Archive of SID

پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال چهاردهم، شماره ۱، پی در پی ۷۹، صفحات ۳۹ تا ۴۱
فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۴/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۱۶

آیا اندازه‌گیری دقیق پارامترهای بیوشیمیایی سرم‌های لیپمیک مقدور است؟

دکتر هوشنگ امیررسولی[1*]، ناصر ولائی[2]

۱. دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. عضو هیأت علمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: وجود لیپید با غلظت بالا در سرم بیماران هیپرلیپمیک منجر به مخدوش کردن نتایج پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نمونه سرم این بیماران می‌شود. با توجه به در دسترس نبودن و گران بودن روش استاندارد اولتراسانتریفوژ جهت جدا کردن لیپید در این موارد و براساس تجربیات شخصی در حذف لیپیدهای این نمونه‌ها به روش استخراج با حلال اتیل استات، این تحقیق در سال ۱۳۸۸ انجام گرفت.

مواد و روشها: ابتدا ۴۵ نمونه سرم نرمال انتخاب شد و پس از تعیین سیزده پارامتربیوشیمیایی در آنها، به آنها لیپید افزوده شد. پس از تأیید لیپمیک بودن آنها، دو سری نمونه از آنها انتخاب شد؛ لیپید قسمت اول به روش استخراج با اتیل استات و قسمت دوم با روش استاندارد اولتراسانتریفوژ از نمونه جدا شد و مجدداً پارامترهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. مقادیر به‌دست آمده از این دو روش با آزمون T مکرر مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: در آزمایشات، نرمال بودن پارامترهای بیوشیمیایی در نمونه اولیه و غیر نرمال بودن پارامترها پس از افزودن لیپید تأیید شد. تفاوت نتایج اندازه‌گیری پارامترهای اعلام شده پس از استخراج لیپید به روش اتیل استات با روش استاندارد اولتراسانتریفوژ از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p> ۰/۶$). با اینکه میزان اوره در روش استخراج کمتر و ALT بیشتر از نمونه اولتراسانتریفوژ بود ($p< ۰/۰۵$) ولی مقادیر دو پارامتر فوق در روش اتیل استات به مقادیر آن در نمونه اولیه نزدیکتر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استخراج لیپید نمونه‌های لیپمیک با حلال اتیل استات مقدور می‌باشد و تحقیقات بیشتر را توصیه می‌نماید.

واژگان کلیدی: هیپرلیپیدمی، لیپمیک، پارامترهای بیوشیمیایی، اتیل استات

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Amirrasouli H, Valai N. Is there a possible way to accurately determine biochemical parameters in lipemic specimens? Pejouhandeh 2011;16(1):39-41.

مقدمه

یکی از دغدغه‌ها و نگرانی پزشکان و آزمایشگاهها اندازه‌گیری دقیق پارامترهای سرم‌های لیپمیک است. زیرا تری‌گلیسرید بالای ۴۰۰ mg/dl به عنوان نمونه لیپمیک در آزمایشهای بیوشیمی بالینی مزاحمت ایجاد می‌کند (۴-۱). روزانه مواردی از نمونه‌های لیپمیک در آزمایشگاهها دیده می‌شود که به‌علت بالا بودن لیپید نمونه، انجام آزمایشات بیوشیمیایی با دقت قابل قبول امکان‌پذیر نمی‌باشد؛ زیرا لیپید به‌علت ایجاد کدورت و تغییر جذب نوری واکنش نهایی، غلظت پارامترهای مورد اندازه‌گیری را به‌طور کاذب تغییر می‌دهد (۲).

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر هوشنگ امیررسولی؛ تهران، میدان قدس، اول خیابان دربند، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، گروه علوم آزمایشگاهی، تلفن: ۲۲۷۱۸۵۳۱ -۲۱- ۹۸+
پست الکترونیک: houshangan@mail.sbmu.com

به‌علاوه به‌علت جایگزینی چربی با آب سرم میزان الکترولیت‌ها که در آب سرم محلول‌اند به همان نسبت کاهش پیدا می‌کند (۵). برای از بین بردن دخالت چربیهای بالا روش استاندارد، استفاده از دستگاه اولتراسانتریفوژ می‌باشد. با این روش چربیها از بقیه سرم جدا شده و در نتیجه تجزیه پارامترهای بیوشیمیایی مقدور خواهد شد (۶). اما به‌علت گرانی و در دسترس نبودن دستگاه اولتراسانتریفوژ استفاده از آن مقدور نمی‌باشد. طبعاً عدم امکان اندازه‌گیری دقیق پارامترهای بیوشیمیایی عوارض شناخته شده خود را دارد (۹-۷). سؤال این است که آیا امکان دارد که با روشهایی چربیهای سرم را جدا کرده و سرم عاری از چربیها را مورد تجزیه قرار داد؟ به نظر می‌آید چون چربیها در بعضی حلالهای شیمیایی قابل استخراج هستند پاسخ این سؤال مثبت باشد و نیز در یک مطالعه آزمایشی پاسخ سؤال نیز مثبت بود. اما نگرانی این

www.SID.ir

Archive of SID

است که با این عمل آیا مقدار پارامترهای بیوشیمیایی مورد اندازه‌گیری تغییر می‌کنند یا خیر. برای پاسخ به این سؤال و به‌منظور مقایسه نتایج پارامترهای بیوشیمیایی سرم‌های لیپمیک در روش حلال اتیل‌استات با روش استاندارد اولتراسانتریفوژ، این تحقیق روی نمونه‌های مراجعه‌کننده به دانشکده پیراپزشکی شهید بهشتی و بیمارستان مهراد در سال ۱۳۸۸ انجام یافت.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. تعداد ۴۵ نمونه سرم نرمال افراد (نمونه A) انتخاب گردید. میزان پارامترهای سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، فسفر، گلوکز، اوره، اسیداوریک، کراتینین، آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، کلسترول، و تری گلیسرید با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و دستگاه RA1000 و فلم فوتومتر به‌دست آمد. برای اندازه گیری پایایی (Reliability)، شش نمونه از طریق Test retest بررسی شد و عدد بدست آمده برابر ۹۶٪ بود.

سپس به تمام این نمونه‌ها به ازاء هر یک میلی لیتر سرم، ۱۰۰ میکرولیتر intralipid اضافه شد، به طوری که تری‌گلیسرید نمونه‌ها به هزار میلی گرم درصد رسید و پارامترهای فوق مجدداً مورد آزمایش قرار گرفت و مقادیر آن ثبت گردید (B). در مرحله بعد به کلیه نمونه‌ها اتیل‌استات به نسبت ۱ میلی‌لیتر سرم + ۲ میلی‌لیتر اتیل‌استات اضافه شد (نمونه C). پس از مخلوط کردن با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و لایه اتیل استات و سرم از هم جدا و آزمایشات به همان روش قبل روی سرم تکرار گردید و مقادیر آنها بررسی و ثبت گردید. ده نمونه از نمونه‌های لیپیدی (B) جهت تعیین validity روش استخراج با اتیل‌استات، با استفاده از روش gold standard اولتراسانتریفوژ در بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران بررسی شد و نتیجه ثبت گردید (نمونه D). مقادیر به‌دست آمده تمام ۱۳ پارامتر در سه مرحله آزمایشات با آزمون T-test دو به دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت و همچنین نسبت A/C و A/D نمونه تعیین و گزارش گردید.

یافته‌ها

تحقیق روی ۴۵ نمونه انجام گرفت. مقادیر پارامترهای بیوشیمیایی برحسب مراحل آن در جدول ۱ ارائه شده است و نشان می‌دهد که در مرحله B که لیپید اضافه شد، مقادیر سدیم، پتاسیم، و منیزیم به طور معنی‌داری کاهش (P<۰/۰۱) و ۱۰ پارامتر بیوشیمیایی دیگر افزایش یافت (P<۰/۰۱).

در مقایسه روشهای حذف لیپید دیده شد که اختلاف میان مقادیر اندازه‌گیری شده در دو روش، در مورد ۹ شاخص سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، فسفر، گلوکز، اسید اوریک، کراتینین، AST، معنی‌دار نبود (P< ۰/۴). به‌علت حذف دو پارامتر کلسترول و تری‌گلیسرید در روشهای استخراج با اتیل‌استات و اولتراسانتریفوژ، این دو پارامتر مورد اندازه‌گیری قرار نگرفت. اما اوره به‌میزان ۷ واحد کمتر از میزان واقعی بود و آزمون نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵) و نیز میزان ALT در روش حذف لیپید توسط اتیل استات به میزان ۵ واحد (۲۱/۷٪) کمتر بود (P<۰/۰۵). ضمن اینکه اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی فوق در روش حذف لیپید با اتیل‌استات نه تنها مقدور بود، بلکه به مقادیر اولیه آنها نیز نزدیکتر بود (جدول ۱).

بحث

تحقیق نشان داد استخراج لیپید توسط اتیل‌استات تأثیری روی پارامترهای مورد مطالعه نداشته است. در بررسی مقالات، تحقیقی که تأثیر اتیل استات و سایر حلالهای شیمیایی را روی نمونه‌های لیپمیک بررسی و گزارش کرده باشد مشاهده نشد و یا در دسترس نبود تا امکان مقایسه وجود داشته باشد.

جدول ۱- مقایسه غلظت پارامترهای بیوشیمیایی در شرایط متفاوت

آنالیت	Serum A	A+lipid	A+lipid+EA*	اولتراسانتریفوژ	P value	A/B	A/D
سدیم	۱۴۴±۲/۴	۱۲۸±۶/۲	۱۴۱±۲/۶	۱۴۲±۲/۲	P<۰/۹	۱/۰۲	۱/۰۱
پتاسیم	۴/۸±۰/۱۵	۳/۶±۰/۱۳	۴/۶±۰/۱۱	۴/۴±۰/۱۳	P<۰/۹	۱/۰۴	۱/۰۹
منیزیم	۱/۸±۰/۳۱	۱/۱±۰/۲۹	۱/۷±۰/۳۳	۱/۵±۰/۳۱	P<۰/۴	۱/۰۵	۱/۲
کلسیم	۹/۲±۰/۸۱	۱۴±۱/۱	۸/۹±۰/۷۲	۹/۶±۰/۷۹	P<۰/۴	۱/۰۳	۰/۹۵
فسفر	۳/۹±۰/۲۱	۶/۱±۰/۳۳	۳/۵±۰/۲۵	۳/۶±۰/۲۷	P<۰/۹	۱/۱	۱/۰۸
گلوکوز	۹۶±۲/۱	۱۶۶±۸/۲	۹۰±۲/۶	۹۹±۲/۹	P<۰/ ۶	۱/۰۶	۰/۹۶
اوره	۲۹±۱/۱	۵۵±۱/۹	۲۴±۱/۳	۳۲±۱/۶	P< ۰/۰ ۵	۱/۲	۰/۹۰
اوریک اسید	۵/۱±۰/۴۱	۸/۹±۰/۷۱	۴/۸±۰/۵۳	۵/۴±۰/۶۱	P<۰/۲	۱/۰۶	۰/۹۴
کراتینین	۱/۱±۰/۲۶	۲/۳±۰/۲۹	۱/۳±۰/۳۱	۱/۳±۰/۲۹	P<۰/۹	۰/۸۴	۰/۸۴
SGOT(AST)	۲۶±۱/۴	۱۱۵±۶/۳۶	۲۹±۲/۸	۲۸±۲/۷	P<۰/۸	۰/۸۹	۰/۹۴
SGPT(ALT)	۲۱±۱/۶	۱۰۹±۵/۶	۱۸±۱/۵	۲۵±۱/۶	P<۰/۰ ۵	۱/۱۶	۰/۸۴
کلسترول	۲۱۵±۵/۴	۲۵۱±۱۵/۲	-	-		-	-
تری‌گلیسرید	۱۶۶±۳/۹	۹۸۷±۷۲/۰	-	-		-	-

*EA: اتیل استات

www.SID.ir

Archive of SID

اما سؤال این است که چگونه و با چه مکانیزمی اتیل‌استات در اندازه‌گیریهای بیوشیمیایی تأثیر نگذاشته است. شاید دلیل اصلی، عدم تجزیه و مخلوط شدن آن با سرم باشد. اتیل‌استات حلال شناخته شده شیمیایی در استخراج چربیها است (۱۰ و ۱۱) و نقش آن تنها جدا کردن چربیها و از بین بردن کدورت حاصل از آنها در نمونه‌های سرم بود؛ کما اینکه در نمونه‌های C، چربیها به‌خوبی از نمونه‌های سرم استخراج شده است؛ و منطقاً نباید روی پارامترهای دیگر اثر کاذب داشته باشد.

این تحقیق دارای محدودیتهایی بود که مهمترین آنها اضافه کردن مقادیر دستی چربی به نمونه‌های سرم برای ایجاد لیپمی بود که طبعاً اعتبار خارجی بالینی ندارد. ولی این تحقیق دارای اعتبار درونی است به دلیل اینکه کار در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است و چنانچه به ما آموخته‌اند، ابتدا باید اعتبار درونی و سپس بیرونی حفظ شود. پیشنهاد می‌شود این تحقیق روی نمونه‌های بیماران با لیپیدمی انجام شود تا مشخص شود آیا استفاده از محلول اتیل استات در اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی دارای ارزش می‌باشد یا خیر. یکی دیگر از کاستی‌های این تحقیق به کارگیری پارامترهای بیوشیمیایی در سرم‌های نرمال بوده است که انحراف معیار آنها کم بوده است، در حالی که ممکن است در افرادی با غلظت پارامترهای غیرنرمال و هیپرلیپمی نتایج غیر از این باشد. از طرف دیگر این تحقیق دارای جنبه‌های مثبتی بود، از قبیل تعداد نمونه بالا (۴۵ نمونه) که در این تحقیق استفاده شد و نیز تمام روشهای اندازه‌گیری شاخصهای سیزده‌گانه که روشهای استاندارد و معتبر بودند و پایایی همه این روشها با برنامه‌های کنترل کیفی موجود بررسی و ارزیابی شد. از همه مهمتر اینکه مورد C با روش استاندارد D و به‌صورت کور با استاندارد طلایی مورد مقایسه قرار گرفت. در هر حال در یک جمع‌بندی به نظر می‌رسد پاسخ سؤال مطروحه یعنی اینکه آیا اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم‌های لیپمیک مقدور است حداقل در شرایط انجام شده مثبت است.

یکی از امتیازات این روش این است که بر عکس روش اولتراسانتریفوژ می‌تواند همه چربیها را بدون توجه به وزن مولکولی آنها جدا نماید در حالیکه در روش اولتراسانتریفوژ مولکول‌های کوچک چربی جدا نمی‌شوند (۵). امتیاز دیگر آن نیز استفاده از محلول ارزان اتیل‌استات است که هزینه آزمایش را زیاد افزایش نمی‌دهد و از همه مهمتر اینکه در هر آزمایشگاهی قابل انجام می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتیجه این تحقیق نشان می‌دهد برای حذف اثر لیپید در نمونه‌های هیپرلیپمیک جهت جلوگیری از مخدوش نمودن نتایج پارامترهای بیوشیمیایی، می‌توان با اطمینان از روش استخراج لیپید با اتیل استات استفاده کرد. این روش به علت ساده بودن و ارزان بودن به طور روتین در هر آزمایشگاهی قابل انجام است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که امکان استفاده از دستگاه اولتراسانتریفوژ را فراهم آوردند صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نماید.

.

REFERENCES

1. Randall AG, Garcia-Webb P, Beilby JP. Interference by haemolysis, icterus and lipaemia in assays on the Beckman Synchron CX5 and methods for correction. Ann Clin Biochem 1990;27(Pt4):345-520.

2. Grafmeyer D,Bondon M, Manchon M,Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. Eur J Clin Chem Clin Biochem1995;33(1):31-52.

3. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJ, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CH. Multicenter evaluation of the interference of hemogolobin, bilirubin and lipids on synchron LX-20 assays. Clin Chem Lab Med 2006;44(4):413-9.

4. Von Schenck H, Lennmarken C, Larsson J. The Effect of fat emulsion on some common clinical chemical analyses. Clin Nutr 1989;8(2):79-81.

5. Dimeski G, Mollee P, Carter A. Effects of hyperlipidemia on plasma sodium, potassium, and chlorid measurements by an Indirect Ion-Selective Electrode Measuring System. Clin Chem 2006;52(1):155-6.

6. Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-Specific Differences in Lipemic Interference in Native and Intralipid-Supplemented Samples. Clin Chem 2004;50(11):2197-201.

7. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the Prediction of atherosclerotic disease. New Perspectives based on the Framingiam study. Ann Intern Med 1979:90(1):85-91.

8. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, Cardiovascular disease and death. The Framingham study. Arch Intern Med 1981;141(9):1128-31.

9. Assmann G, Schutle H. Relation of high- density lipoprotein cholesterol and triglycerids to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the Procam experience).Prospective cardiovasular Munster study. AM J cardiol 1992;70(7):733-77.

10. Whiteley GS, Fuller BJ, Hobbs KEF. Lipid Peroxidation in liver tissue specimens. Cryo Letters 1992;13:83-6.

11. Imberg A. On the microstructures of ethyl acetate / monoolein / water. Colloids Surf B Biointerfaces 2006;53(2):233-40.

www.SID.ir