نگهداری می شوند.

٥) اسید هیدروکلریک (3M): 25 ml از اسید کلریدریک غلیظ با آب مقطر به حجم 100 mlرسانده می شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

٦) اسید هیدروکلریک (0.1M): 8.3 ml از اسید کلریدریک غلیظ با آب مقطر به حجم 1000 mlرسانده می شود.

محلولهای اسید هیدروکلریک در دمای آزمایشگاه (25-21 °C) در ظروف شیشه ای تیره رنگ، به دور از نور نگهداری می شوند.

٧) استانداردهای هیستامین:

- استاندارد ذخیره هیستامین (Stock) 100 µg/ml: 16.5 mg هیستامین دی هیدرو کلراید در اسید هیدرو کلریک 0.1 M حل شده، به حجم 100 ml رسانده می‌شود.

- استاندارد کاری هیستامین (Working) 1 µg/ml: درست پیش از مصرف، 0.1 ml از استاندارد ذخیره برداشته، با آب مقطر به حجم 10 mlرسانده می‌شود.

شکل جامد و محلولهای تهیه شده از آن دردمای یخچال 4°Cدر ظروف شیشه ای تیره رنگ، به دور از نور نگهداری می شود. استاندارد ذخیره هیستامین در این شرایط تا ١ ماه قابل استفاده است و پس از این مدت باید دوباره تهیه شود.

١- روش جمع آوری نمونه و آماده سازی آن:

نمونه های سرمی:

نمونه خونی در لوله های شیشه ای کوچک اسید شور خشک جمع آوری گردید. سرم با استفاده از سانتریفوژ به مدت 10 min در 3000 دور جداسازی شد و با پیپت های شیشه ای به داخل لوله های شیشه ای با مشخصات فوق الذکر منتقل گردید. بلافاصله 0.1 ml/ml پرکلریک اسید 60% برای دپروتئینه کردن آن افزوده شد و به مدت 10 min در 3000 دور سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، مایع شفاف رویی به آرامی به میکروتیوبهای پلی اتیلنی دکانته شد و در 20°C- ذخیره گردید.

٢- نمونه های خون کامل:

نمونه خونی در لوله های شیشه ای کوچک اسید شور خشک حاوی 20 mg/ml اکسالات سدیم (بعنوان ضد انعقاد) و 2.5 mg/ml فلورید سدیم (بعنوان محافظ) جمع آوری شد. برای این نمونه تمامی روند کار تا قرائت نمونه ادامه می یابد و یا پس از انجام مرحله اول(دپروتئینه کردن با اسید)، مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ جدا گشته ودر 20°C- ذخیره می گردد.

روش اندازه گیری هیستامین با فلوریمتر:

با بهینه سازی روش فلوریمتری، تنها به 1 ml خون کامل و یا سرم نیاز است که بر همین اساس، روند کار برای این حجم از نمونه اصلاح می‌گردد:

نمونه فوق الذکر به 0.9 ml آب مقطر افزوده و مخلوط شد. سپس 0.8 ml از مخلوط را برداشته به 0.1 ml هیدروکسید سدیم 5 M، 300 mg کلرید سدیم جامد و 2 ml بوتانول افزوده، مخلوط کرده و سپس سانتریفوژ گردید. فاز آبی جدا شده و فاز بوتانول پس از مخلوط کردن به مدت 1 min با 1 ml سود 0.1 M که با کلرید سدیم اشباع شده است، شستشو داده شد. پس از سانتریفوژ، به 1.6 ml از فاز بوتانول جدا شده، 0.9 ml اسید کلریدریک 0.1 M و 2.8 ml هپتان افزوده، مخلوط و سپس سانتریفوژ شد. سپس لایه آلی خارج و دور ریخته شد. 0.4 ml از فاز آبی به دو لوله جداگانه به نامهای نمونه و شاهد، منتقل گشت. به هریک از این لوله ها 0.08 ml سود 1 M افزوده شد. به لوله نمونه 0.02 ml ارتوفتالدئید اضافه و مخلوط گشت و به مدت 5 min به حال خود رها شد و سپس 0.4 ml اسید کلریدریک 3M به آن افزوده و مخلوط شد. به لوله شاهد 0.06 ml اسید کلریدریک 3M و سپس 0.02ml ارتوفتالدئید افزوده و مخلوط شد.

استاندارد کاری هیستامین از تمامی مراحلی که نمونه در روند آماده سازی در جهت قرائت طی می کند، می گذرد.

برای قرائت نمونه ها با فلوریمتر از طول موج برانگیخته 360 nm و طول موج نشری 450 nm استفاده شد.

برای محاسبه از رابطه زیر استفاده گردید:

مقدار هیستامین (ng/ml) = (قرائت استاندارد / قرائت نمونه) ×١٠٠.

استاندارد سازی روش فلوریمتری:

١- **تعیین کمترین مقدار هیستامین که با روش فلوریمتری قابل اندازه گیری باشد:** این مقدار برای روش اصلی در مراجع مختلف از 1 تا 5 ng/ml ذکر شده است. برای دستیابی به عدد مورد نظر، تعیین کمترین میزان قابل اندازه گیری روش برای هر دو روش اصلی و اصلاح شده انجام گرفت.

٢- **تعیین دقت روش:** دقت روش بنا به تعریف نزدیکی نتایج آزمایشات متعدد بر روی یک نمونه می باشد. جهت تعیین دقت روش فلوریمتری منحنی استاندارد در گستره غلظتی 190-1

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

ng/ml برای هر دو روش اصلی و اصلاح شده ترسیم شد وبرای بررسی هماهنگی (agreement) بین دو روش از دو طریق معادلات رگرسیونی و روش آلتمن بلاند(١٤) استفاده شد. همچنین روند کار برای ٥ نمونه با غلظت مشخص به دو روش اصلی و اصلاح شده سه باردر طول یک روز و در سه روز متوالی انجام شد.

٣- **تعیین درستی روش:** درستی روش بنا به تعریف رابطه میان نتایج بدست آمده و میزان واقعی است. برای تعیین درستی از روش محاسبه درصد بازیافت استفاده گردید. میزان هیستامین نمونه ها در 1 ml خون و 1 ml خون + 0.01 ml استاندارد و 1 ml خون + 0.01 ml آب مقطر اندازه گیری شد و درصد بازیافت طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

درصد بازیافت = (نمونه + استاندارد) - (نمونه + آب مقطر) ×١٠٠

٤- **مقایسه دو نوع نمونه خون کامل و سرم از جهت میزان هیستامین:** از آنجا که در روش اصلی فقط از خون کامل استفاده می شود که در کاربرد و نگهداری دارای محدودیتهایی می باشد، برای یافتن این نکته که اختلافی میان غلظت هیستامین در نمونه خون کامل و سرم موجود است یا خیر، از ١٠ داوطلب مرد سالم (٣٧-٢٠ سال) دو نوع نمونه خون کامل و سرم(طبق روش ذکر شده) گرفته شد و سپس آماده سازی و قرائت گردید.این کار سه بار تکرار شد و میانگین نتایج در نظر گرفته شد.

٥- **بررسی تاثیر بسته شدن رگ با رگ بند بر میزان هیستامین:** از ٨ داوطلب مرد سالم (٤٥-٢٠ سال) دو نوع نمونه با و بدون استفاده از رگ بند تهیه و آماده قرائت گردید تا اختلاف موجود میان این دو روش نمونه گیری مشخص گردد.

٦- **بررسی تاثیر دما و زمان بر میزان هیستامین:** جهت یافتن شرایط روند آماده سازی نمونه از ٨ داوطلب مرد سالم (٤٥-٢٠ سال) نمونه گیری و در ٥ لوله تقسیم گردید.لوله ١ بلافاصله آماده و قرائت گردید. دو لوله بعدی به ترتیب برای ١ و ٣ ساعت در یخ در حال ذوب نگهداری و سپس آماده قرائت گردیدند و دو لوله باقیمانده در دمای آزمایشگاه (21-25°C) ، به ترتیب برای ١ و ٣ ساعت نگهداری و پس از آماده سازی قرائت گردیدند.

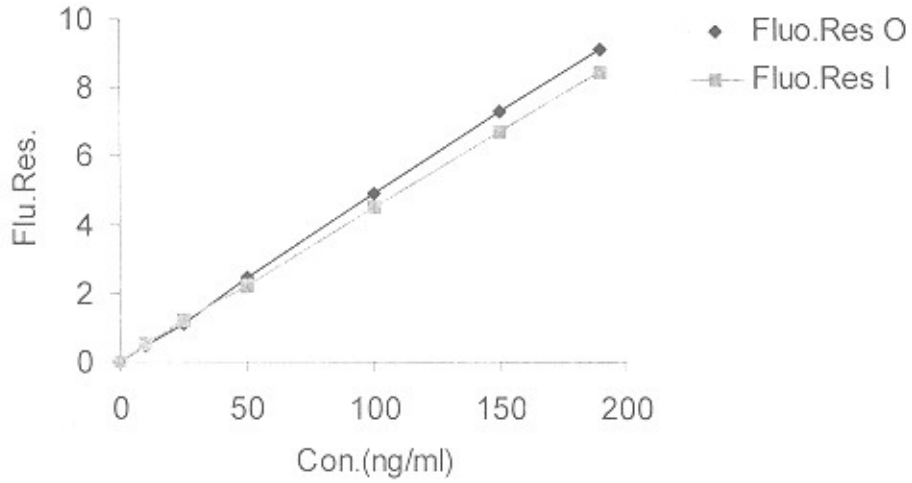
٧- **بررسی امکان نگهداری نمونه ها:** به منظور بررسی امکان نگهداری نمونه ها، در مرحله اول از ١٠ داوطلب مرد سالم (٤٠-٢٥ سال) نمونه های سرمی گرفته شد و به ٤ قسمت تقسیم گردید. نمونه سرمی ١ در روز نمونه گیری آماده و قرائت گردید و نمونه های سرمی ٢و٣و٤ بصورت دست نخورده برای به ترتیب ٥و١٠و١٥ روز در دمای -20°C ذخیره و سپس قرائت گردیدند. در مرحله دوم از ١٠ داوطلب مرد سالم(٤٠-٢١ سال) نمونه های سرمی گرفته شد و به ٨ قسمت تقسیم گردید. ٤ نمونه با اعداد ١ تا ٤ و ٤ نمونه بعدی با حروف a تا d نامگذاری گردیدند. نمونه های سرمی 1 و a در روز نمونه گیری آماده و قرائت گردیدند و نمونه های ٢و٣و٤ دپروتئینه و سپس به ترتیب برای مدت ٥و١٠و١٥ روز در -20°C ذخیره گردیدند. نمونه های سرمی b,c,d دست نخورده و در همین شرایط نگهداری شدند و پس از آماده سازی قرائت گردیدند. این آزمون ٣ بار تکرار شد و میانگین نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

١- **تعیین کمترین میزان قابل اندازه گیری:** کمترین مقدار قابل اندازه گیری هیستامین با روش اصلی و اصلاح شده فلوریمتری، 1 ng/ml بدست آمد.

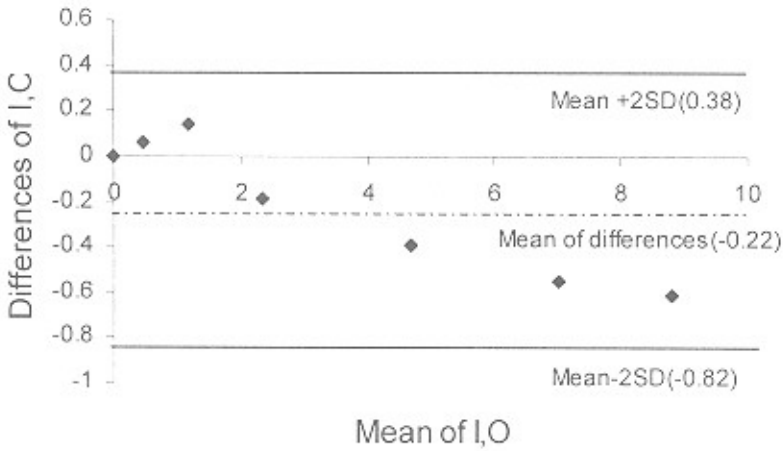
٢- شکل ١ منحنی های کالیبراسیون برای غلظتهای 1-190 ng/ml دو روش اصلی و اصلاح شده را نشان می دهد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]



شکل ١ _ منحنی کالیبراسیون استانداردهای سرمی هیستامین (n g/ml) به روش اصلی(Original=O) و اصلاح شده (Improved=I) فلوریمتری

(Flu.Res.: Fluorimetric Response و Con. : concentration)



شکل ٢ _ توافق (agreement) دو روش اصلی(Original =O) و اصلاح شده(Improved=I) با استفاده از روش آلتمن – بلاند

– SDمعرف انحراف معیار است.

معادلات رگرسیونی پاسخ در هر دو روش محاسبه گردید که در این گستره خطی هستند (r=0.9999) . این معادلات بر حسب مقدار غلظت به عنوان متغیر مستقل و میزان پاسخ دستگاه به عنوان متغیر وابسته به صورت زیر می‌باشند:

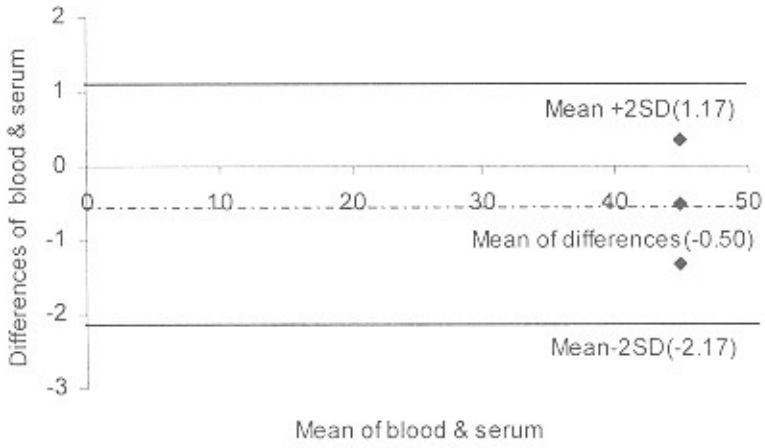
Improved method: y=0.04453x+0.05310

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

Original method: y=0.04845x-0.02112

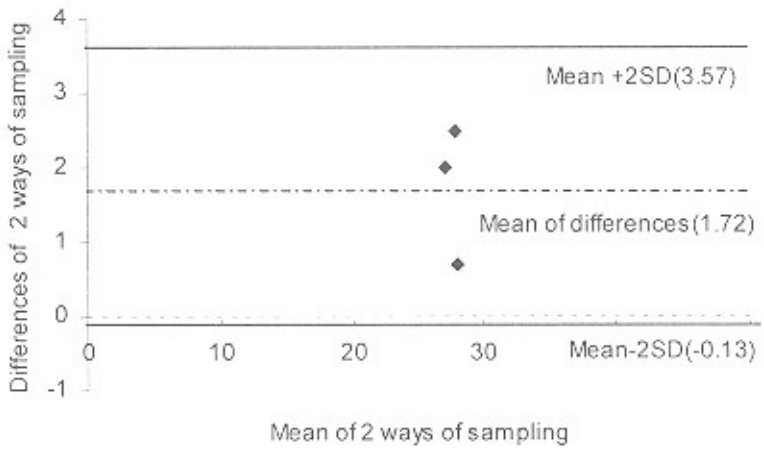
این دو معادله نزدیک به یکدیگرند و نمودار ١ این نزدیکی را نشان می دهد.

٣- برای تعیین توافق دو روش از روش آلتمن - بلاند استفاده شد. شکل ٢ نشان می دهد که تمام نقاط اختلافها در فاصله



شکل ٣ _ توافق (agreement) دو نوع نمونه خون کامل و سرم با استفاده از روش آلتمن - بلاند

- SD معرف انحراف معیار است.



شکل ٤ _ توافق (agreement) دو نوع نمونه گیری با و بدون استفاده از رگ بند با استفاده از روش آلتمن - بلاند

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

Mean ±2SD اختلافها قرار دارند و بنابر این این دو روش با یکدیگر توافق (agreement) دارند.

٤- جداول a ١ و b ١ به ترتیب تغییرات درون روز و بین روز روش فلوریمتری را نشان می دهند.

جدول ١ ـ a : تغییرات درون روز روش فلوریمتری برای اندازه گیری هیستامین

غلظت(ng/ml) شاخص آماری	٥	٢٥	٥٠	١٠٠	١٥٠
انحراف معیار±میانگین	٥/٢١±٠/٥٤	٢٥/١٠±٠/٦٥	٥٠/٨١±٠/٨٦	١٠١/٠٤±٠/٧٥	١٤٩/٨٩±٠/٩٥
ضریب تغییرات	١٠/٣٦	٢/٥٨	١/٦٩	٠/٧٤	٠/٦٣
تعداد	٣	٣	٣	٣	٣

جدول ١ ـ b: تغییرات بین روز روش فلوریمتری برای اندازه گیری هیستامین

غلظت(ng/ml) شاخص آماری	٥	٢٥	٥٠	١٠٠	١٥٠
انحراف معیار±میانگین	٥/١٠±٠/٢٩	٢٥/٨٧±٠/٧٦	٤٩/٩٨±٠/٢٣	١٠٢/٠٢±٠/٧٩	١٥٢/٠٤±٠/٤٨
ضریب تغییرات	٥/٦٨	٢/٩٣	٠/٤٦	٠/٧٧	٠/٣١
تعداد	٣	٣	٣	٣	٣

٥- جدول ٢ نشان دهنده درصد بازیافت بالای ٩٠ درصد ودرستی روش در اندازه گیری هیستامین به روش فلوریمتری می باشد.

٦- شکل ٣ نتایج حاصل از مقایسه دو نوع نمونه خون کامل و سرم را نشان می دهند. برای تعیین توافق میان این دو نوع نمونه نیز از روش آلتمن – بلاند استفاده گردید که با توجه به شکل تمام نقاط اختلافها در فاصله Mean ±2SD قرار دارند وبنابر این این دو نوع نمونه با یکدیگر توافق دارند. این نتیجه نشان می دهد که روش فلوریمتری برای اندازه‌گیری هیستامین محدود به خون کامل نبوده و می توان از نمونه های سرمی هم استفاده نمود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

جدول ٢ـ محاسبه درصد بازیافت هیستامین در تعیین درستی روش فلوریمتری

غلظت(ng/ml)	٥	٢٥	١٠٠
شاخص آماری			
Mean Recovery%	٩١/٥	٩٧	٩٠/٥
انحراف معیار	٠/٥٨	٠/٧٩	٠/٤٥
ضریب تغییرات	٠/٦٣	٠/٨١	٠/٤٩
تعداد	٣	٣	٣

٧- شکل ٤ نشان دهنده نتایج حاصل از اندازه گیری هیستامین سرم با دو روش نمونه گیری با و بدون استفاده از رگ‌بند است. برای تعیین توافق میان این دو نوع نمونه گیری نیز از روش آلتمن - بلاند استفاده گردید که با توجه به شکل تمام نقاط اختلافها در فاصله Mean ±2SD قرار دارند وبنابر این این دو نوع نمونه گیری با یکدیگر توافق دارند.

٨- شکل ٥ نشان دهنده تاثیر دما و زمان بر میزان هیستامین سرم است. بر اساس این یافته، نگهداری نمونه ها در یخ در حال ذوب در طی آماده سازی وقرائت آنها حداکثر در طی ١ ساعت بطور معنی داری ($P<0.05$) از کاهش میزان هیستامین سرم جلوگیری می کند.

٩- شکل ٦ نشان دهنده تاثیر دپروتئینه کردن نمونه های سرمی و عدم آن بر میزان هیستامین در طی نگهداری در 15 روز در دمای 20°C- است. بر اساس این یافته، دیروتئینه کردن سرم بطور معنی داری ($P<0.05$) از کاهش میزان هیستامین در طی نگهداری می‌کاهد.

بحث

تلاشهای گسترده ای در جهت افزایش میزان حساسیت و اختصاصی شدن روشهای اندازه گیری هیستامین انجام شده است (١١). روش فلوریمتری یکی از روشهای استاندارد اندازه گیری هیستامین بشمار می رود و توانایی کاربرد در آزمایشگاههای تشخیص طبی را داراست(٥). این روش محدودیتهای اندکی دارد که جهت رفع آنها و دستیابی به روندی ساده، سریع و کم هزینه، تصمیم به بهینه سازی آن گرفته شد.

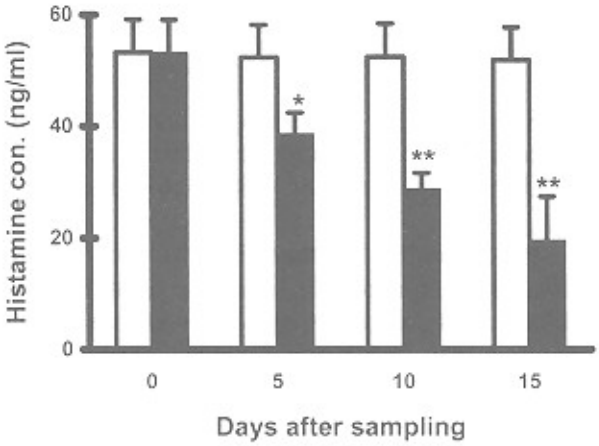
برای اصلاح این روش، حجم نمونه از حدود 10 ml خون مورد نیاز در روش اصلی به تنها 1 ml کاهش داده شد و به موازات آن، روند اصلی نیز متناسب با این حجم از نمونه اصلاح گردید. یافته ها نشان دادند که کاهش حجم نمونه تاثیری در میزان هیستامین آن نخواهد داشت (شکل ١). بنابر این با استفاده از روش اصلاح شده امکان اندازه گیری هیستامین با نمونه ای با حجم کمتربه شکل ساده و قابل انجام و در عین حال سریعتر و کم هزینه تر فراهم می شود.

از آنجا که گزارشاتی از عدم دقت و درستی کافی این روش در اندازه گیری هیستامین وجود داشت (٦و٨)، روش مذکور از نظر کمترین میزان قابل اندازه گیری، دقت و درستی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین میزان قابل اندازه گیری با روش فلوریمتری در حد 1 ng/ml بدست آمد که میزان قابل قبولی است. طبق یافته های بدست آمده، این روش از دقت و تکرار پذیری بالایی برخوردارست (جداول 1a,b) و متوسط درصد بازیافت بیش از 90% است (جدول٢) که بیانگر درستی بالای این روش می‌باشد.

از آنجا که روش اصلی فلوریمتری فقط جهت نمونه خون کامل شرح داده شده بود(١٣)، مقایسه ای میان دو نوع نمونه خون کامل و سرم انجام شد. بر طبق نتایج بدست آمده (شکل ٣) توافق میان دو نمونه مشاهده شد و محدودیت روش به خون کامل حذف گردید.

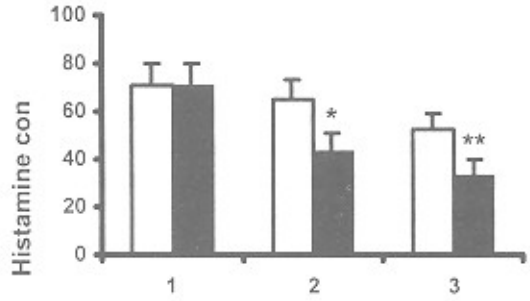
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

همچنین برای یافتن روندی استاندارد جهت آماده‌سازی نمونه گرفته شده، تاثیر دما و زمان بر میزان هیستامین بررسی گردید. بر طبق نتایج بدست آمده (شکل۵)، نگهداری نمونه ها در یخ درحال ذوب در طی آماده سازی و قرائت آنها حداکثر در طی ۱ ساعت بطور معنی داری ($P<0.05$) از کاهش میزان هیستامین سرم جلوگیری می کند.



شکل۵- تاثیر دما و زمان بر میزان هیستامین سرمی

صفر نمایانگر نمونه ای است که بلافاصله آماده قرائت گردید. ستونهای سفید، نمونه های نگهداری شده در یخ در حال ذوب و ستونهای مشکی نمونه های نگهداری شده در دمای اتاق را نشان می دهند.



$P<0.001$ * و $P<0.0001$ ** با آزمون آماری Paired *t*-tes

نتایج نشان دادند که میان غلظت هیستامین نمونه سرمی روز اول و سرم دپروتئینه شده ذخیره شده در 20°C- برای حداقل 15 روز تفاوت معنی داری وجود ندارد، در حالیکه در مورد نمونه های دست نخورده این یافته تایید نمی گردد (شکل٦). بنظر می رسد که عمل آنزیمهای تخریب کننده هیستامین مسئول کاهش غلظت آن در طی نگهداری باشد. بنابراین دپروتئینه کردن روشی ساده جهت جلوگیری از افت هیستامین در طی نگهداری است و محدودیت روش به قرائت نمونه ها در روز نمونه گیری که اغلب به ندرت قابل انجام است را برطرف می کند.

شکل٦- تاثیردپروتئینه کردن نمونه های سرمی بر میزان هیستامین در طی نگهداری در C ° 20- برای ۱۵ روز.

نمونه های دپروتئینه شده و دست نخورده در C ° 20- به مدت ۵و۱۰و۱۵ روز ذخیره شده اند.

ستونهای سفید، نمونه های دپروتئینه شده و ستونهای مشکی نمونه های دست نخورده را نشان می دهند. $P<0.001$ * و $P<0.0001$ ** با آزمون آماری Paired *t*-test.

از دیگر فواید قابل ذکر این روش، عدم نیاز به استفاده از مواد نشاندار و مواد و ستونهای ویژه و کاربر آزموده است.

بعنوان جمع بندی می توان ذکر کرد که بر اساس این مطالعه از این پس می توان با تهیه ۱ میلیلیتر از سرم بیمار که بروش معمول نمونه گیری شده است و دپروتئینه کردن سرم و نگهداری آن در C ° 20- برای حداقل 15 روز، میزان هیستامین سرم را بدون استفاده از مواد نشاندار اندازه گیری کرد. بهینه سازی این روش راه را برای بسیاری از تحقیقات که بدلیل محدودیتهای اندازه گیری هیستامین، متوقف می شدند، بخصوص در اطفال گشود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

منابع

1. Ien G, Ransio M, Owall A, Kaszaki J, Nagy S, Rosenquist M, et al. Release of histamine after ventricular fibrillation and defibrillation during insertion of implantable cardioverter defibrillators(ICD). Inflamm. Res 1995; 44499-505.

2. Schultz WH. Physiological studies in anaphylaxis II. Reaction smooth muscle from guinea pigs rendered tolerant to large doses of serum. J. Pharmacol. Exp. Ther 1911; 2:221-9.

3. Shore PA, Burkhalter A, Chon VH. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther 1959; 127:182-6.

4. Siraghanian RP. Refinements in the automated fluorimetric analysiss system. J. Immunol. Method 1975; 7:283-90.

5. Dyer J, Warren K, Merlin S, Metcalfe DD, et al. Measurement of plasma histamine: description of an improved method and normal values. J.Allergy Clin. Immunol 1982;170:82-7.

6. Brown MH, Barnes PJ, Dollery CT. A sensitive and specific radiometric method for the measurement of plasma histamine in normal individuals. Anal. Biochem 1980; 109:142-6.

7. Verburg KM, Bowsher RR, Heny DP. A new radioenzymatic assay for histamine using purified histamine n-methyltransferase. Life Sci 1983; 32:2855-67.

8. Morel AM, Delaage MA. Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization. J. Allergy Clin Immunol 1988; 82:646-54.

9. Keyzer JJ, Wolthers BG, Muskeit FA, et al. Measurement of plasma histamine by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: methodology and normal values. Anal. Biochem 1984; 139:474-81.

10. Davis TP, Gehrke CW, Cunningham, et al. High performance liquid chromatographic separation and fluorescence measurement of biogenic amines in plasma, urine and tissue. Clin Chim 1978; 24:3117-24.

11. Alam K, Sasaki M, Watanabe T, Maeyama K. Simultaneous determination of histamine and n-methylhistamine by high performance liquid chromatography-chemiluminescence coupled with immobilized diamine oxidase. Anal Biochem 1995; 229:26-34.

12. Heathly RV, Denburg A, Bayer N, Bienstock J. Increased plasma histamine levels in migraine patients. Clin. Allergy 1982;12:145-9.

13. Sonnenwrith AO. Jerret L. Gradwohls clinical laboratory methods and diagnosis 1980; 2:782-3.

14. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1:307-310.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]