پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۱، شماره ۴، صفحات ۶۸-۷۴ (دی-اسفند ۱۳۷۶)

مقایسه روش کالریمتری با الکتروفورز، برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (GHb)

دکتر عبدالرسول کارگر*، دکتر مسعود امینی**، گشتاسب ستاری**، سارنگ یونسی***

* بیمارستان الزهرا (دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)

** مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*** دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

خلاصه

با توجه به آنکه سطح هموگلوبین گلیکوزیله (GHb=Glycated Hemoglobin) در افراد دیابتیک افزایش می‌یابد و بازتابی از متوسط قند خون طی ۶-۹ هفته گذشته می‌باشد و با توجه به توصیه سازمان جهانی بهداشت جهت پی بردن به درجه کنترل بیماران دیابتیک باید از این آزمایش استفاده شود، کلینیسین‌ها و محققان آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری میزان آن در خون روشهای مختلفی را پیشنهاد کرده‌اند. در این میان، روش کالریمتری با توجه به امکانات آزمایشگاهی سراسر ایران از سایر روشها آسان‌تر صورت می‌گیرد. ما در این بررسی سطح GHb را در دو گروه کنترل (۲۴ نفر) و دیابتیک (۳۳ نفر) به وسیله دو روش کالریمتری و الکتروفورز اندازه‌گیری کردیم. نتایج با استفاده از روشهای آماری t-test و تحلیل همبستگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان P کمتر از ۰/۰۵ بود که از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد. میزان GHb اندازه‌گیری شده به وسیله هر دو روش با قند خون ناشتا رابطه معنی‌دار داشت که مقدار این همبستگی با روش کالریمتری (P=۰/۰۰۰، r=۰/۷۵۱۷) و به روش الکتروفورز (P=۰/۰۰۰، r=۰/۷۴۵۸) می‌باشد و میزان همبستگی هموگلوبین گلیکوزیله اندازه‌گیری شده به وسیله هر دو روش به میزان P=۰/۰۰۰، r=۰/۸۹۹ می‌باشد. با آنکه روش کالریمتری نسبت به الکتروفورز بسیار ارزانتر بود و در تمام آزمایشگاههای، حتی نیمه مجهز کشور قابل اجرا می‌باشد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان این شیوه را به عنوان یک روش انتخابی معرفی می‌کند.

مقدمه

گلوکز موجود در پلاسما به آسانی وارد اریتروسیت‌ها می‌شود و طی یک واکنش غیرآنزیمی، کند، غیرقابل برگشت و متناسب با غلظت گلوکز پلاسما در ۱۲۰ روز عمر گویچه سرخ (life span) به هموگلوبین متصل شده، هموگلوبین گلیکوزیله را تشکیل می‌دهد. این هموگلوبین شارژ الکتریکی متفاوتی از هموگلوبین غیرقندی (HbA0) دارد و به آن HbA_1 گفته می‌شود که از چهار جزء فرعی HbA_1a_1، HbA_1a_2، HbA_1b، و HbA_1c تشکیل شده است که حدود ۵-۸ درصد کل هموگلوبین خون را تشکیل می‌دهد. با توجه به نیمه عمر واقعی گویچه‌های سرخ (۶-۷ هفته) و نیمه عمر تئوریک آن (۸-۹ هفته) و سطح GHb در خون نشانه‌ای از متوسط قندخون در ۶-۹ هفته گذشته می‌باشد و میزان آن در افراد دیابتیک -بسته به مقدار هیپرگلیسمی- ممکن است به ۲ تا ۳ برابر میزان طبیعی برسد؛ همین موضوع اساس استفاده از هموگلوبین گلیکوزیله را برای ارزیابی کنترل دراز مدت دیابت امکانپذیر کرده است. از آنجا که در تمام عوارض مزمن بیماران دیابتی و بیماریزایی عوارض مشخص شده که هیپرگلیسمی نقش عمده‌ای دارد؛ و از طرفی glycation پروتئین‌های ساختمانی بافت‌ها در بیماریزایی عوارض مزمن دیابت نقش عمده‌ای دارد (مثل glycation مولکول LDL-Cho که سبب افزایش سطح سرمی LDL-Cho و افزایش میزان رسوب آن روی جدار عروق می‌شود). همین طور glycation پروتئین کریستالین در عدسی چشم که منجر به رسوب پروتئین کریستالین و در نتیجه بروز آب مروارید قندی (Sugar cataract) و غیره می‌شود و بین میزان glycation پروتئین آلی بافتی و GHb همبستگی بالایی وجود دارد بنابراین، با اندازه‌گیری GHb می‌توان علاوه بر پی بردن به درستی اندازه‌گیری قندخون، از آینده بیماران دیابتیک نیز پیش‌آگهی داشته باشیم (۱۴-۱۶).

به طوری که در نهایت، برای رسیدن به یک استاندارد برای مراقبت پزشکی از بیماران دیابتیک توصیه شده است که هر دو ماه (۶ بار در سال) میزان GHb این افراد اندازه‌گیری شود (۱۷). و طبق استانداردهای سازمان جهانی بهداشت، معیار طبقه‌بندی کنترل هیپرگلیسمی براساس GHb به صورت ذیل می‌باشد:

چنانچه مقادیر GHb در محدوده کمتر از سه انحراف معیار از میانگین GHb قرار بگیرد نشان دهنده کنترل خوب دیابت (Good diabetic control) می‌باشد؛ اگر مقادیر GHb در محدوده بین ۳-۵ انحراف معیار از میانگین GHb قرار بگیرد کنترل دیابت نسبتا" خوب (Fair diabetic control) و مقادیر بیشتر از ۵ انحراف معیار از میانگین GHb نشان دهنده کنترل ضعیف دیابت (Poor diabetic control=PDC) می‌باشد (۱۸).

برای اندازه‌گیری GHb روشهای مختلفی وجود دارد ولی اساس تمام این شیوه‌ها در سه دسته زیر جایگزین می‌شود:

روشهایی که ۱) براساس اختلاف در شارژ الکتریکی؛ ۲) براساس اختلاف ساختمانی و ۳) واکنش شیمیایی عمل می‌کنند (۲ و ۱).

متداولترین روشهای به کار برده شده شامل HPLC، الکتروفورز و کالریمتری می‌باشد. HPLC به عنوان یک روش مرجع جهت اندازه‌گیری GHb توصیه شده است ولی انجام آن نیاز به وسایل پیچیده و گرانقیمتی دارد که در هر آزمایشگاهی قابل انجام نمی‌باشد (۴). این آزمایش در حضور HbC، HbD، HbA_2 و HbS به طور کاذب کاهش می‌یابد (۶). روش الکتروفورز نیز مانند HPLC براساس اختلاف شارژ الکتریکی عمل می‌کند. منتها HbS، HbC و مشتقات گلیکوزیله آنها از GHb جدا شده، در نتیجه باعث می‌شود که GHb به طور کاذب کاهش پیدا کند؛ از

طرفی، HbF و متهموگلوبین و Hb Pre-A$_1$c نیز به همراه GHb حرکت کرده و باعث افزایش کاذب نتایج آن می‌شود و برای انجام آن، به مواد و وسایل گرانقیمتی نیاز هست (۴، ۷ و ۹). روش کالریمتری از آنجا که اختصاص به پیوند کتوآمینی موجود در GHb دارد، بنابراین Hbf، Hb Pre-A$_1$c (جزء ناپایدار HbA$_1$c که با تغییرات سریع قند خون تغییر می‌یابد) و سایر گونه‌های هموگلوبین در اندازه‌گیری آن بی‌تاثیر است (۴). در مطالعه‌ای که پیکورارو (Pecoraro) و همکارانش انجام دادند، درجه همبستگی بالایی بین دو روش کالریمتری و کروماتوگرافی تعویض یونی به دست آمد (r=۰/۹۴۳ ،P<۰/۰۰۱) (۱۰).

از آنجا که از بین سه روش یاد شده - با توجه به امکانات کشور- روش کالریمتری عملی‌ترین روش برای اندازه‌گیری GHb می‌باشد مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان بر آن شد که همبستگی میان دو روش کالریمتری و الکتروفورز را بررسی کند تا در صورت وجود یک درجه همبستگی با ارزش، روش کالریمتری را به عنوان روش انتخابی اندازه‌گیری GHb به مقامات بهداشتی - درمانی کشور پیشنهاد نماید.

مواد و روشها

براساس آزمون اختلاف میانگین دو جامعه وقتی که واریانس در جامعه معلوم باشد تعداد نمونه‌های مورد نیاز انتخاب می‌شود. ۲۴ نفر از مزدوجان مراجعه کننده به مرکز تحقیقات تالاسمی اصفهان به منظور انجام تستهای قبل از ازدواج که دستکم دو قند خون پایین‌تر از ۱۴۰ میلیگرم در دسی‌لیتر داشتند، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. ۳۳ نفر از افراد دیابتیک مراجعه کننده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان به عنوان گروه بیمار برگزیده شدند. از افراد گروه کنترل دوباره قند خون ناشتا و GHb به دو روش کالریمتری و الکتروفورز انجام شد. برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله به روش کالریمتری از روش اصلاح شده اسید تیوباربیتوریک که دکتر وینترهالتر (Winterhalter) ارائه کرده بود استفاده شد (۱۰). در این روش بعد از شستشوی گویچه‌های سرخ با سرم فیزیولوژی با استفاده از آب مقطر گویچه‌های سرخ را لیزوهمولیزیتی تهیه می‌کنیم. سپس غلظت هموگلوبین همولیزیت را روی ۱۰ گرم در دسی‌لیتر میزان کرده، یک حجم همولیزیت را با یک حجم اسیداگزالیک ۲ مولار مخلوط می‌کنیم و دو ساعت در حرارت جوش قرار می‌دهیم. طی این مرحله از GHb ترکیبی به نام ۵- هیدروکسی متیل فورفورال (5-HMF) تولید می‌شود. بعد از رسوب پروتئین‌ها به وسیله تری‌کلرواستیک اسید یک حجم از محلول رویی را با یک حجم از تیوباربیتوریک اسید ۰/۲ مولار همراه با ماده نگهدارنده مخلوط کرده، طی یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه‌سانتیگراد قرار می‌دهیم. در این مرحله، ۵-هیدروکسی متیل‌فورفورال با تایوباربیتوریک اسید -مجموعه زرد رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۴۴۳ نانومتر حداکثر جذب نوری را دارد. سپس با استفاده از همولیزیت‌های لیوفیلیزه تهیه شده به وسیله شرکت CIBA-CORNING و مقایسه آن با منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف 5-HMF مقدار GHb اندازه‌گیری شده و برحسب واحد درصدی از کل هموگلوبین (Percent of Total Hb) را گزارش می‌کنیم (۴). برای الکتروفورز نیز از ژل‌ها و بافرهای کیت شرکت Helena استفاده شد که این آزمون در بخش الکتروفورز آزمایشگاه مرکز پزشکی الزهرا انجام شد. نتایج توسط شیوه آماری t-test و تحلیل همبستگی و برنامه آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

گروه کنترل با میانگین سنی ۲۷/۷ سال که در محدوده ۱۸-۵۵ سالگی هستند با حداقل قندخون ۶۴ و حداکثر ۱۳۷ میلیگرم در دسی‌لیتر قرار گرفته، متوسط قندخون آنان ۸۴ میلیگرم در دسی‌لیتر می‌باشد (۱۷). میانگین GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری ۶/۸۷ (۰/۶۳) است که در محدوده بین ۵/۰۴-۷/۷۴ قرار گرفته‌اند. میانگین GHb اندازه‌گیری شده به روش الکتروفورز در این گروه ۶/۴۱ (۰/۷۰۰۹) است که در محدوده بین ۴/۹-۷/۳ قرار دارد (جدول ۱).

گروه بیماران با میانگین سنی ۵۴/۱ سال در محدوده سنی ۳۳-۸۲ سالگی قرار داشتند. حداقل قند خون این بیماران ۶۵ و حداکثر ۳۰۰ میلیگرم در دسی‌لیتر است که متوسط قندخون آنان ۱۶۴ (۶۴) میلیگرم در دسی‌لیتر می‌باشد. و میانگین GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری ۱۰/۵٪ (۲/۰۴) در محدوده ۱۵/۱۲-۷/۲۶ درصد است. میانگین GHb اندازه‌گیری شده به روش الکتروفووز ۱۰/۸٪ (SD=۱/۹۶) است که در محدوده بین ۱۴/۳-۶/۴ درصد قرار داشت (جدول ۱).

میزان همبستگی بین GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری با قندخون در کل دو گروه برابر با P=۰/۰۰۰ و r=۰/۷۵۱۷ می‌باشد که این مقدار در گروه کنترل برابر با P=۰/۱۲ و r=۰/۳۲۶۲ و در گروه بیماران برابر با P=۰/۰۰۱ و r=۰/۵۵۸۱ است (جدول ۲).

میزان همبستگی بین GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری با میزان GHb که به روش الکتروفورز محاسبه شد در کل دو گروه برابر P=۰/۰۰۰ و r=۰/۸۹۹۰ می‌باشد که این مقدار در گروه کنترل به میزان P=۰/۴۷۲۰ و r=۰/۱۵۴۲ و در گروه بیماران برابر با P=۰/۰۰۰ و r=۰/۸۰۷۹ می‌باشد (جدول ۲).

بحث

امروزه اندازه‌گیری GHb به عنوان شاخص کنترل متابولیک در بیماران دیابتیک کاربرد وسیعی پیدا کرده است و میزان موفقیت درمانهایی که به روشهای مختلف انجام می‌شود با این آزمون ارزیابی می‌شود؛ از سوی دیگر، آزمایش ساده‌ای است که در هر زمان از روز می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد، بدون آنکه با غذای خورده شده و یا سطح گلوکز خون در زمان آزمایش ارتباطی داشته باشد و فقط بازتابی از متوسط قند خون در طی یک دوره زمانی گذشته ۶-۹ هفته می‌باشد. و مقدار GHb، با میزان خطر و پیشرفت عوارض مزمن دیابت، مانند رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی به طور مستقیم ارتباط دارد (۱). بررسی روشهای مختلف اندازه‌گیری GHb نشان دهنده آن است که برای اندازه‌گیری GHb نمی‌توان هیچ روشی را به عنوان بهترین روش معرفی کرد و هر کشوری، با توجه به امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی خود، باید یک روش را به عنوان روش مرجع انتخاب کند.

در این مطالعه، بر آن شدیم که ارتباط بین دو روش کالریمتری و الکتروفورز را بررسی کنیم. میزان GHb اندازه‌گیری شده، به هر دو روش با قند خون ناشتا همبستگی بالایی دارد که این درجه همبستگی در مورد روش کالریمتری (P=۰/۰۰۰ و r=۰/۷۵۱۷) از روش الکتروفورز (P=۰/۰۰۰ و r=۰/۷۴۵۸) کمی بیشتر است. و همین موضوع در گروه بیماران هم صدق می‌کند؛ به طوری که درجه همبستگی GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری در گروه بیماران با قند خون ناشتا (P=۰/۰۰۰ و r=۰/۵۵۸۱)، GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری در گروه بیماران با قند خون ناشتا برابر P=۰/۰۰۰ و r=۰/۵۵۸۱ می‌باشد که این مقدار در روش الکتروفورز برابر با P=۰/۰۰۰ و r=۰/۵۴۵۶ است. اما این ارتباط در گروه کنترل وجود ندارد که نیاز به

جدول ۱) مقادیر قندخون و GHb اندازه‌گیری شده در دو گروه کنترل و دیابتیک

گروه	تعداد	GHb به روش الکتروفورز	GHb به روش کالریمتری	قند خون میلیگرم در دسی‌لیتر
کنترل	۲۴	۶/۴۱ ● (۰/۷۰)□	۶/۸۷ (۰/۶۳)	۸۳/۹ (۱۶/۶۴)
بیماران	۳۳	۱۰/۱۸ (۱/۹۶)	۱۰/۵۵ (۲/۰۴)	۱۶۴ (۶۴)
کل	۵۷	۸/۵۹ (۲/۴۳)	۸/۹۹ (۲/۴۳)	۱۳۰ (۱۶۳)

● میانگین

□ انحراف معیار

جدول ۲) مقایسه درجه همبستگی بین سه فراسنج (پارامتر) قندخون و GHb اندازه‌گیری شده به روش کالریمتری و الکتروفورز در کل دو گروه

	GHb$_1$ Elec ○	GHb colo ❶	قند خون ناشتا	P value ✱
□ قندخون ناشتا	۰/۷۴۵۸ □ (۵۷) ■	۰/۷۵۱۷ (۵۷)	۱/۰۰۰ (۵۷)	۰/۰۰۰
GHb colo	۰/۸۹۹۰ (۵۷)	۱/۰۰۰ (۵۷)	۰/۷۵۱۷ (۵۷)	۰/۰۰۰
GHb Elec	۱/۰۰۰ (۵۷)	۰/۸۹۹۰ (۵۷)	۰/۷۴۵۸ (۵۷)	۰/۰۰۰

○ اندازه‌گیری GHb به روش الکتروفورز

❶ اندازه‌گیری GHb به روش کالریمتری

□ درجه همبستگی بین فراسنجها(که P تمام فراسنجهای عمودی واقعی برابر با صفر است)

■ تعداد افراد مورد آزمایش به وسیله دو فراسنج عمودی و افقی

✱ ارزش P بین GHb اندازه‌گیری شده به دو روش الکتروفورز و کالریمتری

بررسی بیشتر دارد. در این بررسی نیز بین میزان GHb اندازه‌گیری شده به وسیله هر دو روش همبستگی بالایی به دست آمد (P=۰/۰۰۰ و r=۰/۸۹۹۰) که این همبستگی بالا می‌تواند توجیه کننده این موضوع باشد که این روشها می‌توانند در هر مرکزی به جای همدیگر مورد استفاده قرار گیرند و نتایج این دو روش قابل مقایسه با همدیگر است.

از آنجا که روش کالریمتری - در مقایسه با روشهای دیگر- ساده و ارزان بوده، در تمام آزمایشگاههای نیمه مجهز کشور قابل اجرا می‌باشد و تحت تاثیر فراسنجهایی مثل آلدیمین یا Hb Pre-A_{1c}، هموگلوبینوپاتی‌ها، اتصالات غیرقندی به مولکول هموگلوبین[مثل هموگلوبین کاربامیله (Carbamylated Hb) در افراد اورمیک و یا استالدئید هموگلوبین در افراد الکلسیم] قرار نمی‌گیرد (۲، ۱۲ و ۱۳). با توجه به آنکه ژلها و بافرهای الکتروفورز برای اندازه‌گیری GHb از خارج از کشور تامین می‌شوند و به آسانی در دسترس افراد قرار نمی‌گیرند مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان این روش را به عنوان روش انتخابی معرفی می‌کند.

تشکر

نگارندگان از خانمها: امامی، نوروزی، امیریان، سرتیپ‌پور، اقتصادی، طلوعی، ماهرالنقش و آقایان: مدرس، قاسمی و آبیار که ما را در این طرح یاری دادند، سپاسگزاری می‌کنند.

مراجع

) Goldstein DE. How much do you know about glycated hemoglobin testing? Clinical Diabetes 1995; jul/Aug: 60-4.

) Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated Hemoglobin: Methodologies and clinical applications. Clin Chem 1986; 32/10 B/:B64-B70.

) Boder GS, Liffle RR, Garrett N, Brown, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of Glycohemoglobin determination in the clinical laboratory. Three years of Experience. Clin Chem 1992; 38:2414-8.

) Sacks DB. Carbohydrate. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds), Tietz text book of clinical chemistry. W.B Saunders Co Philadelphia 1994, PP 928-1001.

5) Gebhart Spp, Wheaton RN, Mullins RE, Austin GE. Comparison of home blood glucose monitoring methods. Clinical Diabetes 1992; March/April: 86.

6) Hamwi A, Shweiger CR, Weitl M, Schmid R. Quantitative measurement of HbA_1C by an immunoturbidimetric Assay compared to a standard Hplc Method. A.J.C.P, 1995; 104:89-95.

7) Catalogous of kit, Titan-Gell Glyco-Heme procedure. Helena laboratories- Mars, 1993.

۸) حسنوند صفری، وهاب زنجانی جواد. اندازه‌گیری هموگلوبین قندی شده پایدار (A_1C) در بیماران دیابتی (NIDDM) به عنوان شاخص درمان کنترل. پایان‌نامه شماره ۱۲۳، صص ۵۰-۶۰، ۱۳۷۰.

9) Kovaleva GG, Gorodetskii VK. Preparation and use of and affinity sorbent containing phenylboric acid, for separation and quantitative determination of glycated hemoglobin. Vopr Med Khim 1992; 38:53-4.

10) Pecoraro RE, Graf RJ, Halter jB, Beiler H, Porte D. Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion exchange chromatography. Diabetes 1979; 28:1120-5.

11) Arm Bruster DA. Fructosamine, Structure, Analysis and Clinical usefulness. Clin Chem 1987; 33:2153-63.

12) Rose Am, Tongate C, Valdesb R. A hemoglobin A_1C immunoassay method not affected by carbamylated hemoglobin. Ann Clin Lab Sci 1995; 25:13-9.

13) Stevens Vj, Fant WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Deterson CM. Acetaldehyd Adducts with hemoglobin. J Clin Invest 1981; 67:381-9.

14) Kennedy L, Mehl TD, Elder E, Varghese M, Merimee TJ. Nonenzymatic Glycosylation of serum and plasma proteins. Diabetes 1982; 31:52-6.

15) Foster DW. Diabetes mellitus. In: Isselbacher Kj, Braun wald E, Wilson jD, Martin jB, Kasper DL (eds), Harrison's principles of Internal Medicine. From McGraw Hill, Inc. New York 1995, PP 1979-2000.

16) Shapiro RE, McManus M, Garrick L, McDonald MJ, Bunn FH. Nonenzymatic glycation of hutman hemoglobin at multiple sites. Metabolism 1979; 28:427-30.

17) Stuart RB. Standards of medical care for diabetic mellitus. J La State Med Soc 1995; 147:59-60.

18) Kilpatrick ES, Rumley AG, Dominiczak MH, Small M. Glycated hemoglobin values. Problems in assessing blood glucose control in diabetes mellitus. BMJ 1994; 309:983-6.