

مقایسه دو روش اندازه گیری Glycolated Hemoglobin در دو حالت ناشتا و غیر ناشتا

هایده علاءالدوله^{۱*}، دکتر جمشید وهاب زنجانی^۲، فرحناز صدیقیان^۳

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل - ۲- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- کارشناس آزمایشگاه بیمارستان شهید بهشتی بابل

سابقه و هدف: از شاخصهای بالارزش برای شناسایی و درمان بیماران دیابتیک، اندازه گیری Glycolated Hemoglobin (GHb) می باشد که نشاندهنده میانگین گلوکز در طی ۲-۳ ماه گذشته است. روشهای مختلفی برای اندازه گیری این شاخص وجود دارد (الکتروفورز، کالریمتریک...) که هر کدام مزایا و معایبی را دارا هستند. مواد و روشها: این تحقیق یک مطالعه توصیفی- تحلیلی بوده و برای انجام طرح ۲۰ فرد با نمونه گیری ساده از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان شهید بهشتی بابل (سالم و دیابتیک) انتخاب و از آنان در دو حالت ناشتا و غیر ناشتا نمونه گیری بعمل آمد و مقدار GHb خون آنان به دو روش الکتروفورز و کالریمتریک اندازه گیری شد. یافته ها: میانگین GHb با روش الکتروفورز در حالت ناشتا ۱۰/۰٪ و در حالت غیر ناشتا ۱۱/۰۴٪ بوده است. میانگین این شاخص با روش کالریمتریک در حالت ناشتا ۲۶۲/۴ nmol/gHb و در حالت غیر ناشتا ۲۶۱/۵ nmol/gHb بوده است. تفاوت معنی داری بین میانگین GHb در دو حالت ناشتا و غیر ناشتا در روش کالریمتریک مشاهده نشد در حالیکه این تفاوت در مورد روش الکتروفورز معنی دار بوده است ($p < 0.001$). نتیجه گیری: با توجه به وجود اختلاف معنی دار بین میانگین GHb در دو حالت ناشتا و غیر ناشتا در روش الکتروفورز که روشی ساده تر می باشد، توصیه می شود که حتماً از بیمار در حالت ناشتا خونگیری بعمل آید ولی در روش کالریمتریک مقدار GHb تحت تأثیر مقدار گلوکز خون در هنگام نمونه برداری نبوده، بنابراین نمونه گیری را در هر ساعتی از روز می توان انجام داد، ولی روش کالریمتریک روشی نسبتاً وقت گیر بوده و کالیبراسیون باید به دقت صورت پذیرد. واژه های کلیدی: دیابت، هموگلوبین گلیکوزیله، قند خون ناشتا، هموگلوبین A1c و هموگلوبین A1

مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از شایعترین اختلالات متابولیکی بوده و بعلت گسترش وسیع آن تخمین میزان واقعی شیوع بیماری دشوار است. اولین نشانه بیماری افزایش بیش از حد قند خون بصورت تدریجی و یا ناگهانی پس از رد کلیه احتمالات ممکن می باشد. با توجه به درصد بالای مرگ و میر در اثر این بیماری و عوارض وخیم ناشی از آن، کنترل و درمان بیماری همواره مد نظر پزشکان و محققین

بوده است. بالا بودن گلوکز بصورت مزمن، موجب بروز یکسری عوارض مانند، بیماریهای قلبی - عروقی، رتینوپاتی، نوروپاتی، عفونت و زخمهایی در پاها می گردد. از علل مهم بروز این عوارض می توان قندی شدن پروتئینهای مختلف بدن را نام برد. بعنوان مثال: قندی شدن کلاژن، آلبومین، کریستالین چشم، لایه بازال کلیه، هموگلوبین و سایر پروتئینها (۱-۳). گلیکوزیله شدن

الکتروفورز، کروماتوگرافی و... برای اندازه‌گیری آن وجود دارد که هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند. هدف از این بررسی، ارزیابی مقدار GHb به دو روش کالریمتریک و الکتروفورز در دو حالت ناشتا و غیرناشتا می‌باشد.

مواد و روشها

این مطالعه یک بررسی توصیفی - تحلیلی می‌باشد. در این تحقیق از ۳۰ فرد با نمونه‌گیری ساده از بین افراد مراجعه کننده به بابل بیمارستان شهید بهشتی انتخاب و مقدار GHb خون آنان در دو حالت ناشتا و غیرناشتا برای ارزیابی روشهای کالریمتریک و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. از این افراد در حالت ناشتا و دو ساعت بعد از غذا مقدار ۴cc خون گرفته شد. ۱cc از آن به لوله حاوی فلئوئر سدیم (برای جلوگیری از کاهش قند خون در طول نگهداری) و ۳cc به لوله حاوی EDTA (برای جلوگیری از انعقاد خون) اضافه شد. مقدار قند خون با روش گلوکز اکسیداز با استفاده از دستگاه آنالیزر تعیین شد. مقدار GHb نیز به دو روش کالریمتریک و الکتروفورز اندازه‌گیری شد (لازم به ذکر است که بیماران از نظر مقدار هموگلوبین F در محدوده طبیعی قرار داشته‌اند).

اندازه‌گیری GHb به روش الکتروفورز

این روش بر مبنای اختلاف شارژ الکتریکی انواع هموگلوبینها قرار دارد. الکتروفورز هموگلوبین در ژل آگارز و در $PH=6-6/3$ صورت گرفت. کیت مورد استفاده Helena بوده و با دستگاه Helena نیز آزمایش انجام شد. در این روش مقدار HbA_1 کلاً اندازه‌گیری می‌شود. در این روش $PreA_{1c}$ نیز همراه با شاخص مربوطه جدا می‌شود. اندازه‌گیری GHb به روش کالریمتریک

اساس روش شیمیایی بر مبنای آزاد شدن 5-HMF از HbA_{1c} در حضور یک اسید ضعیف قرار دارد. مواد مورد استفاده در این روش عبارتند از: اسیدگزالیک ۵/۰ مولار، اسیدتری کلرواستیک ۴۰ گرم درصد، تیوباریتوریک ۵۰۰۰۰ مولار و محلول استاندارد ۵ هیدروکسی متیل

گلوامرولهای کلیه، توان عبور انتخابی مواد را از آنها می‌گیرد که اولین نشانه آن دفع پروتئین از ادرار (Proteinuria) است که سرانجام به نارساییهای کلیوی منجر می‌شود (۴).

ورود گلوکز به داخل گلبول قرمز وابسته به انسولین نبوده و با افزایش گلوکز، مقدار بیشتری از آن نیز وارد سلول شده، با هموگلوبین داخل گلبول ترکیب و گلیکوهموگلوبین را تشکیل می‌دهد (۵) و چون این قندی شدن در طول عمر گلبول قرمز روی می‌دهد، بنابراین مقدار آن به غلظت گلوکز خون در طی این مدت که بالغ بر ۳-۲ ماه است، بستگی دارد (۶). بالاتر بودن این نوع هموگلوبین با بروز عوارض بیشتری از بیماری در بیماران همراه است (۷و۵).

هموگلوبین اصلی را در بالغین، هموگلوبین A تشکیل می‌دهد که وقتی به گلوکز اتصال می‌یابد به A_{1c} گفته می‌شود و شامل اجزاء a، b و c است. HbA_{1c} جزء اصلی HbA_1 بوده و ۶-۴٪ از کل هموگلوبینها را در افراد طبیعی تشکیل می‌دهد. تبدیل HbA به HbA_{1c} واکنشی آهسته و غیرقابل برگشت است (۲). لازم به ذکر است که HbA ابتدا به $preA_{1c}$ و سپس به A_{1c} تبدیل می‌شود و سرعت تجزیه $preA_{1c}$ به HbA حدوداً ۶۰ برابر بیش از تبدیل $preA_{1c}$ به A_{1c} است (۲). مقدار هموگلوبین گلیکوزیله در بیماران دیابتی ۲ تا ۳ برابر افراد نرمال می‌باشد.

با مطالعه بر روی ۲۰۶ بیمار دیابتی از ۸ جامعه بومی آمریکایی در نیومکزیک، مشخص شد که مقدار HbA_{1c} با افزایش چربی و قند تحت تأثیر قرار می‌گیرد و فعالیت فیزیکی تأثیری در مقدار آن ندارد (۸) و در مطالعه‌ای بر روی کارگران ژاپنی، ارتباط مثبتی بین مقدار HbA_{1c} و رده‌های شغلی بدست آمد که در آن افرادی با حمایت اجتماعی کمتر دارای مقادیر بالاتری از هموگلوبین گلیکوزیله بوده‌اند (۹). بررسی GHb روشی مناسب و با ارزش برای تشخیص بیماری دیابت و ارزیابی درمان آن می‌باشد. روشهای مختلفی مانند روش کالریمتریک،

فورفورال (تهیه شده از کارخانه merk آلمان).

۲ آورده شده است.

روش کار

۱- تهیه همولیزات: خون حاوی EDTA را ۳ بار با سرم فیزیولوژی شسته و غلظت هموگلوبین تمام خونها را روی ۵ گرم درصد تنظیم می نمائیم.

۲- هیدرولیز اسیدی: ۲cc از همولیزات را همراه با ۱cc از اسید اگزالیک به مدت ۲ ساعت در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۳- رسوب دادن: به تمام لوله ها ۱cc محلول اسیدتری کلرواستیک ۰.۴٪ اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می نمائیم.

۴- مرحله رنگزائی: ۲cc از صاف شده را با ۵cc از محلول تیوباریتوریک اسید مخلوط و یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و در طول موج ۴۴۳ نانومتر، جذب تمام لوله ها را در برابر لوله شاهد قرائت می نمائیم. در این روش جزء c از HbA₁ (HbA_{1c}) بررسی می شود و همچنین PreA_{1c} نیز به دلیل حذف آن از محیط عمل، روی نتیجه آزمایش اثری ندارد.

یافته ها

میانگین و انحراف معیار قند خون ناشتا (FBS)، HbA_{1c} و HbA_{1c} در دو گروه افراد طبیعی و دیابتیک در جدول ۱ آورده شده است. بین قند خون ناشتا و مقدار HbA_{1c} (HbA_{1c}) GHb در کل افراد مورد مطالعه رابطه معنی دار بوده ($p < 0.001$) ولی در داخل هر گروه رابطه معنی دار نبوده است.

میانگین و انحراف معیار مقدار شاخصهای مورد بررسی در دو حالت ناشتا و غیرناشتا در ۳۰ فرد مورد مطالعه که از بین افراد سالم و دیابتیک انتخاب شده بودند، با استفاده از آزمون آماری T اختلاف معنی داری بین میانگین HbA_{1c} (روش کالریمتریک) در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مشاهده نشد ولی این اختلاف در مورد در جدول

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار مقدار هموگلوبین A_{1c}، A₁

و قندخون ناشتا در افراد طبیعی و دیابتیک

گروهها	طبیعی	دیابتیک
قندخون ناشتا (mg%)	۸۸/۹±۹/۸	۲۲۰±۹۶/۶
هموگلوبین (nmol/gHb)	۲۶۵±۱۶/۹	۴۷۲±۱۲۲/۶
درصد هموگلوبین A ₁	۶/۲±۱/۴	۱۳/۹±۴/۶

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مقدار قند خون، هموگلوبین A₁ و

A_{1c} در دو حالت ناشتا و غیرناشتا

وضعیت	ناشتا	غیر ناشتا
قندخون (mg%)	۱۵۸±۸۵/۳	۲۲۰/۸±۱۱۳/۱
هموگلوبین A _{1c} nmol/gHb	۳۶۲/۴±۹۴/۶	۳۶۱/۵±۹۳/۳
هموگلوبین A ₁ (%)	۱۰/۰۱±۴/۴	۱۱/۰۴±۴/۶

اندازه گیری HbA₁ (روش الکتروفورز) معنی دار بوده است ($p < 0.001$).

بحث

همانطور که در جدول (۱) مشاهده می شود میانگین GHb در افراد دیابتیک افزایش چشمگیری را نسبت به افراد طبیعی نشان می دهد، بنابراین این شاخص، معیار خوبی برای بررسی افراد دیابتیک می باشد. در جدول ۲، میانگین HbA_{1c} و HbA₁ در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مورد مقایسه قرار گرفته است.

میانگین HbA₁ در حالت ناشتا، ۱۰٪ و در حالت غیرناشتا، به ۱۱٪ افزایش یافته است. ولی میانگین HbA_{1c} در دو حالت ناشتا و غیرناشتا تفاوت عددی نشان نمی دهد. با استفاده از آزمون آماری T نیز اختلاف معنی داری با $p < 0.001$ بین مقادیر HbA₁ (الکتروفورز)

نمونه‌گیری، بخصوص در این گروه، در حالت ناشتا صورت گیرد. همچنین افزایش غیرطبیعی HbF، می‌تواند بصورت کاذب مقدار آن را افزایش دهد و همولیز نیز مقدار آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۱و۶).

از طرف دیگر روش شیمیایی کالریمتریک، روشی مشکل و وقت‌گیر بوده و در صورتی که کالیبراسیون بخوبی صورت نگیرد بروز خطای زیادی را موجب می‌گردد، ولی چون در این روش PreA1c از محیط عمل حذف می‌گردد، نمونه‌گیری را می‌توان در هر ساعتی از روز انجام داد و تفاوتی در مقدار آن در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مشاهده نمی‌گردد.

پیشنهاد

کلیه بیماران دیابتیک در صورت عدم کنترل مناسب از سوی بیمار و یا پزشک با افزایش HbA1c روبرو هستند که مقدار آن هیچگونه ارتباطی به میزان قند خون ناشتا و یا غیرناشتا در مقطع انجام تست نداشته و با میزان گلوکز در طی حدوداً دو ماه گذشته در ارتباط است (۱۲و۶). در نتیجه HbA1c شاخص بالارزشی از نظر درمانی است که بیان‌کننده وضعیت درونی بیمار در طول این مدت است و اندازه‌گیری آن هر ۲-۳ ماه یک بار به درمان و کنترل این بیماران بصورت صحیح کمک مؤثری می‌نماید و باید مد نظر پزشکان قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که هزینه انجام این مطالعه را تقبل نموده‌اند و از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان شهید بهشتی بابل و مسئول محترم وقت، آقای دکتر احمد خیرخواهان که صمیمانه در پیشبرد این تحقیق ما را همراهی نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مشاهده شده است، در حالیکه در مورد HbA1c (کالریمتریک) اختلاف، معنی‌دار نبوده است. وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین HbA1c در دو حالت ناشتا و غیرناشتا نشان‌دهنده ارتباط HbA1c با قند خون در هنگام نمونه‌برداری در روش الکتروفورز است و هنگامی که گلوکز بیشتری دریافت شود، سریعاً به HbA اتصال یافته و مقدار HbA1c را افزایش می‌دهد و مقدار HbA1c در حالت غیرناشتا نمی‌تواند شاخص مناسبی برای بررسی گلوکز در ۲-۳ ماهه اخیر باشد. هرگاه نتوان بدرستی ترکیب واسط PreA1c را حذف کرد ارتباط معنی‌داری بین قند دو ساعته و شاخص مورد نظر مشاهده خواهد شد.

کلیه محققینی که موفق به حذف ترکیب ناپایدار نشده‌اند بین قند دو ساعته و GHb رابطه معنی‌داری را گزارش نموده‌اند (۱۰). ولی در اندازه‌گیری HbA1c به روش کالریمتریک، چون در طی مراحل آزمایش PreA1c (هموگلوبینهایی که هنوز گلوکز بصورت پایدار به آنها متصل نشده و بتازگی قندی شده‌اند)، از محیط عمل حذف می‌گردد (در حالیکه در روش الکتروفورز این جزء حذف نمی‌گردد)، بنابراین تأثیری روی نتیجه آزمایش نداشته و بخوبی نشان‌دهنده میانگین گلوکز در ۲-۳ ماهه اخیر است (HbA1c) بعد از تشکیل، تا زمان مرگ گلوبول قرمز در داخل آن باقی می‌ماند). در مقایسه بین این دو روش، روش الکتروفورز روشی نسبتاً آسان بوده ولی چون همه اجزاء هموگلوبین گلیکوزیله A (a,b,c) را در بر می‌گیرد و PreA1c نیز از محیط عمل خارج نمی‌شود، بهتر است نمونه‌گیری در حالت ناشتا صورت گیرد. این روش بخوبی قادر به تشخیص افراد دیابتیک بوده ولی در مورد افراد پره دیابتیک که مقدار GHb آنان افزایش کمی را نشان می‌دهد باید با تستهای تشخیصی دیگر نیز همراه باشد و

References

1. Davidson MB. Diabetes Mellitus, Diagnosis and treatment, Third edition, 1991; 224-230.
2. Bunn HF. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. Diabetes 1981; 30(7) 613-616.
3. Wilson, Braunwald, et al. Harrisons principles of internal medicine, 1991; 1739-59.
4. Cohem MP, Urdariva E, et al. Non enzymatic glycosylation of basement membranes. Diabetes 1981; 30: 367-370.
5. Abraham EC. Glycosylated hemoglobins, Marcel Dekker 1985; 19: 5-25.
6. Gillery P. Hue G. et al. Hemoglobin A1c determination and hemoglobinopathies: problems and strategies. Ann Biol Clin 2000; 54(4): 425-9.
7. Bishop JR, Judd W.M, et al. Use of glycosylated Hb to identify diabetics at high risk for penile periprosthetic infections. Diabetes 1992; 142: 386-388.
8. Carter JS, Gilliland SS. Public health and clinical implications of high hemoglobin A1c levels and weight in younger adult native American people with diabetes. Arch Intern Med 2000; 160(22): 3471-6.
9. Kawakamin N. Akachi K. Strain J. Social support in the work place and HbA1c in Japanese men. Occup Environ Med 2000; 57(12): 805-9.
۱۰. عزیززاده الف. تعیین فراوانی هموگلوبین A1c در بیماران دیابتیک و رابطه آن با نحوه درمان و مهار بیماری، مجله نظام پزشکی، ۱۳۶۵؛ ۹(۶): ۴۵۲-۶۲.
11. Egede LE. Obah E, et al. Spurious elevation of HbA1c by hereditary persistence of fetal hemoglobin. South Med J 2000; 93 (1): 62-4.
12. Allen C, Zaccaro DJ, et al. Glycosylated control in early IDDM, Diabetic Control 1992; 8(15): 980-7.