

● مقالات تحقیقی (۷)

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

کم‌خونی فقر آهن یک مشکل مهم سلامتی است. بهبود شرایط فقر آهن در اطفال از چند سال قبل مورد توجه محققان بوده است. در این پژوهش ما اهمیت اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم را برای تشخیص کم‌خونی فقر آهن 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 فقر آهن 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 ۷۲ کودک در فاصله سنی ۱۲-۸ سال مراجعه کننده به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشگاههای بابل از بهمن ماه سال ۱۳۷۲ تا آذر ماه سال ۱۳۷۸ که علایم کم‌خونی فقر آهن 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 ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر اسکن گردید. هماتوکریت از طریق سانتریفوژ مورد بررسی قرار گرفت. فری‌تین سرم، اشیاع شدن ترانسفرین، ظرفیت کل اتصال آهن و آهن سرم با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل سیسیل CE-) اندازه‌گیری شد. حساسیت روش پروتوپورفیرین ۹۳/۳ درصد، ویژگی آزمایش ۹۱/۵ درصد و ارزش پیش تشخیصی این روش برابر با ۶۸/۳ درصد 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 فقر آهن 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



معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$). نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که اندازه گیری مقدار پروتوپورفیرین سرم می تواند در غربالگری کم خونی ناشی از فقر آهن استفاده شود.

واژه های کلیدی: پروتوپورفیرین، کم خونی، فقر آهن، اسپکتروفلورومتری

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 آزمونها، 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 [۱،۲]. از طرفی بررسی هموگلوبین، شاخص گویچه های سرخ، فری تین سرم و درصد اشباع شدن ترانسفرین، روشهای پرزحمت و پرهزینه برای غربالگری می باشند [۳،۴]. بررسی توزیع سلولی و غلظت پروتوپورفیرین 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 [۵،۶]. افراد مبتلا به التهاب سیستماتیک مزمن نیز علائم کم خونی را نشان می دهند که با مشخصات نارسایی متابولیسم آهن مطابقت دارد [۷،۸]. در افراد طبیعی بدون کم خونی فقر آهن مقدار پروتوپورفیرین کمتر از ۴۰ میکرومول در لیتر و در بیماران مبتلا به کم خونی فقر آهن مقدار آن افزایش

می یابد [۹،۱۰]. به دلایل کم خونی فقر آهن و افزایش سرب در بدن مقدار پروتوپورفیرین گویچه های قرمز نیز افزایش می یابد، 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 آزمایشهای معمولی اندازه گیری پروتوپورفیرین نیز ضروری است [۱۵]. تا به حال مشخص شده است که اندازه گیری مقدار پروتوپورفیرین 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، بکارگیری روشی ساده، کم هزینه و دقیق برای غربالگری کم خونی ناشی از فقر آهن ضرورت دارد. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی روش اندازه گیری پروتوپورفیرین 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.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی

پروتوپورفیرین استاندارد و اتانل از شرکت سیگما و کیت های بیوشیمیایی 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 آذرماه ۱۳۷۸ بودند. شرایط ورود به تحقیق عبارت بودند از: داشتن علائم 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 در نظر گرفتن شرایط بالینی ورود به تحقیق، همچنین آزمایش غربالگری فری تین سرم تعداد ۱۵۳ نفر انتخاب شدند، ۷۹ 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

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

نام آزمون	حساسیت	ویژگی	ارزش پیش تشخیصی
فری‌تین سرم	$58/1 \pm 3/2$	$43/2 \pm 1/4$	$28/6 \pm 1/3$
ترانسفرین	$37/4 \pm 1/4$	$59/4 \pm 1/2$	$42/5 \pm 1/2$
هماتوکریت	$21/5 \pm 1/3$	$63/2 \pm 1/4$	$53/4 \pm 1/2$
پروتوپورفیرین	$93/3 \pm 1/3$	$91/5 \pm 1/2$	$68/3 \pm 1/4$
آهن سرم	$43/4 \pm 1/4$	$52/6 \pm 1/5$	$47/2 \pm 1/5$

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

نام آزمون	نمونه‌های افراد شاهد ^(۱)	نمونه‌های افراد مبتلا به کم‌خونی فقر آهن ^(۱)
فری‌تین سرم	$137/38 \pm 2/23$	$7/62 \pm 1/12$
هماتوکریت	$34/03 \pm 1/11$	$25/45 \pm 1/13$
ظرفیت کل اتصال آهن	$303/91 \pm 1/12$	$449/33 \pm 2/14$
آهن سرم	$22/36 \pm 1/23$	$33/32 \pm 2/12$
پروتوپورفیرین	$37/73 \pm 1/12$	$151/17 \pm 1/11$
درصد اشباع ترانسفرین	$38/42 \pm 2/11$	$78/21 \pm 2/12$

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

فسری تین بیش از ۲۵ میکروگرم در لیتر داشتند در فاصله سن ۱۲-۸ سال و علائم کم‌خونی فقر آهن 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 میلی لیتر از تعداد ۷۹ نفر در فاصله سنی ۱۱-۶ سال که علائم کم‌خونی فقر آهن را نشان داده‌اند و آزمایش سطح سرمی فری تین نیز این علائم را تایید نمود، از مراجعه کنندگان به بیمارستانها، درمانگاهها و آزمایشهای بابل از بهمن ۱۳۷۴ تا آذرماه ۱۳۷۸، تهیه گردید. نمونه‌های تهیه شده توسط آلومینم 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 موئنه به مدت ۵ دقیقه بررسی شدند. سطح سرمی آهن، ظرفیت کل اتصال آهن و فری تین 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 میلی لیتر اتانل ۹۰ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها توسط همزن مکانیکی مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد. پروتوپورفیرین موجود در محلول سوپرناتانت^(۱) 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 فقر آهن تجزیه و تحلیل گردید و

هماتوکریت، پروتوپورفیرین با هم مقایسه شده است (جدول ۱). حساسیت آزمون پروتوپورفیرین برای تشخیص کم‌خونی فقر آهن برابر با $93/3 \pm 1/3$ و ویژگی آن برابر با $91/5 \pm 1/2$ و ارزش پیش تشخیصی آن $68/3 \pm 1/4$ است که در مقایسه با سایر روشهای موجود برای بررسی کم‌خونی فقر آهن، شاخصهای تشخیصی بالاتری دارد. میانگین و انحراف معیار مقادیر کمی فری تین سرم، ظرفیت کل اتصال آهن سرم، هماتوکریت، آهن و پروتوپورفیرین سرم در افراد شاهد و مبتلا به کم‌خونی فقر آهن با هم مقایسه شده است (جدول ۲) نتایج حاصل نشان می‌دهند که در افراد مبتلا به کم‌خونی فقر آهن مقدار

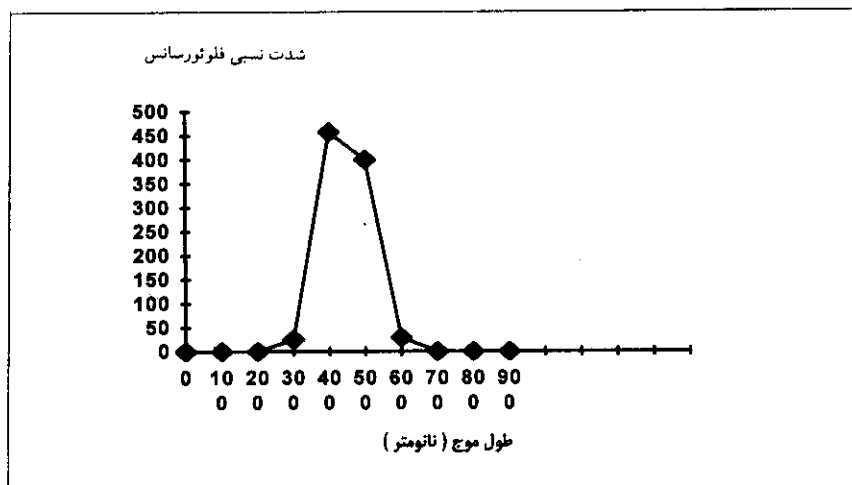
$P < 0/05$ رابطه معنی‌دار تلقی شد. برای محاسبه حساسیت‌ها تعداد نتایج مثبت واقعی آزمایشها به مجموع تعداد نتایج منفی کاذب و نتایج واقعی تقسیم گردید و برای بدست آوردن ویژگی هر یک از آزمونها تعداد نتایج منفی واقعی آزمایشها به مجموع نتایج مثبت واقعی به مجموع تعداد نتایج مثبت کاذب و نتایج مثبت واقعی تقسیم گردید و بدین طریق حساسیت، ویژگی و ارزش پیش تشخیصی هر یک از آزمونها بطور جداگانه محاسبه شد.



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

۱- Supernatant

سرم را ۳۰ تا ۳۴ میکروگرم در لیتر برای مردان و برای زنان ۲۵ تا ۲۱۰ 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 فقر آهن نیز با گزارش سایر محققان که میزان پروتوپورفیرین سرم را در افراد مبتلا به کم‌خونی فقر آهن بیش از ۴۰ میکرومول در هر مول «هم» یا ۵/۸ میکروگرم در هر گرم هموگلوبین و مقدار فری تین 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 فقر آهن 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 فقر آهن وجود دارد ($P < 0.05$) (نمودار ۲). 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 فقر آهن به همراه اندازه‌گیری مقدار هموگلوبین و فری تین سرم مفید است. ■



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

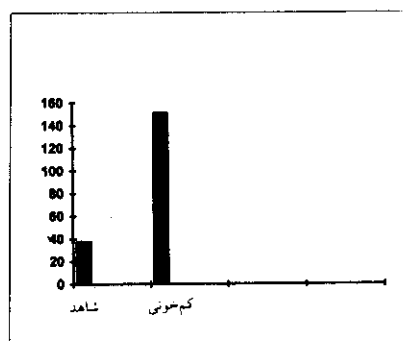
نانومتر حداکثر شدت نسبی فلئورسانس را داشت. نمونه‌ها از طیف پروتوپورفیرین استخراج شده سرم توسط روش اتانل در نمودار ۱ نشان داده شده است. در نمودار ۲ مقدار پروتوپورفیرین در افراد شاهد و افراد مبتلا به کم‌خونی فقر آهن نشان داده شده است [۱۶، ۱۷].

بحث و نتیجه‌گیری

از بین آزمونهای موجود برای تشخیص کم‌خونی فقر آهن مانند درصد اشباع ترانسفرین، هموگلوبین و فری تین سرم، مهمترین آزمون است، اما به دلیل هزینه بالای این آزمون در این پژوهش روش اندازه‌گیری پروتوپورفیرین سرم برای تشخیص کم‌خونی فقر آهن مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج بدست آمده از این پژوهش با گزارش سایر محققان که مقدار طبیعی اشباع شدن ترانسفرین را ۲۵ تا ۵۰ درصد و مقدار طبیعی ترانسفرین را ۲ تا ۴ گرم در لیتر و مقدار طبیعی آن را ۱۰/۷ تا ۳۲/۲ میکرومول در لیتر و مقدار فری تین

فری تین سرم برابر با 7.62 ± 1.2 میکرومول در لیتر و هماتوکریت $25/45/25 \pm 1/13$ ظرفیت کل اتصال آهن برابر با $33/32 \pm 1/12$ میکرومول در لیتر و مقدار پروتوپورفیرین به حدود $151/17 \pm 1/11$ میکرومول در لیتر و درصد اشباع شدن ترانسفرین برابر $78/2 \pm 1/2\%$ است. پروتوپورفیرین در طول موج ۴۵۷

پروتوپورفیرین سرم (میکرومول در لیتر)



نمودار شماره (۲): مقادیر پروتوپورفیرین سرم در افراد طبیعی و افراد مبتلا به کم‌خونی فقر آهن. (هر یک از ستون‌ها مقدار متوسط حاصل از انجام ۱۰-۱۲ آزمایش می‌باشد)

مراجع

1. Macdougall LC. Monitoring of iron status and iron supplementation in patient treated with erythropoietin. *Curr 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 Pediat* 1994;1:473-479.
3. Beldus M, Walter H, K.Thies K. Transferin receptor assay and zinc protoporphyrin as markers of iron deficient erythropoiesis 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 *rhodospirillum rubrum*. *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. Lto 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 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 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, Schreieiber WE, Jamani A. Quantitative fluorometric screening in different of thalassemia from iron deficiency anemia. *Eurp Hematology* 1998;60(4):826-831. ■

