مجله دیابت و لیپید ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۰؛ دوره ۱۰ (شماره ۴) ۳۶۵-۳۵۵

طراحی روش کمولومینسانس برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار

الهام‌السادات آقایی میبدی[۱]، ملیحه پاک نژاد[۲]، فرشته عتابی[۳]، آزاده ابراهیم حبیبی[۳]، باقر لاریجانی[۳]، کبری امیدفر[۳*]

چکیده

مقدمه: آلبومین فراوان‌ترین پروتئین سرم انسانی است. اندازه‌گیری آلبومین در ادرار به منظور ارزیابی عملکرد کلیه در بیماری‌های مختلف دارای اهمیت است. روش‌های مختلفی شامل روش‌های رسوب دهی، رنگ سنجی و روش‌های ایمونولوژیک برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار وجود دارد. از بین این روش‌ها، روش آنزیم ایمونواسی بر پایه کمولومینسانس دقت و حساسیت بالاتری دارد، در این تحقیق این روش به صورت رقابتی طراحی شد.

روش‌ها: به منظور طراحی این روش آزمایش‌های مختلفی انجام شد، جهت دستیابی به آنتی‌بادی علیه آلبومین، سلول‌های هیبریدومای موشی کشت شدند، آنتی‌بادی ترشح شده از این سلول‌ها در محیط کشت، پس از تخلیص و تعیین غلظت، در ساخت کونژوگه استفاده شد. سپس آزمایش تیتراسیون جهت به دست آوردن غلظت مناسب آنتی ژن مرحله پوشش دهی و رقت مناسب کونژوگه انجام گردید، بر اساس نتایج این آزمایش روش رقابتی کمولومینسانس طراحی شد، در نهایت دقت و صحت روش طراحی شده بررسی شد.

یافته‌ها: در بررسی دقت این روش آزمون درون سنجش و بین سنجش بر روی دو نمونه ادرار انجام شد و CV کمتر از ۱۰٪ مشاهده شد. برای بررسی صحت، غلظت آلبومین ۴۰ نمونه ادرار با استفاده از این روش اندازه‌گیری شد، نتایج این روش در تفکیک افراد بیمار از افراد سالم با نتایج کیت تجاری ۱۰۰٪ مطابقت دارد و همبستگی خوبی (r = ۰/۹۹) بین نتایج به دست آمده از این دو روش وجود دارد.

نتیجه‌گیری: محدوده قابل سنجش این روش µg/ml ۲۰۰- ۰/۲۵ است. روش رقابتی کمولومینسانس طراحی شده دارای حساسیت و دقت مناسب برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلبومینوری، کمولومینسانس، سنجش ایمنی

۱- گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات

۲- گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران

۳- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مقدمه

آلبومین[1] سرم، فراوان‌ترین پروتئین پلاسمای خون است. بعد از فیلتراسیون گلومرولی[2]، مقداری از آلبومین توسط سلول‌های اپی تلیال لوله‌ها باز جذب شده و توسط پروتئازهای موجود در این سلول‌ها به قطعاتی با وزن مولکولی متفاوت تبدیل شده، مجدداً به مایع لوله‌های ادراری ترشح می‌شود [۳-۱]. هنگامی که نفوذپذیری گلومرول کلیوی، نسبت به آلبومین به طور غیر طبیعی افزایش یابد، دفع آلبومین در ادرار بیش از مقدار طبیعی می‌شود. حضور آلبومین در ادرار با مقادیر ۲۹۹ - ۳۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته، ۱۹۹- ۲۰ میکروگرم در دقیقه در نمونه ادرار شبانه و ۲۹۹- ۳۰ میکروگرم در میلی‌گرم کراتینین در نمونه ادرار رندوم معادل میکروآلبومینوری[3] و بیشتر از مقادیر ذکر شده نشان دهنده ماکروآلبومینوری[4] می‌باشد. همچنین مقادیر کمتر از حدود فوق طبیعی در نظر گرفته می‌شود [۷-۴]. تشخیص میکروآلبومینوری از این جهت دارای اهمیت است که نشان دهنده تخریب کلیه و به عنوان یک عامل پیشگویی کننده وضعیت بیمار برای تشخیص ابتدایی بیماران قندی با نفروپاتی کلیه می‌باشد. در بسیاری از کشورهای جهان نفروپاتی دیابتی علت اصلی ESRD[5] است. بنابراین میکروآلبومینوری به عنوان یک علامت زودرس از ضایعات کلیوی دیابت است که در دیابت نوع ۱و۲ دیده می‌شود و پیش‌بینی کننده نفروپاتی دیابتی و پیشرفت به سمت ESRD است [۸]. آلبومینوری یک عامل پیش بینی کننده مستقل برای حوادث کاردیو واسکولر در بیماران دیابتی است. شناسایی حضور آلبومین به مقدار کم در ادرار به عنوان یک راهکار تشخیص خطر ابتلا به ضایعات کلیوی نه تنها در بیماران دیابتی، بلکه در پیگیری تشخیص و درمان بیماران با فشار خون بالا است و در عفونت‌های حاملگی نیز قابل استفاده می‌باشد [۱۰، ۹، ۷، ۵].

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار وجود دارد، که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند. از بین روش‌های مختلف برای اندازه‌گیری آلبومین، روش آنزیم ایمونواسی[6] (EIA) نسبت به سایر روش‌ها به جز HPLC[7] از دقت و حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد. در این تحقیق به منظور تشخیص آلبومین در ادرار از روش کمولومینسانس استفاده شد که به شکل یک سنجش ایمنی آنزیمی به روش رقابتی مستقیم با حساسیت بالا طراحی شده است. در این روش آنزیم HRP واکنش اکسیداسیون لومینول را به ۳-آمینوفتالات تسریع می‌کند، این واکنش همراه با تشعشع مقدار کم نور در طول موج ۴۲۸ نانومتر است.

در تحقیق مزبور میزان آلبومین موجود در نمونه‌های ادرار افراد سالم و دیابتی با استفاده از روش آنزیم ایمونواسی بر پایه کمولومینسانس[8] (کمی‌لومینسانس) سنجش می‌شود و با نتایج حاصل از روش استاندارد معمول آزمایشگاهی مقایسه می‌شود. آنتی‌بادی‌هایی[9] که در طراحی این روش به کار می‌رود تولید داخلی است و این آنتی‌بادی‌ها از سلول‌های هیبریدومای[10] موشی به دست می‌آیند. هدف از این تحقیق طراحی روش کمولومینسانس به منظور تشخیص آلبومین در ادرار است که از دقت و حساسیت مناسبی برخوردار باشد.

روش‌ها

تولید و تخلیص آنتی‌بادی علیه آلبومین

به منظور دستیابی به آنتی‌بادی علیه آلبومین، از سلول‌های هیبریدومای موشی تولید شده در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. ابتدا این سلول‌ها در محیط کشت RPMI با FBS ۳٪ کشت شدند، پس از رشد این سلول‌ها، جهت تأیید ترشح آنتی‌بادی علیه آلبومین از این سلول‌ها در محیط کشت، آزمایش الایزای غیر مستقیم انجام شد. آنتی‌بادی ترشح شده در محیط کشت با روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم اشباع و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شد، پس از تعیین

1- Albumin
2- Glomerular Filteration (GF)
3- Microalbminuria
4- Macroalbuminuria
5- End Stage Renal Disease

6- Enzyme Immuno Assay
7- High Performance Liquid Chromatography
۸- واژه Chemoluminescence بیشتر اوقات در متون علمی به شکل Chemiluminescence نوشته می‌شود.
9- Antibodies
10- Hybridoma

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

غلظت به روش برادفورد، از این آنتی‌بادی برای ساخت کونژوگه آنتی‌بادی- آنزیم پراکسیداز استفاده شد.

آماده‌سازی کونژوگه آنتی‌بادی- آنزیم پراکسیداز

این کونژوگاسیون با استفاده از روش اکسیداسیون سدیم متا پرایودات صورت گرفت. ۱۰۰µl از سدیم متاپرایدوات ۰/۱M (تازه تهیه شده) به محلول ۶ mg/ml آنزیم پراکسیداز اضافه شد، محلول پس از هم خوردن به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای محیط در تاریکی در بافر استات سدیم (۱mM، pH~۴/۴) در دمای ۴ °C دیالیز شد. pH محلول آنزیم دیالیز شده با استفاده از بافر کربنات سدیم (۰/۲M، pH~۹/۵)، بین ۹/۵-۹ تنظیم شد (تنظیم pH آنزیم در این محدوده بسیار مهم است) و این محلول بلافاصله به محلول ۱mg/ml آنتی‌بادی علیه آلبومین در بافر کربنات سدیم (۱۰mM، pH~۹/۵) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط هم خورد. به این محلول ۵۰µl از محلول سدیم بورهیدرات ۴mg/ml (تازه تهیه شده) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ °C هم خورد. سپس حجم برابر از محلول اشباع سولفات آمونیوم به این محلول اضافه شد و این محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. رسوب در بافر فسفات (۰/۰۱M، pH~۷/۲) حل شد. در پایان از ستون سفادکس[1] G-25 استفاده شد. خروجی‌های ستون با فعالیت بالا در ویال‌های کوچک تقسیم و در دمای ۷۰ °C- نگهداری شد.

آزمایش تیتراسیون جهت طراحی روش رقابتی کمولومینسانس

به منظور طراحی روش رقابتی کمولومینسانس، آزمایش تیتراسیون جهت به دست آوردن غلظت مناسب آنتی ژن پوشش‌دهی و رقت مناسب کونژوگه انجام شد؛ از آنتی ژن آلبومین سرم انسانی(HSA[2]) با غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ نانوگرم در ۱۰۰ میکرولیتر و از آنتی ژن آلبومین سرم گاوی (BSA[3]، به عنوان کنترل منفی) با غلظت ۸۰۰ نانوگرم در ۱۰۰ میکرولیتر برای پوشش دهی استفاده شد، پس از مرحله بلاک کردن با استفاده از محلول بلاک کننده (محلول ۳٪ شیر خشک بدون چربی در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار، pH~۷/۲)، از کونژوگه آنتی‌بادی- آنزیم پراکسیداز با رقت ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ در هر چاهک ریخته شد و پس از ۱ ساعت انکوباسیون و شستشو از سوبسترای کیت تجاری در هر چاهک ریخته شد (برای انتخاب سوبسترای مناسب این آزمایش با دو نوع سوبسترا انجام شد) و پلیت پس از چند ثانیه تکان دادن در دستگاه لومینومتر خوانده شد.

طراحی روش رقابتی کمولومینسانس

آزمایش کمولومینسانس به روش رقابتی به صورت زیر طراحی شد: در هر چاهک پلیت کمولومینسانس۱۰۰µl از آنتی ژن آلبومین سرم انسانی (HSA) با غلظت μl^{-1} ۱۰۰ ۸۰۰ng، ریخته شد و پلیت به مدت یک شبانه روز در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از شستشو به هر چاهک ۲۰۰µl از محلول بلاک کننده اضافه شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از شستشو ۴۵ µl از بافر فسفات (۰/۰۱ مولار، pH~۷/۲) و ۵ µl از هر غلظت استاندارد (۲۰۰ µg/ml، ۱۰۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰) تهیه شده (از آنتی ژن آلبومین سرم انسانی با غلظت ۱ mg/ml در زمینه ادرار با مقادیر بسیار کم آلبومین) در هر چاهک ریخته شد و سپس ۵۰µl از کونژوگه آنتی‌بادی- آنزیم پراکسیداز با رقت ۱/۱۰۰ در هر چاهک ریخته شد و پلیت به مدت ۳ ساعت و در آزمایش دیگری مشابه این آزمایش به مدت ۲ ساعت روی شیکر انکوبه شد. پس از شستشو، از سوبسترای کیت تجاری به مقدار ۱۰۰µl در هر چاهک ریخته شد. پلیت پس از چند ثانیه تکان دادن جهت خوانش در دستگاه لومینومتر قرار داده شد.

بررسی حساسیت[4] و ویژگی[5] روش پیشنهادی

جهت تعیین حساسیت روش پیشنهادی آنتی ژن آلبومین در غلظت های کمتر از ۱ µg/ml ساخته شد و مقادیر RLU بررسی شد. به منظور بررسی ویژگی این روش ترکیبات

1- Sephadex
2- Human Serum Albumin
3- Bovine Serum Albumin

4- Sensitivity
5- Specificity

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مختلفی به نمونه ادرار با غلظت ۳۰µg/ml افزوده شد وتـأثیر حضور ایـن عوامـل بـر عملکـرد آنتـی بـادی در ایـن روش بررسی شد.

ارزیابی خطی بودن[1] روش پیشنهادی

به منظور بررسی خطی بودن روش پیشنهادی از نمونـه ادرار بـا غلظـت ۲۲۶ µg/ml اسـتفاده شـد و مقـادیر RLU در رقت‌های مختلف این نمونه بررسی شد.

آزمون بررسی دقت و صحت روش پیشنهادی

بـه منظـور بررسـی دقـت روش پیـشنهادی، ارزیـابی درون سنجش و بین سـنجش بـر روی دو نمونـه ادرار بـا غلظـت پایین و بـالا انجـام شـد. بـه منظـور بررسـی صـحت روش پیشنهادی غلظت آلبومین ۴۰ نمونـه ادرار بـا اسـتفاده از ایـن روش اندازه‌گیری شد و نتایج این روش با نتـایج بـه دسـت آمده از کیت تجاری Randox مقایسه شد. اساس آزمایش در کیت تجاری Randox ایمونوتوربیدومتری است و این کیـت دارای حساسیت ۳µg/ml می باشد.

یافته‌ها

هدف از این تحقیق طراحی روش کمولومینسانس به منظـور اندازه‌گیری آلبومین در ادرار است کـه از دقـت و حـساسیت مناسبی برخوردار باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش الایزای غیر مستقیم، ترشح آنتی‌بادی علیـه آلبـومین از سـلول‌هـای هیبریـدوما در محیط کشت، تأیید شد. همچنین بـا انجـام آزمـایش متقـاطع مشخص شد که آنتی‌بادی ترشح شده در محیط کشت دارای ویژگی بالایی نسبت به آنتی ژن آلبومین سرم انسانی است.

در این تحقیق جهت به دست آوردن غلظت مناسب آنتی ژن مرحله پوشش دهی و رقت مناسب کونژوگـه بـرای طراحـی روش رقابتی کمولومینسانس، آزمایش تیتراسیون انجـام شـد (جدول ۱). باتوجه بـه جـدول، در غلظـت ۸۰۰ نـانوگرم در ۱۰۰ میکرولیتـر از آنتـی ژن پوشـش دهـی HSA و BSA و رقـت ۱/۱۰۰ از کونژوگـه آنتـی بـادی- آنـزیم پراکـسیداز، اختلاف RLU (واحد نسبی نور)[2] مناسبی بین HSA و BSA وجود دارد، از آنجا که دو نـوع سوبـسترا در دسـترس بـود، جهت انتخاب سوبسترای مناسب این آزمایش بـا سوبـسترای دوم در غلظت ۸۰۰ نـانوگرم در ۱۰۰ میکرولیتـر از آنتـی ژن HSA و رقت ۱/۱۰۰ از کونژوگه نیز تکرار شد که در نتیجـه آن مقدار RLU از ۵۲۶۸ به ۱۳۶۱۷ افزایش پیدا کرد، بنابراین در طراحی روش کمولومینسانس رقـابتی از سوبـسترای دوم استفاده شد.

روش کمولومینسانس رقابتی با دو انکوباسون متفاوت انجـام شد (جـدول ۲). در انکوباسـیون سـه سـاعته پلیـت حـاوی مخلـوط کونژوگـه و اسـتاندارد، اخـتلاف RLU، بـین غلظـت‌هـای ۱۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ µg/ml وجـود دارد، در صورتی که در RLU غلظت‌های کمتر از ۱۰ رونـد افزایـشی مشاهده نشد. در انکوباسیون دو ساعته پلیت حاوی مخلـوط کونژوگه و استاندارد، اختلاف RLU مناسبی بین غلظت‌هـای مختلف استانداردها وجود دارد، بنابراین آزمایش انکوباسیون دو ساعته به عنوان روش پیشنهادی انتخاب شد. بدین ترتیب نمـودار مقـادیر RLU برحـسب غلظـت بـرای زمـان‌هـای انکوباسیون متفاوت بر اساس داده‌های جـدول ۲، رسـم شـد (نمودار ۱). با توجه به نمودار، روند افزایش RLU با کـاهش غلظـت اسـتاندارد در انکوباسـیون دو سـاعته منطقـی‌تـر از انکوباسـیون سـه سـاعته اسـت. بنـابراین بـرای تـشخیص غلظت‌های کمتر از ۱، انکوباسیون دو ساعته مناسب‌تر اسـت. غلظت‌هـای مختلـف اسـتانداردها در ۱۰ روز بـا اسـتفاده از روش پیشنهادی اندازه‌گیری شد و میـانگین مقـادیرRLU بـه ازاء هر غلظت استاندارد محاسبه شد (جدول ۳). با توجه بـه جدول خطای نسبی استانداردها تقریبا ۱۰٪ می‌باشد. نمـودار غلظت بر حسب میانگین مقادیر RLU در ۱۰ روز با اسـتفاده از روش پیشنهادی براساس داده‌هـای جـدول ۳، رسـم شـد (نمودار ۲). در نمودار ۲، خط پیوسته ناحیـه خطـی را نـشان می‌دهد و خط چـین ناحیـه‌ای را نـشان مـی‌دهـد کـه در آن خطای اندازه‌گیری زیاد است و غلظت دقیق قابل اندازه‌گیری نیـست، بنـابراین روش طراحـی شـده در محـدوده غلظـت ۱۰-۲۰۰ µg/ml به صورت خطی رفتار می‌کند.

1- Linearity

2- Relative Light Unite

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

جهت تعیین حساسیت این روش آنتی ژن آلبومین در غلظت‌های کمتر از µg/ml ۱ ساخته شد و پس از انجام آزمایش و بررسی مقادیر RLU مشخص شد که این روش قادر به تشخیص دقیق غلظت در محدوده µg/ml ۲۰۰-۱ است و مقادیر کمتر از µg/ml ۱ با توجه به نمودار ۲ (نمودار داخلی) به صورت یک حد بالا برای غلظت قابل تشخیص است.

حضور عوامل مداخله‌گر در زمینه ادرار می‌تواند بر عملکرد آنتی‌بادی و نتایج به دست آمده از سنجش تأثیر داشته باشد. به منظور بررسی ویژگی روش پیشنهادی نقش عوامل مداخله‌گر شامل استامینوفن[1]، اسید آسکوربیک[2]، کافئین[3]، اسید جنتیسیک[4]، آمپی سیلین[5]، تتراسایکلین[6]، دی گلوکز[7] ($2g/dL^{-1}$)، هموگلوبین[8] ($1mg/dL^{-1}$)، اکسی تتراسایکلین[9] ($100mg/dL^{-1}$)، آلفا- اسید گلیکو پروتئین[10] ($0/2dL/mg^{-1}$)، اسید بتا هیدروکسی بوتیریک[11] ($0/22g/dL^{-1}$)، اسید اوریک[12] (g/dL^{-1} ۰/۱)، اوره[13] ($10g/dL^{-1}$)، استون[14] ($75\ mg/dL^{-1}$)، آلفا آمیلاز[15] ($4000U/L^{-1}$)، آلفا آنتی تریپسین[16] ($0/012L/g^{-1}$)، هولوترانسفرین[17] ($10dL/mg^{-1}$)، کلسیم[18] ($100dL/mg^{-1}$)، اسید سالیسیلیک[19] و اسید استیل سالیسیلیک[20] ($400dL/mg^{-1}$) بر روی نمونه ادرار با غلظت µg/ml ۳۰ آلبومین که مقدارRLU آن ۵۴۵۰ بود، بررسی شد. با افزودن هر یک از ترکیبات بالا به این نمونه و انجام روش پیشنهادی، مقدارRLU تغییری نکرد. بنابراین روش پیشنهادی در حضور ترکیبات ذکر شده نسبت به آلبومین اختصاصی عمل می کند.

به منظور بررسی خطی بودن روش پیشنهادی از نمونه ادرار با غلظت µg/ml ۲۲۶ استفاده شد. این نمونه در رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ با استفاده از استاندارد صفر تهیه شد. پس از انجام روش پیشنهادی و بررسی مقادیر RLU به دست آمده در رقت‌های مختلف و محاسبه ضریب رقت، مشخص شد که این روش، همانطورکه نمودار ۲ نشان می‌دهد در محدوده µg/ml ۲۰۰-۱۰ به صورت خطی رفتار می‌کند.

نتایج ارزیابی درون سنجش و بین سنجش به منظور بررسی دقت روش پیشنهادی در جدول ۴، آمده است. به طور کلی در این ارزیابی از دو نمونه ادرار با غلظت µg/ml ۱۴/۴ و µg/ml ۱۳۴ استفاده شد، در ارزیابی درون سنجش غلظت آلبومین هر نمونه ۱۰ بار در یک روز با روش پیشنهادی اندازه‌گیری شد و به ترتیب CV، ۷٪ و ۶٪ مشاهده شد. در ارزیابی بین سنجش غلظت آلبومین هر نمونه در ۱۰روز متوالی با این روش اندازه‌گیری شد و به ترتیب CV، ۱۰٪ و ۹٪ مشاهده شد.

به منظور بررسی صحت روش پیشنهادی، غلظت آلبومین ۴۰ نمونه ادرار با استفاده از این روش اندازه‌گیری شد و نتایج این روش با نتایج به دست آمده از کیت تجاری Randox مقایسه شد (نمونه‌های دارای غلظت بالاتر از µg/ml ۲۰۰ با استفاده از استاندارد صفر رقیق شدند). نتایج در جدول ۵ آمده است. در بررسی نمونه‌های مشابه (ردیف ۲۷ جدول ۵) که دارای غلظتی بالاتر از µg/ml ۲۰۰ بودند، مقادیر RLU مشابه مقایر RLU در غلظت µg/ml ۲۰۰ به دست آمد. به عبارتی در مقدار RLU روند کاهشی مشاهده نشد. بنابراین در غلظت‌های بالاتر ازµg/ml ۲۰۰ پدیده هوک مشاهده می‌شود؛ بدین ترتیب نمونه‌های دارای غلظت‌های بالاتر ازµg/ml ۲۰۰ باید رقیق شوند و جهت تعیین غلظت واقعی این نمونه‌ها ضریب رقت محاسبه شود. براساس این نتایج، منحنی غلظت در کیت تجاری (C_C) بر حسب غلظت در روش پیشنهادی (C_S) رسم شده است (نمودار ۳). ضریب رگراسیون نزدیک ۱ نشان می‌دهد که این دو غلظت ارتباط خطی مناسبی با هم دارند. شیب خط این نمودار ۵۲ درجه می‌باشد.

در نمودار شماره ۴، منحنی تمام لگاریتمی غلظت در کیت تجاری (C_C) بر حسب غلظت در روش پیشنهادی (C_S)

1- Acetaminophen
2- Ascorbic acid
3- Caffeine
4- Gentisic acid
5- Ampicillin
6- Tetracycline
7- D-glucose
8- Hemoglobin
9- Oxytetracycline
10- α-acid glycoprotein
11- β-hydroxybutyric acid
12 Uric acid
13- Urea
14- Acetone
15- α-amylase
16- α-antitrypsin
17- holo-transferrin
18- Calcium
19- Salicylic acid
20- Acetylsalicylic acid

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

رسم شده است. ضریب رگراسیون نزدیک ۱ در این نمودار نشان می‌دهد که فرض خطی بودن ارتباط دو غلظت در نمودار ۳، فرض درستی بوده است.

جدول ۱- مقادیر RLU به دست آمده از آزمایش تیتراسیون برحسب نوع آنتی ژن مرحله پوشش دهی، غلظت پوشش دهی و رقت کونژوگه

	غلظت پوشش دهی با BSA	غلظت پوشش دهی باHSA		
کونژوگه با رقت ۱/۱۰۰	۸۰۰*	۴۰۰*	۶۰۰*	۸۰۰*
	۶۰۸	۳۵۸۵	۴۱۱۳	۵۲۶۸
کونژوگه با رقت ۱/۲۰۰	–	۱۱۱۱	۱۳۹۶	۱۳۲۲

* بیانگر غظت پوشش دهی بر حسب نانوگرم در ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد.

در هر غلظت پوشش دهی به ازاء مقادیر متفاوت رقت کونژوگه، آزمایش دو بار تکرار شد.

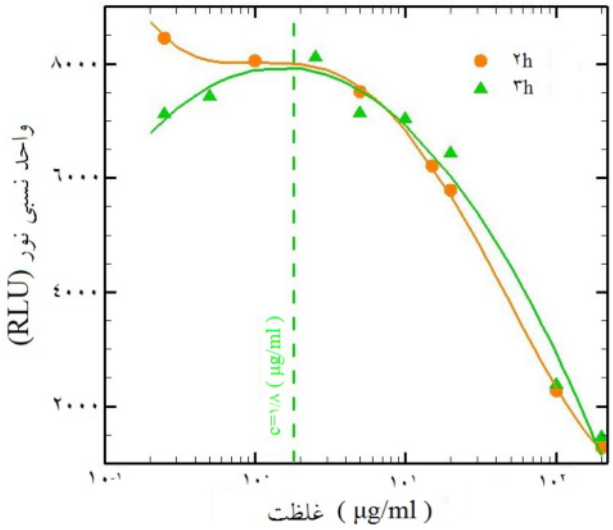
تمام مقادیر RLU به صورت میانگین گزارش شده است.

جدول۲- مقادیر RLU به دست آمده در دو زمان انکوباسیون متفاوت به ازاء غلظت‌های استاندارد

غلظت استاندارد (µg/ml)	مقادیرRLU در انکوباسیون سه ساعته	مقادیرRLU در انکوباسیون دو ساعته
۰	۸۳۶۲	۸۴۷۹
۰/۲۵	۷۱۱۷	۸۳۶۳
۰/۵	۷۴۲۰	۷۹۵۴
۲/۵	۸۱۰۵	۷۸۷۴
۵	۷۱۲۹	۷۵۶۹
۱۰	۷۰۲۳	۶۸۲۲
۲۰	۶۴۲۱	۵۸۱۴
۱۰۰	۲۳۷۱	۲۲۷۰
۲۰۰	۱۴۴۶	۱۲۷۲

به ازاء غلظت‌های مختلف استانداردها در هر انکوباسیون آزمایش ده بار تکرار شد.

تمام مقادیر RLU به صورت میانگین گزارش شده است.



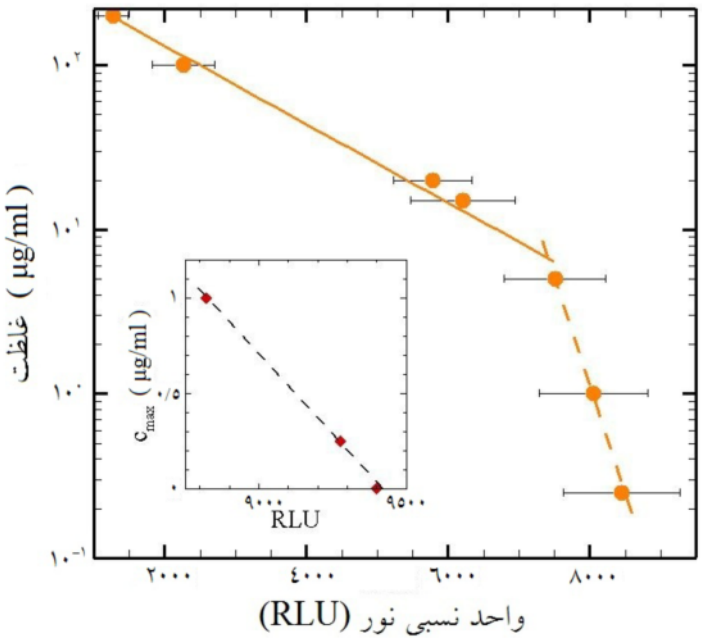
نمودار ۱- نمودار مقادیر RLU برحسب غلظت درانکوباسیون دو ساعته و انکوباسیون سه ساعته بر اساس داده‌های جدول ۲

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

جدول ۳- مقادیر RLU به دست آمده به ازاء هر غلظت استاندارد در ۱۰ روز با استفاده از روش پیشنهادی

غلظت استاندارد	۰	۰/۲۵	۱	۵	۱۰	۲۰	۱۰۰	۲۰۰
مقادیر RLU	۸۴۷۹±۴۵۰	۸۴۵۳±۸۷۱	۸۰۵۴±۴۴۸	۷۵۰۸±۶۸۶	۶۲۰۹±۷۸۰	۵۷۸۱±۵۵۷	۲۲۷۰±۴۶۱	۱۲۷۲±۲۱۴

تعداد نمونه مورد مطالعه: ۸ نمونه است که همان غلظت‌های استاندارد می باشد.
هر غلظت استاندارد به مدت ۱۰ روز و در هر روز ۲ بار اندازه گیری شد.
واحد غلظت استاندارد بر حسب µg/ml می باشد.
تمام مقادیر RLU به دست آمده به ازاء هرغلظت استاندارد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.



نمودار ۲- نمودار غلظت برحسب میانگین مقادیر RLU در ۱۰ روز با استفاده از روش پیشنهادی براساس داده‌های جدول ۳
* نمودار داخلی مقدار بیشینه غلظت (C_{max}) برحسب مقدار RLU را برای غلظت‌های کمتر از µg/ml ۱ نشان می‌دهد. در این غلظت‌ها خطا در حدی است که مقدار دقیق غلظت قابل اندازه گیری نمی باشد و تنها یک حد بالا برای غلظت قابل تشخیص است.

جدول ۴- نتایج ارزیابی درون سنجش[1] و بین سنجش[2] دو نمونه ادرار

	درون سنجش	%CV	بین سنجش	%CV
نمونه با غلظت ۱۴/۴ µg/ml	۱۱/۴ ± ۰/۸	۷	۱۱/۵ ± ۱/۲	۱۰
نمونه با غلظت ۱۳۴ µg/ml	۹۷ ± ۶	۶	۹۵ ± ۹	۹

تعداد نمونه مورد مطالعه: ۲ نمونه ادرار
غلظت آلبومین هر نمونه در هر ارزیابی (درون سنجش، بین سنجش) ۱۰ بار اندازه گیری شد.
مقادیر غلظت در هر ارزیابی به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده است.
CV (ضریب تغییرات) به صورت درصد بیان شده است.

1- Intra assay
2- Inter assay

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

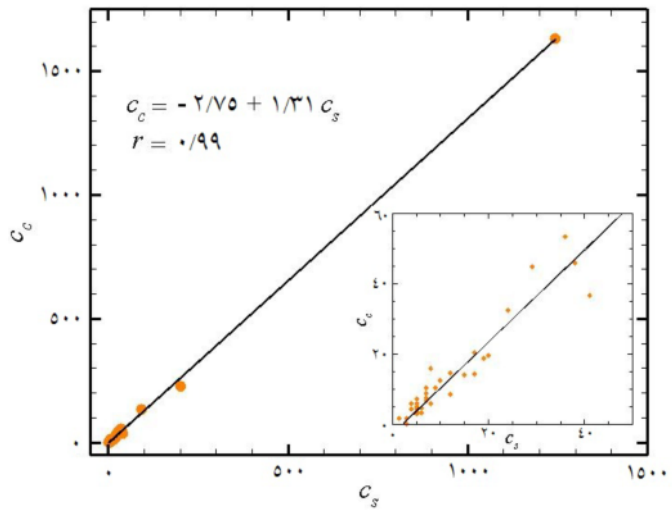
جدول ۵- مقایسه نتایج سنجش غلظت آلبومین در ۴۰ نمونه ادرار در کیت تجاری و روش پیشنهادی

ردیف	غلظت در کیت تجاری (µg/ml)	غلظت در روش پیشنهادی (µg/ml)	ردیف	غلظت در کیت تجاری (µg/ml)	غلظت در روش پیشنهادی (µg/ml)
۱	کمتر از ۳	کمتر از ۱	۲۱	۱۴	۱۵
۲	کمتر از ۳	۳	۲۲	۱۴/۴	۱۲
۳	۴/۵	۶	۲۳	۱۵/۸	۸
۴	۳۲/۵	۲۴	۲۴	۱۸/۸	۱۹
۵	۴۵/۸	۳۸	۲۵	۴۴/۹	۲۹
۶	۱۳۴	۹۳	۲۶	۵۳/۶	۳۶
۷	۲۲۶	۲۰۰	۲۷	۱۶۳۲	۱۲۴۴
۸	۳۶/۷	۴۱	۲۸	۶/۶	۷
۹	۱۹/۴	۲۰	۲۹	کمتر از ۳	۳
۱۰	۲۰/۲	۱۷	۳۰	۱۴/۱	۱۷
۱۱	۳	۵	۳۱	۴/۶	۵
۱۲	۳/۲	۶	۳۲	۵/۸	۴
۱۳	۳/۵	۵	۳۳	۸/۵	۱۲
۱۴	۴/۲	۴	۳۴	۴/۱	۵
۱۵	۵/۸	۸	۳۵	۷	۵
۱۶	۵/۹	۵	۳۶	۳/۴	۵
۱۷	۷/۵	۷	۳۷	۱۰/۳	۷
۱۸	۸/۸	۷	۳۸	کمتر از ۳	۰
۱۹	۱۰/۳	۹	۳۹	کمتر از ۳	۰
۲۰	۱۲/۴	۱۰	۴۰	۵	۵

تعداد نمونه مورد مطالعه: ۴۰ نمونه ادرار

غلظت آلبومین هر نمونه در هر روش (روش کیت تجاری، روش پیشنهادی) دو بار اندازه گیری شد.

مقادیر غلظت به صورت میانگین گزارش شده است.

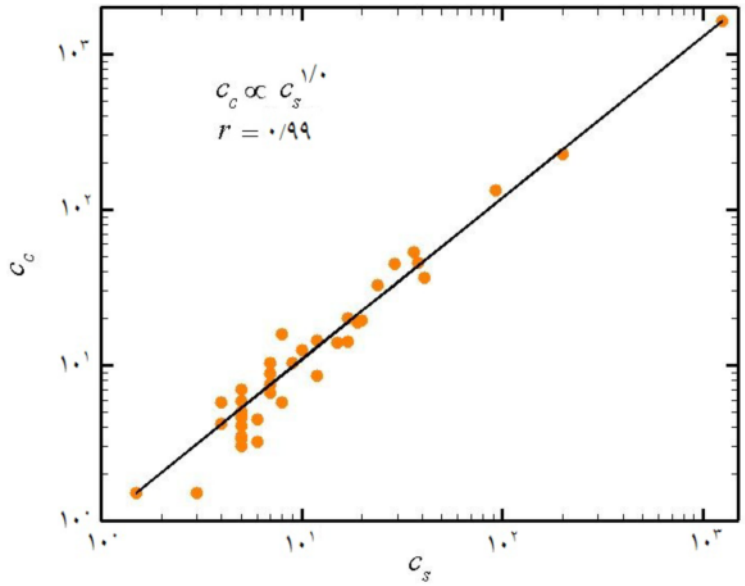


نمودار ۳- منحنی غلظت در کیت تجاری (C_C) برحسب غلظت در روش پیشنهادی (C_S) بر اساس داده‌های جدول ۵

با توجه به ضریب رگراسیون $r = 0/99$، این دو غلظت ارتباط خطی مناسبی با هم دارند.

شیب خط این نمودار ۵۲ درجه می‌باشد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]



نمودار ۴- منحنی تمام لگاریتمی غلظت در کیت تجاری (C_C) برحسب غلظت در روش پیشنهادی (C_S)

بحث

آلبومین سرم فراوان‌ترین پروتئین پلاسمای خون است که در کبد تولید می‌شود و مهم‌ترین نقش آن، تنظیم حجم خون از طریق حفظ فشار اسمزی کلوئیدی است. این مولکول به عنوان حامل هورمون‌های محلول در چربی، نمک‌های صفراوی، بیلی روبین آزاد، اسیدهای چرب آزاد، کلسیم، یون‌ها و برخی از داروها استفاده می‌شود. میکروآلبومینوری هنگامی رخ می‌دهد که از کلیه مقادیر کمی از آلبومین به ادرار نشت می‌کند [۱۱]. اندازه‌گیری آلبومین در ادرار از این جهت دارای اهمیت است که شاخص مهمی در تشخیص بیماری قلبی- عروقی و تشخیص زود هنگام عارضه کلیوی در افراد دیابتی و افراد با فشار خون بالا می‌باشد.

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار وجود دارد، که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشد. یکی از دقیق‌ترین روش‌ها روش کروماتوگرافی (HPLC) است. به واسطه این روش می‌توان ضایعات کلیوی را در بیماران دیابتی و افراد با فشار خون بالا ۴ سال زودتر از دیگر روش‌ها تشخیص داد [۱۳، ۱۲]. معایب این روش هزینه بالای انجام آزمایش و همچنین دستگاه مورد نظر می‌باشد [۱۴].

روش‌های دیگر اندازه‌گیری آلبومین، روش‌های رسوب‌دهی شامل جوشاندن، تری کلرواستیک اسید و سولفوسالیسیلیک اسید [۱۵] و روش‌های رنگ سنجی شامل برادفورد[1]، بیوره[2] و آلبومین آبی ۵۸۰[3] می‌باشد [۱۶]. روش‌های ایمونولوژیک شامل ایمونواسی (رادیوایمونواسی[4] (RIA)، آنزیم ایمونواسی [۱۷]) ایمونونفلومتری[5] (IN)، ایمونوتوربیدومتری[6] (IT)، برای اندازه‌گیری کمی آلبومین و استریپ‌ها به منظور اندازه‌گیری نیمه کمی و کیفی آلبومین استفاده می‌شود [۱۹، ۱۸].

از بین روش‌های مختلف ارائه شده برای اندازه‌گیری آلبومین روش‌های رنگ سنجی و کدورت سنجی [۱۶، ۱۵] دارای حساسیت مناسب نبوده ولی در عوض روش‌های رادیو و آنزیم ایمونواسی دارای سادگی و حساسیت مناسب در حد نانوگرم در میلی‌لیتر و حتی کمتر می‌باشند. از طرفی در حالی که روش‌های ایمونولوژیک فقط قادر به شناسایی مولکول کامل آلبومین می‌باشند، ولیکن با روش HPLC می‌توان با دقت و حساسیت بالا آلبومین و قطعاتی از آلبومین را که تحت تأثیرپروتئازها قرار گرفته‌اند شناسایی

1- Bradford
2- Biuret
3- Albumin Blue 580
4- Radio Immuno Assay
5- Immunonephelometric
6- Immunoturbidometric

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

کرد [۲۰]. در این تحقیق آزمایش‌های مختلفی برای طراحی یک روش رقابتی مناسب انجام شد، تفاوت این آزمایش‌ها فقط در مرحله انکوباسیون پلیت حاوی مخلوط استاندارد و کونژوگه بود. این مرحله از نظر شرایطی مانند درجه حرارت انکوباسیون، زمان انکوباسیون و مخلوط کردن معرف‌ها قبل و در طول مرحله انکوباسیون دارای اهمیت است.

بر اساس آزمایش‌های انجام شده، انکوباسیون پلیت حاوی مخلوط استاندارد و کونژوگه در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت روی شیکر، دارای نتایج قابل قبولی بود و این آزمایش به عنوان روش پیشنهادی انتخاب شد. از طرفی نتایج آزمون بررسی دقت و صحت روش پیشنهادی نشان می‌دهد که این روش در اندازه‌گیری آلبومین در ادرار دارای دقت و حساسیت مناسبی است.

تا کنون روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار طراحی شده است؛ در سال ۱۹۸۶ روش ایمنی آنزیمی رقابتی برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار طراحی شد که دارای انکوباسیون دو مرحله‌ای بود. محدوده قابل سنجش در این روش µg/ml ۷۸– ۰/۵و حساسیت آن µg/ml ۰/۵ گزارش شده است [۲۱]. همچنین در این سال روش ایمنی آنزیمی رقابتی سریعی برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار طراحی شد که محدوده قابل سنجش در آن µg/ml ۲۰۰– ۰/۹ و حساسیت آن کمتر از µg/ml ۰/۹ گزارش شده است [۲۲]. در سال ۱۹۹۱ روش جدید ایمونوتوربیدومتری بر پایه حضور پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ ایجاد شد که حضور این پلیمر، کمپلکس ایمنی بین آلبومین و آنتی‌بادی اختصاصی را تسریع کرد [۲۳]. در سال۱۹۹۲ چندین روش ایمونولوژیکی (ایمونوتوربیدومتری، ایمونونفلومتری، رادیوایمونواسی) برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار با هم مقایسه شدند [۲۴]. در سال۲۰۰۲ روش‌های ایمونوکروماتوگرافی با استفاده از ذرات لاتکس و طلاپوشانیده شده با آنتی‌بادی نیز طراحی شده و به بازار عرضه شده است، اما هزینه انجام تست برای هر فرد نسبتا گران است [۲۵]. با توجه به اینکه آلبومین در ادرار به دو شکل واکنش‌پذیر[1] و غیر واکنش‌پذیر از لحاظ ایمنی[2] وجود دارد، در افراد دیابتی با پیشرفت میکرو آلبومینوری غلظت آلبومین غیر واکنش‌پذیر افزایش می‌یابد، در حقیقت برای بیماران دیابتی نوع ۱ و ۲ تعیین این آلبومین به خصوص بوسیله HPLC می‌تواند شروع آلبومینوری مزمن را به ترتیب ۳/۹ و ۲/۴ سال زودتر پیش‌بینی کند. بر این اساس تحقیقاتی در زمینه مقایسه روش HPLC با روش‌های دیگر انجام شد: در سال ۲۰۰۳ HPLC با RIA، IT و IN [۲۶]، در سال ۲۰۰۴ HPLC با RIA [۲۷] و در سال ۲۰۰۷ HPLC با IN [۲۸] مقایسه شد. در سال ۲۰۰۳ روش کمولومینسانس رقابتی سریع و حساسی برای اندازه‌گیری مقادیر پایین آلبومین در ادرار طراحی شد. در این روش از استراکریدینیوم به عنوان نشانه استفاده شده است. حساسیت این روش ng/ml ۱۰ می‌باشد که به نظر می‌رسد دارای حساسیت بیشتری نسبت به روش پیشنهادی است در این روش از آنتی‌بادی متصل به ذرات پارا مغناطیسی برای جداسازی کمپلکس ایمنی، استفاده شده است [۲۹].

در سال ۲۰۰۵ Woodhead و همکاران روش کمولومینسانس ساده‌ای را برای اندازه‌گیری آلبومین در ادرار طراحی کردند. در این روش هم از استر اکریدینیوم به عنوان نشانه استفاده شده است. این روش دارای دو مرحله انکوباسیون است، در صورتی که روش پیشنهادی دارای یک مرحله انکوباسیون می‌باشد. حساسیت این روشµg/ml ۰/۰۱۶ است و محدوده قابل سنجش آن µg/ml ۵– ۰/۱ می‌باشد. بنابراین برای اندازه‌گیری غلظت آلبومین ادراری با استفاده از این روش، نمونه‌ها باید ۱۰ تا ۵۰ برابر رقیق شوند، در صورتی که محدوده قابل سنجش در روش پیشنهادی µg/ml ۲۰۰– ۰/۲۵ است و تنها نمونه‌های بالاتر از µg/ml ۲۰۰ باید رقیق شوند.CV به دست آمده از آزمون ارزیابی بین سنجش در این روش ۱۵٪ می‌باشد که در مقایسه با روش پیشنهادی، دارای درصد خطای نسبی بیشتری می‌باشد [۳۰].

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. محققین بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را از این مرکز اعلام می‌دارند.

1- Immunochemically reactive
2- Immunochemically nonreactive

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مأخذ

1. Hillard LM, Osicka TM, Clavant SP, Robinson PJ, Nikolic DJ, Comper WD. Characterization of the urinary albumin degradation pathway in the isolated perfused rat kidney. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 36-44.
2. Khatam Z, Mcilveen DW, Nesbitt SG. Screening for microalbuminuria by use of microproteinuria. *Eeast Mediteer Health* 2005; 11: 358-365.
3. Russo LM, Bakris GL, Comper WD. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 899-919.
4. Abid O, Sun Q, Sugimoto K, Mercan D, Vincent JL. Predictive value of microal-buminuria in medical ICU patients: results of a pilot study. *Chest* 2001; 120: 1984-1988.
5. Khawali C, Andriolo A, Ferreira SR. Comparison of methods for urinary albumin determination in patients with type 1 diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 337-343.
6. King JS, Fielden M, Boyce WH. A procedure for concentration of normal urinary albumin and globulins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 108: 726-728.
7. Meinhardt U, Ammann RA, Fluck C. Microalbumonuria in diabetes mellitus: efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 254-257.
8. Pfat T, Franz U, Herfeld F. Rapid immunochro-matographic strip test for the detection of albuminuria and brief literature review on albuminuria screening. *Eur J Med Res* 2006; 11: 3-6.
9. Gansevoort RT, Verhave JC, Hillege HL. The validity of screening based on spot morning urine samples to detect subjects with microal-bumonuria in the general population. *Kidney Int* 2005; 94: 25-35.
10. Romundstad S, Holmen J, Hallan H, Kveni ld K. Microalbumonuria, cardiovascular disease and risk factors in a nondiabetic/ nonhyper-tensive population. The Nord- Trondelag Health study (HUNT, 1995-97). *J Intern Med* 2002; 252: 164-172.
11. Viberti GC, Jarrett RJ, Cartney M, Keen H. Increased glomerular permeability to albumin induced by exercise in diabetic subjects. *Diabetologirz* 1978; 14: 293-300.
12. Comper WD, Osicka TM, Jermus G. High prevalence of immuno-uneractive intact albumin in urine of diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 4: 33-42.
13. Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 219-225.
14. Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin GL. Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin Chem* 2006; 52: 389 -397.
15. Hill PG. The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 565-578.
16. Kessler MA, Meinitzer A, Petak W, Wolfbeis OS. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the albumin blue 580 fluorescence assay. *Clin Chem* 1997; 43: 996-1002.
17. Fielding BA, Price DA, Houlton CA. Enzyme immunoassay for urinary albumin. *Clin Chem* 1983; 29: 355-357.
18. Teppo AM. Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. *Clin Chem* 1982; 28: 1359-1361.
19. Woo J, Floyd M, Cannon DC, Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. *Clin Chem* 1978; 24: 1464-1467.
20. Redon J. Measurement of microalbuminuria - what the nephrologists should know. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 1: 4.
21. Townsend JC. A competitive immunoenzy-mometric assay for albumin in urine. *Clin Chem* 1986; 32: 1372-1374.
22. Chesham J, Anderton SW, Kingdon CFM. Rapid competitive enzymoimmunoassay for albumin in urine. *Clin Chem* 1986; 32: 669-671.
23. Gigli G, Altomonte F, Bocca B, Colombano M, De Grandi R, Ponte M, Triolo A. Evaluation of a new immunoturbidimetry technique for measuring microalbuminuria. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1991; 67: 273-278.
24. Ottavio G, Giuseppe P, Aldo C, Lorella C, Amalia L, Monica N, et al. Which method for quantifying microalbuminuria in diabetics. *Acta Diabetol* 1992; 28: 3-4
25. Larijani B, Javadi A, Shafaee M. Screening for microalbuminuria in the early detection of diabetic nephropathy: A cheap and simple method. *Acta Med Iran* 2000; 40-43.
26. Wayne DC, George J, Tanya MO. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 2004; 37: 105-111
27. Osicka TM, Comper WD. Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin Chem* 2004; 50: 2286 –2291.
28. Dianna JM, Kevan RP, Elizabeth LM, Qing S, Steven JC, Paul ZZ, et al. HPLC-Detected albuminuria peredicts mortality. *J Clin Epidemiol* 2007; 18: 3171-3176.
29. Horton JK, Davies M, Woodhead JS, Weeks I. A rapid and sensitive method for estimating low concentrations of albumin in human urine. *Clin Chim Acta* 1989; 186: 45-51.
30. Bagazgoitia FJ, Garcia JL, Ibarra JM, Patiño R, Diéquez C, Weeks I, et al. Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for urinary albumin. *J Biolumin Chemilumin* 1989; 3: 169-174.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]