

## مقایسه سطح هوموسیستئین، اسید فولیک و کوبالامین پلاسمای بیماران پس از سکته قلبی با افراد سالم در شهرستان گرگان

### چکیده

**زمینه و هدف:** هوموسیستئین طی متابولیسم متیونین در بدن حاصل می شود. مطالعات فراوانی وجود دارند که موید ارتباط بین افزایش هوموسیستئین خون با افزایش احتمال بیماریهای قلبی عروقی اند. این مطالعه به منظور مقایسه سطح هوموسیستئین بیماران با افراد سالم و بررسی علت احتمالی تاثیر کمبود ویتامین B<sub>12</sub> و فولات بر سطح هوموسیستئین پس از سکته قلبی حاد صورت گرفته است.

**روش بررسی:** این تحقیق یک مطالعه توصیفی-تحلیلی است که بر روی ۴۸ بیمار مبتلا به سکته قلبی و ۴۸ فرد سالم صورت گرفته است. سنجش هوموسیستئین به روش آنزیم ایمنوواسی، آزمایش اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> به روش RIA اجرا شد. سطح اطمینان در کلیه آزمونها ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** میانگین غلظت هوموسیستئین در گروه بیمار  $30.3 \pm 5.3 \mu\text{mol/L}$  و در گروه شاهد  $11.1 \pm 3.1 \mu\text{mol/L}$  بود که بیانگر تفاوت معنی داری بین دو گروه است ( $P < 0.001$ ). میانگین غلظت B<sub>12</sub> در گروه مورد  $208.9 \pm 297.1 \text{ pg/ml}$  و در گروه شاهد  $261.5 \pm 205.3 \text{ pg/ml}$  بود. همچنین میانگین غلظت فولات در گروه بیماران  $2.9 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$  و در گروه شاهد  $4.3 \pm 3.5 \text{ ng/ml}$  بود که تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد. از ۹۶ فرد مورد مطالعه سطح هوموسیستئین ۵۲ نفر بالاتر از میزان طبیعی بود. به طوری که میزان هوموسیستئین در کلیه بیماران بیش از مقدار طبیعی بدست آمد. مقدار فولات در ۱۵ نفر کمتر از میزان طبیعی بود که از این تعداد ۱۱ نفر در گروه بیماران قرار داشتند.

**نتیجه گیری:** با توجه به افزایش حدود سه برابری میانگین غلظت هوموسیستئین در بیماران نسبت به گروه شاهد و عدم ارتباط این افزایش با کاهش ویتامین B<sub>12</sub>، به نظر می رسد در بررسی عوامل موثر و زمینه ساز بیماریهای قلبی در منطقه باید علاوه بر سایر عوامل خطر، سطح HC و فولات را نیز به طور جدی در نظر داشت.

**واژه های کلیدی:** هوموسیستئین، اسید فولیک، کوبالامین، سکته قلبی، بیماری قلبی عروقی

### حمید رضا جوشقانی

استادیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

### احمد علی شیرافکن

استادیار گروه قلب، مرکز آموزشی درمانی پنجم آذر، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

### عبدالجلال مرجانی

دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

### نویسنده مسئول: حمید رضا جوشقانی

تلفن: ۰۱۷۱-۴۴۲۱۶۶۴

پست الکترونیک:

[hr\\_joshaghani@yahoo.com](mailto:hr_joshaghani@yahoo.com)

**آدرس:** گرگان، بلوار هیرکان، ابتدای جاده شصت کلا، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پیراپزشکی و بهداشت، گروه علوم آزمایشگاهی

**وصول مقاله:** ۸۶/۲/۳

**اصلاح نهایی:** ۸۶/۱۱/۸

**پذیرش مقاله:** ۸۷/۱/۳۱

## روش بررسی

این تحقیق یک مطالعه توصیفی-تحلیلی است که بر روی ۴۸ بیمار بستری در بخش CCU بیمارستان پنجم آذر گرگان انجام پذیرفت. از بیمارانی که حداکثر ۲۴ ساعت از زمان بستری شدن آنها می گذشت و سابقه مصرف فولات و B<sub>12</sub> را به عنوان مکمل در سالهای اخیر نداشتند، پس از معاینات بالینی پزشک متخصص قلب و اجرای آزمایشهای معمول در شرایط ناشتا، ۵ میلی لیتر خون گرفته شد. نمونه ها هر روز به

آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه منتقل و پس از جدا سازی سرماها در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

همچنین از ۴۸ فرد سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیمار همتراز شده بودند، پس از اخذ شرح حال مبنی بر نداشتن هیچ گونه سابقه MI، فشارخون بالا، دیابت و هیپرلیپیدمی، در شرایط ناشتا خونگیری به عمل آمد. مراحل ابتدایی بر روی نمونه ها همانند گروه بیمار اعمال گردید.

سنجش هوموسیستئین (HC) به روش آنزیم ایمنو اسی (EIA) و با استفاده از کیت شرکت IBL آلمان اجرا گردید. در این روش ابتدا اتصال هوموسیستئین با پروتئین توسط DTT (دی تیوتریتول) احیاء شده، هوموسیستئین به صورت آزاد در می آید. هوموسیستئین آزاد به طور آنزیماتیک به S-آدنوزیل-L-هوموسیستئین (SAH) تبدیل می گردد. اساس سنجش در این روش رقابت بین S-آدنوزیل-L-هوموسیستئین موجود در نمونه با S-آدنوزیل-L-هوموسیستئین متصل شده به جداره چاهکها برای اتصال و واکنش با جایگاه اتصال منوکلونال آنتی بادی می باشد. برای آزمایش اسید فولیک و ویتامین B<sub>12</sub> از کیت Simul Trac- SNB محصول شرکت MP Biomedicals استفاده شد. اصول آزمایش در این کیت بر اساس رقابت بین مقدار مشخصی از مواد و ماده مجهول که در نمونه بیمار وجود دارد، می باشد. ویتامین B<sub>12</sub> یا فولات نشان دار نشده بر سر اتصال به جایگاههای محدود پروتئین با نمونه های نشان دار رقابت می کنند. بنابراین میزان رادیواکتیویته متصل شده با غلظت ویتامین B<sub>12</sub> و فولات نمونه بیمار و استاندارد نسبت معکوس دارد. در این کیت به علت آنکه ویتامین B<sub>12</sub> با <sup>57</sup>Co و فولات با <sup>125</sup>I کتزوگه شده اند، هر دو آزمایش در یک لوله اجرا می گردد. نتایج با آزمونهای آماری t مستقل، ANOVA و همبستگی با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح اطمینان در کلیه آزمون ها ۹۵٪ در نظر گرفته شد.

سکته قلبی حاد (AMI) یکی از شایعترین تشخیص های بیماران مراجعه کننده به بیمارستانها در کشورهای صنعتی است. AMI اغلب هنگامیکه جریان خون عروق کرونر پس از انسداد ترومبوتیک در عروقی که قبلاً به علت آترواسکلروزیس باریک شده اند، رخ می دهد (۱).

Wilson و McCully برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ ثنوری ارتباط بین آترواسکلروزیس و هوموسیستئین (HC) را بیان نمودند (۲). در سال های اخیر مطالعات فراوانی بر روی ارتباط افزایش هوموسیستئین خون با بیماریهای قلبی عروقی اجرا گردیده است (۳-۵).

هوموسیستئین جزء آمینو اسیدهایی است که در گروه جانبی خود دارای ریشه سولفیدریل است. این اسید آمینه طی متابولیسم متیونین حاصل می شود. شایعترین علت هوموسیستئینوری نقص آنزیم سیستاتیونین بتا سنتتاز است که موجب افزایش بروز بیماری قلبی عروقی می گردد (۶).

در افراد طبیعی میزان هوموسیستئین پلاسما بین ۵ تا ۱۲ میکرومول بر لیتر است که ۹۷ درصد آنها به شکل اکسیده می باشد. هیپر هوموسیستئینی به درجات مختلفی تقسیم می گردد. هوموسیستئینی خفیف زمانی گفته می شود که میزان هوموسیستئین کمتر از ۱۶ μmol/L، در درجه ملایم هوموسیستئین بین ۱۶ تا ۳۰ میکرومول بر لیتر، متوسط بین ۳۱ تا ۱۰۰ میکرومول بر لیتر و هیپر هوموسیستئینی شدید زمانی است که غلظت هوموسیستئین بیش از ۱۰۰ μmol/L باشد (۷).

در نارسایی سیستاتیونین بتا سنتتاز اغلب غلظت هوموسیستئین به بیش از ۱۰۰ μM/L می رسد (۸). در مقابل افزایش خفیف تا متوسط غلظت هوموسیستئین در بیماران اغلب به علت نارسایی در دریافت و جذب ویتامینهای گروه B و سایر موارد ژنتیکی مانند چند شکلیهای آنزیم متیل تراهایدروفولات ردوکتاز می باشد (۹). طبق گزارش محققین بین افزایش هوموسیستئین با سکته قلبی (۱۰) و آترواسکلروزیس آئورت (۱۱) ارتباط وجود دارد. احتمال داده می شود که افزایش خفیف هوموسیستئین فرآیند آترواسکلروزیس را از طریق مکانیسم ایجاد ترومبوز تسریع نماید (۱۲). به همین دلیل این مطالعه به منظور مقایسه سطح هوموسیستئین بیماران با افراد سالم و بررسی علت احتمالی تاثیر کمبود ویتامین B<sub>12</sub> و فولات بر سطح هوموسیستئین پس از سکته قلبی حاد صورت گرفته است.

## یافته ها

از ۴۸ بیماری که در این مطالعه شرکت داشتند، ۳۶ نفر مرد و ۱۲ نفر زن بودند. در گروه شاهد ۲۹ نفر مرد و ۱۹ نفر زن حضور داشتند.

میانگین سنی گروه بیماران  $9/1 \pm 52/5$  سال و گروه شاهد  $6/8 \pm 48/6$  سال بود. میانگین سنی مردان بیمار و زنان بیمار به ترتیب  $9/3 \pm 51/5$  و  $8/1 \pm 55/5$  سال بود.

میانگین غلظت HC در گروه بیمار  $30/3 \pm 5/3$  میکرومول بر لیتر و در گروه شاهد  $3/1 \pm 11/1$  میکرومول بر لیتر بود که بیانگر تفاوت معنی داری بین دو گروه است ( $P < 0.001$ ).

میانگین غلظت B12 در گروه مورد  $297/1 \pm 208/9$  پیکوگرم بر میلی لیتر و در گروه شاهد  $261/5 \pm 205/3$  پیکوگرم بر میلی لیتر بود که تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد.

میانگین غلظت فولات در گروه بیماران  $3/9 \pm 2/9$  نانوگرم بر میلی لیتر و در گروه شاهد  $4/3 \pm 3/5$  نانوگرم بر میلی لیتر بود که تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد. همچنین در این مطالعه همبستگی معنی داری بین غلظت HC و افزایش سن مشاهده نشد.

بر اساس مقادیر طبیعی HC ( $15 \mu\text{mol/L} <$  طبیعی)، B12 ( $120 \text{ pg/ml} <$  پایین) و فولات ( $1/5 \text{ ng/ml} <$  پایین) افراد مورد مطالعه به دو زیر گروه تقسیم شدند. از ۹۶ نفر سطح HC ۵۲ نفر ( $54/2\%$ ) بالاتر از میزان طبیعی بود. به طوری که میزان HC در کلیه بیماران بیش از مقدار طبیعی بود و در گروه شاهد ۴ نفر ( $8/3\%$ ) سطح HC بالاتر از میزان طبیعی داشتند. نکته جالب توجه در مورد این چهار نفر این بود که در همگی سطح فولات طبیعی بود، اما در ۳ نفر B12 کمتر از مقدار طبیعی بود. میزان B12 در ۲۶ نفر ( $27/1\%$ ) کمتر از سطح طبیعی بود که از این تعداد ۱۲ نفر در گروه بیماران و ۱۴ نفر در گروه شاهد قرار داشتند. هیچ گونه ارتباط آماری معنی داری بین دو گروه شاهد و بیمار مشاهده نشد. در گروه بیماران ۳۰ درصد ( $11/48$ ) و در گروه شاهد هشت درصد ( $4/48$ ) میزان فولات کمتر از حد طبیعی بود که این اختلاف از نظر

آماري براساس تست  $X^2$  معنی دار بوده است ( $P < 0.05$ )

علی رغم مشاهده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین مقدار فولات در دو گروه بیمار و شاهد، پس از تقسیم بندی افراد بر اساس میزان طبیعی فولات به دو زیر گروه از نظر تعداد افراد مبتلا به کمبود فولات اختلاف معنی دار آماری بین دو گروه مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

این میزان در افراد بیمار بیش از افراد گروه شاهد بود.

جدول ۱: میانگین غلظت هوموسیستین، ویتامین B12 و فولات در گروه مورد و شاهد بر حسب جنس

	B12 (pg/ml)	HC(μmol/L)	(ng/ml) فولات
مورد	$286/5 \pm 187/7$	$31/3 \pm 5/0$	$3/7 \pm 3/1$
مرد	$328/8 \pm 270/0$	$27/1 \pm 5/1$	$4/5 \pm 2/1$
زن			
شاهد	$216/8 \pm 158/7$	$11/3 \pm 3/5$	$3/8 \pm 2/1$
مرد	$329/6 \pm 250/7$	$10/7 \pm 2/3$	$4/9 \pm 5/0$
زن			

## بحث

در این مطالعه میانگین غلظت HC در گروه بیمار به طور واضحی بیشتر از گروه شاهد بود و این نشانگر تاثیر HC در عوارض قلبی عروقی و سکتته قلبی است. در یک مطالعه در سنگاپور در سال ۲۰۰۲ از Ng و همکاران، نتایج به دست آمده عکس مطالعه حاضر بود. در آن مطالعه که بر روی ۱۶۸ بیمار اجرا شده ارتباط معنی داری بین AMI و غلظت HC مشاهده نشد (۱۳). در حالی که نتایج گزارش قوجق و همکاران در بابل بیانگر افزایش معنی دار HC در بیماران با سابقه سکتته قلبی نسبت به گروه شاهد است ( $25/05 \pm 2/44$ ) در گروه بیماران در برابر  $1/26 \pm 12/75$  در گروه شاهد (۱۴). در این تحقیق اختلاف معنی داری بین فولات و B12 در دو گروه بیمار و شاهد مشاهده نشد. در حالی که در گزارش Verhoef و همکاران میزان HC در گروه بیماران قلبی ۱۱٪ بیشتر از گروه کنترل بوده است. میزان B6 و فولات در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان می داد، اما B12 ارتباط آشکاری را با بیماری قلبی نشان نداد. همچنین فولات و B12 پلاسما ارتباط معکوسی با HC پلاسما داشتند؛ ولی این حالت در مورد B6 مشاهده نشد (۱۵).

علی رغم این که در مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین افزایش میانگین HC با کاهش میانگین ویتامینهای B12 و فولات مشاهده نشد، هنگامی که افراد مورد مطالعه را بر حسب مقادیر نرمال به دو زیر گروه تقسیم نمودیم، کاهش معنی دار فولات در گروه بیمار کاملاً مشهود بود. به عبارت دیگر می توان کاهش فولات را یکی از عوامل موثر در افزایش سطح HC پلاسما به شمار آورد. با این حال به نظر می رسد علاوه بر کمبود فولات،

بعلاوه روش HPLC با اینکه حساسیت بیشتری نسبت به روش ELISA دارد، به علت نیاز به دستگاههای گران قیمت و کارکنان متخصص به هیچ وجه روش اجرایی محسوب نمی گردد. پیشنهاد می شود با توجه به افزایش حدود سه برابری میانگین غلظت HC در بیماران نسبت به گروه شاهد و عدم ارتباط این افزایش با کاهش ویتامین B<sub>12</sub>، پزشکان متخصص این منطقه افزایش اثری سطح HC و در نتیجه کمبود فولات را از عوامل خطر جدی در نظر داشته باشند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به خاطر حمایت کامل از اجرای این تحقیق و کارکنان بخش CCU بیمارستان پنجم آذر گرگان به سبب همکاری صمیمانه شان سپاسگزاری می نمایند.

عوامل ژنتیکی بالاخص نقص آنزیم متیل تراهایدروفولات ردو کتاز نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

در یک مطالعه مورد شاهدی که کریستنسن و همکاران در سال ۱۹۹۹ در نروژ اجرا کرد، غلظت HC در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد افزایش داشت و غلظت فولات کاهش نشان می داد. در این مطالعه محققین معتقد بودند که عوامل جانبی مثل مصرف الکل و سیگار سبب این نتایج شده است. پس از همتراز کردن دو گروه بیمار و شاهد از نظر مصرف الکل و سیگار ارتباط معنی داری بین HC و فولات با MI مشاهده نشد (۱۶). در مطالعه حاضر ما نتوانستیم از نظر مصرف الکل اطلاعات دقیقی به دست آوریم، زیرا از نظر برخی مسائل اجتماعی عمدتاً به اینگونه سوالات پاسخ قابل اطمینانی داده نمی شود.

در این مطالعه هر چند ابزار اندازه گیری هوموسیستئین (روش ELISA) حساسترین ابزار موجود نمی باشد.

با توجه به اینکه مطالعه مورد شاهدی است و روش سنجش برای هر دو گروه یکسان می باشد، در نتیجه جوابهای حاصل برای مقایسه دو گروه قابل اطمینان هستند.

### References

- 1) Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, and Joseph Loscalzo. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th edition, 2008, part nine, section 4, chapter 230, McGraw-Hill, new York.
- 2) McCully KS, Wilson RB. *Homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis*. *Atherosclerosis* 1975;22:215-227
- 3) Huang T, Yuan G, Zhang Z, Zou Z, Li D. *Cardiovascular pathogenesis in hyperhomocysteinemia*. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17:8-16.
- 4) Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. *Homocysteine and coronary atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:517-527.
- 5) Guba SC, Fink LM, Fonseca V. *Hyperhomocysteinemia – an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease*. *Am J Clin Pathol* 1996;106:709-722.
- 6) van der Crabben SN, Wijburg FA, Ackermans MT, Sauerwein HP. *Effect of cysteine dosage on erythrocyte glutathione synthesis rate in a patient with cystathionine beta synthase deficiency*. *J Inher Metab Dis*. 2008 Jan 24; [Epub ahead of print]
- 7) Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. *Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease*. *Annu Rev Nutr*, 1992, 12: 279-298.
- 8) Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Gröbe H, Schmidt H, Schweitzer L. *The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency*. *Am J Hum Genet*. 1985; 37: 1–31.
- 9) Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians*. *Circulation*. 1996; 94:2410–2416.
- 10) Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. *Homocysteine and myocardial infarction*. *Atherosclerosis*. 1988; 71: 227–233.
- 11) Tribouilloy CM, Peltier M, Iannetta Peltier MC, Trojette F, Andrejak M, Lesbre JP. *Plasma homocysteine and severity of thoracic aortic atherosclerosis*. *Chest*. 2000; 118: 1685–1689.
- 12) Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. *Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression*. *Circulation*. 2001; 103: 934–940.
- 13) Ng KC, Yong QW, Chan SP, Cheng A. *Homocysteine, folate and vitamin B12 as risk factors for acute myocardial infarction in a Southeast Asian population*. *Ann Acad Med Singapore*. 2002 ;31(5):636-40.
- 14) Qujeq D, Omran TS, Hosini L. *Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction*. *Clin Biochemistry* 2001;34:97-101
- 15) Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH, Willett WC. *Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate*. *Am J Epidemiol* 1996;143:845-859
- 16) Christensen B, Landaas S, Stensvold I, Djurovic S, Retterstol L, Ringstad J, Berg K, Thelle DS. *Whole blood folate, homocysteine in serum, and risk of first acute myocardial infarction*. *Atherosclerosis*. 1999 ;147(2):317-26.