

ارتباط اندازه LDL با کنترل گلیسمی در بیماران دیابتی نوع دو

فرانک کازرونی^۱، ابراهیم جوادی^{۲*}

چکیده

مقدمه: خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران دیابتی، ۲ تا ۴ برابر افراد غیر مبتلا به دیابت است. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که عناصر دیس لیپیدمی، مستقل از یکدیگر دارای اثرات اتروژنیک می‌باشند؛ در شرایطی که به نظر می‌رسد LDL کوچک و چگال اتروژنیک‌ترین جزء این مجموعه باشد. در این تحقیق به منظور بررسی این‌که آیا کنترل گلیسمی (که توسط میزان HbA1c معین می‌شود) می‌تواند دارای اثرات مطلوب بر اندازه LDL باشد، ارتباط بین HbA1c با اندازه LDL در بیماران دیابتی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: در این تحقیق اندازه LDL در ۸۱ نفر بیمار دیابتی در محدوده سنی ۵۰ تا ۷۰ سال به روش پلی اکریل امیدژل الکتروفورز (PAGE) با گرادینت غلظتی تعیین شد. BMI داوطلبین پس از اندازه‌گیری قد و وزن آنها محاسبه شد. جهت تعیین غلظت تری گلیسرید و HDL-C از کیت‌های آنزیمی استفاده گردید. HbA1c به روش ایمنوتوربیدومتريک تعیین شد. **یافته‌ها:** براساس نتایج، اندازه LDL همبستگی معنی‌داری با تری گلیسرید ($r=0/281, P<0/05$)، جنسیت ($P<0/05$)، $r=0/276$ ، HbA1c ($r=0/232, P<0/05$) و HDL-C ($r=0/215, P<0/01$) نشان داد. به کمک آنالیز رگرسیون خطی نشان داده شد که تری‌گلیسرید ($\text{Standardized } \beta=-0/192, P<0/054$)، HDL-C ($\text{Standardized } \beta=0/214, P<0/05$) و جنس مؤنث ($\text{Standardized } \beta=0/196, P<0/056$) به عنوان عوامل مستقل در تعیین اندازه LDL نقش دارند. HbA1c با توجه به Colinearity شدید با HDL-C از مدل حذف شد.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم همبستگی معکوس بین اندازه LDL و HbA1c، HbA1c به عنوان عاملی مستقل در تعیین اندازه LDL در بیماران دیابتی نقش ندارد. بنظر می‌رسد کاهش در میزان HDL-C در نتیجه کنترل ضعیف دیابت باعث کاهش اندازه LDL می‌شود.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، LDL کوچک و چگال، HbA1c

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، بخش بیوشیمی

۲- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن:

۸۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی از علل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی در این بیماران ۲ تا ۴ برابر افراد غیر مبتلا به دیابت است [۱]. در کنار عوامل خطر شناخته شده بیماری‌های قلبی عروقی از جمله هیپرکلسترولمی، افزایش فشار خون، کشیدن سیگار و سابقه فامیلی که فقط ۲۰ تا ۲۵٪ افزایش خطر را در این بیماران توجیه می‌کند، دیس لیپیدمی به عبارتی افزایش لیپوپروتئین‌های غنی از تری گلسیرید، کاهش HDL-C و افزایش LDL کوچک و چگال (dense LDL=d-LDL) به عنوان یکی از علل مهم افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی مطرح می‌باشد [۲]. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که عناصر دیس لیپیدمی مستقل از یکدیگر دارای اثرات اتروژنیک می‌باشند [۳]. در شرایطی که d-LDL از اتروژنیک‌ترین اجزای این مجموعه شناخته شده است [۴]. به ترتیبی که افرادی که فرم غالب LDL آنها از نوع کوچک و چگال (فنتوتیپ B) است سه برابر بیشتر از افرادی که فرم غالب LDL آنها از نوع بزرگ (فنتوتیپ A) است در معرض بیماری‌های قلبی عروقی هستند [۵، ۶]. در این تحقیق به منظور بررسی این‌که آیا کنترل گلیسمی که توسط میزان HbA1c نشان داده می‌شود می‌تواند دارای اثر مطلوب بر اندازه LDL باشد، ارتباط HbA1c با اندازه LDL در بیماران دیابتی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه ۸۱ بیمار دیابتی نوع ۲ (۴۶ زن و ۳۵ مرد) که با توجه به ضوابط WHO قند خون آنها در حالت ناشتا و پس از ۱، ۲ و ۳ بار اندازه‌گیری بیش از ۱۲۶mg/dl بود و توسط پزشک بیمار دیابتی نوع ۲ تشخیص داده شده و تحت درمان با انسولین یا داروهای هیپوگلیسمیک بودند؛ مورد بررسی قرار گرفتند. داوطلبین در صورت داشتن معیارهای مورد نظر از جمله عدم وجود سابقه بیماری‌های کلیوی، تیرویدی و کبدی و عدم

مصرف سیگار در این تحقیق انتخاب شدند. افراد انتخاب شده نمی‌بایست تحت درمان با داروهای کاهنده لیپیدی باشند یا حداقل می‌بایست یک ماه قبل از انجام آزمایش مصرف این داروها را قطع کرده باشند [۷].

نمونه خون ۸ صبح پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتا بودن از داوطلبین اخذ شد و به لوله‌های حاوی EDTA (۱mg/dl) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (۴/۶μg/ml) به ترتیب به عنوان ضد انعقاد و آنتی اکسیدان منتقل گردید. نمونه پلاسما پس از سانتریفوژ در دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، جدا شده و تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید.

جهت تعیین اندازه LDL از روش PAGE با شیب غلظتی ۱۶-۲٪ استفاده شده [۸]. پس از تهیه گرادیانت غلظتی به دنبال پلیمریزاسیون ژل و قبل از نمونه‌گذاری، ژل در بافر الکتروفورز به مدت ۲۰ دقیقه تحت جریان ۱۲۵ ولت و دمای ۱۰ درجه قرار گرفت. سپس ۴ میکرولیتر نمونه پلاسما را داوطلب با محلول سوکروز ۵۰٪ و برموفل ۱/۰٪ به نسبت ۴:۱ مخلوط شده به کمک سرنگ هامیلتون به چاهک‌ها اضافه شد. در هر نوبت همراه با نمونه داوطلبین د ردو چاهک مختلف دو نوع استاندارد متفاوت اضافه شد و در شرایط یکسان همراه با نمونه‌ها الکتروفورز صورت گرفت. یکی از دو نوع استاندارد را مخلوط استاندارد پروتئینی با قطر معین (شامل تیروگلوبولین با قطر ۱۷ نانومتر، فریتین با قطر ۱۲/۲ نانومتر، کاتالاز با قطر ۱۰/۴ نانومتر، لاکتات دهیدروژناز با قطر ۸/۱ نانومتر و آلبومین با قطر ۷ نانومتر کیت، Biotech Pharmacia) و استاندارد دوم را ذرات لاتکس با قطر ۵۰ نانومتر تشکیل می‌داد (Alfa Aesar). ذرات لاتکس قبل از نمونه‌گذاری می‌بایست به نسبت ۱:۱ با آب مقطر رقیق می‌شد. پس از نمونه‌گذاری در آغاز کاربه ترتیب جریان ۱۵ ولت به مدت ۱۵ دقیقه و جریان ۷۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه برقرار شد و سپس الکتروفورز تحت جریان با ولتاژ ثابت ۱۲۵ ولت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۱۰ درجه ادامه یافت. در پایان قطعه ای از ژل که حاوی مخلوط استاندارد پروتئینی بود از بقیه ژل جدا شده بطور جداگانه توسط رنگ کوماسی R-250 رنگ‌آمیزی گردید. جهت

است که فراوانی فنوتیپ B در مردان دیابتی ۷۴/۳ درصد و فراوانی این فنوتیپ در زنان دیابتی ۴۷/۸ درصد بود. در جدول ۲ میانگین متغیرهای سن، BMI، تری گلیسرید، HDL-C و HbA1c در بیماران دیابتی با فنوتیپ‌های A و B مقایسه شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که میانگین سن در این دو گروه تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد. غلظت تری گلیسرید در دیابتی‌ها با فنوتیپ B به‌طور معنی‌داری بیشتر از بیماران با فنوتیپ A بود ($210.3 \pm 103.2 \text{ mg/dl}$ در مقابل $155.1 \pm 55.8 \text{ mg/dl}$ و $P < 0.05$) میزان HDL-C در بیماران دیابتی با فنوتیپ A بیشتر از بیماران با فنوتیپ B بود ($43.3 \pm 7.3 \text{ mg/dl}$ در مقابل $53.5 \pm 16.5 \text{ mg/dl}$ و $P < 0.05$). BMI در دیابتی‌ها با فنوتیپ B بطور معنی‌داری بیشتر از BMI بیماران دیابتی با فنوتیپ A بود ($27.7 \pm 1.4 \text{ kg/m}^2$ در مقابل $26.5 \pm 1.4 \text{ kg/m}^2$ و $P < 0.01$) به علاوه همان‌گونه که در جدول ۲ آورده شده است HbA1c بیماران دیابتی با فنوتیپ B بطور معنی‌داری بیشتر از بیماران دارای فنوتیپ A بود (9.1 ± 0.2 در مقابل 7.6 ± 0.1 و $P < 0.01$).

به منظور بررسی همبستگی بین اندازه LDL و متغیرهای فوق از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. همانگونه که در جدول ۳ آورده شده است بین اندازه LDL با تری گلیسرید ($r = -0.281$, $P < 0.05$)، جنسیت ($P < 0.05$)، HbA1c ($r = -0.232$, $P < 0.05$) همبستگی معکوس و با HDL-C ($r = 0.215$, $P < 0.01$) همبستگی مستقیم دیده شد.

رنگ‌آمیزی نمونه‌ها و استاندارد لاتکس از رنگ Oil Red O استفاده شد. سپس به ازای هر ژل براساس لگاریتم قطر هر یک از استانداردها و Rf مربوط به هر یک منحنی استاندارد رسم شد. از این منحنی به منظور تعیین فنوتیپ داوطلبین از لحاظ LDL استفاده شد. جهت تعیین غلظت تری گلیسرید و گلوکز خون از روش‌های آنزیمی استفاده شد (کیت زیست شیمی). در اندازه‌گیری HDL-C به روش رسوبی ابتدا با استفاده از پلی آنیون‌ها و در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی لیوپروتئین‌ها حاوی apoB-100 رسوب داده شدند و پس از رسوب این لیوپروتئین‌ها HDL-C در محلول رویی به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد (کیت زیست شیمی). HbA1c به روش ایمونوتوریدومتريک اندازه‌گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. آزمون‌های مورد استفاده شامل Independent t-test، ضریب همبستگی پیرسون و آزمون رگرسیون بود. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ فراوانی فنوتیپ A و B در بیماران دیابتی آورده شده است. براساس نتایج حاصل فراوانی فنوتیپ B در بیماران دیابتی ۵۹ درصد و فراوانی فنوتیپ A در این بیماران ۴۱ درصد بود. به علاوه چنانچه در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود فراوانی این دو فنوتیپ به تفکیک جنسیت نیز در این بیماران بررسی شد. نتایج حاصل حاکی از آن

جدول ۱- فراوانی افراد با فنوتیپ A و B در بیماران دیابتی

تعداد کل	فنوتیپ	
	B	A
زن	۲۲ (۴۷/۸٪)	۲۴ (۵۲/۲٪)
مرد	۳۵ (۷۴/۳٪)	۹ (۲۵/۷٪)
تعداد کل	۴۸ (۵۹٪)	۳۳ (۴۱٪)

جدول ۲- مقایسه میانگین متغیرهای پیوسته در بیماران دیابتی با فنوتیپ A و B

P Value	فنوتیپ B	فنوتیپ A	
	n = ۴۸	n = ۳۳	
NS	۵۶۷ ± ۶۷	۵۷۲ ± ۶	سن (سال)
P<۰/۰۱	۲۷/۷ ± ۱/۴	۲۶/۵ ± ۱/۴	kg/m2 BMI
P<۰/۰۵	۲۱۰/۳ ± ۱۰۳/۲	۱۵۵/۱ ± ۵۵/۸	تری گلیسرید (mg/dl)
P<۰/۰۵	۴۳/۳ ± ۷/۳	۵۳/۵ ± ۱۶/۵	(mg/dl) HDL-C
P<۰/۰۱	۹/۱ ± ۲	۷/۶ ± ۱/۸	(%) HbA1c

جدول ۳- ضریب همبستگی (r) بین اندازه LDL و متغیرهای پیوسته در بیماران دیابتی

اندازه LDL		
P value	r	
NS	-۰/۰۴۰	سن (سال)
P<۰/۰۵	-۰/۲۷۶	جنسیت (زن / مرد)
P<۰/۰۵	-۰/۲۸۱	تری گلیسرید (mg/dl)
NS	-۰/۰۹۲	(kg/m2) BMI
P<۰/۰۱	۰/۲۱۵	(mg/dl) HDL-C
P<۰/۰۵	-۰/۲۳۲	(%) HbA1c

به نظر می رسد هیپرتری گلیسریدمی که معمولاً در این دسته بیماران مشاهده می شود باعث افزایش غلظت VLDL-TG می گردد. در این شرایط روند انتقال کلسترول تری گلیسرید بین VLDL-TG و LDL در حضور کلسترول استر ترانسفر پروتئین تسریع می شود و بدین ترتیب LDL غنی از تری گلیسرید سوبسترای مناسبی برای لیپاز کبدی محسوب می شود و تحت تأثیر این آنزیم به d-LDL تبدیل می شود. نشان داده شده است که در بیماران دیابتی فعالیت لیپوپروتئین لیپاز معمولاً کاهش یافته در شرایطی که فعالیت لیپاز کبدی افزایش می یابد تغییر در فعالیت این دو آنزیم نیز تشکیل d-LDL را تسهیل می دهد [۹]. براساس نتایج مطالعه حاضر و منطبق با نتایج مطالعات دیگر فنوتیپ B با

در مدل رگرسیون خطی اثر متغیرهای تری گلیسرید، HDL-C، جنسیت و HbA1c به عنوان عوامل مستقل تعیین کننده اندازه LDL بررسی شد در مدل چند متغیره HbA1c بدلیل وجود Colinearity با HDL-C از مدل خارج گردید. در نهایت TG رابطه معکوس ($\beta=۰/۱۹۲$) و HDLC ($\text{Standardized } \beta=۰/۲۱۴$) و جنس مونث ($\text{Standardized } \beta=۰/۱۹۶$) رابطه مستقیمی با سایز LDL در سطح معنی داری $P<۰/۰۵$ نشان دادند.

بحث

در این تحقیق فراوانی فنوتیپ B در بیماران دیابتی بیشتر از فنوتیپ A بود. اگر چه عوامل مؤثر در افزایش فراوانی d-LDL در بیماران دیابتی به خوبی شناخته نشده است؛

است که تری گلیسرید و HDL-C مستقل از دیگر پارامترها همبستگی معنی داری با اندازه LDL-C نشان داده و از شاخص های مهم تعیین کننده اندازه LDL هستند [۱۴]. در این تحقیق دیده شد که علی رغم همبستگی معکوس موجود بین HbA1c و اندازه LDL، HbA1c به عنوان یک عامل مستقل در تعیین اندازه LDL نقش ندارد. با توجه به این که در مدل رگرسیون Colinearity شدیدی بین HbA1c و HDL-C دیده شد بنظر می رسد کنترل ضعیف دیابت از طریق کاهش در سطح HDL-C [۱۳] باعث کاهش اندازه LDL می شود.

نتیجه گیری نهایی این که بنظر می رسد گرچه HbA1c به عنوان عامل مستقل در تعیین اندازه LDL نقش ندارد از طریق کاهش در میزان HDL-C تأثیر خود را بر اندازه LDL می گذارد.

غلظت های بالاتر تری گلیسرید و غلظت های پایین تر HDL-C در مقایسه با فنوتیپ A همراه می باشد این پروفایل لیپیدی تحت عنوان فنوتیپ لیوپروتین اترورژن نامیده می شود [۱۰]. در این تحقیق همبستگی معکوس بین اندازه LDL با تری گلیسرید، جنسیت و HbA1c و همبستگی مستقیم با HDL-C مشاهده شد. Erbey و Jenkins در مطالعات مجزا همبستگی معکوس بین اندازه LDL با HbA1c را گزارش کردند [۱۱، ۱۲] در گزارش Pruhell و همکارانش نیز عنوان شد که در بیماران دیابتی تحت درمان، کاهش HbA1c با افزایش اندازه LDL همراه است [۱۳]. در این تحقیق به کمک مدل رگرسیون خطی نشان داده شد که از بین متغیرهای مورد مطالعه TG، HDL-C و جنسیت به عنوان عوامل مستقل در تعیین اندازه LDL نقش دارند (البته با توجه به نتایج آنالیز آماری این پارامترها در مرز معنی داری قرار داشتند). مطالعات مختلفی حاکی از آن

مآخذ

- Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: and epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 463-524.
- Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *The American Journal of Cardiology* 1988; 82(12A): 67U-73U.
- Spanheimer RG. Reducing cardiovascular risk in diabetes. *Postgraduate Medicine* 2001; 109: 26-36.
- Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46: 733-749.
- Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfraction: relative contribution of small dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994; 106: 241-253.
- Packard C, Caslake M, Seperd J. The role of small dense low-density lipoprotein (LDL): a new look. *Int J Cardiology* 2000; 74: 17-22.
- Prescott J, Owens D, Collins P. The fatty acid distribution in low density lipoprotein in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439: 110-116.
- Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986; 18: 417-431.
- Taskinen MR. Insulin resistance & lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1996; 6: 153-160.
- Austin MA, King MC, Vranizan Km, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82: 495-506.
- Erbey JR, Robbins D, Forrest K, et al. Low density lipoprotein particle size & coronary artery disease in child hood-onset type 1 diabetes population. *Metabolism* 1999; 48: 531-534.
- Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D, et al. Serum lipoproteins in the diabetes control & complication trial. *Diabetes Care* 2003; 26: 810-818.
- Purnell JQ, Marcovina SM, Hoaknson JE, et al. Levels of lipoprotein (a), apolipoprotein B & lipoprotein cholesterol distribution in IDDM: Results from follow up in the DCCT. *Diabetes* 1995; 44: 1218-1226.
- Mykkanen L, Haffner SM, Rainwater DL. Relationship of LDL size to insulin sensitivity in normoglycemic men. *Arterioscler Thromb Vascl Biol.* 1997; 17: 1447-1453.