

ارزیابی متغیرهای اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله با روش کالریمتری

*دکتر رضا محمدی^۱، مریم شیخ زاده^۱ و جیهه نوروزی^۱^۱گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

چکیده:

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

روش بررسی: روش کالریمتری اندازه گیری HbA_{1c} بر اساس آزادسازی گلوکز اتصال یافته به هموگلوبین در حرارت جوش به شکل ۵- هیدروکسی متیل فورفورال (5HMF) و اندازه گیری آن در یک واکنش رنگی با اسید تیوباربتوریک (TBA) می باشد. این روش تحت تأثیر متغیرهای مختلفی قرار دارد.

نتایج: مطالعه حاضر نشان داد که محلول TBA برای مدت ۱ ماه حداقل در ۴ درجه سانتی گراد پایدار می باشد. اما کاهش زمان جوش از ۵ ساعت به ۱ ساعت شدت رنگ حاصل را تا ۴۲٪ کاهش می دهد. به همین ترتیب، کاهش زمان و درجه حرارت انجام دادن واکنش رنگی به ترتیب از ۴۰ دقیقه به ۱۵ دقیقه و از ۵۰ درجه سانتی گراد به ۲۵ درجه سانتی گراد موجب کاهش ۲۹٪ و ۶۳٪ در شدت رنگ می شود. علاوه بر آن، رنگ حاصل در حرارت اتاق ناپایدار بوده و ظرف ۴۰ دقیقه تا ۵۳٪ کاهش می یابد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده برای اندازه گیری HbA_{1c} با روش کالریمتری، استفاده از ۵ ساعت حرارت جوش، واکنش رنگ زایی به مدت ۴۰ دقیقه در حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد و خواندن سریع جذب نوری توصیه می گردد.

کلیدواژه ها: ۱- دیابت ۲- هموگلوبین گلیکوزیله / HbA_{1c} ۳- اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله

مقدمه:

فعالیت بدنی و روش درمان می باشد، اندازه گیری قندخون در طول روز به تنهایی نمی تواند معیار قابل اعتمادی برای ارزیابی درمان در نظر گرفته شود. بنابراین برای کنترل درمان نیاز به روشی است که کم تر دچار تغییرات روزانه گردد. اندازه گیری مقدار هموگلوبین (HbA_{1c}) A_{1c} به عنوان بخش اصلی هموگلوبین گلیکوزیله، قابل اعتمادترین روش برای ارزیابی درمان هیپرگلیسمی در مبتلایان به دیابت می باشد. (۲)

بیماری دیابت شایع ترین ناهنجاری غدد درون ریز بوده و مقدار گلوکز خون بیش ترین نقش را در بروز عوارض بیماری دیابت دارد. بنابراین کنترل و تنظیم قند خون در مبتلایان به دیابت از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. (۱) با توجه به این که میزان قندخون افراد دیابتی تابعی از میزان غذای مصرفی،

- اسیدازگزالیک 0.25 mol/L : مقدار 100 MI محلول اسیدازگزالیک 0.5 mol/L با 100 mL آب مقطر مخلوط می شود این معرف برای ۲ هفته در حرارت اتاق پایدار است.

- کلرید سدیم 9 g/L : میزان ۹ گرم کلرید سدیم در ۱ لیتر آب مقطر حل می گردد. این معرف برای ۳ ماه در حرارت اتاق پایدار است.

- اسیدتری کلرواستیک 400 g/L : میزان ۴۰۰ گرم اسید تری کلرواستیک در یک ظرف ۱ لیتری ریخته شده و پس از افزودن آب مقطر به آن و حل شدن حجم به ۱ لیتر رسانده می شود. این محلول ۳ ماه در ۴ درجه سانتی گراد پایدار است.

اسیدتیوباریتوریک 50 mmol/L : مقدار 0.72 گرم اسید تیوباریتوریک را در 100 mL آب مقطر حل شده و با استفاده از محلول سود 1 mol/L pH، به 6.0 رسانده می شود. این معرف حداقل ۱ ماه در یخچال پایدار می باشد.

- اندازه گیری HbA_{1c} : ابتدا نمونه خون وریدی با ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر تهیه می شود و بعد از سانتریفوژ با دور 2000 g به مدت ۱۰ دقیقه، پلاسما آن جدا می گردد. نمونه فاقد پلاسما در ۳ ثوبت با محلول سالین شست و شو داده می شود. بدین منظور پس از اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر محلول سالین به لوله سانتریفوژ و مخلوط کردن سلول ها با سالین، سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در 2000 g صورت می گیرد و پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی کاملاً تخلیه می گردد این شست و شو به همین طریق ۲ بار دیگر تکرار می شود و در آخرین 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 $1/4$ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و کاملاً مخلوط می گردد تا تمام گلبول های قرمز لیز شده و همولیزات حاصل

HbA_{1c} به دنبال اتصال گلوکز به زنجیر بتا هموگلوبین ایجاد می گردد. کمپلکس حاصل در ابتدا به شکل pre- HbA_{1c} ناپایدار بوده و به تدریج به شکل پایدار HbA_{1c} تبدیل می شود بنابراین به دنبال تغییرات کوتاه مدت مقدار گلوکز خون احتمال ایجاد pre- HbA_{1c} و تجزیه آن وجود دارد اما با ثابت ماندن میزان گلوکز، HbA_{1c} پایدار ایجاد می شود و تا زمان تخریب گلبول قرمز و تجزیه هموگلوبین هم چنان پایدار خواهد ماند. (۳) با توجه به طول عمر حدود ۱۲۰ روز گلبول های قرمز طبیعی، میزان HbA_{1c} موجود در گردش خون انعکاسی از گلوکز خون در طی ۱ تا ۲ ماه گذشته می باشد. (۴)

تاکنون روش های متعددی برای اندازه گیری HbA_{1c} مطرح شده و مورد استفاده قرار گرفته است. نتایجی که با استفاده از روش های مختلف گزارش می گردد، اختلاف قابل توجهی دارند و مقایسه نتایج حاصل از آزمایشگاه های مختلف مشکل می باشد. عدم وجود استاندارد مناسب، حساسیت متفاوت روش ها و وجود عوامل مداخله گر مختلف از علل این تفاوت ها می باشند. (۵) متداول ترین روش اندازه گیری HbA_{1c} در آزمایشگاه های کشور، روش کالریمتری است. اساس این روش، آزادسازی گلوکز متصل به هموگلوبین در یک محیط اسیدی ملایم به شکل ۵-هیدروکسی متیل فورفورال (5HMF) و تعیین مقدار آن بر اساس شدت رنگ حاصل از واکنش با اسید تیوباریتوریک (TBA) می باشد. در این روش متغیرهای متعددی وجود دارند که عدم توجه به آن ها ممکن است موجب بروز خطاهای قابل توجهی گردد. (۶) در مطالعه حاضر، اثر این متغیرها بر نتایج، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی:

- اسیدازگزالیک 0.5 mol/L : $31/5$ گرم اسیدازگزالیک در 500 mL میلی لیتر آب مقطر حل می شود. این معرف برای ۲ هفته در حرارت اتاق پایدار است.

استفاده گردید. در طی این مدت، محلول TBA در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد.

نتایج حاصل از انجام دادن ۱۰ بار آزمایش روی یک نمونه در جدول شماره ۱ آورده شده است، هیچ تفاوت معنی داری بین نتایج به دست نیامد.

جدول شماره ۱. نتایج حاصل از بررسی پایداری TBA

محلول TBA	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات
محلول تازه تهیه شده	۱۰	۴۹/۷	۰/۴۸	۰/۹۶
بعد از ۱ هفته	۱۰	۴۹/۵	۰/۵۲	۱/۰۵
بعد از ۲ هفته	۱۰	۴۹/۴	۰/۵۱	۱/۰۳
بعد از ۳ هفته	۱۰	۴۸/۷	۰/۳۵	۰/۷
بعد از ۴ هفته	۱۰	۴۸/۶	۰/۳۹	۰/۸

مدت زمان جوش: آزمایش در شرایط مشابه در ۳۵ لوله انجام شد. با این تفاوت که لوله ها به ۵ گروه تقسیم شدند و لوله های سری اول تا پنجم به ترتیب ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت در معرض حرارت جوش قرار گرفتند.

نتایج حاصل در جدول شماره ۲ آورده شده است. همان گونه که ملاحظه می گردد، با کاهش زمان جوش، شدت رنگ حاصل نیز کم تر می شود. به طوری که با حرارت جوش ۱ ساعته تنها ۰/۵۸٪ از شدت رنگ حاصل از حرارت جوش ۵ ساعته به دست آمد.

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از بررسی زمان جوش

مدت زمان جوش	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصد رنگ تولیدی
۱ ساعت	۷	۸/۵۳	۰/۶۲	۷/۳	۵۸
۲ ساعت	۷	۱۰/۳	۰/۳۵	۳/۴	۷۱
۳ ساعت	۷	۱۰/۵	۰/۴۱	۳/۸	۷۲
۴ ساعت	۷	۱۲/۰	۰/۴۸	۴/۰	۸۲
۵ ساعت	۷	۱۴/۶	۰/۴۸	۳/۲	۱۰۰

مدت زمان انجام دادن واکنش رنگی: آزمایش در شرایط مشابه در ۵۰ لوله انجام شد، با این تفاوت که لوله ها به ۵

شود. در مرحله بعد در یک لوله در پیچ دار ۱/۰ میلی لیتر همولیزات با ۰/۵ میلی لیتر محلول اسید اگزالیک mol/L ۰/۵ مخلوط و بعد از بستن در آن، لوله به مدت ۱ ساعت درین ماری جوش قرار داده می شود. بعد از خنک شدن، میزان ۱/۰ میلی لیتر محلول اسید تری کلرواستیک به لوله اضافه شده و بعد از مخلوط کردن، سانتریفوژ در ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه صورت می گیرد تا پروتئین های موجود در نمونه رسوب نمایند. برای انجام دادن واکنش رنگی، ۱/۵ میلی لیتر مایع رویی با ۰/۵ میلی لیتر محلول TBA مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۰°C قرار داده می شود. در نهایت، شدت رنگ حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۴۳ نانومتر در مقابل بلانک خوانده می شود.

برای تهیه بلانک نیز ۱/۰ میلی لیتر محلول اسید اگزالیک ۰/۲۵ mol/L با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۱/۰ میلی لیتر معرف اسیدتری کلرواستیک مخلوط می گردد. (۶) در پایان نتایج به صورت جذب نوری (OD) بیان شدند.

نتایج:

متغیرهای متعددی در روش کالیمتری اندازه گیری HbA_{1c} وجود دارند که برای به دست آوردن نتایج قابل تکرار، باید تحت کنترل قرار گیرند. در این مطالعه پایداری TBA، مدت زمان جوش برای تولید 5HMF، مدت زمان رنگ زایی، دمای مناسب برای رنگ زایی و پایداری رنگ تولیدی، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای ارزیابی هر یک از این متغیرها، سایر متغیرها ثابت نگه داشته شدند و متغیر مورد نظر در حالات مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

- پایداری TBA: بعد از تهیه محلول TBA، از آن برای انجام دادن واکنش رنگی طی ۴ هفته متوالی

درصد رنگ تولیدی	ضریب تغییرات	انحراف معیار	میانگین	تعداد	درجه حرارت
۳۷	۳/۱	۰/۵۲	۱۶/۴	۱۰	۲۵ درجه سانتی گراد
۵۶	۱/۹	۰/۴۸	۲۵/۲	۱۰	۳۰ درجه سانتی گراد
۶۸	۱/۶	۰/۵۲	۳۰/۶	۱۰	۳۵ درجه سانتی گراد
۷۱	۱/۷	۰/۵۴	۳۱/۸	۱۰	۳۷ درجه سانتی گراد
۸۱	۰/۹	۰/۳۴	۳۶/۲	۱۰	۴۰ درجه سانتی گراد
۹۶	۱/۱	۰/۵۲	۴۳/۱	۱۰	۴۵ درجه سانتی گراد
۱۰۰	۱/۵	۰/۶۴	۴۴/۷	۱۰	۵۰ درجه سانتی گراد

پایداری رنگ تولید شده دردمای اتاق: آزمایش در شرایط مشابه در ۱۰ لوله انجام شد. بعد از قراردادن لوله ها به مدت ۴۰ دقیقه دربن ماری ۴۰ درجه سانتی گراد جهت انجام دادن واکنش رنگ زایی، بلافاصله وهم چنین درفاصله زمانی ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ دقیقه بعد از خروج 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 بعد از ۴۰ دقیقه درحرارت اتاق ۵۳٪ می باشد.

جدول شماره ۵. نتایج حاصل ازپایداری رنگ در دمای اتاق

درصد کاهش رنگ	ضریب تغییرات	انحراف معیار	میانگین	تعداد	دما
صفر	۱/۹	۰/۶۸	۳۶/۳	۱۰	زمان: صفر
۱۶	۲/۵	۰/۷۸	۳۰/۵	۱۰	زمان: ۵ دقیقه
۳۲	۳/۸	۰/۹۵	۲۴/۸	۱۰	زمان: ۱۰ دقیقه
۳۸	۵/۱	۱/۱۴	۲۲/۶	۱۰	زمان: ۱۵ دقیقه
۴۰	۲/۵	۰/۵۵	۲۱/۷	۱۰	زمان: ۲۰ دقیقه
۴۸	۳/۰	۰/۵۷	۱۸/۹	۱۰	زمان: ۳۰ دقیقه
۵۳	۴/۶	۰/۷۸	۱۷/۱	۱۰	زمان: ۴۰ دقیقه

گروه مختلف تقسیم شدند و لوله های سری اول تا پنجم به ترتیب به مدت ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۴۵ دقیقه دردمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

نتایج حاصل درجدول شماره ۳ آورده شده است همان طورکه ملاحظه می گردد، با کاهش مدت زمان انجام دادن واکنش، شدت رنگ حاصل نیز کم تر می شود. بطوری که بازمان ۱۵ دقیقه، ۷۱٪ شدت رنگ حاصل از زمان ۴۰ دقیقه به دست می آید.

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

مدت زمان قراردادن در ۴۰°C	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تغییرات	درصد رنگ تولیدی
۱۵ دقیقه	۱۰	۲۵/۹	۰/۸۸	۳/۳	۷۱
۲۰ دقیقه	۱۰	۲۸/۹	۰/۳۲	۱/۱	۸۰
۲۵ دقیقه	۱۰	۳۱/۴	۰/۷۰	۲/۲	۸۷
۳۰ دقیقه	۱۰	۳۵/۷	۰/۴۸	۱/۳	۹۸
۴۰ دقیقه	۱۰	۳۶/۳	۰/۶۸	۱/۹	۱۰۰

درجه حرارت انجام دادن واکنش رنگی . آزمایش در شرایط مشابه در ۷۰ لوله انجام شد، با این تفاوت که لوله ها به ۷ سری تقسیم شدند و لوله های سری اول تا هفتم به ترتیب در دما های ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نتایج حاصل در جدول شماره ۴ آورده شده است. همان گونه که مشاهده می شود . با کاهش درجه حرارت انجام دادن واکنش، شدت رنگ حاصل نیز کم تر می شود. به طوری که شدت رنگ حاصل ازدمای ۲۵ درجه سانتی گراد، تنها ۳۷٪ شدت رنگ به دست آمده ازدمای ۵۰ درجه سانتی گراد می باشد.

جدول شماره ۴. نتایج حاصل از بررسی دمای انجام دادن واکنش رنگی

بحث

با وجود آن که روش کالریتری اندازه گیری HbA_{1C} امروزه بندرت توصیه شده و از کتب مرجع نیز حذف شده است. (۴) متأسفانه هنوز اغلب آزمایشگاه های تشخیص طبی موجود در ایران از این روش استفاده می کنند. یکی از مشکلات عمده این روش، وجود متغیرهای متعدد می باشد که خود ناشی از نیاز به انجام دادن مراحل کاری متعدد است. میزان آزادسازی 5HMF از HbA_{1C} شدیداً تحت تأثیر شرایط و مدت زمان جوش می باشد. هیدرولیز در شرایط اسیدی ملایم موجب به آزاد شدن تمام گلوکز متصل به هموگلوبین نمی شود، در حالی که با استفاده از شرایط اسیدی قوی، آزادسازی گلوکز بهتر انجام شده، اما در این شرایط 5HMF تولید شده تخریب می گردد (۶).

از سوی دیگر، زمان مورد نیاز برای آزادسازی گلوکز اتصال یافته به هموگلوبین به شکل 5HMF بسیار طولانی بوده و حتی با دمای جوش ۵ ساعته نیز میزان این آزادسازی کامل نمی باشد، علاوه بر آن، افزایش زمان جوش خود می تواند موجب تخریب 5HMF تولید شده گردد. (۶) نتایج نشان می دهند که وقتی دمای جوش به ۱ ساعت کاهش می یابد، میزان آزادسازی 5HMF نسبت به دمای جوش ۵ ساعته حدود ۴۲٪ کاهش نشان می دهد. در این مورد، دامنه مقادیر به دست آمده و حساسیت آزمون کم تر می شود. استفاده از زمان های جوش متفاوت در روش های شیمیایی، یکی از علل عمده تفاوت بین نتایج آزمایشگاه های مختلف می باشد که مقایسه را غیرممکن می نماید. شدت رنگ حاصل در مرحله رنگ زایی وابستگی زیادی به دمای انجام دادن آن دارد. از سوی دیگر وقتی واکنش رنگی در دمایی بیش از دمای اتاق انجام شود، پایداری رنگ در دمای اتاق پایین بوده و میزان جذب نوری با گذشت زمان کاهش قابل توجهی را نشان می دهد. از این رو یا باید مرحله رنگ زایی در دمای اتاق انجام شود که در این حالت میزان واکنش رنگی کم

خواهد بود، یا این که بلافاصله بعد از خروج لوله ها از بن ماری، میزان جذب نوری خوانده شود.

مطالعه انجام شده نشان می دهد که برای دست یابی به نتایج قابل تکرار لازم است تمام متغیرهای موجود در آزمون کالریتری سنجش HbA_{1C} شدیداً تحت کنترل باشند. از سوی دیگر لازم است آزمایشگاه ها از روش های یکسانی استفاده کنند تا نتایج گزارش شده توسط آزمایشگاه های مختلف قابل مقایسه باشند. هر چند، با توجه به مشکلات موجود، امروزه روش کالریتری اندازه گیری HbA_{1C} کنار گذاشته شده است و بجای آن روش HpLC توصیه می گردد. شاهد این ادعا، حذف این روش از کتب معتبر بیوشیمی بالینی (۵ و ۶) و عدم وجود مقالات جدید تر در این زمینه می باشد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، سرکار خانم فاطمه کریمی و سرکار خانم شکوه چیپورنژاد که در این اجرای طرح هم کاری نمودند، تشکر و قدردانی شده و برای ایشان آرزوی موفقیت می گردد.

منابع

1. Little R., Wiedmeyer H., England; James M. Jacobson; Frank H. Wians, Jr; David E. Goldstein. Interlaboratory Standardization of Measurements of Glycohemoglobins. *Clinical Chemistry* 1992;38: 2472-8.
2. Tahara Y. and Shima K. Kinetics of HbA_{1C} , Glycated Albumin, and ructosamine and Analysis of Their Weight Functions Against preceding Plasma Glucose Level. *Diabetics Care* 1995;18: 440-7.
3. Hall M. Carbohydrates. In: Anderson S. and Cockayne S. *Clinical Chemistry*. 1st 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.

Abstract

Evaluation of a Colorimetric Method in Glycated Hemoglobin measurement

*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 as 5-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 temperature and would decrease as much as 53% within 40 minutes.

Conclusion: With the colorimetric measurement 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