



● مقالات تحقیقی (۷)

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

کم خونی 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 کم خونی 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 عالیم کم خونی فقرآهن بروز داده بودند و سطح سرمی فریتین پایین داشتند، از بهمن ماه سال ۱۳۷۲ تا آذر ماه سال ۱۳۷۸ به عنوان گروه آزمون و از تعداد ۷۴ کودک در فاصله سنی ۸-۱۲ سال مراجعه کننده به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشگاههای بابل از بهمن ماه سال ۱۳۷۸ تا آذرماه سال ۱۳۷۴ که عالیم کم خونی فقرآهن را بروز نداده بودند و سطح سرمی فریتین بالا داشتند به عنوان گروه شاهد، مقدار ۲ میلی‌لیتر خون در لوله‌های آزمایش تهیه شد. پروتوپورفیرین سرم با استفاده از اسپکتروفلورومتر RF-5000 اندازه‌گیری شد. در طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر 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 $\frac{۳}{۵}$ درصد، ویژگی آزمایش $\frac{۱۵}{۹۱}$ درصد و ارزش پیش تشخیصی این روش برابر با $\frac{۳}{۸}$ درصد بود، که نسبت به سایر روشها برای تشخیص کم خونی ناشی از فقر آهن مناسبتر است و همچنین مقدار پروتوپورفیرین سرم در بیماران مبتلا به کم خونی فقرآهن $\frac{۴}{۴}$ برابر افراد شاهد بود و بین گروه شاهد و گروه بیماران اختلاف آماری

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

دکتر سیده ربابه علیجانپور
پزشک عمومی



معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$). نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که اندازه گیری مقدار پروتوبورفیرین سرم می تواند در غربالگری کم خونی ناشی از فقر آهن استفاده شود.

واژه های کلیدی: پروتوبورفیرین، کم خونی، فقر آهن، سپکتروفلورومتری

مواد و روش کار

مواد شیمیایی

پروتوبورفیرین استاندارد و اتسانول از شرکت سیگما و کیت های بیو شیمیایی برای اندازه گیری آهن سرم، فری تین، ظرفیت کل آهن از نمایندگی شرکت های 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 آذر ماه ۱۳۷۸ بودند. شرایط ورود به تحقیق عبارت بودند از: داشتن علایم کم خونی فقر آهن، سطح سرمی فری تین پایین تر از ۲۵ میکروگرم 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 فری تین سرم تعداد ۱۵۳ نفر انتخاب شدند، نفر در گروه آزمون و ۷۴ نفر در گروه شاهد قرار گرفتند.

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

می باید [۹، ۱۰]، به دلایل کم خونی فقر آهن و افزایش سرب در بدن مقدار پروتوبورفیرین گویچه های قرمز نیز افزایش می باید،

بنابراین در تفسیر نتایج آزمایشها برای تشخیص افتراقی هر یک از موارد باید دقت شود [۱۱، ۱۲]. شرایط کم خونی فقر آهن 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 فقر آهن علاوه بر انجام آزمایشهاي معمولی اندازه گیری پروتوبورفیرین نیز ضروری است [۱۵]. تا به حال مشخص شده است که اندازه گیری مقدار پروتوبورفیرین در بین اهداء کنندگان خون مبتلا به کم خونی فقر آهن جهت کنترل وضعیت آنان بسیار مناسب است [۱۶]. بنابراین با توجه به مشکلات تشخیص افتراقی کم خونی ناشی از فقر آهن از سایر انواع کم خونی ها و عوارض ناشی از کم خونی فقر آهن و جهت جلوگیری از گسترش آن، بکار گیری روشی ساده، کم هزینه و دقیق برای غربالگری کم خونی ناشی از فقر آهن ضرورت دارد. هدایت انجام این پژوهش ارزیابی روش اندازه گیری پروتوبورفیرین در مقایسه با سایر روشهای موجود برای تشخیص کم خونی ناشی از فقر آهن 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 می شود.

مقدمه

تعدادی از آزمونهای آزمایشگاهی برای تشخیص کم خونی فقر آهن در بین اطفال استفاده می شود، اما هر یک از آنها محدودیت هایی دارند، از جمله این آزمون های بررسی هماتوکریت است، مشکل این آزمون این است، که فقط اطفال مبتلا به کم خونی شدید فقر آهن را شناسایی می کند و تعداد زیادی از اطفالی که هماتوکریت طبیعی دارند، به درمان با آهن پاسخ می دهند، که نشانه حساسیت کم برای حدود پایین مقادیر طبیعی هماتوکریت در تشخیص کم خونی فقر آهن است [۱۷]. از طرفی بررسی هموگلوبین، شاخص گویچه های سرخ، فری تین سرم و درصد اشایع شدن ترانسفیرین، روشهای پر زحمت و پرهزینه برای غربالگری می باشد [۱۸، ۱۹]. بررسی توزیع سلولی و غلظت پروتوبورفیرین گویچه های سرخ به عنوان آزمونهای ساده برای تشخیص افتراقی کم خونی فقر آهن از سایر عوامل ایجاد کننده میکروسیتوز مانند تالاسمی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۰]. افراد مبتلا به التهاب سیستماتیک مزمن نیز علایم کم خونی را نشان می دهند که با مشخصات نارسایی متابولیسم آهن مطابقت دارد [۲۱]. در افراد طبیعی بدون کم خونی فقر آهن مقدار پروتوبورفیرین کمتر از ۴۰ میکرومول در لیتر و در بیماران مبتلا به کم خونی فقر آهن مقدار آن افزایش



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

نام آزمون	حساسیت	ویژگی	ارزش پیش تشخیصی
فری‌تین سرم	%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
پروتوبورفیرین	%۹۳/۳±۱/۳	%۹۱/۵±۱/۲	%۶۸/۳±۱/۴
آهن سرم	%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 پروتوبورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن

نام آزمون	نمونه‌های افراد شاهد ^(۱)	نمونه‌های افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن ^(۱)
فری‌تین سرم	۱۳۷/۳۸±۲/۲۳	۷/۶۲±۱/۱۲
هماتوکریت	۳۴/۰۳±۱/۱۱	۲۵/۴۵±۱/۱۳
ظرفیت کل اتصال آهن	۳۰۳/۹۱±۱/۱۲	۴۴۹/۳۳±۲/۱۴
آهن سرم	۲۲/۳۶±۱/۲۳	۳۳/۳۲±۲/۱۲
پروتوبورفیرین	۳۷/۷۳±۱/۱۲	۱۵۱/۱۷±۱/۱۱
درصد اشباع ترانسفرین	%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 ۱۰ - ۱۲ آزمایش می‌باشد.

هماتوکریت، پروتوبورفیرین با هم مقایسه شده است (جدول ۱). حساسیت آزمون پروتوبورفیرین برای تشخیص کم خونی فقر آهن برابر با $۱/۳\pm ۱/۳$ ٪، ویژگی آن برابر با $۹۱/۵\pm ۱/۲$ ٪ و ارزش پیش تشخیصی آن $۱/۴\pm ۱/۴$ ٪ است که در مقایسه با سایر روش‌های موجود برای بررسی کم خونی فقر آهن، شاخصهای تشخیصی بالاتری دارد. میانگین و انحراف معیار مقادیر کمی فری‌تین سرم، ظرفیت کل اتصال آهن سرم، هماتوکریت، آهن و پروتوبورفیرین سرم در افراد شاهد و مبتلا به کم خونی فقر آهن با هم مقایسه شده است (جدول ۲) نتایج حاصل نشان می‌دهند که در افراد مبتلا به کم خونی فقر آهن مقدار

$۰/۰۵\pm ۰/۰۵$ ٪ 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

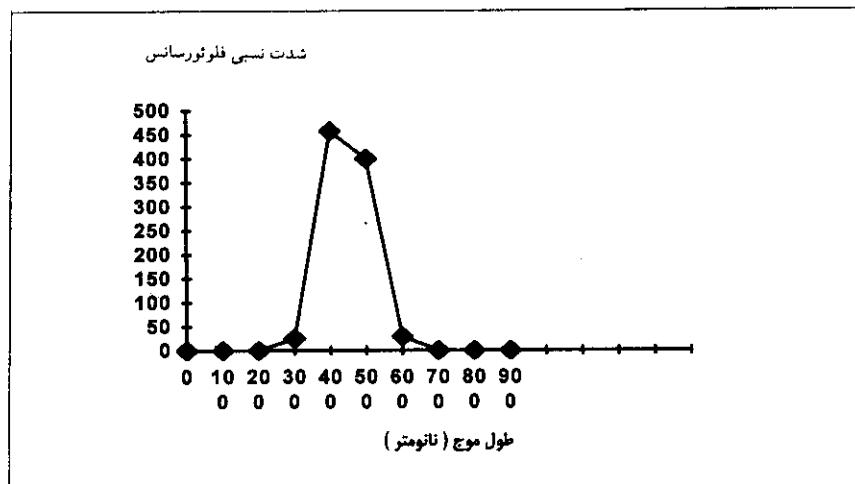
حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی آزمونهای آهن سرم، ترانسفرین،

فری‌تین بیش از ۲۵ میکروگرم در لیتر داشتند در فاصله سن ۱۲ - ۸ سال و عالیم کم خونی فقر آهن نداشتند، تهیه شد و توسط لوله‌های آزمایش در یخچال در دمای ۴ درجه تا انجام آزمایش‌های بعدی حداقل تا ۲ روز ذخیره شد. همچنین مقدار ۲ میلی‌لیتر از تعداد ۷۹ نفر در فاصله سنی ۱۱ - ۶ سال که عالیم کم خونی فقر آهن را نشان داده‌اند و آزمایش سطح سرمی فری‌تین نیز این عالیم را تایید نمود، از مراجعه کنندگان به بیمارستانها، درمانگاه‌ها و آزمایش‌های بابل از بهمن ۱۳۷۴ تا آذرماه ۱۳۷۸، تهیه گردید.

نمونه‌های تهیه شده توسط آلومینیم فویل در مقابل نور حفاظت شدند و در دمای ۴ درجه در یخچال تا انجام آزمایش‌های بعدی ذخیره شدند، حداقل تا ۲ روز. هماتوکریت از طریق سانتریفوژ نمونه‌ها در لوله‌های موینه به مدت ۵ دقیقه بررسی شدند. سطح سرمی آهن، ظرفیت کل اتصال آهن و فری‌تین با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و کیت بیوشیمیابی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتوبورفیرین 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 هموزن گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها توسط همزن مکانیکی مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد. پروتوبورفیرین موجود در محلول سوپرینیتانت^(۱) با استفاده از اسپکتروفوتومتری (شیمادزو ۵۰۰۰ -R-F) در طول موج ۴۵۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون آماری χ^2 جهت مقایسه میانگین متغیرهای مختلف هر یک از گروههای کنترل و مبتلا به کم خونی فقر آهن تجزیه و تحلیل گردید و

۱- Supernatant

سرم را ۳۴ تا ۳۶ میکروگرم در لیتر برای مردان و برای زنان ۲۱ تا ۲۵ میکروگرم در لیتر و مقدار پروتوبورفیرین کمتر از ۴۰ میکرومول «هم» یا کمتر از $2/3$ 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 پروتوبورفیرین سرم را در افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن بیش از ۴۰ میکرومول در هر مول «هم» یا $5/8$ میکروگرم در هر گرم هموگلوبین و مقدار فری‌تین سرم $9/5$ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش داده‌اند منطبق و قابل مقایسه می‌باشد [۱۶، ۱۷، ۲۸]. طیف پروتوبورفیرین 457 نانومتر است که کمترین خطا در این طول موج برای اندازه‌گیری پروتوبورفیرین وجود دارد، همچنین تا غلظت 180 میکرومول در لیتر منحنی استاندارد خطی است و با توجه به تغییرات مقدار پروتوبورفیرین سرم در شرایط مختلف در حد این محدوده قرار می‌گیرد. بنابراین در روش بکار گرفته شده دقت کافی برای اندازه‌گیری پروتوبورفیرین وجود دارد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که مقدار پروتوبورفیرین در بین افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن 4 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 ($P < 0.05$) (نمودار ۲). با توجه به حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی مناسب و ساده بودن انجام آزمون اندازه‌گیری پروتوبورفیرین سرم و قابل دسترس و کم‌هزینه بودن آن نسبت به روش‌های موجود، روش اندازه‌گیری پروتوبورفیرین سرم برای غربالگری کم‌خونی ناشی از فقرآهن به همراه اندازه‌گیری مقدار هموگلوبین و فری‌تین سرم مفید است.



نمودار شماره (۱): نمونه طیف پروتوبورفیرین استخراج شده توسط روش اتابل

فری‌تین سرم برابر با $7/62 \pm 1/2$ میکرومول در لیتر و همایاتکریت $25/45 \pm 1/13$ ظرفیت کل اتصال آهن برابر با $1/12$ نشان داده شده است. در نمودار 2 مقدار پروتوبورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن نشان داده شده است [۱۶، ۱۷].

نمودار شماره (۱): نمونه طیف پروتوبورفیرین استخراج شده توسط روش اتابل

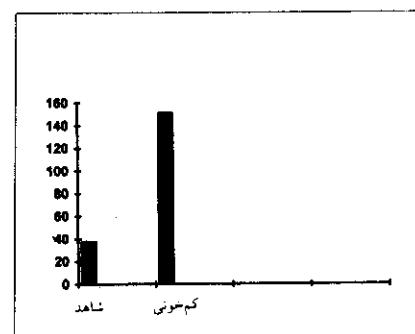
فری‌تین سرم برابر با $7/62 \pm 1/2$ میکرومول در لیتر و همایاتکریت $25/45 \pm 1/13$ ظرفیت کل اتصال آهن برابر با $1/12$ نشان داده شده است. در نمودار 2 مقدار پروتوبورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن نشان داده شده است [۱۶، ۱۷].

نمودار شماره (۲): مقادیر پروتوبورفیرین سرم در افراد طبیعی و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن. (هر یک از ستون‌ها مقدار متوسط حاصل از انجام $10-12$ 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 پروتوبورفیرین 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 25 تا 55 درصد و مقدار طبیعی ترانسفرین را 2 تا 4 گرم در لیتر و مقدار طبیعی آن را $10/7$ تا $32/2$ میکرومول در لیتر و مقدار فری‌تین

بروتوبورفیرین سرم (میکرومول در لیتر)



نمودار شماره (۲): مقادیر پروتوبورفیرین سرم در افراد طبیعی و افراد مبتلا به کم‌خونی فقرآهن. (هر یک از ستون‌ها مقدار متوسط حاصل از انجام $10-12$ آزمایش می‌باشد)



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 protoporphyrin in screening young children for iron deficiency. *Clin Pediatr* 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 rhodobacter sphaeroides. *Biochem* 1994;299:869-864.
7. Hukmani P, Tripathy BC. Spectrofluorometric estimation of intermediates of chlorophyll biosynthesis: Protoporphyrin LX, Mg-protoporphyrin and protochlorophyllide. *Analytical Biochem* 1992;206(1):125-130.
8. Ito S, Tsudzuki M, Komori M. Celadon: an eggshell color mutation in Japanese 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 α and β thalassaemia and iron deficiency. *J Clin Pathol* 1994;47:205-208.
10. Zwennis WC, Franssen AC, Wigginans 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 control 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, Schreeiber WE, Jamani A. Quantitative fluorometric screening in different of thalassemia from iron deficiency anemia. *Eur Hematology* 1998;60(4):826-831.

■

