جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۲/هفته چهارم دی ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۰

بررسی اثر هوموسیستئین و آسپرین بر روی پارامترهای انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در شرایط آزمایشگاهی

دکتر جواد زوار رضا[۱]، فهیمه دانش پویا[۲]، دکتر بمانعلی جلالی[۳]، حمید رضا شاهمرادی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: برخی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش هوموسیستئین در خون، تغییراتی در سیستم انعقاد و فیبرینولیز ایجاد می‌نماید، ولی مکانیسم دقیق آن روشن نیست. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی غلظت‌های مختلف هوموسیستئین و آسپرین بر روی پارامترهای انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در پلاسمای افراد سالم بود.

روش‌ها: ابتدا پلاسمای غنی از هوموسیستئین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار) و آسپرین (۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه گردید و پس از انکوبه نمودن در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، پارامترهای انعقاد به روش کدورت‌سنجی تعیین شدند. همچنین ضریب نفوذپذیری لخته تعیین گردید. از آزمون Student-t برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: اثر متقابل هوموسیستئین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار با آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان کل انعقاد (۱/۱۵ ± ۸۲۰/۰۰ ثانیه)، حداکثر سرعت انعقاد (۰/۰۰۳ ± ۰/۲۳۲) و ضریب نفوذپذیری لخته [۰/۱۵۱ ± ($۱/۱۰۸ \times ۱۰^{-۶}$)] نسبت به گروه هوموسیستئین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار به ترتیب برابر با ۱۲/۸ ± ۵۵۵/۰ ثانیه، ۰/۰۰۸ ± ۰/۲۵۸، ۰/۰۳۸۱ ± ($۰/۴۹۳ \times ۱۰^{-۶}$) معنی‌دار بود. هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار همراه با آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر بر روی هیچ یک از شاخص‌ها اثر معنی‌داری نداشت. هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار با آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر در برابر هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار تنها در ضریب نفوذپذیری لخته [به ترتیب ۰/۰۷۱ ± ($۰/۷۸۷ \times ۱۰^{-۶}$) و ۰/۰۵۳ ± ($۰/۶۳۶ \times ۱۰^{-۶}$)] اثر معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: آسپرین با مقادیر بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر بر روی غلظت‌های بالاتر هوموسیستئین تأثیر بیشتری دارد، به طوری که با ایجاد وقفه در مرحله‌ی انعقاد، لخته دیرتر تشکیل می‌شود و با عملکردی که بر روی ساختار لخته دارد نفوذپذیری آن را افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: هوموسیستئین، آسپرین، انعقاد، نفوذپذیری

ارجاع: زوار رضا جواد، دانش پویا فهیمه، جلالی بمانعلی، شاهمرادی حمید رضا. **بررسی اثر هوموسیستئین و آسپرین بر روی پارامترهای انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در شرایط آزمایشگاهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۲): ۱۹۴۰-۱۹۳۲

مقدمه

آترواسکلروز عمده‌ترین علت بیماری عروق کرونر است و به طور عمده شریان‌های بزرگ و متوسط را درگیر می‌کند (۱). این فرایند در تمام طول مدت زندگی هر فرد صورت می‌گیرد ولی سرعت آن بستگی به عوامل خطر مختلف دارد. زمانی که

۱- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، شعبه‌ی بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فهیمه دانش پویا
Email: daneshpouya@outlook.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پلاک‌های غنی از لیپید از دیواره‌ی رگ‌ها جدا می‌شوند، رگ‌ها آسیب می‌بینند و لخته ایجاد می‌شود. بیماری‌های لخته‌ساز عامل تعداد زیادی از مرگ و میرها می‌باشند. تشکیل لخته مهم‌ترین علت بروز سندروم کرونری حاد و مرگ ناگهانی حاصل از ایسکمی قلب می‌باشد (۲). از بین عوامل خطر بیماری‌های قلبی- عروقی، می‌توان به هوموسیستئین اشاره نمود. هوموسیستئین یک اسید آمینه‌ی گوگرددار است، که در مسیر متابولیسم متیونین در بدن تولید می‌شود (۳). نقایص ژنتیکی به علت نقص آنزیم‌هایی درگیر در متابولیسم هوموسیستئین و یا کمبود ویتامین‌هایی مثل فولات، کوبالامین و B_6 سبب افزایش سطح هوموسیستئین پلاسما می‌شوند (۴). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که افزایش هوموسیستئین در مایعات بدن همراه با افزایش مرگ و میر به علت بیماری‌های قلبی- عروقی می‌باشد. در این زمینه احتمال تداخل هوموسیستئین در سیستم انعقاد و فیبرینولیز مطرح می‌باشد (۶-۵). همچنین برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش هوموسیستئین در خون، باعث تبدیل آن به هوموسیستئین تیولاکتون یعنی شکل حلقوی هوموسیستئین می‌شود که عملکرد فیبرینوژن را تغییر می‌دهد و لخته‌های فیبرینی مقاوم به لیز تشکیل می‌دهد (۷، ۳). با این وجود در مورد جزییات اثر هوموسیستئین در فرایند انعقاد و فیبرینولیز اطلاعات زیادی در دست نیست و مکانیسم دقیق خطرزایی این اسید آمینه مشخص نشده است (۹-۸). با توجه به احتمال اثر ترکیبات ضد التهابی در جلوگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، از آسپرین به عنوان کاهنده‌ی تجمع پلاکتی القا شده در اثر چندین محرک فیزیولوژی، استفاده گردید (۱۰). یکی از خصوصیات مهم آسپرین مهار سنتز پروستاگلندین‌ها در پلاکت‌های خون است (۱۱). عملکرد دیگر آسپرین استیله کردن ریشه‌های لیزین زنجیره‌ی آلفایفیبرینوژن است که با تغییر در ساختار فیبرینوژن، لخته‌ی تشکیل‌یافته را به آسانی لیز می‌کند (۱۲).

با توجه به اهمیت بیماری‌های قلبی- عروقی، در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های بالای هوموسیستئین و آسپرین بر روی سیستم انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در خارج از بدن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

جهت تهیه‌ی پلاسما، از ۵۰ فرد سالم ۳۵-۲۵ ساله که سابقه‌ی ابتلا به بیماری قلبی- عروقی، آلرژی و اختلالات متابولیسمی لیپیدی یا کربوهیدراتی و مصرف درمان دارویی نداشتند پس از ۱۰ ساعت ناشتا بودن، نمونه‌ی خون با محلول سیترات سدیم (۳/۸ درصد) تهیه گردید. سپس جهت به دست آوردن پلاسما، نمونه‌های خون سیتراته با سرعت ۴۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن پلاسماهای به دست‌آمده مخلوط و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد فریز شدند.

برای اندازه‌گیری پارامترهای انعقاد از روش Williams و همکاران با کمی تغییر استفاده گردید (۱۳). ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PBS) (۲۰ میکرومولار NaHPO4، ۲۰ میکرومولار NaH2PO4، ۰/۱۵ مولار NaCl، با pH = ۷/۴)، ۲۵ میکرولیتر محلول آنزیم استرپتوکیناز ۷۵۰ واحد در میلی‌لیتر (Sigma)، ۵ میکرولیتر محلول کلرید کلسیم ۲ مولار (Merck) و ۳ میکرولیتر محلول

www.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ترومبین انسانی ۰/۵ واحد در میلی‌لیتر (Sigma) جهت فعال کردن فاکتورهای انعقادی به ۴۰۰ میکرولیتر پلاسما در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه ELISA reader (EPOCH- Bio Tek) تغییرات جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر هر ۱۰ ثانیه یک بار قرائت گردید و سپس با رسم منحنی کینتیکی برای هر نمونه (تغییرات جذب نسبت به زمان) پارامترهای انعقاد شامل زمان کل انعقاد و حداکثر سرعت انعقاد، تعیین گردید.

در این مطالعه از روش اندازه‌گیری نفوذپذیری لخته که پیش از این تعیین شده است (۱۴)، استفاده شد. برای این کار در لوله‌ی پلاستیکی، به ۴۰۰ میکرولیتر از پلاسمای سیتراته، ۵ میکرولیتر کلرید کلسیم ۲ مولار (Merck) و ۳ میکرولیتر ترومبین انسانی ۰/۵ واحد در میلی‌لیتر (Sigma) اضافه شد و اجازه داده شد تا لخته تشکیل شود. بعد از آن به مدت دو ساعت در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس بر روی لخته‌ی تشکیل‌یافته مقدار معینی از بافر (۰/۰۵ مول در لیتر Tris HCl، ۰/۱۵ مول در لیتر NaCl و pH = ۷/۴) افزوده شد و زمان عبور بافر از لخته موجود اندازه‌گیری گردید. ضریب نفوذپذیری با معیار Ks (ثابت دارسی)، نشان‌دهنده‌ی سطح لخته‌ای است که اجازه‌ی جریان از شبکه‌ی فیبرینی را می‌دهد و از طریق معادله‌ی $Ks = (Q. L. \eta)/ (t. A. \Delta p)$ محاسبه می‌شود. در این معادله Q نشان‌دهنده حجم بافری است که از میان لخته در زمان t جریان می‌یابد، L طول لخته‌ی فیبرینی (۱/۶ سانتی‌متر)، η ویسکوزیته‌ی بافر (۲ تا ۱۰ Poise)، A سطح لخته‌ی موجود در لوله‌ی پلاستیکی جهت عبور بافر (۴/۱۷ سانتی‌متر مربع)، و Δp اختلاف فشار (دین بر سانتی‌متر مربع) می‌باشد (۱۵).

در مرحله‌ی بعد محلول کار غنی از هوموسیستئین با غلظت (۱۰۰۰ میکرومولار) تهیه شد. از این محلول مقادیر هوموسیستئین ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در ۴۰۰ میکرولیتر پلاسما تهیه گردید. مقادیر مختلفی از آسپرین نیز به غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۴۰۰ میکرولیتر از پلاسما تهیه شد. این نمونه‌ها به همراه پلاسمای بدون هوموسیستئین به عنوان شاهد هوموسیستئین و پلاسمای بدون آسپرین به عنوان شاهد آسپرین، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پارامترهای انعقادی و ضریب نفوذپذیری نمونه‌ها تعیین شدند.

در مرحله‌ی آخر هر یک از غلظت‌های هوموسیستئین با غلظت‌های مختلف آسپرین، در ۴۰۰ میکرولیتر از پلاسما به طور متوالی مخلوط شدنده و به همراه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار از هوموسیستئین به عنوان شاهد برای هر گروه، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پارامترهای انعقادی و ضریب نفوذپذیری برای همه‌ی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون Student-t استفاده شد. مقادیر $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جدول ۱ نتایج مقایسه‌ی پارامترهای انعقادی و ضریب نفوذپذیری را در غلظت‌های مختلف

هوموسیستئین در پلاسما، آسپرین در پلاسما و شاهدهای آن‌ها نشان می‌دهد.

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهند که هوموسیستئین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه‌ی شاهد بر روی زمان کل انعقاد، حداکثر سرعت انعقاد و ضریب نفوذپذیری اثر معنی‌دار داشته است. آسپرین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز در مقایسه با نمونه‌ی شاهد اثر معنی‌داری بر روی زمان کل انعقاد، حداکثر سرعت انعقاد و ضریب نفوذپذیری داشت.

نتایج حاصل از اندازه گیری پارامترهای هوموسیستئین و آسپرین

جدول ۲ مقایسه‌ی پارامترهای انعقادی و ضریب نفوذپذیری لخته را در نمونه‌های هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار با غلظت‌های مختلف آسپرین نشان می‌دهد.

زمان کل انعقاد، حداکثر سرعت انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار همراه با آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری داشت. پارامترهای مورد بررسی در گروه هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار با آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و همین طور هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار با آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند.

جدول ۱. اثر غلظت‌های مختلف هوموسیستئین و آسپرین بر روی پارامترهای انعقاد و ضریب نفوذپذیری لخته در پلاسما

پارامترها	زمان کل انعقاد	مقدار P	حداکثر سرعت انعقاد	مقدار P	ضریب نفوذپذیری لخته	مقدار P
شاهد	۷۳۵/۰۰ ± ۵/۵۰	–	۰/۲۲۰ ± ۰/۰۱۷	–	$(۱/۰۵۸ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۱۰۳$	–
هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار	۵۵۵/۰۰ ± ۱۲/۸۹	< ۰/۰۰۱	۰/۲۵۸ ± ۰/۰۰۸	۰/۰۲۵.	$(۰/۴۹۳ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۱۰۳$	< ۰/۰۰۱
هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار	۶۳۸/۰۰ ± ۸/۰۰	< ۰/۰۰۱	۰/۲۵۱ ± ۰/۰۰۸	۰/۰۴۷	$(۰/۶۳۶ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۰۵۳$	۰/۰۰۳
هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار	۷۱۱/۰۰ ± ۱۰/۵۰	۰/۰۲۴	۰/۲۳۶ ± ۰/۰۰۵	۰/۱۹۶	$(۰/۸۹۸ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۰۹۳$	۰/۱۱۸
آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۸۹۷/۰۰ ± ۵/۱۹	< ۰/۰۰۱	۰/۱۶۳ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۳۴	$(۲/۱۶۹ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۳۶۳$	۰/۰۰۷
آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر	۷۷۴/۰۰ ± ۵/۵۰	< ۰/۰۰۱	۰/۱۷۰ ± ۰/۰۱۰	۰/۰۴۰	$(۱/۶۱۵ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۲۰۳$	۰/۰۱۳
آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر	۷۳۵/۰۰ ± ۵/۷۷		۰/۱۸۶ ± ۰/۰۱۰	۰/۰۴۶	$(۱/۳۲۰ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۰۸۶$	۰/۰۲۹

زمان کل انعقاد بر حسب ثانیه، حداکثر سرعت انعقاد برابر با تفاضل سه جذب متوالی بر ثانیه، ضریب نفوذپذیری لخته (Ks) بر حسب سانتی‌متر مربع است.

جدول ۲. مقایسه‌ی شاخص‌های مورد نظر در نمونه‌های مختلف هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار با آسپرین در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر

پارامترها	زمان کل انعقاد	مقدار P	حداکثر سرعت انعقاد	مقدار P	ضریب نفوذپذیری لخته	مقدار P
هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار	۵۵۵/۰۰ ± ۱۲/۸۹	–	۰/۲۵۸ ± ۰/۰۰۸	–	$(۰/۴۹۳ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۱۰۳$	–
هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۸۲۰/۰۰ ± ۱/۱۵	< ۰/۰۰۱	۰/۲۳۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۴۶	$(۱/۱۰۸ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۱۵۱$	۰/۰۰۲
هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر	۷۲۱/۰۰ ± ۷/۰۹	< ۰/۰۰۱	۰/۲۵۴ ± ۰/۰۰۴	۰/۹۶۹	$(۰/۷۸۳ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۰۲۷$	< ۰/۰۰۱
هوموسیستئین ۲۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر	۶۱۰/۰۰ ± ۳۶/۰۵	۰/۰۷۰	۰/۲۵۹ ± ۰/۰۰۱	۰/۶۳۶	$(۰/۵۷۵ \times ۱۰^{-۶}) \pm ۰/۰۴۰$	۰/۰۶۴

زمان کل انعقاد بر حسب ثانیه، حداکثر سرعت انعقاد برابر با تفاضل سه جذب متوالی بر ثانیه، ضریب نفوذپذیری لخته (Ks) بر حسب سانتی‌متر مربع است.

جدول ۳. اثر هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار همراه با آسپرین ۱، ۱۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر روی شاخص‌های مورد نظر

پارامترها	زمان کل انعقاد	مقدار P	حداکثر سرعت انعقاد	مقدار P	ضریب نفوذپذیری لخته	مقدار P
هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار	۶۳۸/۰۰ ± ۸/۰۰	–	۰/۲۵۱ ± ۰/۰۰۸	–	(۰/۶۳۶ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۰۵۳	–
هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۸۵۴/۰۰ ± ۵/۰۳	< ۰/۰۰۱	۰/۲۲۴ ± ۰/۰۰۵	۰/۰۱۰	(۱/۲۹۵ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۱۸۳	۰/۰۰۴
هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر	۷۶۰/۰۰ ± ۵/۰۰	< ۰/۰۰۱	۰/۲۴۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۱۲۶	(۰/۹۴۳ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۱۰۹	۰/۰۱۲
هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار و آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر	۶۶۳/۰۰ ± ۱۸/۰۲	۰/۱۰۰	۰/۲۴۴ ± ۰/۰۰	۰/۱۹۳	(۰/۷۸۷ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۰۷۱	۰/۰۴۳

زمان کل انعقاد بر حسب ثانیه، حداکثر سرعت انعقاد برابر با تفاضل سه جذب متوالی بر ثانیه، ضریب نفوذپذیری لخته (Ks) بر حسب سانتی‌متر مربع است.

جدول ۴. مقایسه‌ی شاخص های مورد بررسی در نمونه‌های هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار و آسپرین ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر

پارامترها	زمان کل انعقاد	مقدار P	حداکثر سرعت انعقاد	مقدار P	ضریب نفوذپذیری لخته	مقدار P
هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار	۷۱۱/۰۰ ± ۱۰/۵۰	–	۰/۲۳۶ ± ۰/۰۰۵	–	(۰/۸۹۸ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۰۹۳	–
هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۸۷۶/۰۰ ± ۵/۸۵	< ۰/۰۰۱	۰/۲۱۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	(۱/۵۶۷ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۲۷۵	۰/۰۱۶
هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار و آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر	۷۹۲/۰۰ ± ۴/۰۴	< ۰/۰۰۱	۰/۲۲۳ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۳۰	(۱/۲۵۴ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۱۷۹	۰/۰۳۸
هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار و آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر	۷۴۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰	۰/۰۲۶	۰/۲۳۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۳۵۸	(۱/۱۶۸ × ۱۰$^{-۶}$) ± ۰/۱۰۶	۰/۰۳۰

زمان کل انعقاد بر حسب ثانیه، حداکثر سرعت انعقاد برابر با تفاضل سه جذب متوالی بر ثانیه، ضریب نفوذپذیری لخته (Ks) بر حسب سانتی‌متر مربع است.

جدول ۳ مقایسه‌ی شاخص‌های مورد بررسی را در نمونه‌های هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار با غلت‌های مختلف آسپرین نشان می‌دهد.

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار با آسپرین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اثر معنی‌داری بر روی همه‌ی پارامترهای مورد بررسی به جز حداکثر سرعت انعقاد تفاوت معنی‌داری نسبت به هوموسیستئین ۱۰۰ میکرومولار داشت.

جدول ۴ نیز نتایج شاخص‌های مورد بررسی را در نمونه‌های هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار و غلظت‌های مختلف آسپرین نشان می‌دهد.

هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار با آسپرین ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش معنی‌دار همه‌ی پارامترهای بررسی‌شده نسبت به هوموسیستئین ۵۰ میکرومولار، به جز حداکثر سرعت انعقاد، شد.

بحث

هوموسیستئین در پلاسما عملکرد بیماری‌زایی دارد و هموستاز را به هم می‌زند. این فرایند دارای یک سیستم پیچیده است (۹-۸). در مطالعه‌ای که انجام شد، مشاهده گردید که هوموسیستئین در غلظت‌های خاصی تسریع‌کننده‌ی انعقاد می‌باشد. در این مطالعه

مشاهده شد که هوموسیستئین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار در زمان کل انعقاد، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت، به طوری که غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیشترین اثر را روی پلاسما داشت. بنابراین افزایش هوموسیستئین در پلاسما می‌تواند یک عامل خطر مهم باشد و زمان تشکیل لخته را سریع‌تر نماید. طبق مطالعاتی که پیش از این در خارج از بدن بر روی پلاسما انجام شد علت کاهش زمان کل انعقاد در اثر افزایش هوموسیستئین، اثر پیش انعقادی آن بود. دلیل این امر این است که هوموسیستئین باعث افزایش بیان فاکتور بافتی و ترومبواکسان A2 می‌گردد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر چون بررسی بر روی پلاسما صورت پذیرفت، افزایش بیان فاکتور بافتی و ترومبواکسان A2 نمی‌توانند دلیلی بر انعقاد سریع‌تر باشند، بنابراین پروتئین‌های دیگری در این امر دخالت دارند. این عوامل باعث تشکیل زود هنگام لخته می‌شوند. با این وجود هنوز مکانیسم دقیق این که چرا هوموسیستئین در غلظت‌های بالاتر از ۱۵ میکرومولار باعث افزایش لخته‌زایی می‌گردد، مشخص نشده است (۱۷، ۷).

در این بررسی، حداکثر سرعت انعقاد در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد. در یک مطالعه مشاهده شد که حداکثر سرعت انعقاد در حضور هوموسیستئین با غلظت‌های ۱-۰/۰۱ میلی‌مولار و هوموسیستئین تیولاکتون با غلظت ۱-۰/۱ میکرومولار، بر روی فیبرینوژن خالص نیز افزایش معنی‌دار داشت (۷). Olas و همکاران در مطالعه‌ای چنین بیان داشتند که هوموسیستئین و هوموسیستئین تیولاکتون باعث تغییر گروه‌های تیول و آمینو در پروتئین‌های پلاسما می‌شود و با هوموسیستئینه نمودن این نواحی عملکرد پروتئین‌ها از جمله فیبرینوژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هوموسیستئین سبب تشکیل سریع‌تر لخته شد. می‌توان گفت فیبرینوژن محلول در پلاسما سریع‌تر به فیبرین نامحلول تبدیل شده است و لخته‌ی فیبرینی با سرعت بیشتری تشکیل شده است. در غلظت ۵۰ میکرومولار چنین تغییری مشاهده نشد. بر اساس نتایج مطالعه‌ی Marchi و همکاران هوموسیستئین در غلظت ۵۲ میکرومولار افزایش اندکی در خصوصیات انعقادی نشان می‌دهد (۱۹). با توجه به نتایجی که در مطالعه‌ی حاضر به دست آمد، این غلظت توانایی عملکرد لازم جهت تأثیر روی تشکیل لخته را نداشت ولی در محدوده‌ی غلظت‌هایی (۱۰۰-۳۰ میکرومولار) است که برای جلوگیری از گسترش آترواسکلروز باید مورد توجه قرار گیرد (۲۰).

بر اساس نتایج مطالعه ی حاضر، لخته‌ی تشکیل‌شده از هوموسیستئین ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نسبت به گروه شاهد کمترین نفوذپذیری را نشان داد و مدت زمان بیشتری طول کشید تا بافر از لخته‌ی تشکیل‌یافته عبور نماید. در مطالعه‌ای دیگر، هوموسیستئین باعث تشکیل لخته‌ی محکم با منافذ کوچک‌تر شد. لخته‌ی تشکیل‌شده، مقاوم به لیز شدن بود. آن‌ها علت این امر را در گروه تیول هوموسیستئین دانستند که FXIII (Factor XIII) انعقادی را تغییر شکل می‌دهد. تغییر در این فاکتور باعث ایجاد پیوندهای عرضی بیشتری با فیبرینوژن می‌شود و در نتیجه لخته‌های سفت با منافذ کوچک‌تر ایجاد می‌نماید (۲۱). بنابراین با توجه به نتایجی که از

اندازه‌گیری ضریب نفوذپذیری از مطالعه‌ی حاضر و مطالعات دیگر به دست آمد، به نظر می‌رسد که هوموسیستئین بر روی پروتئین‌های دیگر سیستم انعقادی نیز تأثیر می‌گذارد.

در این مطالعه خصوصیات آسپرین نیز مورد بررسی قرار گرفت. آسپرین بر روی تشکیل لخته و ضریب نفوذپذیری لخته تأثیر داشت و زمان کل انعقاد و نفوذپذیری لخته را بیشتر نمود و حداکثر سرعت انعقاد کاهش داد.

در مطالعه‌ی Undas و همکاران، آسپرین بر روی فاکتورهای انعقادی مانند ترومبین، فیبرینوژن، FXIII و فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی اثر داشت. آسپرین بر روی انعقاد از طریق کاهش سنتز ترومبین عمل می‌کند. زمانی که ترومبین در دسترس نباشد زمان تشکیل لخته طولانی می‌شود و لخته با سرعت آهسته‌تری تشکیل می‌شود. همچنین کاهش فعالیت ترومبین بر روی فعالیت FXIII اثر دارد و باعث تضعیف عملکرد این فاکتور می‌شود. همچنین آسپرین ریشه‌های لیزین در فیبرینوژن را استیله می‌کند، در نتیجه لخته‌ای که تشکیل می‌شود استحکام لازم را نخواهد داشت و نفوذپذیری لخته افزایش می‌یابد (۲۲).

در این مطالعه، آسپرین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تمامی غلظت‌های هوموسیستئین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار) را تحت تأثیر قرار داد، به طوری که مدت زمان انعقاد و نفوذپذیری لخته بیشتر شد و انعقاد با سرعت آهسته‌تری پیش رفت. بنابراین آسپرین اثرات هوموسیستئین بر روی تشکیل لخته و ضریب نفوذپذیری لخته را کاهش می‌دهد. Mehmetoglu و Kurban مشاهده کردند که مقدار هوموسیستئین بالا با مصرف آسپرین کاهش می‌یابد (۲۳). همچنین Schroecksnadel و همکاران دریافتند که مصرف آسپرین با غلظت‌های ۵-۳ میلی‌مول به طور معنی‌داری باعث کاهش عملکرد هوموسیستئین می‌شود (۲۱).

در این مطالعه همچنین مشاهده شد ضریب نفوذپذیری لخته زمانی که غلظت زیادی از آسپرین با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هوموسیستئین در پلاسما وجود داشته باشد، افزایش یافت و چنان چه اشاره شد باعث تشکیل فیبرهای کلفت با منافذ بزرگ گردید. بنابراین تخلخل لخته را افزایش داد. در مطالعه‌ی Fatah و همکاران مصرف آسپرین با دوز ۱۶۰ میلی‌گرم مؤثرتر از ۷۵ میلی‌گرم بود و در بیماران مبتلا به بیماری شریان کرونری تخلخل لخته‌ی فیبرینی را افزایش داد و لخته‌ای با نفوذپذیری بالا تشکیل داد (۱۰).

نتیجه‌گیری

آسپرین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تمامی غلظت‌های هوموسیستئین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار) را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث تأخیر در انعقاد و افزایش نفوذپذیری لخته می‌گردد. اگر چه آسپرین در غلظت‌های کمتر تأثیر چندانی بر غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار ندارد.

References

1. Xu H, Shi D, Chen K. Atherosclerosis: an integrative East-west medicine perspective. Evid Based Complement Alternat Med 2012; 2012: 148413.
2. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. Rev Esp Cardiol 2009; 62(10): 1161-78.
3. Sauls DL, Warren M, Hoffman M.

Homocysteinylated fibrinogen forms disulfide-linked complexes with albumin. Thromb Res 2011; 127(6): 576-81.

4. Kristensen B, Malm J, Nilsson TK, Hultdin J, Carlberg B, Dahlen G, et al. Hyperhomocysteinemia and hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke. Stroke 1999; 30(5): 974-80.
5. da Cunha AA, Scherer E, da Cunha MJ, Schmitz F, Machado FR, Lima DD, et al. Acute hyperhomocysteinemia alters the coagulation system and oxidative status in the blood of rats. Mol Cell Biochem 2012; 360(1-2): 205-14.
6. Phang M, Lazarus S, Wood LG, Garg M. Diet and thrombosis risk: nutrients for prevention of thrombotic disease. Semin Thromb Hemost 2011; 37(3): 199-208.
7. Malinowska J, Nowak P, Olas B. Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylation on hemostatic properties of plasma. Thromb Res 2011; 127(3): 214-9.
8. Lauricella AM, Quintana IL, Kordich LC. Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. Thromb Res 2002; 107(1-2): 75-9.
9. Lauricella AM, Quintana I, Castanon M, Sassetti B, Kordich L. Influence of homocysteine on fibrin network lysis. Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17(3): 181-6.
10. Fatah K, Beving H, Albage A, Ivert T, Blomback M. Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? Eur Heart J 1996; 17(9): 1362-6.
11. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. Nat New Biol 1971; 231(25): 235-7.
12. Ajjan RA, Standeven KF, Khanbhai M, Phoenix F, Gersh KC, Weisel JW, et al. Effects of aspirin on clot structure and fibrinolysis using a novel in vitro cellular system. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29(5): 712-7.
13. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26(6): 1397-404.
14. Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. Circulation 2002; 106(15): 1938-42.
15. Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. Biochim Biophys Acta 1989; 997(1-2): 96-110.
16. Coppola A, Davi G, De S, V, Mancini FP, Cerbone AM, Di MG. Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. Semin Thromb Hemost 2000; 26(3): 243-54.
17. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. Blood 1997; 90(1): 1-11.
18. Olas B, Kolodziejczyk J, Malinowska J. May modifications of human plasma proteins stimulated by homocysteine and its thiolactone induce changes of hemostatic function of plasma in vitro? Gen Physiol Biophys 2010; 29(2): 186-93.
19. Marchi R, Carvajal Z, Weisel JW. Comparison of the effect of different homocysteine concentrations on clot formation using human plasma and purified fibrinogen. Thromb Haemost 2008; 99(2): 451-2.
20. Hortin GL. Homocysteine: Clinical Significance and Laboratory Measurement. Lab Med 2006; 37(9): 551-3.
21. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Wirleitner B, Schennach H, Fuchs D. Aspirin downregulates homocysteine formation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Scand J Immunol 2005; 62(2): 155-60.
22. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. Blood 2007; 109(6): 2285-92.
23. Mehmetoglu I, Kurban S. Effects of two different doses of acetylsalicylic acid on serum nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, and homocysteine levels in healthy volunteers. Turk J Med Sci 2012; 42(2): 269-74.

Journal of Isfahan Medical School Received: 09.10.2013

Vol. 31, No. 262, 4th Week, January 2014 Accepted: 11.12.2013

In-Vitro Study of Homocysteine and Aspirin Effects on Coagulation and Clot Permeability

Javad Zavar-Reza PhD[1], Fahimeh Danesh-Pouya MSc[2], Bemanali Jalali PhD[3], Hamidreza Shahmoradi MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: Some studies suggest that increased homocystein in blood leads to alterations in coagulation; however, the precise mechanism is not clear. The aim of this study was to compare different concentrations of homocysteine and aspirin on coagulation parameters and permeability coefficient of clot in the plasma of healthy individuals in vitro.

Methods: Different concentrations of homocysteine (50, 100, 200 µM) and aspirin (1, 10, 100 mg/l) were added to the plasma citrate. They were incubated at 37℃ for 24 hours. Then, coagulation parameters were analyzed by the turbidimetric procedure at 405 nm and permeability coefficient of clot was determined. The independent samples t-test was utilized to compare the results.

Findings: Homocysteine at 200 µM with aspirin 100 mg/l had significant changes in the total coagulation time (820.00 ± 1.15 s), maximum coagulation velocity (0.232 ± 0.003), the permeability coefficient of clot [$(1.108 \times 10^{-6}) \pm 0.151$] compared to homocysteine at 200 µM [555.00 ± 12.89, 0.258 ± 0.008, $(0.493 \times 10^{-6}) \pm 0.038$, respectively] ($P < 0.05$). Homocysteine at 200 µM with aspirin 1 mg/l did not significantly change in either parameter ($P > 0.05$). Homocysteine at 100 µM with aspirin 1 mg/l significantly changed only in the permeability coefficient [$(0.787 \times 10^{-6}) \pm 0.071$] compared to homocysteine at 100 µM [$(0.636 \times 10^{-6}) \pm 0.053$] ($P < 0.05$).

Conclusion: Aspirin with the dose more than 1 mg/l had more effect on higher concentrations of homocysteine and delayed forming clot by impeding the coagulation. It increased clot permeability, too.

Keywords: Homocysteine, Aspirin, Coagulation, Permeability

Citation: Zavar-Reza J, Danesh-Pouya F, Jalali B, Shahmoradi H. **In-Vitro Study of Homocysteine and Aspirin Effects on Coagulation and Clot Permeability.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(262): 1932-40

1- Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- Department of Biochemistry, School of Medicine, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Fahimeh Danesh-Pouya MSc, Email: daneshpouya@outlook.com