Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاداسلامی
سال ١٤ ، شماره ١، صفحات ٢٩ تا ٣٤ (پاییز٨٣)

Orginal Article

ارزیابی متغیرهای اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله با روش کالریمتری

*دکتررضا محمدی[١] مریم شیخ زاده[١] وجیهه نوروزی[١]

[١]گروه بیوشیمی دانشگاه آزاداسلامی واحدپزشکی تهران

چکیده :

هدف : دراین مطالعه اندازه گیری عوامل متعددی که روی نتایج حاصل از روش کالریمتری اندازه گیری هموگلوبینی A_{1c} (HbA_{1c}) اثر دارند ، مورد بررسی قرارگرفته است . هموگلوبین A_{1c} (HbA_{1c}) به عنوان بخش اصلی هموگلوبین گلیکوزیله درگردش خون قابل اعتمادترین روش ارزیابی درمان هیپرگلیسمی درمبتلایان به دیابت می باشد.

روش بررسی: روش کالریمتری اندازه گیریHbA_{1c} براساس آزادسازی گلوکز اتصال یافته به هموگلوبین درحرارت جوش به شکل ٥- هیدروکسی متیل فورفورال (5HMF) و اندازه گیری آن دریک واکنش رنگی با اسید تیوباربیتوریک (TBA) می باشد.این روش تحت تأثیر متغیرهای مختلفی قراردارد.

نتایج : مطالعه حاضرنشـان دادکه محلول TBA برای مدت ١ ماه حداقل در٤ درجه سانتی گراد پایدار می باشد.اما کاهش زمان جوش از ٥ ساعت به ١ساعت شدت رنگ حاصل را تا ٤٢٪ کاهش می دهد.به همین ترتیب ، کاهش زمان ودرجه حرارت انجام دادن واکنش رنگی به ترتیب از ٤٠ دقیقه به ١٥ دقیقه واز ٥٠ درجه سانتی گراد به ٢٥ درجه سانتی گراد موجب کاهش ٢٩٪ و٦٣٪ در شدت رنگ می شود. علاوه برآن ، رنگ حاصل درحرارت اتاق ناپایدار بوده وظرف ٤٠ دقیقه تا ٥٣٪ کاهش می یابد.

نتیجه گیری : براساس نتایج به دست آمده برای اندازه گیری HbA_{1c}باروش کالریمتری ، استفاده از٥ ساعت حرارت جوش ، واکنش رنگ زایی به مدت ٤٠ دقیقه درحرارت ٥٠ درجه سانتی گراد وخواندن سریع جذب نوری توصیه می گردد.

کلیدواژه ها : ١- دیابت ٢- هموگلوبین گلیکوزیله / HbA_{1c} ٣- اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله

مقدمه :

بیماری دیابت شایـع ترین ناهنجاری غدد درون ریز بوده و مقدار گلوکزخون بیش ترین نقش را دربروز عوارض بیماری دیابت داردبنابراین کنترل وتنظیم قند خون درمبتلایان به دیابت ازاهمیت زیادی برخوردارمی باشد. (١) با توجه به این که میزان قندخون افراد دیابتی تابعی از میزان غذای مصرفی ، فعالیت بدنی وروش درمان می باشد، اندازه گیری قندخون درطول روز به تنهایی نمی تواند معیار قابل اعتمادی برای ارزیابی درمان درنظرگرفته شود بنابر برای کنترل درمان نیاز به روشی است که کم تردچار تغییرات روزانه گردد.اندازه گیری مقدار هموگلوبین A_{1c} (HbA_{1c}) به عنوان بخش اصلی هموگلوبین گلیکوزیله ، قابل اعتمادترین روش برای ارزیابی درمان هیپرگلیسمی درمبتلایان به دیابت می باشد. (٢) HbA_{1c} به دنبال اتصال گلوکز به زنجیر بتا هموگلوبین ایجاد می گردد.کمپلکس حاصل درابتدا به شکل $pre\text{-}HbA_{1c}$ ناپایدار بوده وبه تدریج به شکل پایدار HbA_{1c} تبدیل می شود بنابراین به دنبال تغییرات کوتاه مدت مقـدارگلـوکـز خـون احتـمال ایـجاد $pre\text{-}HbA_{1c}$ وتجزیه آن وجود دارد اما با ثابت ماندن میزان گلوکز،

www.SID.ir

Archive of SID

HbA_{1c}پایدار ایجاد می شودو تازمان تخریب گلبول قرمز وتجزیه هموگلوبین هم چنان پایدار خواهد ماند.(۳) با توجه به طول عمر حدود ۱۲۰ روزگلبول های قرمزطبیعی ، میزان HbA_{1c} موجود در گردش خون انعکاسی ازگلوکز خون درطی ۱ تا ۲ماه گذشته می باشد.(٤)

تاکنون روش های متعددی برای اندازه گیری HbA_{1c} مطرح شده ومورد استفاده قرارگرفته است . نتایجی که با استفاده از روش های مختلف گزارش می گردد،اختلاف قابل توجهی دارند ومقایسه نتایج حاصل ازآزمایشگاه های مختلف مشکل می باشد.عدم وجود استاندارد مناسب ، حساسیت متفاوت روش ها و وجود عوامل مداخله گر مختلف ازعلل این تفاوت ها می باشند.(۵) متداول ترین روش اندازه گیری HbA_{1c} درآزمایشگاه های کشور، روش کالریمتری است . اساس این روش ، آزادسازی گلوکز متصل به هموگلوبین دریک محیط اسیدی ملایم به شکل ۵-هیدروکسی متیل فورفورال(5HMF) و تعیین مقدار آن براساس شدت رنگ حاصل از واکنش با اسیدتیوباربیتوریک (TBA) می باشد. دراین روش متغیرهای متعددی وجود دارندکه عدم توجه به آن ها ممکن است موجب بروز خطاهای قابل توجهی گردد.(٦) درمطالعه حاضر ، اثر این متغیرها برنتایج ، مورد ارزیابی قرارگرفته است .

روش بررسی :

- اسیداگزالیک mol/L ۰/۵ : ۳۱/۵ گرم اسید اگزالیک درmL ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می شود .این معرف برای ۲ هفته درحرارت اتاق پایداراست.

- اسیداگزالیک mol/L ۰/۲۵: مقدار ۱۰۰Ml محلول اسید اگزالیک mol/L ۰/۵ با ۱۰۰mLآب مقطر مخلوط می شود این معرف برای ۲ هفته درحرارت اتاق پایدار است .

- کلرید سدیم g/L ۹: میزان ۹ گرم کلرید سدیم در۱ لیتر آب مقطر حل می گردد .این معرف برای ۳ ماه درحرارت اتاق پایدار است.

- اسیدتری کلرواستیک g/L ٤۰۰ : میزان ٤۰۰ گرم اسید تری کلرواستیک در یک ظرف ۱ لیتری ریخته شده وپس از افزودن آب مقطربه آن و حل شدن حجم به ۱ لیتر رسانده می شود. این محلول ۳ ماه در ٤ درجه سانتی گراد پایدار است .

اسیدتیوباربیتوریک mmol/L ۵۰: مقدار ۰/۷۲ گرم اسید ۲- تیوباربیتوریک را در mL ۱۰۰ آب مقطر حل شده و با استفاده ازمحلول سود pH,1mol/L به٦/۰ رسانده می شود . این معرف حداقل ۱ ماه دریخچال پایدار می باشد.

- اندازه گیری HbA_{1c} : ابتدا نمونه خون وریدی با ضدانعقاد اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) با غلظت۲ میلی گرم درمیلی لیتر تهیه می شود وبعدازسانتریفوژبا دور g ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه ، پلاسمای آن جدا می گردد.نمونه فاقد پلاسما در۳نوبت با محلول سالین شست وشو داده می شود.بدین منظورپس از اضافه کردن ۱۰ میلی لیترمحلول سالین به لوله سانتریفوژ ومخلوط کردن سلول هابا سالین ، سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در g۲۰۰۰ صورت می گیردو پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً تخلیه می گردد این شست و شو به همین طریق ۲باردیگر تکرارمی شود ودرآخرین مرحله شست و شو، تخلیه مایع رویی به طور کامل صورت می گیرد تا گلبول های قرمز متراکم با حداقل محلول ، به دست آید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه خون متراکم به ۱/٤ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده وکاملاً مخلوط می گردد تاتمام گلبول های قرمز لیزشده وهمولیزات حاصل شود.درمرحله بعد دریک لوله درپیچ دار ۱/۰ میلی لیتر همولیزات با ۰/۵ میلی لیتر محلول اسید اگزالیک mol/L ۰/۵ مخلوط وبعدازبستن درآن ، لوله به مدت ۱ ساعت دربن ماری جوش قرارداده می شود .بعد ازخنک شدن ،میزان۱/۰میلی

www.SID.ir

Archive of SID

لیتر محلول اسید تری کلرواستیک به لوله اضافه شده وبعداز مخلوط کردن ، سانتریفوژ درg۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه صورت می گیرد تا پروتئین های موجود درنمونه رسوب نمایند.برای انجام دادن واکنش رنگی، ۱/۵میلی لیتر مایع رویی با ۰/۵ میلی لیتر محلول TBA مخلوط شده وبه مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری $40^{\circ}C$ قرارداده می شود . درنهایت ، شدت رنگ حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج ٤٤٣ نانومتر درمقابل بلانک خوانده می شود.
برای تهیه بلانک نیز ۱/۰ میلی لیتر محلول اسید اگزالیک ۰/۲۵mol/L با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۱/۰میلی لیتر معرف اسیدتری کلرواستیک مخلوط می گردد.(۶)
درپایان نتایج به صورت جذب نوری (OD) بیان شدند.

نتایج :

متغیرهای متعددی درروش کالریمتری اندازه گیری HbA_{1C}وجود دارندکه برای به دست آوردن نتایج قابل تکرار ، باید تحت کنترل قرارگیرند.
در این مطالعه پایداری TBA ، مدت زمان جوش برای تولید 5HMF ، مدت زمان رنگ زایی ، دمای مناسب برای رنگ زایی وپایداری رنگ تولیدی ، مورد ارزیابی قرارگرفتند.
برای ارزیابی هریک از این متغیرها ، سایر متغیرها ثابت نگه داشته شدند ومتغیرمورد نظردرحالات مختلف مورد بررسی قرارگرفت.
- پایداری TBA : بعدازتهیه محلول TBA، ازآن برای انجام دادن واکنش رنگی طی ٤ هفته متوالی استفاده گردید.درطی این مدت ،محلول TBA در دمای ٤درجه سانتی گراد نگه داری شد. نتایج حاصل از انجام دادن۱۰ بار آزمایش روی یک نمونه درجدول شماره ۱ آورده شده است، هیچ تفاوت معنی داری بین نتایج به دست نیامد.

جدول شماره ۱. نتایج حاصل ازبررسی پایداری TBA

محلولTBA	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
محلول تازه تهیه شده	۱۰	٤۹/۷	۰/٤۸	۰/۹٦
بعداز۱ هفته	۱۰	٤۹/۵	۰/۵۲	۱/۰۵
بعداز۲هفته	۱۰	٤۹/٤	۰/۵۱	۱/۰۳
بعداز۳ هفته	۱۰	٤۸/۷	۰/۳۵	۰/۷
بعداز٤هفته	۱۰	٤۸/٦	۰/۳۹	۰/۸

مدت زمان جوش : آزمایش درشرایط مشابه در۳۵ لوله انجام شد.بااین تفاوت که لوله ها به ۵ گروه تقسیم شدندولوله های سری اول تاپنجم به ترتیب۱، ۲،۳، ٤ و۵ ساعت درمعرض حرارت جوش قرارگرفتند.
نتایج حاصل درجدول شماره۲ آورده شده است.همان گونه که ملاحظه می گردد، باکاهش زمان جوش ، شدت رنگ حاصل نیزکم ترمی شود.به طوری که با حرارت جوش ۱ ساعته تنها ۵۸٪ از شدت رنگ حاصل ازحرارت جوش ۵ ساعته به دست آمد.

جدول شماره ۲. نتایج حاصل ازبررسی زمان جوش

مدت زمان جوش	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصدرنگ تولیدی
۱ ساعت	۷	۸/۵۳	۰/٦۲	۷/۳	۵۸
۲ساعت	۷	۱۰/۳	۰/۳۵	۳/٤	۷۱
۳ ساعت	۷	۱۰/۵	۰/٤۱	۳/۸	۷۲
٤ساعت	۷	۱۲/۰	۰/٤۸	٤/۰	۸۲
۵ ساعت	۷	۱٤/٦	۰/٤۸	۳/۲	۱۰۰

مدت زمان انجام دادن واکنش رنگی: آزمایش درشرایط مشابه در۵۰ لوله انجام شد، با این تفاوت که لوله ها به ۵ گروه مختلف تقسیم شدند و لوله های سری اول تاپنجم به ترتیب به مدت ۱۵،۲۰، ۲۵،۳۰و۴۰ دقیقه دردمای ٤۰ درجه سانتی گراد قرارداده شدند.
نتایج حاصل درجدول شماره۳ آورده شده است همان طورکه ملاحظه می گردد، باکاهش مدت زمان انجام دادن

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش ، شدت رنگ حاصل نیز کم تر می شود. بطوری که بازمان ۱۵ دقیقه ، ۷۱٪ شدت رنگ حاصل از زمان ٤٠ دقیقه به دست می آید.

جدول شماره ۳. نتایج حاصل از بررسی زمان انجام دادن واکنش رنگی

مدت زمان قراردادن در ٤٠°C	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصد رنگ تولیدی
۱۵ دقیقه	۱۰	۲۵/۹	۰/۸۸	۳/۳	۷۱
۲۰دقیقه	۱۰	۲۸/۹	۰/۳۲	۱/۱	۸۰
۲۵ دقیقه	۱۰	۳۱/٤	۰/۷۰	۲/۲	۸۷
۳۰دقیقه	۱۰	۳۵/۷	۰/٤۸	۱/۳	۹۸
٤۰دقیقه	۱۰	۳٦/۳	۰/٦۸	۱/۹	۱۰۰

درجه حرارت انجام دادن واکنش رنگی . آزمایش درشرایط مشابه در۷۰ لوله انجام شد، با این تفاوت که لوله ها به ۷ سری تقسیم شدند ولوله های سری اول تاهفتم به ترتیب در دما های ۲۵، ۳۵،۳۰، ٤۵،٤۰،۳۷ و۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

نتایج حاصل در جدول شماره٤ آورده شده است. همان گونه که مشاهده می شود .

با کاهش درجه حرارت انجام دادن واکنش ، شدت رنگ حاصل نیزکم تر می شود.

به طوری که شدت رنگ حاصل ازدمای ۲۵ درجه سانتی گراد، تنها۳۷٪ شدت رنگ به دست آمده ازدمای ۵۰ درجه سانتی گراد می باشد.

جدول شماره ٤. نتایج حاصل ازبررسی دمای انجام دادن واکنش رنگی

درجه حرارت	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصد رنگ تولیدی
۲۵ درجه سانتی گراد	۱۰	۱٦/٤	۰/۵۲	۳/۱	۳۷
۳۰ درجه سانتی گراد	۱۰	۲۵/۲	۰/٤۸	۱/۹	۵٦
۳۵ درجه سانتی گراد	۱۰	۳۰/٦	۰/۵۲	۱/٦	٦۸
۳۷ درجه سانتی گراد	۱۰	۳۱/۸	۰/۵٤	۱/۷	۷۱
٤۰درجه سانتی گراد	۱۰	۳٦/۲	۰/۳٤	۰/۹	۸۱
٤۵ درجه سانتی گراد	۱۰	٤۳/۱	۰/۵۲	۱/۱	۹٦
۵۰درجه سانتی گراد	۱۰	٤٤/۷	۰/٦٤	۱/۵	۱۰۰

پایداری رنگ تولید شده دردمای اتاق: آزمایش درشرایط مشابه در ۱۰ لوله انجام شد.بعدازقراردادن لوله ها به مدت ٤۰ دقیقه دربن ماری ٤۰ درجه سانتی گراد جهت انجام دادن واکنش رنگ زایی، بلافاصله وهم چنین درفاصله زمانی ۲۰،۱۵،۱۰،۵، ۳۰و ٤۰ دقیقه بعدازخروج لوله ها از بن ماری ، مقادیر جذب نوری خوانده شد.

درطی این مدت لوله ها در دمای اتاق قرارداشتند.نتایج به دست آمده درجدول شماره ۵ آورده شده است. همان طورکه ملاحظه می گردد، رنگ حاصل دردمای محیط فاقد پایداری بوده وبه تدریج شدت آن کاهش می یابد. به طوری که این کاهش بعداز٤۰ دقیقه درحرارت اتاق ۵۳٪ می باشد.

جدول شماره ۵. نتایج حاصل ازپایداری رنگ در دمای اتاق

دما	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصدکاهش رنگ
زمان: صفر	۱۰	۳٦/۳	۰/٦۸	۱/۹	صفر
زمان : ۵ دقیقه	۱۰	۳۰/۵	۰/۷۸	۲/۵	۱٦
زمان:۱۰ دقیقه	۱۰	۲٤/۸	۰/۹۵	۳/۸	۳۲
زمان :۱۵ دقیقه	۱۰	۲۲/٦	۱/۱٤	۵/۱	۳۸
زمان:۲۰ دقیقه	۱۰	۲۱/۷	۰/۵۵	۲/۵	٤۰
زمان:۳۰ دقیقه	۱۰	۱۸/۹	۰/۵۷	۳/۰	٤۸
زمان:٤۰ دقیقه	۱۰	۱۷/۱	۰/۷۸	٤/٦	۵۳

بحث

باوجود آن که روش کالریمتری اندازه گیری HbA_{1C} امروزه بندرت توصیه شده وازکتب مرجع نیز حذف شده است .(٤)

متأسفانه هنوزاغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی موجود درایران ازاین روش استفاده می کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

یکی ازمشکلات عمده این روش ، وجود متغیرهای متعدد می باشدکه خود ناشی ازنیازبه انجام دادن مراحل کاری متعدداست.میزان آزادسازی 5HMF ازHbA_{1C} شدیداً تحت تأثیر شرایط ومدت زمان جوش می باشد.

هیدرولیز درشرایط اسیدی ملایم موجب به آزادشدن تمام گلوکز متصل به هموگلوبین نمی شود،درحالی که با استفاده از شرایط اسیدی قوی ، آزادسازی گلوکز بهتر انجام شده ، اما دراین شرایط 5HMF تولید شده تخریب می گردد(٦).

ازسوی دیگر ، زمان مورد نیاز برای آزادسازی گلوکز اتصال یافته به هموگلوبین به شکل 5HMF بسیار طولانی بوده وحتی با دمای جوش ۵ ساعته نیز میزان این آزادسازی کامل نمی باشد، علاوه برآن ،افزایش زمان جوش خود می تواند موجب تخریب 5HMF تولیدشده گردد.(٦)نتایج نشان می دهندکه وقتی دمای جوش به ۱ ساعت کاهش می یابد، میزان آزادسازی 5HMF نسبت به دمای جوش ۵ ساعته حدود ٤۲٪ کاهش نشان می دهد. دراین مورد ، دامنه مقادیر به دست آمده و حساسیت آزمون کم تر می شود.استفاده از زمان های جوش متفاوت درروش های شیمیایی، یکی از علل عمده تفاوت بین نتایج آزمایشگاه های مختلف می باشدکه مقایسه را غیرممکن می نماید.شدت رنگ حاصل درمرحله رنگ زایی وابستگی زیادی به دمای انجام دادن آن دارد.ازسوی دیگر وقتی واکنش رنگی در دمایی بیش از دمای اتاق انجام شود، پایداری رنگ در دمای اتاق پایین بوده ومیزان جذب نوری با گذشت زمان کاهش قابل توجهی را نشان می دهد.

ازاین رو یا بایدمرحله رنگ زایی در دمای اتاق انجام شودکه دراین حالت میزان واکنش رنگی کم خواهدبود،یا این که بلافاصله بعدازخروج لوله ها از بن ماری، میزان جذب نوری خوانده شود.

مطالعه انجام شده نشان می دهدکه برای دست یابی به نتایج قابل تکرار لازم است تمام متغیرهای موجود درآزمون کالریمتری سنجش HbA_{1C} شدیداً تحت کنترل اشند.ازسوی دیگر لازم است آزمایشگاه ها ازروش های یکسانی استفاده کنند تا نتایج گزارش شده توسط آزمایشگاه های مختلف قابل مقایسه باشند. هرچند، باتوجه به مشکلات موجود، امروزه روش کالریمتری اندازه گیری HbA_{1C} کنارگذاشته شده است وبجای آن روش HpLC توصیه می گردد. شاهد این ادعا ، حذف این روش ازکتب معتبربیوشیمی بالینی (٤و٥) وعدم وجودمقالات جدیدتردراین زمینه می باشد.

تشکروقدردانی: بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه آزاداسلامی واحدپزشکی تهران ، سرکارخانم فاطمه کریمی وسرکارخانم شکوه چیپورنژاد که دراین اجرای طرح هم کاری نمودند، تشکر وقدردانی شده وبرای ایشان آرزوی موفقیت می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCE:

1. Little R.,Wiedmeyer H.,England ;James M.Jacobson ; Frank H.Wians, Jr ; David E.GoldsteinInterlaboratoryStandardazation of Measurments of Glycohemoglobins. Clinical Chemistry 1992;38: 2472-8.

2. Tahara Y. and Shima K. Kinetics of HbA_{1c},GLycatedAlbumin,and ructosamine and Analysis of Their Weight Functions Against preceding Plasma Glucose Level.Diabetics Care1995;18: 440-7.

3. Hall M. Carbohydrates. In: Anderson S. and Cockayne S. Clinical Chemistry.lst Edition.New York; McGraw-Hill;2003: 153-78.

4. Standefer J.Eaton P.Evaluation of a Colorimetric Method for Determination of Glycosylated Hemoglobin. Clinical Chemistry. 1983;29: 135-140.

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract

Evaluation of a Colorimetric Method in Glycated Hemoglobin measurment

*R . Mohammadi Ph.D [I] M.Sheikhzadeh B.S [II] V.Norouzi B.S [II]

Objective:Measuring of hemoglobin A_{1c}(HbA_{1c})as the main glycated hemoglobin in circulation, is the most reliable method for evaluation of hyperglycemia control in diabetic patients.
Method:Colorimetric measuring method for HbA_{1c} is based on releasing glucose in 100°C as5-hydroxymethylfurfural(5HMF)and then measuring it in a colorimetric reaction with thiobarbituric acid (TBA).This method is affected by different variables.
Results: This study shows that TBA solution is stable at 4°c at least for one month. But by reducing the time of boiling from 5 hours to 1 hour, color intensity would decrease as much as 42% . On the other hand, reducing the time and temperature of colorimetric reaction from 40 to 15 minutes and 50 ° C to 25° C would result in 29% and 63% reduction in color intensity, respectively. In addition, developed color is unstable at room temprature and would decerase as much as 53% within 40 minutes.
Conclusion: With the colorimetric measurment of HbA_{1c} , it is recommended to use 5 hours boiling , colorimetric reaction in 50 ° C for 40 minutes,and rapid reading of optical density.

Key words: 1-Diabetes 2- Glycated hemoglobin / HbA_{1c} 3- Glycated hemoglobin Determination

[I] - Assistant professor of Biochemistry , Islamic Azad University Tehran Medical Unit(*corresponding Author)
[II] BS in Biochemistry

www.SID.ir