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

● مقالات تحقیقی (۷)

مقایسه روش اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم با سایر آزمونهای آزمایشگاهی برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن در اطفال

چکیده

کم‌خونی فقرآهن یک مشکل مهم سلامتی است. بهبود شرایط فقرآهن در اطفال از چند سال قبل مورد توجه محققان بوده است. در این پژوهش ما اهمیت اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم را برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن بررسی کردیم. هدف این تحقیق ارزیابی ارزش غربالگری پروتوپورفیرین سرم در اطفال است. تعداد ۷۹ کودک در فاصله سنی ۱۱-۶ سال مراجعه کننده به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشگاههای بابل که علایم کم‌خونی فقرآهن بروز داده بودند و سطح سرمی فری‌تین پایین داشتند، از بهمن ماه سال ۱۳۷۴ تا آذر ماه سال ۱۳۷۸ به عنوان گروه آزمون و از تعداد ۷۴ کودک در فاصله سنی ۱۲-۸ سال مراجعه کننده به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشگاههای بابل از بهمن ماه سال ۱۳۷۴ تا آذرماه سال ۱۳۷۸ که علایم کم‌خونی فقرآهن را بروز نداده بودند و سطح سرمی فری‌تین بالا داشتند به عنوان گروه شاهد، مقدار ۲ میلی‌لیتر خون در لوله‌های آزمایش تهیه شد. پروتوپورفیرن سرم با استفاده از اسپکتروفلورومتر RF-5000 اندازه‌گیری شد. در طول موج ۶۰۰-۴۰۰نانومتر اسکن گردید. هماتوکریت از طریق سانتریفوژ مورد بررسی قرار گرفت. فری‌تین سرم، اشباع شدن ترانسفرین، ظرفیت کل اتصال آهن و آهن سرم با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل سیسیل -CE) اندازه‌گیری شد. حساسیت روش پروتوپورفیرین ۹۳/۳درصد، ویژگی آزمایش ۹۱/۵درصد و ارزش پیش تشخیصی این روش برابر با ۶۸/۳درصد بود، که نسبت به سایر روشها برای تشخیص کم‌خونی ناشی از فقر آهن مناسبتر است و همچنین مقدار پروتوپورفیرین سرم در بیماران مبتلا به کم‌خونی فقرآهن ۴ برابر افراد شاهد بود و بین گروه شاهد و گروه بیماران اختلاف آماری

دکتر دردی قوجق
استادیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی بابل، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک

دکتر سیده ربابه علیجانپور
پزشک عمومی

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

معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که اندازه‌گیری مقدار پروتوپورفیرین سرم می‌تواند در غربالگری کم‌خونی ناشی از فقرآهن استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پروتوپورفیرین، کم‌خونی، فقرآهن، اسپکتروفلورومتری

مقدمه

تعدادی از آزمونهای آزمایشگاهی برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن در بین اطفال استفاده می‌شود، اما هر یک از آنها محدودیت‌هایی دارند، از جمله این آزمونها، بررسی هماتوکریت است، مشکل این آزمون این است، که فقط اطفال مبتلا به کم‌خونی شدید فقرآهن را شناسایی می‌کند و تعداد زیادی از اطفالی که هماتوکریت طبیعی دارند، به درمان با آهن پاسخ می‌دهند، که نشانه حساسیت کم برای حدود پایین مقادیر طبیعی هماتوکریت در تشخیص کم‌خونی فقرآهن است[۱،۲]. از طرفی بررسی هموگلوبین، شاخص گویچه‌های سرخ، فری‌تین سرم و درصد اشباع شدن ترانسفرین، روشهای پرزحمت و پرهزینه برای غربالگری می‌باشند[۳،۴]. بررسی توزیع سلولی و غلظت پروتوپورفیرین گویچه‌های سرخ به عنوان آزمونهای ساده برای تشخیص افتراقی کم‌خونی فقرآهن از سایر عوامل ایجاد کننده میکروسیتوز مانند تالاسمی مورد استفاده قرار گرفته است[۵،۶]. افراد مبتلا به التهاب سیستماتیک مزمن نیز علایم کم‌خونی را نشان می‌دهند که با مشخصات نارسایی متابولیسم آهن مطابقت دارد[۷،۸]. در افراد طبیعی بدون کم‌خونی فقرآهن مقدار پروتوپورفیرین کمتر از ۴۰ میکرومول در لیتر و در بیماران مبتلا به کم‌خونی فقرآهن مقدار آن افزایش می‌یابد[۹،۱۰]. به دلایل کم‌خونی فقرآهن و افزایش سرب در بدن مقدار پروتوپورفیرین گویچه‌های قرمز نیز افزایش می‌یابد، بنابراین در تفسیر نتایج آزمایشها برای تشخیص افتراقی هر یک از موارد باید دقت شود[۱۱،۱۲]. شرایط کم‌خونی فقرآهن و مسمومیت با سرب از نظر بالینی متفاوت است و هر کدام مشخصات ویژه خود را دارند[۱۳،۱۴]. برای تشخیص افتراقی بین تالاسمی و آنمی فقرآهن علاوه بر انجام آزمایشهای معمولی اندازه‌گیری پروتوپورفیرین نیز ضروری است[۱۵]. تا به حال مشخص شده است که اندازه‌گیری مقدار پروتوپورفیرین در بین اهداء کنندگان خون مبتلا به کم‌خونی فقرآهن جهت کنترل وضعیت آنان بسیار مناسب است[۱۶]. بنابراین با توجه به مشکلات تشخیص افتراقی کم‌خونی ناشی از فقرآهن از سایر انواع کم‌خونی‌ها و عوارض ناشی از کم‌خونی فقرآهن و جهت جلوگیری از گسترش آن، بکارگیری روشی ساده، کم‌هزینه و دقیق برای غربالگری کم‌خونی ناشی از فقرآهن ضرورت دارد. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی روش اندازه‌گیری پروتورفیرین در مقایسه با سایر روشهای موجود برای تشخیص کم‌خونی ناشی از فقرآهن است. بدین ترتیب با توجه به اهمیت تشخیص و پیشگیری این بیماری روش مناسب با حساسیت و ویژگی بالا و با هزینه کم برای غربالگری این بیماری انتخاب می‌شود.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی

پروتوپورفیرین استاندارد و اتانل از شرکت سیگما و کیت‌های بیوشیمیایی برای اندازه‌گیری آهن‌سرم، فری‌تین، ظرفیت کل آهن از نمایندگی شرکت‌های شیمیایی تهیه شدند. سایر مواد و محلولهای شیمیایی در حد آزمایشگاهی بودند و در محل آزمایشگاه تهیه گردیدند.

روش

این مطالعه به صورت تجربی صورت پذیرفت. جمعیت مورد مداخله بیماران مراجعه کننده به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشگاههای بابل از بهمن ماه ۱۳۷۴ تا آذرماه۱۳۷۸ بودند. شرایط ورود به تحقیق عبارت بودند از: داشتن علایم کم‌خونی فقرآهن، سطح سرمی فری‌تین پایین‌تر از ۲۵میکروگرم در لیتر، عدم استفاده از داروهای موثر برای آهن سرم از میان ۲۶۵ نفر مراجعه کننده با درنظر گرفتن شرایط بالینی ورود به تحقیق، همچنین آزمایش غربالگری فری‌تین سرم تعداد ۱۵۳ نفر انتخاب شدند، ۷۹ نفر در گروه آزمون و ۷۴نفر در گروه شاهد قرار گرفتند.

مقدار ۲ میلی‌لیتر سرم تهیه شده در لوله‌های آزمایش از تعداد ۷۴ نمونه افراد شاهد، مراجعه کننده به بیمارستانها، آزمایشگاهها و درمانگاهها که سطح سرمی

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

فری‌تین بیش از ۲۵ میکروگرم در لیتر داشتند در فاصله سن ۱۲-۸ سال و علایم کم‌خونی فقرآهن نداشتند، تهیه شد و توسط لوله‌های آزمایش در یخچال در دمای ۴ درجه تا انجام آزمایشهای بعدی حداکثر تا ۲ روز ذخیره شد. همچنین مقدار ۲ میلی‌لیتر از تعداد ۷۹نفر در فاصله سنی ۱۱-۶ سال که علایم کم‌خونی فقرآهن را نشان داده‌اند و آزمایش سطح سرمی فری‌تین نیز این علایم را تایید نمود، از مراجعه کنندگان به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشهای بابل از بهمن ۱۳۷۴ تا آذرماه ۱۳۷۸، تهیه گردید. نمونه‌های تهیه شده توسط آلومنیم فویل در مقابل نور حفاظت شدند و در دمای ۴ درجه در یخچال تا انجام آزمایشهای بعدی ذخیره شدند، حداکثر تا ۲ روز. هماتوکریت از طریق سانتریفوژ نمونه‌ها در لوله‌های مویئنه به مدت ۵ دقیقه بررسی شدند. سطح سرمی آهن، ظرفیت کل اتصال آهن و فری‌تین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و کیت بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم ۵۰ میکرولیتر از نمونه خون تهیه شده به لوله آزمایش انتقال داده شد، سپس ۲۵۰ میکرولیتر از آب مقطر عاری از یون به آن اضافه شد و هموژنه گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر اتانل ۹۰درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها توسط همزن مکانیکی مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد. پروتوپورفیرین موجود در محلول سوپرنیتانت[1] با استفاده از اسپکتروفتومتری (شیمادزو ۵۰۰۰ ر- ف) در طول موج ۴۵۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون آماری t جهت مقایسه میانگین متغیرهای مختلف هر یک از گروههای کنترل و مبتلا به کم‌خونی فقرآهن تجزیه و تحلیل گردید و P<۰/۰۵ رابطه معنی‌دار تلقی شد. برای محاسبه حساسیت‌ها تعداد نتایج مثبت واقعی آزمایشها به مجموع تعداد نتایج منفی کاذب و نتایج واقعی تقسیم گردید و برای بدست آوردن ویژگی هر یک از آزمونها تعداد نتایج منفی واقعی آزمایشها به مجموع نتایج مثبت واقعی به مجموع تعداد نتایج مثبت کاذب و نتایج مثبت واقعی تقسیم گردید و بدین طریق حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی هر یک از آزمونها بطور جداگانه محاسبه شد.

نتایج

حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی آزمونهای آهن سرم، ترانسفرین، هماتوکریت، پروتوپورفیرین با هم مقایسه شده است (جدول۱). حساسیت آزمون پروتوپورفیرین برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن برابر با ۱/۳±۹۳/۳٪، ویژگی آن برابر با ۱/۲±۹۱/۵٪ و ارزش پیش تشخیصی آن ۱/۴±۶۸/۳٪ است که در مقایسه با سایر روشهای موجود برای بررسی کم‌خونی فقرآهن، شاخصهای تشخیصی بالاتری دارد. میانگین و انحراف معیار مقادیر کمی فری‌تین سرم، ظرفیت کل اتصال آهن سرم، هماتوکریت، آهن و پروتوپورفیرین سرم در افراد شاهد و مبتلا به کم‌خونی فقرآهن با هم مقایسه شده است(جدول۲) نتایج حاصل نشان می‌دهند که در افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن مقدار

جدول شماره(۱): مقایسه شاخص‌های حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی آزمونهای فری‌تین، ترانسفرین، هماتوکریت و پروتوپورفیرین در تشخیص کم خونی فقر آهن

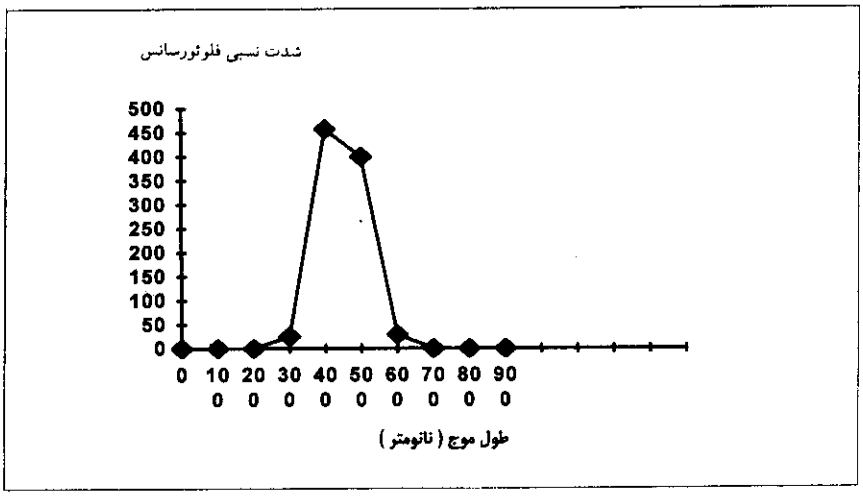
نام‌آزمون	حساسیت	ویژگی	ارزش‌پیش‌تشخیصی
فری‌تین‌سرم	٪۵۸/۱±۳/۲	٪۴۳/۲±۱/۴	٪۳۸/۶±۱/۳
ترانسفرین	٪۳۷/۴±۱/۴	٪۵۹/۴±۱/۲	٪۴۲/۵±۱/۲
هماتوکریت	٪۲۱/۵±۱/۳	٪۶۳/۲±۱/۴	٪۵۳/۴±۱/۲
پروتوپورفیرین	٪۹۳/۳±۱/۳	٪۹۱/۵±۱/۲	٪۶۸/۳±۱/۴
آهن‌سرم	٪۴۳/۴±۱/۴	٪۵۲/۶±۱/۵	٪۴۷/۲±۱/۵

جدول شماره(۲): میانگین و انحراف معیار سطح سرمی فری‌تین، هماتوکریت، ظرفیت کل اتصال آهن و پروتوپورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن

نام‌آزمون	نمونه‌های افرادشاهد[1]	نمونه‌های‌افرادمبتلابه‌کم‌خونی‌فقرآهن[1]
فری‌تین‌سرم	۱۳۷/۳۸±۲/۲۳	۷/۶۲±/۱۲
هماتوکریت	۳۴/۰۳±۱/۱۱	۲۵/۴۵±۱/۱۳
ظرفیت‌کل‌اتصال آهن	۳۰۳/۹۱±۱/۱۲	۴۴۹/۳۳±۲/۱۴
آهن سرم	۲۲/۳۶±۱/۲۳	۳۳/۳۲±۲/۱۲
پروتوپورفیرین	۳۷/۷۳±۱/۱۲	۱۵۱/۱۷±۱/۱۱
درصداشباع‌ترانسفرین	٪۳۸/۴۲±۲/۱۱	۷۸/۲۱±۲/۱۲

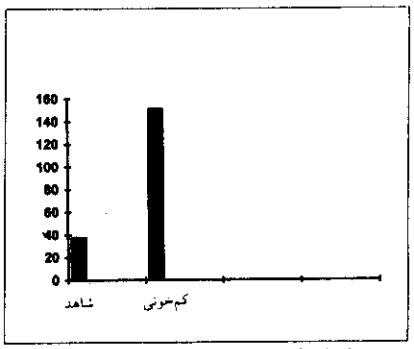
۱ - نتایج برحسب میکرومول در لیتر ارایه شده است. هر یک از مقادیر ارایه شده مقدار متوسط حاصل از انجام ۱۲-۱۰ آزمایش می‌باشد.

1- Supernatant



نمودارشماره(۱): نمونه طیف پروتوپورفیرین استخراج شده توسط روش اتانل

فری‌تین سرم برابر با ۱/۲±۷/۶۲ میکرومول در لیتر و هماتوکریت ۱/۱۳±۲۵/۴۵/۲۵ ظرفیت کل اتصال آهن برابر با ۱/۱۲±۳۳/۳۲ میکرومول در لیتر و مقدار پروتوپورفیرین به حدود ۱/۱۱±۱۵۱/۱۷ میکرومول در لیتر و درصد اشباع شدن ترانسفرین برابر ۱/۲±۷۸/۲٪ است. پروتوپورفیرین در طول موج ۴۵۷ نانومتر حداکثر شدت نسبی فلوئورسانس را داشت. نمونه‌ها از طیف پروتوپورفیرین استخراج شده سرم توسط روش اتانل در نمودار ۱ نشان داده شده است. در نمودار ۲ مقدار پروتوپورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن نشان داده شده است[۱۶،۱۷].



نمودارشماره(۲): مقادیر پروتوپورفیرین سرم در افراد طبیعی و افراد مبتلا به کم خونی فقرآهن. (هر یک از ستون‌ها مقدار متوسط حاصل از انجام ۱۲-۱۰ آزمایش می‌باشد)

بحث و نتیجه‌گیری

از بین آزمونهای موجود برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن مانند درصد اشباع ترانسفرین، هموگلوبین و فری‌تین سرم، مهمترین آزمون است، اما به دلیل هزینه بالای این آزمون در این پژوهش روش اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم برای تشخیص کم‌خونی فقرآهن مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج بدست آمده از این پژوهش با گزارش سایر محققان که مقدار طبیعی اشباع شدن ترانسفرین را ۲۵ تا ۵۰درصد و مقدار طبیعی ترانسفرین را ۲ تا ۴گرم در لیتر و مقدار طبیعی آن را ۱۰/۷ تا ۳۲/۲ میکرومول در لیتر و مقدار فری‌تین سرم را ۳۰تا۳۴ میکروگرم در لیتر برای مردان و برای زنان ۲۵تا۲۱۰ میکروگرم در لیتر و مقدار پروتوپورفیرین کمتر از ۴۰ میکرومول «هم» یا کمتر از ۲/۳ میکروگرم در هر گرم هموگلوبین گزارش داده‌اند منطبق است[۱۶،۱۷]. نتایج حاصل از این پژوهش در افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن نیز با گزارش سایر محققان که میزان پروتوپورفیرین سرم را در افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن بیش از ۴۰ میکرومول در هر مول «هم» یا ۵/۸ میکروگرم در هر گرم هموگلوبین و مقدار فری‌تین سرم ۹/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش داده‌اند منطبق و قابل مقایسه می‌باشد[۷،۸،۱۶]. طیف پروتوپورفیرین ۴۵۷ نانومتر است که کمترین خطا در این طول موج برای اندازه‌گیری پروتوپورفیرین وجود دارد، همچنین تا غلظت ۱۸۰ میکرومول در لیتر منحنی استاندارد خطی است و با توجه به تغییرات مقدار پروتوپورفیرین سرم در شرایط مختلف در حد این محدوده قرار می‌گیرد. بنابراین در روش بکار گرفته شده دقت کافی برای اندازه‌گیری پروتوپورفیرین وجود دارد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که مقدار پروتوپورفیرین در بین افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن ۴ برابر مقدار آن در افراد شاهد است که از نظر آماری اختلاف قابل توجهی بین میانگین مقدار آن در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن وجود دارد ($P<0/05$)(نمودار۲). با توجه به حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی مناسب و ساده بودن انجام آزمون اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم و قابل دسترس و کم‌هزینه بودن آن نسبت به روشهای موجود، روش اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم برای غربالگری کم‌خونی ناشی از فقرآهن به همراه اندازه‌گیری مقدار هموگلوبین و فری‌تین سرم مفید است. ■

مراجع

1. Macdougall LC. Monitoring of iron status and iron supplementation in patient treated with erythropoietin. Cuur Opin Nephrol Hypertens 1994; 3(4): 620-625.
2. Seigel RM, Lagrone DGH. The use of zinc protoporphrin in screening young children for iron deficiency. Clin Pediat 1994;1:473-479.
3. Beldus M, Walter H, K.Thies K. Transferin receptor assay and zinc protoporphyrin as markers of iron deficient erythropoisis end stage renal disease patients. Clin Nephrol 1998; 49(3):186-192.
4. Kono K, Yoshida Y, Harada A. Zinc protoporphyrin as an indicator for occupational lead exposure. Bulletin of the Osaka Medical School 1982;28(1):14-26.
5. Kaul B,Slavin G, Davidow B. Free erythrocyte protoporphyrin and zinc protoporphyrin measurements compared as primary screening methods for detection of lead poisoning. Clin Chem 1983;28(8):1467-1470.
6. Gorchein A. Uptake of protoporphyrin and continuous spectrophotometry assay for magnesium chelatase in rhodebacter spheroides. Biochem 1994;299:869-864.
7. Hukmani P,Tripathy BC. Spectroflyuorometric estimation of intermediates of chlorophyll biosynthesis: Protoporphyrin LX, Mg-protoporphyrin and protochlorophyllide. Analytical Biochem 1992;206(1):125-130.
8. Lto S, Tsudzuki M, Komori M. Celadon: an eggshell color mutation in Japannese quail. J of Hered 1993; 84(2): 145-147.
9. Tillyer ML. Tillyer CR. Use of red cell distribution width and erythrocyte zinc protoporphyrin in differential diagnosis of a and b thalassaemia and iron deficiency. J Clin Pathol 1994;47:205-208.
10. Zwennis WC, Franssen AC, Wiginans MJ. Use of zinc protoporphyrin in screening individuals for exposure to lead. Clin Chem 1990;36(8):1456-1459.
11. Julian J. Chisolm JR. Is lead poisoning still a problem? Clin Chem 1997;23(2):252-255.
12. Labbe RF. Rettmer RL. Measurement of zinc protoporphyrin with the protofluor-z-system. Clin Chem 1990;36(4):702-703.
13. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. Blood 1993;81(5):1200-1204.
14. Parsons PJ, Stanton, NV, Gunter EW. An interlaboratory comparison of conterol materials for use with hematofluorometers. Clin Chem 1989;35(10):2059-2065.
15. Harthoorn Le, Lindemans J.Langenhuijsen M. Combined use of erythrocyte zinc protoporphyrin and mean corpuscular volume test for fecal porphyrin. Clin Chem 1991;37(6):826-831.
16. Harthoorn LE, Lindemans J, Langenhuijsen M. Zinc protoporphyrin as screening test in female blood donors. Clin Chem 1998;44(4):800-804.
17. Pudek MR, Schreeeiber WE, Jamani A. Quantitative fluorometric screening in different of thalassemia from iron deficiency anemia. Eurp Hematology 1998;60(4):826-831. ■