● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال دوم ، شمارهٔ ۴ پی‌درپی(۸) ، صفحه ۴۱ الی ۴۵ ، پاییز ۱۳۷۹

مقایسهٔ دو روش اندازه‌گیری *Glycolated Hemoglobin* در دو حالت ناشتا و غیرناشتا

هایده علاءالدوله‌ای [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 باارزش برای شناسایی و درمان بیماران دیابتیک، اندازه‌گیری Glycolated Hemoglobin (GHb) می‌باشد که نشاندهندهٔ میانگین گلوکز در طی ۳-۲ ماه گذشته است. روشهای مختلفی برای اندازه‌گیری 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 ۳۰ فرد با نمونه‌گیری ساده از بین مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهید بهشتی بابل (سالم و دیابتیک) انتخاب و از آنان در دو حالت ناشتا و غیرناشتا نمونه‌گیری بعمل آمد و مقدار GHb خون آنان به دو روش الکتروفورز و کالریمتریک اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین GHb با روش الکتروفورز در حالت ناشتا۱۰/۰۱٪ و در حالت غیر ناشتا ۱۱/۰۴٪ بوده است. میانگین این شاخص با روش کالریمتریک در حالت ناشتا ۲۶۲/۴nmol/gHb و در حالت غیرناشتا ۲۶۱/۵nmol/gHb بوده است. تفاوت معنی‌داری بین میانگین GHb در دو حالت ناشتا و غیرناشتا در روش کالریمتریک مشاهده نشد در حالیکه این تفاوت در مورد روش الکتروفورز معنی‌دار بوده است ($p<0/001$).

نتیجه گیری: با توجه به وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین GHb در دو حالت ناشتا و غیرناشتا در روش الکتروفورز که روشی ساده‌تر می‌باشد، توصیه می‌شود که حتماً از بیمار در حالت ناشتا خونگیری بعمل آید ولی در روش کالریمتریک مقدار GHb تحت تأثیر مقدار گلوکز خون در هنگام نمونه‌برداری نبوده، بنابراین نمونه‌گیری را در هر ساعتی از روز می‌توان انجام داد، ولی روش کالریمتریک روشی نسبتاً وقت‌گیر بوده و کالیبراسیون باید به دقت صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی: *دیابت، هموگلوبین گلیکوزیله، قندخون 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 نشانهٔ بیماری افزایش بیش از حد قند خون بصورت تدریجی و یا ناگهانی پس از رد کلیهٔ احتمالات ممکن می‌باشد. با توجه به درصد بالای مرگ‌ومیر 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، نفروپاتی، عفونت و زخمهایی در پاها می‌گردد. از علل مهم بروز این عوارض می‌توان قندی‌شدن پروتئینهای مختلف بدن را نام برد. بعنوان مثال: قندی‌شدن کلاژن، آلبومین، کریستالین چشم، لایهٔ بازال کلیه، هموگلوبین و سایر پروتئینها(۳-۱). گلیکوزیله شدن

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.4.7.5]

گلومرولهای کلیه، توان عبور انتخابی مواد را از آنها می‌گیرد که اولین نشانهٔ 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 قندی‌شدن 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 آن A_1 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 تجزیهٔ $preA_{1c}$ 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 جامعهٔ بومی آمریکایی در نیومکزیک، مشخص شد که مقدار HbA1c 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 HbA1c 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، 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 ـ 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 قرارگرفت. از این افراد در حالت ناشتا و دو ساعت بعد از غذا مقدار ۴cc خون گرفته شد. ۱cc از آن به لولهٔ حاوی فلوئور سدیم (برای جلوگیری از کاهش قند خون در طول نگهداری) و ۳cc به لولهٔ 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 محدودهٔ 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=۶-۶/۳ 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: اسیداگزالیک ۰/۵ مولار، اسیدتری‌کلرواستیک ۴۰ گرم درصد، تیوباربیتوریک ۰/۰۰۵ مولار و محلول استاندارد ۵ هیدروکسی متیل

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.4.7.5]

فورفورال (تهیه شده از کارخانهٔ merk آلمان).

روش کار

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

۲- **هیدرولیز اسیدی:** ۲cc از همولیزات را همراه با ۱cc از اسیداگزالیک به مدت ۲ ساعت در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم.

۳- **رسوب دادن:** به تمام لوله‌ها ۱cc محلول اسیدتری‌کلرواستیک ۴۰٪ اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌نمائیم.

۴- **مرحلهٔ رنگزائی:** ۲cc از صاف شده را با ۰/۵cc از محلول تیوباربیتوریک اسید مخلوط و یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و در طول موج ۴۴۳ نانومتر، جذب تمام لوله‌ها را در برابر لولهٔ شاهد قرائت می‌نمائیم.

در این روش جزء c از HbA_1 (HBA_{1c}) بررسی می‌شود و همچنین $PreA_{1c}$ نیز به دلیل حذف آن از محیط عمل، روی نتیجهٔ آزمایش اثری ندارد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار قند خون ناشتا (FBS)، HbA_1 و HbA_{1c} در دو گروه افراد طبیعی و دیابتیک در جدول ۱ آورده شده است. بین قند خون ناشتا و مقدار (HbA_{1c} GHb (HbA_1, در کل افراد مورد مطالعه رابطه معنی‌دار بوده ($p<0/001$) ولی در داخل هر گروه رابطه معنی‌دار 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 معنی‌داری بین میانگین HbA_{1c} (روش کالریمتریک) در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مشاهده نشد ولی این اختلاف در مورد در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار مقدار هموگلوبین A_1، A_{1c} و قندخون ناشتا در افراد طبیعی و دیابتیک

گروهها	طبیعی	دیابتیک
قندخون‌ناشتا (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 A_1 و A_{1c} در دو حالت ناشتا و غیرناشتا

وضعیت	ناشتا	غیر ناشتا
قندخون (mg%)	۱۵۸± ۸۵/۳	۲۲۰/۸±۱۱۳/۱
هموگلوبین A1c nmol/gHb	۳۶۲/۴±۹۴/۶	۳۶۱/۵±۹۳/۳
هموگلوبین A1 (٪)	۱۰/۰۱± ۴/۴	۱۱/۰۴± ۴/۶

اندازه‌گیری HbA_1 (روش الکتروفورز) معنی‌دار بوده است ($p<0/001$).

بحث

همانطور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود میانگین GHb در افراد دیابتیک افزایش چشمگیری را نسبت به افراد طبیعی نشان می‌دهد، بنابراین این شاخص، معیار خوبی برای بررسی افراد دیابتیک می‌باشد. در جدول ۲، میانگین HbA_1 و HbA_{1c} در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مورد مقایسه قرار گرفته است.

میانگین HbA_1 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 نمی‌دهد. با استفاده از آزمون آماری T نیز اختلاف معنی‌داری با $p<0/001$ بین مقادیر HbA1(الکتروفورز)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.4.7.5]

در دو حالت ناشتا و غیرناشتا مشاهده شده است، در حالیکه در مورد HbA_{1c}(کالریمتریک) اختلاف، معنی‌دار نبوده است. وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین HbA_1 در دو حالت ناشتا و غیرناشتا نشاندهندهٔ ارتباط HbA_1 با قند خون در هنگام نمونه‌برداری در روش الکتروفورز است و هنگامی که گلوکز بیشتری دریافت شود، سریعاً به HbA اتصال یافته و مقدار HbA_1 را افزایش می‌دهد و مقدار HbA_1 در حالت غیرناشتا نمی‌تواند شاخص مناسبی برای بررسی گلوکز در ۳-۲ ماههٔ اخیر باشد. هرگاه نتوان بدرستی ترکیب واسط $PreA_{1c}$ را حذف کرد ارتباط معنی‌داری بین قند دو ساعته و شاخص مورد نظر مشاهده خواهد شد.

کلیهٔ محققینی که موفق به حذف ترکیب ناپایدار نشده‌اند بین قند دو ساعته و GHb رابطهٔ معنی‌داری را گزارش نموده‌اند(۱۰). ولی در اندازه‌گیری HbA_{1c} به روش کالریمتریک، چون در طی مراحل آزمایش $preA_{1c}$ (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 نتیجهٔ آزمایش نداشته و بخوبی نشاندهندهٔ میانگین گلوکز در ۳-۲ ماههٔ اخیر است(HbA_{1c} بعد از تشکیل، تا زمان مرگ گلبول قرمز در داخل آن باقی می‌ماند). در مقایسهٔ بین این دو روش، روش الکتروفورز روشی نسبتاً آسان بوده ولی چون همهٔ اجزاء هموگلوبین گلیکوزیلهٔ A (c،b،a) را در بر می‌گیرد و $preA_{1c}$ 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 پره‌دیابتیک که مقدار GHb آنان افزایش کمی را نشان می‌دهد باید با تستهای تشخیصی دیگر نیز همراه باشد و 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 $PreA_{1c}$ 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

کلیهٔ بیماران دیابتیک در صورت عدم کنترل مناسب از سوی بیمار و یا پزشک با افزایش HbA_{1c} 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 HbA_{1c} شاخص باارزشی از نظر درمانی است که بیان کنندهٔ وضعیت درونی بیمار در طول این مدت است و اندازه‌گیری آن هر ۳-۲ 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 حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که هزینهٔ 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.

****

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.4.7.5]

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 رابطهٔ آن با نحوهٔ درمان و مهار بیماری، مجلهٔ نظام پزشکی، ۱۳۶۵؛ ۹(۶): ۶۲-۴۵۲.

11. Egede LE. Obah E, et al. Spurious elevation of HbA1c by hereditary persistance 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.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل - دانشگاه علوم پزشکی- تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.4.7.5]