

# اندازه گیری هموگلوبین A<sub>1</sub>C در سگهای به ظاهر سالم نژاد شینلو

دکتر ملیحه عباسعلی پورکبیره<sup>۱</sup> دکتر ابراهیم جوان آملی<sup>۲</sup> دکتر سعید بکائی<sup>۳</sup> دکتر پروانه خضرای نی<sup>۴</sup>

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۴، ۴۳-۴۱، (۱۳۸۰)

کیت هموگلوبین گلیکوزیله (GHB) مورد استفاده از شرکت مهسایاران و کیت اندازه گیری هموگلوبین از شرکت زیست شیمی تهیه گردید. و آزمایشها بر روی خون تام انجام گردید. با توجه به تحقیقاتی که در انسان انجام شده است در افراد نرمال رابطه ای بین قندخون ناشتا و میزان هموگلوبین A<sub>1</sub>C، و همچنین تفاوت معنی داری بین حالت ناشتا و غیرناشتا وجود ندارد و از طرفی اجزای ناپایدار هموگلوبین گلیکوزیله (Hb A<sub>1</sub>C) در این آزمایش تداخل ایجاد نمی کند (۲). لذا ناشتا بودن سگهای مورد مطالعه در این تحقیقات اهمیت نداشت. از طرف دیگر اورمیک بودن و مصرف داروها موجب افزایش یا کاهش نتایج نمی شود. در این روش که به عنوان کلریمتریک نامیده می شود پنتوزها در مجاورت اسیدهای ضعیف تشکیل فورفورال و هگزوزها تشکیل هیدروکسی متیل فورفورالها می دهند. بنابراین هموگلوبین A<sub>1</sub>C در معرض اسید ضعیفی مثل اسید اکسالیک هیدرولیز شده و ۵ هیدروکسی متیل فورفورال (5-HMF) آزاد می شود. سپس پروتئینها به وسیله اسید تری کلرواستیک رسوب داده می شود و مایع رویی با اسید تایوباربتوریک وارد واکنش شده و محلول رنگی ایجاد می گردد که حداکثر جذب نوری آن در طول موج ۴۴۳ نانومتر قرائت و میزان (Hb A<sub>1</sub>C) اندازه گیری می شود. واکنش برای گلوکز متصل به کتوآمین اختصاصی است و به وسیله هموگلوبین F و هموگلوبینهای دیگر و همچنین PreA<sub>1</sub>C تحت تأثیر قرار نمی گیرد.

## نتایج

نتایج حاصل از اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1</sub>C) در جدول ۱ ارائه شده است. همان گونه که ملاحظه می شود میانگین و انحراف معیار، خطای معیار و سایر پارامترهای مورد نظر به تفکیک سن و جنس در این جدول آورده شده است. برای مقایسه میانگینهای مقادیر HbA<sub>1</sub>C برحسب جنس از آزمون T- student و برحسب سن از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید. براساس آزمونهای انجام شده علی رغم مشاهده اختلاف ظاهری مقادیر محاسبه شده و بالاتر بودن مقدار متوسط HbA<sub>1</sub>C در جنس نر (۵/۷۴ درصد) نسبت به جنس ماده (۵/۴۵ درصد) از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نگردید، همچنین با آنکه مقادیر پارامتر مورد نظر در گروه سنی اول (۶-۰ ماه) و گروه سنی چهارم (۱۹ ماه و بیشتر) (۵/۷۲ درصد) و در گروه سنی دوم (۱۲-۷ ماه)، (۵/۸۰ درصد) و گروه سنی سوم (۱۸-۱۳ ماه)، (۵/۰۹ درصد) بوده است اما آزمون آنالیز واریانس یکطرفه این اختلافات را تأیید نمود.

## بحث

تعداد ۴۵ قلابه سگ نژاد شینلو در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت که ۳۰ قلابه از سگها نر و ۱۵ قلابه دیگر ماده بودند. در کل جمعیت مورد مطالعه حداقل میزان هموگلوبین گلیکوزیله مربوط به سگهای نر (۳/۳ درصد) و حداکثر میزان آن مربوط به سگهای ماده (۸/۳ درصد) بود. پس از انجام آزمون T- student معلوم شد که بین سگهای نر و ماده از نظر هموگلوبین گلیکوزیله اختلاف معنی داری وجود ندارد. بنابراین می توان نتایج به دست آمده از تحقیق فوق را برای گروههای سنی مختلف و همچنین برای سگهای نر و

در این تحقیق برای تعیین مقادیر طبیعی هموگلوبین A<sub>1</sub>C در سگهای به ظاهر سالم نژاد شینلو از ۴۵ قلابه سگ استفاده شده است که ۳۰ قلابه نر و ۱۵ قلابه ماده بودند. برای اندازه گیری هموگلوبین A<sub>1</sub>C از کیت های آماده اندازه گیری هموگلوبین A<sub>1</sub>C به روش کلریمتریک استفاده شد. در این روش هموگلوبین A<sub>1</sub>C در معرض اسید ضعیفی مثل اسیداکسالیک هیدرولیز شده و ۵- هیدروکسی متیل فورفورال آزاد می شود، سپس پروتئینها به وسیله اسید تری کلرواستیک رسوب داده می شوند و مایع رویی با اسید تایوباربتوریک وارد واکنش شده و محلول رنگی ایجاد می کند که جذب آن در طول موج ۴۴۳ نانومتر اندازه گیری می شود. میانگین و انحراف معیار در کل جمعیت سگهای مورد مطالعه ۵/۶۴ ± ۰/۹۵ برآورد شده و میزان هموگلوبین A<sub>1</sub>C در سگهای نر و ماده اختلاف معنی دار نداشت و از نظر گروههای مختلف سنی نیز اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی: هموگلوبین A<sub>1</sub>C، کلریمتریک، سگ، شینلو، دیابت قندی.

گلوبول قرمز (RBC) سلولی غیر وابسته به انسولین است که گلوکز داخل سلولی آن با مکانیزم انتشار تسهیل شده و متعاقب افزایش گلوکز پلاسما به طوری که فزونی می یابد در یک واکنش غیر آنزیماتیک با هموگلوبین درون گلوبول قرمز ترکیب شده و تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1</sub>C) را می دهد. این واکنش به طور آهسته و غیر قابل برگشت و در طول ۱۲۰ روز عمر گلوبول قرمز اتفاق می افتد. لذا بررسی هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1</sub>C) می تواند روشی مناسب برای کنترل طولانی مدت دیابت بوده و از طرفی به عنوان روشی برای تشخیص شروع عوارض دیابت مطرح باشد و چون هیپرگلیسمی های موقت و گذرا نمی تواند سبب افزایش آن گردند لذا به نظر می رسد که اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله (به خصوص HbA<sub>1</sub>C) بتواند در تشخیص هیپرگلیسمی دایمی (نظیر دیابت ملیتوس) در سگها مفید واقع شود (۱،۳،۶). برای استفاده از این پارامتر لازم است که مقادیر نرمال آن با روشهای متداول در جمعیت مورد نظر به دست آید. در این تحقیق از روش کلریمتریک استفاده شده است که از جمله مزایای آن جداسازی PreA<sub>1</sub>C (جزء ناپایدار هموگلوبین گلیکوزیله) می باشد. در این روش غیر ناشتا بودن سگ تأثیری در افزایش میزان HbA<sub>1</sub>C ندارد (۸). بنابراین نمونه گیری را در هر هنگامی از روز می توان انجام داد.

## مواد و روش کار

تعداد ۴۵ قلابه سگ نژاد شینلو به ظاهر سالم ارجاعی به بیمارستان دامهای کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتخاب شدند. ۳۰ قلابه از این سگها نر و ۱۵ قلابه ماده بودند. منظور از سگهای به ظاهر سالم سگهایی بودند که برای واکسیناسیون به بیمارستان ارجاع می شدند. پس از انجام معاینات اولیه و اطمینان از سلامت آنها، مشخصات در برگهای جداگانه ثبت شد. این مشخصات شامل نام صاحب دام، تاریخ نمونه برداری، سن دام، شماره پرونده و سابقه پرادراری (Polyuria) و پرنوشی (Polydipsia) بود. سپس اقدام به اخذ ۵ میلی لیتر خون از ورید سفالیک سگهای مورد مطالعه گردید. نمونه های خون در لوله های حاوی EDTA ریخته شده و سپس جهت اندازه گیری هموگلوبین A<sub>1</sub>C به آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید.

۱) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۴) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



جدول ۱- پارامترهای مربوط به هموگلوبین A<sub>1</sub>C در سگهای به ظاهر سالم نژاد شینلو بر حسب سن و جنس، ارجاعی به بیمارستان شماره ۱ دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (سال ۱۳۷۹).

پارامترهای HbA <sub>1</sub> C						جنس	سن (ماه)
حد اکثر	حداقل	خطای انحراف معیار	انحراف معیار	میانگین	تعداد نمونه		
۷/۵	۴/۷	۰/۱۵	۰/۷۱	۵/۸۱	۲۱	نر	۰ - ۶
۸/۳	۴/۱	۰/۶۷	۱/۶۳	۵/۴۰	۶	ماده	
۸/۳	۴/۱	۰/۱۹	۰/۹۶	۵/۷۲	۲۷	جمع	
۶/۳	۵/۸	۰/۲۵	۰/۳۵	۶/۰۵	۲	نر	۷ - ۱۲
۵/۶	۵/۵	۰/۰۵	۰/۰۷	۵/۵۵	۲	ماده	
۶/۳	۵/۵	۰/۱۸	۰/۳۶	۵/۸۰	۴	جمع	
۵/۵	۴/۹	۰/۱۸	۰/۳۲	۵/۱۴	۳	نر	۱۳ - ۱۸
۶/۳	۴/۱	۰/۶۶	۱/۱۴	۵/۰۳	۳	ماده	
۶/۳	۴/۱	۰/۳۱	۰/۷۵	۵/۰۹	۶	جمع	
۷/۱	۳/۳	۰/۸۲	۱/۶۴	۵/۶۵	۴	نر	۱۹ - ۲۷
۷/۱	۵/۰۳	۰/۴۵	۰/۹۰	۵/۸۱	۴	ماده	
۷/۱	۳/۳	۰/۴۳	۱/۲۲	۵/۷۲	۸	جمع	
۷/۵	۳/۳	۰/۱۵	۰/۸۳	۵/۷۴	۳۰	نر	کلیه گروههای سنی
۸/۳	۴/۱	۰/۳۰	۱/۱۸	۵/۴۵	۱۵	ماده	
۸/۳	۳/۳	۰/۱۴	۰/۹۵	۵/۶۴	۴۵	جمع	

در روش کلریمتریک نیز مواردی از قبیل پدید آمدن Denovoformation ترکیب ۵- هیدروکسی متیل فورفورال در نمونه‌های حاوی مقادیر بالای گلوکز سبب افزایش کاذب در مقدار هموگلوبین گلیکوزیله می‌شود. بنابراین از نظر کمی، بیشترین مقادیر هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1</sub>C) در شرایط نرمال مربوط به روش کروماتوگرافی تعویض یونی و بعد از آن به ترتیب مربوط به روش کلریمتریک و کروماتوگرافی جذب می‌باشد (۲). البته با در نظر گرفتن این واقعیت که مقادیر به دست آمده در هر روش با توجه به میزان جداسازی Pre A<sub>1</sub>C و سایر موارد ایجاد کننده افزایش کاذب، مختص همان روش است لذا با ذکر نوع روش و مقادیر نرمال آن مشکلی در تفسیر بالینی هموگلوبین گلیکوزیله در سگهای مورد مطالعه ایجاد نمی‌گردد.

### References

- عباسعلی پورکبیره، م. خضرای نیا، پ. جوان آملی، ا. (۱۳۷۸): تعیین مقادیر طبیعی هموگلوبین A<sub>1</sub>C (هموگلوبین قندی شده پایدار) در سگهای به ظاهر سالم. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران دوره ۵۴، شماره ۴، صفحه: ۸۹-۹۱.
- علاءالدوله‌ای، ه. (۱۳۷۳): بررسی HbA<sub>1</sub>C به روش کلریمتریک. پایان نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی از دانشگاه تربیت مدرس.
- Border, GS. (1992): Clinical Chemistry., 38, 12: 2414-2418.
- Easley, JR. (1986): Glycosylated hemoglobin in dogs: Veterinary Clinical Pathology 15, 1:12-15.
- Elliott, DA., Nelson, RW., Feldman, EC., (1997): Glycosylated hemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs. JAVMA, 211, 6: 723-727.
- Gabbay, KH. (1979): Diabets, 28:337-340.
- Helena HbA<sub>1</sub>C column procedure brochure, according to the Micochromatographic Methodology for Quantitation of HbA<sub>1</sub>C (1998).
- Ladenson, J.H., Chan, K. M. (1985): Glycosylated hemoglobin and diabetes. A case and an overview of the subject. Clin. Chem. 31,6: 1060-1067.
- Mahaffey, EA. (1982): Glycosylated hemoglobin in diabetic and non diabetic dogs. JAVMA, 180, 6: 635-637.

ماده مورد استفاده قرار داد. در تحقیقی که توسط نگارنده و همکاران (۱۳۷۸) در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران روی ۲۶ قلاده سگ به ظاهر سالم انجام شده مقادیر نرمال (HbA<sub>1</sub>C) با روش میکروکروماتوگرافی تعویض یونی اندازه‌گیری شد و هیچ‌گونه اختلاف معنی داری بین سگهای نر و ماده ملاحظه نگردید که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱). با توجه به مقادیر به دست آمده در تحقیق فوق الذکر (Mean = درصد ۷/۰۳ و Sd = درصد ۱/۰۲) و مقایسه آن با تحقیق حاضر به روش کلریمتریک (Mean = درصد ۵/۶۴ و Sd = درصد ۰/۹) به نظر می‌رسد که بین پارامترهای هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1</sub>C) در این دو نوع تحقیق اختلاف معنی داری وجود دارد (P < ۰/۰۰۱) که به علت جدا نشدن کامل Pre A<sub>1</sub>C در روش کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد که تا حدودی سبب افزایش کاذب در مقدار هموگلوبین گلیکوزیله نیز می‌گردد (۱).

Mahaffey و همکاران در سال ۱۹۸۲ در یک تحقیق بر روی ۴۰ قلاده سگ سالم میزان هموگلوبین گلیکوزیله را با روش کروماتوگرافی تعویض یونی اندازه‌گیری نموده و پارامترهای زیر را گزارش نمودند. Mean = درصد ۶/۴۳ و Sd = درصد ۱/۰۰ و معنی داری را نشان می‌دهد (P < ۰/۰۱) (۹).

Easley و همکاران در سال ۱۹۸۶ با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی ۴۴ قلاده سگ سالم هموگلوبین گلیکوزیله را اندازه‌گیری نموده و پارامترهای زیر را گزارش نمودند. Mean = درصد ۷/۱ و Sd = درصد ۱/۰۱ (۴).

در تحقیق دیگر Elliott و همکاران در سال ۱۹۹۷ مقادیر هموگلوبین گلیکوزیله را در سگهای سالم بر روی ۴۰ قلاده سگ اندازه‌گیری نموده پارامترهای زیر (Mean = درصد ۳/۳ و Sd = درصد ۰/۸) را به دست آوردند. نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر دارای اختلاف معنی داری بود (P < ۰/۰۰۱). علت اختلاف مربوط به روش به کار گرفته شده برای اندازه‌گیری HbA<sub>1</sub>C است (۵).

در اکثر روشهایی که برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله وجود دارد نکته بسیار مهم برداشتن ترکیب حدواسط ناپایدار Pre A<sub>1</sub>C می‌باشد و در روشهایی که این ترکیب به طور کامل خارج نمی‌شود باعث افزایش کاذب در مقدار هموگلوبین گلیکوزیله می‌گردد (۱۲ و ۲). در روش کروماتوگرافی جذبی Pre A<sub>1</sub>C تمام هموگلوبینهای غیرگلیکوزیله به طور کامل از محیط خارج می‌شوند در حالی که در روش کروماتوگرافی تعویض یونی مقدار کمی Pre A<sub>1</sub>C در محیط عمل باقی می‌ماند که سبب افزایش کاذب در مقدار هموگلوبین گلیکوزیله می‌گردد (۷، ۸، ۱۰).



10. Miedema, K., Casparie, T. (1984): Glycosylated hemoglobin: Biochemical evaluation and clinical utility. *Ann. Clin. Biochem.* 21:2-15.
11. Sacks, D.B. (1994): Carbohydrate. In *The Textbook of Clinical Chemistry*, edited by Ashwood, E.R., Tietz. W.B. Saunders Company. Philadelphia: USA, PP: 928-1001.
12. Ashwood, E.R., Tietz. (1994): *The Text Book of Clinical Chemistry* 2<sup>nd</sup> ed, W.B. Saunders Company. Philadelphia: USA, PP: 980-988.

### Measurement of HbA<sub>1c</sub> in normal configuration dogs (German Shepherd breed) by colorimetric assay

Abassali Pourkabireh, M.<sup>1</sup>, Javan Amoli, E.<sup>2</sup>, Bokaei, S.<sup>3</sup>  
Khazraeinia, P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. <sup>2</sup>Graduated from The Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. <sup>3</sup>Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. <sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. *J. Fac. Vet. Med. Tehran. Univ.* 56, 4: 41-43, 2001.

Hb A<sub>1c</sub> is a useful determinant for identification of subclinical diabetes mellitus in dog. Therefore, determination of normal value of Hb A<sub>1c</sub> in normal configuration dogs is demanded. In this study, total blood samples were taken from 45 dogs (30 male and 15 female) for determination of Hb A<sub>1c</sub> concentration through colorimetric method by prepared kits. In this method, Hb A<sub>1c</sub> was exposed to Oxalic Acid and hydrolysed by that and 5-hydroxy methyl furfural produced. Proteins were precipitated by Trichloro Acetic Acid and upper phase was reacted by Thiobarbituric Acid and provided colored solution. Its absorbance was assayed in 443 nm. Mean and standard deviation in total samples were 5.69 ± 0.95 respectively. Hb A<sub>1c</sub> concentration between males and females was not significantly differed, and also there was no significant difference between age groups.

**Key words:** Colorimetric Assay, Diabetes Mellitus, Dog, German Shepherd, Hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>).

