

ارتباط شاخص‌های عصبی ادراکی و روانی با کمبود کوبالامین و اسید فولیک در سالمندان شهر مشهد

لیدا معنوی فر^۱، حبیب الله نعمتی کریموی^۲، امیره نجات شکوهی^۳، عباس شیردل^۴، محمد تقی شاکری^۵، منیره محبوب^۶

^۱ کارشناس ارشد، عضو هیئت علمی دانشکده پیراپزشکی و بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

^۲ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

^۳ دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

^۴ دانشیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

^۵ دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی و بهداشت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

^۶ عضو هیئت علمی دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

نویسنده رابط: لیدا معنوی فر، نشانی: مشهد، میدان ملک آباد، ابتدای خیابان فلسطین، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی. تلفن: ۰۵۱۱-۷۶۱۰۱۱۱-۳؛ نمابر: ۰۵۱۱-۸۸۲۸۵۶۴-۰۵۱۱ پست الکترونیک:

manavifarl@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۶/۲۷؛ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۲

مقدمه و اهداف: اختلالات عصبی ادراکی و روانی در سالمندان شایع است. در این مطالعه ارتباط مقادیر سرمی کوبالامین، فولات،

هموسیستین با شاخص‌های عصبی ادراکی و روانی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش کار: ۲۸۰ سالمند در بیمارستان امام رضا (ع) شهر مشهد پذیرش شدند. معاینات فیزیکی و آزمون‌های لازم توسط پزشک بعمل آمد. اسیدفولیک و کوبالامین سرم به روش RIA اندازه‌گیری شد. برای ۷۸ سالمند که دارای کوبالامین $120-450 \text{ pg/ml}$ و فولات $13-15 \text{ ng/ml}$ بودند، هموسیستین سرم به روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج با spss تحلیل گردید.

نتایج: بر اساس هموسیستین $15 \mu\text{mol/l}$ ، نقطه برش برای کمبود کوبالامین و فولات سرم بترتیب 330 pg/ml و 7 ng/ml بود. بین کوبالامین و فولات، ارتباط معنی داری وجود داشت ($p < 0/001$). هموسیستین ارتباط عکس با کوبالامین ($p < 0/001$) و فولات ($p = 0/044$) داشت. مطالعه ما نشان داد که کوبالامین و فولات و هموسیستین سرم با شاخص‌های ادراکی عصبی و روانی ارتباط معنی‌دار ندارد به جز در مورد هموسیستین با رفلکس‌های تاندونی عمقی ($p = 0/045$). در سالمندان دچار دمانس، هموسیستین سرم بالا بود.

نتیجه‌گیری: با نتایج این مطالعه و نتایج ضد و نقیض در سایر مطالعات، بنظر می‌رسد که باید در روش‌های ارزیابی اختلالات عصبی ادراکی و روانی تجدید نظر گردد. چنانچه بین شاخص‌های آزمایشگاهی و اختلالات عصبی ادراکی روانی ارتباط معنی‌دار بدست آید، می‌توان با غربالگری دوره‌ای سالمندان از نظر هموسیستین یا کوبالامین و اسید فولیک از بروز این اختلالات پیشگیری نمود.

واژگان کلیدی: سالمندان، کوبالامین، فولات، هموسیستین، شاخص‌های عصبی ادراکی و روانی

مقدمه

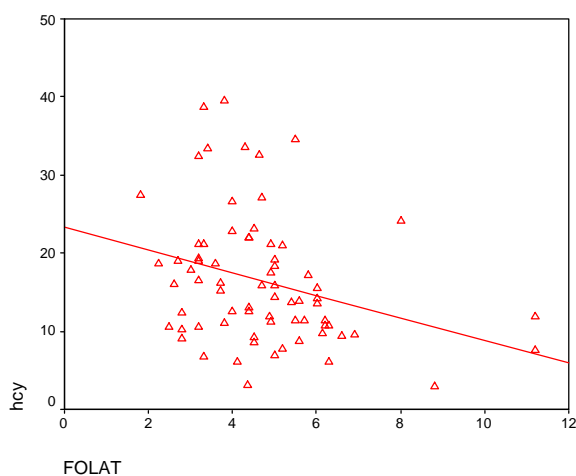
سوءتغذیه را ۲۰-۵٪ و درصد شیوع کمبود فولات را ۲۰-۱٪ گزارش می‌کنند و سالمندان را اقشار آسیب‌پذیر جامعه از نظر فقر ویتامین‌های مزبور می‌دانند (۱).

شیوع کمبود کوبالامین در سالمندان به همراه افزایش متیل مالونیک اسید در اروپا و آمریکا را ۱۵٪ گزارش کرده‌اند و مصرف $7.612 \text{ } \mu\text{g/day}$ به میزان ۳۰-۱۲ در سالمندان در خطر

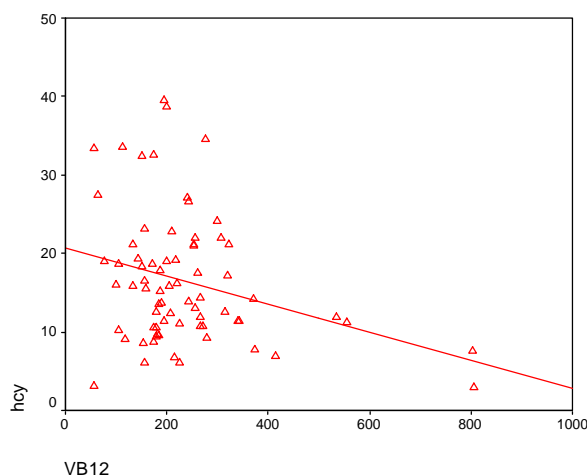
سالانه تعداد زیادی از سالمندان با علائم خفیف و مبهم از قبیل علائم کم خونی، شکایات عصبی ادراکی و روانی به پزشک یا مراکز درمانی مراجعه می‌کنند که ممکن است ناشی از کمبود کوبالامین و اسید فولیک باشد. شیوع گاستریت آتروفیک با افزایش سن و سوء تغذیه از عوامل شایع کاهش این دو ویتامین در سالمندان است. بژورکاگرن و همکاران درصد شیوع کمبود کوبالامین در

مهمی برای اختلالات قلبی عروقی و مغزی عروقی می‌دانند (۷). توام بودن عوارض سوء جذب و سوء تغذیه و کمبود کوبالامین و اسیدفولیک و افزایش هموسیستئین و اختلالات عصبی ادراکی هوشی در سالمندان ممکن است دلیل بر همبستگی آن‌ها با هم باشد.

مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ بر روی سالمندان در ایالات متحده نشان می‌دهد بر مبنای هموسیستئین سرم >15 و مقادیر کوبالامین سرم $150-200 \text{ pg/ml}$ ، در اواخر عمر، نسبت کمبود کوبالامین از ۱ به ۲۰ در سنین ۶۵-۷۴ به ۱ به ۱۰ در سنین ۷۵ سال به بالا می‌رسد دلالت بر اثر گذاری و اهمیت این ویتامین در سالمندان دارد (۸). کادو و همکاران در سال ۲۰۰۵ اندازه‌گیری هموسیستئین پلاسما را برای ارزیابی بیماری که مشکوک به کمبود کوبالامین و فولات هستند مفید دانسته و



شکل ۱- منحنی پراکنش بین فولات و هموسیستئین



شکل ۲- منحنی پراکنش بین هموسیستئین و کوبالامین

سوء تغذیه را توصیه می‌کنند (۲).

در امریکا توصیه مرجع غذایی (RAD) ^۱ برای جذب قطعی $1 \mu\text{g/day}$ کوبالامین برای بالغین، $2/4 \mu\text{g/day}$ است زیرا متوسط جذب غذا ۵۰٪ است؛ در حالی که در بسیاری از جوامع مصرف روزانه کمتر از $1 \mu\text{g/day}$ است که ممکن است با علائم بالینی همراه باشد یا نباشد (۲). بدیهی است که رژیم کمتر از $0/5 \mu\text{g/day}$ موجب کم‌خونی مگالوبلاستیک نمی‌گردد؛ ولی بروز هیپرهموسیستئینمی با این رژیم‌های محدود شایع است (۲).

طی مطالعه‌ای بر روی قشر کم درآمد در جنوب غربی تهران در سال ۲۰۰۴، شیوع کمبود کوبالامین در زنان ۲۷/۲٪ و در مردان ۲۶/۳۲٪ و کمبود اسید فولیک در زنان ۹۷/۹۲٪ و در مردان ۹۸/۶۷٪ و در صد افزایش هموسیستئین در زنان ۴۱/۷۰٪ و در مردان ۷۳/۱٪ تخمین زده شد (۳).

نقش عمده سیانوکوبالامین (cbl) در پستانداران در دو مسیر است: الف- به صورت آدنوزیل در تبدیل متیل مالونیل کوآنزیم A به سوکسینیل کوآنزیم A عمل می‌کند و لذا کمبود کوبالامین منجر به افزایش متیل مالونیک اسید می‌گردد. ب- به صورت متیل کوبالامین در سنتز متیونین از هموسیستئین عمل می‌کند. متیونین به S-آدنوزین متیونین (SAM) تبدیل می‌گردد و معتقدند این ماده نقش اساسی در عملکرد سیستم عصبی دارد و شکایات نورولوژیک، اغلب بدلیل کمبود کوبالامین است (۴).

کمبود کوبالامین و فولات هردو تولید تتراهیدروفولات را مختل می‌کنند و موجب علائم هماتولوژیک و تغییرات مگالوبلاستی می‌گردند.

شایع‌ترین علائم کمبود کوبالامین عبارتند از کم‌خونی و ماکروسیتوز و علائم نورولوژیک مثل پاراستزی، بی‌خوابی، عدم کنترل عضلانی و در مواردی دمانس و اختلال روانی. هیلتون و همکاران با مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که علائم نورولوژیک غالباً قبل از هماتولوژیک بروز می‌کنند و بیش از یک چهارم تظاهرات نورولوژیک ناشی از کمبود کوبالامین با هماتوکریت نرمال ویا mcv طبیعی همراه بوده است (۵).

شایع‌ترین علائم کمبود فولات، کم‌خونی و ماکروسیتوز و علائم عصبی روانی شامل افسردگی، دمانس و سایر علائمی است که اغلب همراه کمبود کوبالامین و سایر اختلالات بوده است (۶). کمبود کوبالامین و فولات هردو موجب افزایش هموسیستئین می‌گردند و تحقیقات جدید هیپرهموسیستئینمی را فاکتور خطر

^۱ Recommended Allowance Diatery

^۲ Mean Corpuscular Volume

جدول شماره ۱- مقادیر هموسیستئین سرم به تفکیک جنس

$\mu\text{mol} / \text{l}$	هموسیستئین	مرد n(%)	زن n(%)	کل n(%)
≤ 15		۱۷(۲۲/۴)	۲۲(۲۸/۹)	۳۹(۵۱)
> 15		۲۵(۳۲/۹)	۱۲(۱۵/۸)	۳۷(۴۸/۷)
کل افراد		۴۲	۳۴	۷۶
درصد کل		% ۵۵/۳	% ۴۴/۷	% ۱۰۰

هیپر هموسیستئینی = ۴۸/۷%

جدول شماره ۲- میانگین کوبالامین (pg/ml) و فولات (ng/ml) و هموسیستئین

($\mu\text{mol} / \text{l}$) در دو گروه آزمون MMSE مثبت و منفی

	MMSE score	تعداد	میانگین	SD
Hcy	≤ 20 مثبت	۱۵	۱۷/۹۱	۸/۱۸
	> 20 منفی	۵۷	۱۵/۶۵	۷/۹۲
VB12	≤ 20 مثبت	۴۹	۲۶۵/۱۳	۲۲۵/۹۸
	> 20 منفی	۱۸۳	۲۷۸/۰۲	۲۲۴/۷۲
فولات	≤ 20 مثبت	۴۹	۵/۲۳	۳/۳۰
	> 20 منفی	۱۸۴	۵/۳۵	۳/۳۱

بسیار پایین است (۱۱). بررسی دیگری نشان می‌دهد که در بیماران با افسردگی شدید و مقاوم به فلوکستین، سطح فولات سرم پایین است (۱۲). ناگا و همکاران گزارش نمودند که ۲۸٪ از بیماران مبتلا به دمانس، هموسیستئین سرم بالا دارند؛ در حالیکه بندرت دارای متیل مالونیک سرم بالا هستند (۱۳). مطالعات انجام شده در ایران درصد شیوع بالایی از اختلالات عصبی روانی و ادراکی را نشان می‌دهند. نوربالا و همکاران (۲۰۰۴)، شیوع اختلالات فکری را در مناطق شهری ۲۱/۳٪ و در مناطق روستایی ۲۰/۹٪ گزارش می‌کنند و نشان می‌دهند که علائم افسردگی و اضطراب درصد بالایی از اختلالات را شامل می‌شوند (۱۴).

محمدی و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار می‌کنند که حدود ۷ میلیون ایرانی از یک یا چند اختلال روانی رنج می‌برند. آن‌ها در یک بررسی جمعیتی تصادفی شامل ۲۸۱۵۰ فرد ۱۸ سال به بالا شیوع اختلالات روانی را ۱۰/۸۱٪ گزارش می‌نمایند که شایع‌ترین آن‌ها اضطراب (۸/۳۵٪) و اختلالات خلقی (۴/۲۹٪) است. آن‌ها شیوع اختلالات روانی را ۰/۸۹٪، اختلالات عصبی ادراکی را ۲/۷۸٪ و اختلالات تجزیه‌ای را ۰/۷۷٪ گزارش می‌کنند (۱۵). مخبر و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۸ بر روی سالمندان ۶۰-۹۸ ساله در خراسان رضوی با آزمون افسردگی، ۲۳/۵٪ از افراد را در خطر افسردگی می‌دانند (۱۶).

در این مطالعه ما پس از اندازه‌گیری میزان کوبالامین و اسید فولیک و هموسیستئین سرم و تعیین معیار برای کمبود کوبالامین و اسید فولیک، ارتباط میزان کوبالامین و اسید فولیک و هموسیستئین سرم را با علائم و شواهد عصبی (آزمایش رفلکس تاندونی عمقی، رفلکس پوستی کف پای، حس درد، حس ارتعاش) و علائم روانی (آزمون افسردگی، بی‌خوابی، گریه بی‌دلیل) و علائم ادراکی (آزمون MMSE) مورد بررسی قرار دادیم. با توجه به شیوع اختلالات نورولوژیک در سالمندان و با توجه به نتایج پژوهش‌های مشابه، در مورد ارتباط این اختلالات با افزایش هموسیستئین و کمبود کوبالامین و اسید فولیک، چنانچه این همبستگی در جامعه مورد مطالعه ما آشکار و قطعی گردد، نقش عمده‌ای در پیشگیری از آسیب‌پذیری سالمندان توسط دست اندرکاران بهداشت و سلامت سالمندان خواهد داشت تا تحت برنامه‌های غربال‌گری، تشخیص و درمان مناسب قرار گیرند.

توصیه می‌کنند برای بیمارانی که با آزمایش‌های بیوشیمیایی، هماتولوژیک، علائم کم‌خونی و یافته‌های عصبی ادراکی کمبود ویتامین مشخص و قطعی نیست، مفیدترین آزمون جهت تشخیص کمبود کوبالامین، اندازه‌گیری هموسیستئین و متیل مالونیک اسید سرم و ادرار است (۹).

از دیگر شاخص‌های بالینی کمبود اسید فولیک و کوبالامین، علائم عصبی ادراکی و روانی است. بررسی این شاخص‌ها حتی زمانی که غلظت سرمی اسیدفولیک و کوبالامین پایین نباشد می‌تواند در تشخیص به موقع کمبود مفید باشد.

شاهار و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای بر روی ۶۵۰ سالمند بیمارستانی در اسرائیل به این نتیجه رسیدند که ۵۰٪ از بیماران دارای کمبود کوبالامین در حد مرز ($150-250 \text{ pmol/l}$) بودند و این کمبود با بیماری مغزی عروقی و اختلالات شناختی ارتباط معنی‌دار داشت ($P=0/046$). در این مطالعه ارتباطی بین بیماری گاستریت و میزان کوبالامین وجود نداشت (۱۰).

طی مطالعاتی در ونزوئلا در سال ۲۰۰۴ کمبود کوبالامین در سالمندان ۲۶/۴٪ و کمبود فولات ۴۳/۳٪ گزارش می‌گردد و با آزمون Folteins minimental نشان داده می‌شود که ۴۹٪ از سالمندان اختلالات ذهنی دارند و سطح کوبالامین در این گروه

روش کار

نوع مطالعه یک بررسی توصیفی-تحلیلی بود. حجم نمونه پیشنهاد شده برای این پژوهش بر مبنای نمونه برداری تصادفی ساده، ۱۸۸ نفر بود. از آن جا که نمونه برداری به صورت خوشه‌ای بود با احتساب افزایش ۲۰٪ و نیز خطای $d = 0.05$ و $\alpha = 0.05$ تعداد نمونه ۲۶۵ نفر در نظر گرفته شد.

در این پژوهش، ۲۸۰ سالمند بالای ۶۵ سال از مناطق ۱۲ گانه شهر مشهد مورد مطالعه قرار گرفتند. در بیمارستان بعد از پذیرش و خونگیری (ناشتا)، توسط پزشک علائم فیزیکی، بالینی و نتایج تست‌های عصبی ادراکی و روانی شامل آزمون مینی-منتال (MMSE)^۲، رفلکس‌های تاندونی عمقی (DTR)^۳، رفلکس پوستی کف پائی (رومبرگ)^۴ و آزمون افسردگی (GDS)^۵ و سایر اطلاعات دموگرافیک در فرم‌های مخصوص ثبت گردید. سالمندانی که در سه ماه قبل مولتی ویتامین و ویتامین B12 صنعتی

دریافت کرده بودند و یا اطلاعات کافی در مورد آن‌ها نبود از مطالعه حذف گردیدند. سپس با نمونه‌های سرم منجمد شده (در 20°C -)، مقادیر کوبالامین و اسید فولیک سرم به روش (RIA (DRG kits Cat#, Rla-1990, Germany) اندازه‌گیری شدند. مطابق رفرنس کیت مصرفی، مقادیر کوبالامین کمتر از pg/ml ۱۲۰ و فولات کمتر از ng/ml ۱/۵، کمبود در حد پایین بودند. ۷۸ نفر از سالمندان را که دارای کوبالامین pg/ml ۱۲۰-۴۵۰ = VB12 و فولات ng/ml ۱۷-۱/۵ بودند و بعلاوه فاقد فاکتورهای مخدوش‌کننده اندازه‌گیری هموسیستئین بودند، یعنی سیگاری نبودند و کراتینین سرم آن‌ها کمتر از mg/dl ۱/۵ بود و داروهایی مثل تری متوپریم، متفورمین، امپرازول و ... مصرف نکرده بودند، مجدداً انتخاب و میزان هموسیستئین سرم آن‌ها به روش (DRG kit Cat#: EIA-2925, Germany) ELISA اندازه‌گیری شد. در این مطالعه اثر سن به لحاظ اینکه افراد شرکت کننده در مطالعه میانگین سنی $72 \pm 7/5$ سال داشتند مورد نظر قرار نگرفت.

جدول شماره ۳- میانگین کوبالامین (pg/ml) و فولات (ng/ml) و هموسیستئین

($\mu\text{mol/l}$) در دو گروه آزمون افسردگی مثبت و منفی

Score افسردگی	تعداد	میانگین	SD
Hcy >۵ مثبت	۱۲	۱۵/۳۲	۷/۵۳
Hcy ≤۵ منفی	۵۷	۱۶/۳۴	۸/۲۴
VB12 >۵ مثبت	۴۷	۳۱۰/۶۳	۳۱۴/۸۱
VB12 ≤۵ منفی	۱۶۷	۲۶۹/۳۹	۱۹۵/۳۸
فولات >۵ مثبت	۴۶	۵/۳۳	۳/۷۱
فولات ≤۵ منفی	۱۶۹	۵/۳۵	۳/۳۰

جدول شماره ۴- میانگین کوبالامین (pg/ml) و فولات (ng/ml) و هموسیستئین ($\mu\text{mol/l}$)

در دو گروه رفلکس پوستی کف پائی معکوس و طبیعی

رفلکس پوستی کف پائی	تعداد	میانگین	SD
Hcy معکوس	۰	۰	۰
Hcy طبیعی	۵۷	۱۵/۲۸	۷/۳۳
VB12 معکوس	۳	۴۰۰/۶۶	۳۱۷/۰۵
VB12 طبیعی	۱۵۷	۲۸۰/۶۶	۲۴۱/۸۶
فولات معکوس	۳	۸/۰۵	۴/۷۶
فولات طبیعی	۱۵۷	۵/۵۶	۳/۶۶

در آنالیز آماری، پس از کنترل توزیع نرمال، فاصله اطمینان متغیرهای اصلی برای جامعه مورد پژوهش به صورت $\bar{x} \pm 2SD$ به دست آمد. شاخص‌های آماری برای زیر گروه‌های خاصی از جامعه مشخص گردید و مقایسه‌های لازم برای هر یک از شاخص‌ها در زیر گروه‌ها با استفاده از آزمون نان پارامتری من ویتنی^۶ انجام شد.

یافته‌ها

تعداد سالمندان مورد مطالعه ۲۸۰ نفر به تفکیک جنس ۱۲۶ مرد (۴۵٪) و ۱۵۴ زن (۵۵٪) با میانگین سنی $72/09 \pm 7/5$ سال بودند. بعد از حذف عوامل مداخله‌گر (۴۵ نفر)، میانگین کوبالامین سرم در ۲۳۵ سالمند برابر بود با $257/88 \pm 182$ که شامل ۱۰۵ مرد با میانگین کوبالامین $222/94$ و ۱۳۰ زن با میانگین کوبالامین $285/92$ بودند.

میانگین فولات سرم در ۲۴۰ سالمند برابر بود با $5/21 \pm 2/82$ که شامل ۱۰۶ مرد با میانگین فولات $4/71$ و 134 زن با میانگین فولات $5/60$ بودند.

مقدار هموسیستئین سرم در ۷۶ سالمند برابر بود با $34 \pm 7/27 \mu\text{mol/l}$ که شامل ۴۲ مرد با میانگین $18/49$ و 34 زن با میانگین $13/68$ بودند. درصد هیپرهموسیستئینمی بر اساس

^۲ بررسی مختصر وضعیت روانی (Mini-mental state exam)

^۳ رفلکس تاندونی عمقی (Deep tendon reflex)

^۴ فلکس پوستی کف پائی (Romberg)

^۵ معیار افسردگی سالمندان (Geriatric Depression Scale)

^۶ Mann-Whitney

۱- آزمون MMSE

مقایسه میانگین‌های فولات و هموسیستین و کوبالامین در دو گروه با آزمون MMSE مثبت (با نمره ≤ 20) و منفی (با نمره > 20) با استفاده از آزمون‌های من ویتنی نشان داد که میانگین‌های فولات و هموسیستین و کوبالامین در دو گروه MMSE مثبت (با نمره ≤ 20) و MMSE منفی (با نمره > 20) معنی‌دار نیست؛ به عبارتی بین میانگین سه متغیر هموسیستین ($p = 0/258$) و فولات ($Z = -1/13$) و کوبالامین ($p = 0/652$ و $Z = -0/451$) و فولات ($p = 0/452$ و $Z = -0/73$) در دو گروه مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

۲- دمانس

در ۷۸ سالمند که هموسیستین سرم آن‌ها اندازه‌گیری شده بود، ۱۰ نفر با دمانس واضح مشاهده شد که همه دارای هموسیستین بالا با میانگین $1 \pm 6/83 \mu\text{mol/l}$ بود. ۲۲/۰۱ بودند.

۳- آزمون افسردگی

ارتباط فولات و کوبالامین و هموسیستین با دو گروه آزمون افسردگی مثبت (با نمره > 5) و منفی (با نمره ≤ 5) معنی‌دار نبود؛ به عبارتی بین میانگین سه متغیر هموسیستین ($p = 0/675$) و فولات ($Z = -0/42$) و فولات ($p = 0/326$ و $Z = -0/983$) و کوبالامین ($p = 0/893$ و $Z = -0/135$) در دو گروه مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

۴- رفلکس پوستی کف پای (آزمون بابنسکی)

مقایسه میانگین‌های فولات و کوبالامین و هموسیستین در دو گروه آزمون رومبرگ ($p = 0/5$ و $Z = 0/897$) و دو گروه آزمون بابنسکی ($p = 0/5$ و $Z = 0/673$) نیز معنی‌دار نبود.

۵- رفلکس‌های تاندونی عمقی (DTR)

بین رفلکس‌های تاندونی عمقی با کوبالامین ارتباط معنی‌دار وجود داشت؛ ولی با فولات و هموسیستین وجود نداشت. با تست آنالیز واریانس یک طرفه، میانگین کوبالامین در سه گروه طبیعی و افزایش و کاهش در آزمون DTR تفاوت معنی‌داری وجود داشت. ($f = 3/266$ ، $df = 2$ ، $p = 0/45$)؛ ولی میانگین فولات در سه گروه طبیعی و افزایش و کاهش در آزمایش DTR ($p = 0/855$)، نیز میانگین هموسیستین در این سه گروه ($f = 0/156$ ، $df = 2$ ، $p = 0/161$) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

هموسیستین بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ برابر با $48/7\%$ بود. و این افزایش در مردان $32/9\%$ و در زنان $15/8\%$ بود (جدول شماره ۱). مقدار کوبالامین زمانی که هموسیستین سرم بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ باشد برابر با $149/54 \pm 190/93$ و با دامنه $41/39$ تا $330/47$ بود؛ لذا نقطه برش برای کوبالامین $330/47$ در نظر گرفته شد. یعنی سالمندان با کوبالامین کمتر از 330 pg/ml (42 pmol/l) در جاتی از کمبود کوبالامین را دارا بودند (حدودمرزی یا مارژینال^۸).

به این ترتیب درصد سالمندان با کمبود کوبالامین در حدود پایین (< 122) برابر با $22/7\%$ و در حدود مرزی یا مارژینال ($122-330$) برابر با $51/8\%$ و در حدود طبیعی (> 330) برابر با $44/5\%$ بود.

مقدار فولات زمانی که هموسیستین سرم بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ باشد برابر با $1/20 \pm 4/11$ با دامنه $2/91 - 6/51$ بود. لذا نقطه برش برای فولات سرم $6/5 \text{ ng/ml}$ ($10/36 \text{ ng/ml}$) در نظر گرفته شد یعنی سالمندان با فولات کمتر از $6/5 \text{ ng/ml}$ در جاتی از کمبود فولات را دارا بودند (حدود مرزی یا مارژینال^۸).

جدول همبستگی پیرسون نشان داد که کوبالامین با فولات سرم ($p = 0/000$ و $r = 0/682$) و نیز هموسیستین با کوبالامین سرم ($p = 0/111$ و $r = -0/291$) و فولات سرم ارتباط منفی معنی‌داری دارد ($p = 0/044$ و $r = -0/251$).

در منحنی‌های پراکنش هموسیستین با فولات و کوبالامین در ۷۶ سالمندی که کمبود در حدود مارژینال داشتند (منحنی شماره ۱ و ۲) این ارتباط معکوس دیده می‌شود.

ارتباط هموسیستین و کوبالامین و فولات سرم با علائم عصبی-ادراکی و روانی:

برای بررسی علائم عصبی ادراکی و روانی سالمندان از آزمون‌های MMSE و رفلکس تاندونی عمقی، رفلکس پوستی کف پای (بابنسکی)، آزمون رومبرگ، آزمون افسردگی و نیز بررسی حس ارتعاش^۹ و حس درد^{۱۰}، بی‌خوابی^{۱۱}، تحرک^{۱۲} و گریه بی‌دلیل^{۱۳} استفاده شد.

^۸ borderline=marginal = low normal

^۹ vibration

^{۱۰} pain perception

^{۱۱} insomnia

^{۱۲} motivation

^{۱۳} Easily Crying

۶- سایر علائم عصبی روانی

آزمون من ویتنی نشان داد که میانگین کوبالامین و فولات و هموسیستئین سرم در سایر یافته‌های عصبی- روانی مثل بی‌خوابی و گریه بی دلیل و تحرک و حس درد و حس ارتعاش تفاوت معنی‌داری ندارند و همبستگی‌ها بصورت زیر بود:

حس درد با میانگین فولات ($p=0/808$ و $Z=-0/243$)
 حس درد با میانگین کوبالامین ($p=0/327$ و $Z=-0/984$)
 حس ارتعاش با میانگین فولات ($p=0/466$ و $Z=-0/729$)
 حس ارتعاش با میانگین کوبالامین ($p=0/480$ و $Z=-0/706$)
 حس ارتعاش با میانگین هموسیستئین ($p=0/358$ و $Z=0/919$)
 بی‌خوابی با میانگین فولات ($p=0/428$ و $Z=-0/792$)
 بی‌خوابی با میانگین کوبالامین ($p=0/434$ و $Z=-0/782$)
 بی‌خوابی با میانگین هموسیستئین ($p=0/520$ و $Z=0/643$)
 تحرک با میانگین فولات ($p=0/217$ و $Z=-0/234$)
 تحرک با میانگین کوبالامین ($p=0/502$ و $Z=-0/677$)
 تحرک با میانگین هموسیستئین ($p=0/745$ و $Z=0/325$)

بحث

مطالعات نشان می‌دهند که به موازات سن، بویژه در جوامع با سطح فرهنگی اقتصادی اجتماعی پایین‌تر، اختلالات عصبی ادراکی هوشی و حتی دمانس و از طرفی گاستریت (آتروفی و التهاب مخاط معده و سندرم سوء جذب غذا) شیوع بیشتری می‌یابد. عده‌ای توأم بودن این دو عارضه با هم را دلیل بر نقش کمبود کوبالامین اسیدفولیک در ایجاد اختلالات عصبی، ادراکی و هوشی دانسته‌اند.

مطالعات نشان می‌دهند افزایش هموسیستئین که به دلالتی همچون کمبود کوبالامین و فولات، نارسایی کلیوی، نقص ژنتیکی، کاهش حجم خون و هیپوتیروئیدی ایجاد می‌شود، در سنین بالا فاکتور خطر مستقلی برای اختلالات قلبی عروقی، دژنراسیون اعصاب و سایر ضایعات عروقی مغزی محسوب می‌شود (۸) و لذا افزایش آن در هر جمعیتی نیازمند بررسی‌های آماری دقیق و فرآیندهای درمانی خاص است.

سلوب و همکاران (۷) میزان هموسیستئین طبیعی را کمتر از $14 \mu\text{mol/l}$ ، ای-فیگلین و همکاران (۱۸) و نیز بژورکاگرن و همکاران (۱) میزان طبیعی هموسیستئین را کمتر از $15 \mu\text{mol/l}$ در نظر گرفتند.

یائول و همکاران (۱۹)، با اندازه‌گیری هموسیستئین و متیل

مالونیل کوآنزیم A سرم و بررسی‌های بالینی از نظر گاستریت و نوروپاتی به همراه آزمایش‌های هماتولوژی نتیجه گرفتند که شیوع کمبود کوبالامین در سالمندان بیش از آنچه گزارش می‌شود است و اظهار داشتند که معیار کمبود کوبالامین را باید 300 pmol/l و اظهار داشتند که معیار کمبود کوبالامین را باید 408 pg/ml در نظر گرفت. ولی رازن و همکاران، نقطه برش را 220 pmol/l (299 pg/ml) در نظر گرفتند (۲۰).

بژورگاگرن و همکاران در سوئد (۲۰۰۳) سالمندان دارای کوبالامین 300 pmol/l و متیل مالونیل کوآنزیم A $1/3 \mu\text{mol/l}$ و هموسیستئین $1/15 \mu\text{mol/l}$ را در مرحله اول کمبود خواندند و اظهار داشتند که کمبود در این مرحله قابل درمان و بیماری برگشت پذیر است (۱). مایک ولتر و همکاران در زنان مسن آلمانی نقطه برش برای کوبالامین و فولات را بترتیب 350 pg/ml (258 pmol/l) و 3 ng/ml (7 nmol/l) اعلام نمودند (۲۱). فیگلین و همکاران، کمبود فولات سرم را به مقدار 11 nmol/l (یا $4/9 \text{ ng/ml}$) همراه با هموسیستئین $1/15 \mu\text{mol/l}$ و کمبود کوبالامین سرم را 147 pmol/l (220 pg/ml) به همراه متیل مالونیل کوآنزیم A $1/24 \mu\text{mol/l}$ تعریف نمودند (۱۸).

مطالعات نشان می‌دهند متیل مالونیل کوآنزیم A فقط با کاهش کوبالامین افزایش می‌یابد؛ در حالیکه هموسیستئین با کمبود فولات و کوبالامین هردو افزایش می‌یابد و در بعضی موارد هموسیستئین شاخص حساس‌تری برای کمبود فولات قلمداد شده است تا کوبالامین (۲۱). افزایش متابولیت‌ها بویژه متیل مالونیل کوآنزیم A، اغلب قبل از بروز علائم هماتولوژیک و کاهش کوبالامین سرم مشاهده می‌شود (۲۲). هواس و همکاران هیچگونه ارتباطی بین متیل مالونیل کوآنزیم A سرم و علائم نورولوژیک و معدی روده‌ای یافت نمودند. لذا در میان متابولیت‌ها ماندازه‌گیری هموسیستئین را ترجیح دادیم (۲۳).

در مطالعات ما برای تعیین نقطه برش، افزایش هموسیستئین در کمبود کوبالامین و فولات در حدود مارژینال (حدمرز) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس هموسیستئین $1/15 \mu\text{mol/l}$ ، در 78 نفر از سالمندانی که دارای کوبالامین $120-450 \text{ pg/ml}$ و فولات $13-1/5 \text{ ng/ml}$ بودند، نقطه برش برای کمبود کوبالامین 330 pg/ml یا (244 pmol/l) و برای کمبود فولات $6/5$ یا (11 nmol/l) در نظر گرفته شد. باتوجه به نقاط برش بدست آمده، درصد شیوع کمبود کوبالامین در سالمندان $73/6\%$ و درصد شیوع کمبود فولات $70/3\%$ بود. $51/8\%$ از سالمندان کمبود کوبالامین در سطوح مرزی (مارژینال) $122-330 \text{ pg/ml}$ و

۲۲/۷٪ کمبود کوبالامین در حد پایین 122 pg/ml داشتند. ۴۸/۷٪ از سالمندان هیپرهومیستئینی با میانگین $15/77 \pm 7/27$ داشتند و کمبود هر دو، کوبالامین و فولات با افزایش هموسیستئین ارتباط معنی‌دار داشت ($p < 0/001$). این ارتباط حتی در مورد کمبود در سطوح مرزی نیز وجود داشت ($p < 0/001$). منحنی پراکنش هموسیستئین با فولات و کوبالامین به خوبی این ارتباط را نشان می‌دهد (منحنی شماره ۱ و ۲).

از نقش کمبود کوبالامین و اسیدفولیک در ایجاد اختلالات عصبی ادراکی هوشی، نتایج گوناگون در دست است. ناگا و همکاران شاخص‌های گاستریت را به طور غیرمستقیم از طریق آنتی بادی ضد M-k-ATPase و هلیکوباکتر پیلوری و فاکتور داخلی (IF) به روش الایزا در ۴۷ بیمار مبتلا به آلزایمر، ۹ بیمار مبتلا به آلزایمر با ضایعات عروقی، ۵۴ بیمار دچار دمانس عروقی و ۸ بیمار دارای اختلالات روانشناختی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که هموسیستئین در اختلالات دمانس با هر اتیولوژی بالاست؛ ولی ارتباط معنی‌دار بین دمانس و اختلالات روانشناختی و کمبود کوبالامین و فولات و مارکرهای گاستریت نیافتند (۳). ناگا و همکاران گزارش نمودند که ۲۸٪ از بیماران دمانسی، هموسیستئین سرم بالا دارند در حالیکه بندرت دارای متیل مالونیک سرم بالا هستند (۱۳).

یافته‌های ما با نتایج این مطالعه مطابقت می‌کند. در ۷۸ سالمندی که هموسیستئین سرم آنها اندازه گرفته شد ۱۰ نفر (۱۲/۸٪) دمانس واضح داشتند که همه دارای هموسیستئین بالا یا برابر $6/83 \pm 22/1$ بودند.

کمبود کوبالامین و فولات یکی از مواردی است که موجب افزایش هموسیستئین می‌گردد. در مطالعه ما ارتباط آماری معنی‌داری بین افراد دارای دمانس و مقادیر کوبالامین و فولات وجود نداشت. لذا افزایش هموسیستئین در دمانس ممکن است به هر دلیل دیگری نیز باشد. چنانکه قبلاً ذکر شد افزایش هموسیستئین یک فاکتور خطر مستقل برای بیماری‌های مغزی عروقی است؛ لذا اگر بتوان ارتباط روشن تری بین افزایش هموسیستئین و دمانس بدست آورد آن وقت پیشگیری اولیه از آن با عوامل کاهش دهنده هموسیستئین را می‌توان مطرح نمود که از دیدگاه بهداشت عمومی حائز اهمیت است.

روبرت که عملکرد ذهنی را با آزمون Folstein's minimental بررسی نموده است گزارش می‌کند که ۴۵٪ سالمندان دارای اختلالات ذهنی هستند و در این افراد سطح $V.B12$ بسیار پایین بوده است (۲۴). این بررسی با آزمون دیگری به نام MMSE نیز

صورت گرفته است. MMSE آزمونی است که با اختلالات ذهنی خفیف، زمانی که معیارهای دمانس کامل نگشته است، مثبت می‌شود (نمره بیش از ۲۳-۲۰ طبیعی است). در مطالعه حاضر بین سه متغیر هموسیستئین و فولات و کوبالامین در دو گروه MMSE مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و این یافته تا حدی با مطالعات ناگا و همکاران مطابقت داشت. در مطالعه او ارتباط ضعیفی بین MMSE و فولات وجود داشت. وی با مطالعه‌ای دیگر بر روی بیماران با کراتینین بالا و هموسیستئین بالا نتیجه گرفت که زمانی که هموسیستئین بالا به دلیل کراتینین بالا و نارسایی کلیوی باشد نیز هموسیستئین با MMSE ارتباط معنی‌دار نخواهد داشت (۱۳).

کادو و همکاران در جمعیت نسبت بالایی از سالمندان ۷۹-۷۴ ساله ($n = 880$) در ۱۰ کشور اروپایی، ارتباط ضعیف ولی معنی‌دار بین نمرات آزمون MMSE و کمبود کوبالامین می‌یابند (۸). آن‌ها همچنین نتیجه گرفتند در سالمندانی که فولات سرم کاهش و هموسیستئین سرم افزایش دارد، اختلالات ادراکی بیشتر است (۸).

در این مطالعه جهت بررسی ارتباط علائم روانی سالمندان با مقادیر کوبالامین و فولات و هموسیستئین سرم، آزمون افسردگی، بی‌خوابی و گریه بی دلیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میانگین‌های سه متغیر هموسیستئین و کوبالامین و فولات در دو گروه با آزمون افسردگی مثبت (با نمره بیش از ۵) و منفی (با نمره کمتر از ۵) تفاوت معنی‌داری ندارند و با علائم بی‌خوابی و گریه نیز نتایج به همین گونه بود و لذا به نظر می‌رسد که افسردگی شدید و اختلالات روانی پیشرفته با کمبود اسیدفولیک و کوبالامین همراه هستند.

ما ارتباط شاخص‌های عصبی سالمندان با سه متغیر کوبالامین و اسیدفولیک و هموسیستئین سرم را توسط آزمون‌هایی همچون رفلکس تاندونی عمقی، رفلکس پوستی کف پائی، رومبرگ، حس ارتعاش و حس درد مورد، بررسی قرار دادیم. در همه موارد به جز رفلکس تاندونی عمقی ($F = 3/26$, $df = 2$, $p = 0/045$) ارتباط معنی‌دار وجود نداشت.

بژورکگرن و همکاران (۲۰۰۴) نیز به همین نتایج دست یافته‌اند و اظهار داشته‌اند که از آنجا که در تعدادی از منابع، اختلالات ادراکی اولین علامت کمبود کوبالامین و فولات قلمداد شده است، برای بررسی آن‌ها اولاً نیاز به ابزارهای تشخیصی کامل تری است، ثانیاً نتایج مطالعات در جمعیت‌های مختلف متفاوت بوده و بستگی به تعداد افراد مورد مطالعه و انتخاب صحیح نمونه مورد مطالعه

دارد (۱).

هموسیستئین $15 \mu\text{g/ml}$ > با کمبود کوبالامین و فولات در همه سطوح (پایین و در حدود مرز)، کمبود کوبالامین و فولات و حتی افزایش هموسیستئین سرم، ارتباط معنی‌داری با شاخص‌های اختلالات عصبی روانی و ادراکی مورد اندازه‌گیری ندارد. البته در کارآیی و دقت و صحت آزمایش‌ها و روش‌های ارزیابی اختلالات عصبی ادراکی و روانی چه به لحاظ کیفیت و یا کمیت، می‌بایستی مورد تجدید نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد کمبود کوبالامین و فولات و حتی افزایش هموسیستئین سرم در سالمندان، ارتباط معنی‌داری با شاخص‌های اختلالات عصبی روانی و ادراکی مورد اندازه‌گیری ندارد.

از آنجا که اختلالات عصبی ادراکی و روانی، مشکل شایع سالمندان است و نتایج مطالعات، شیوع قابل ملاحظه‌ای از هیپرهموسیستئینمی در سالمندان را گزارش می‌کنند، به نظر می‌رسد که باید در روش‌های سنجش و ارزیابی تجدید نظر نمود و یا از روش‌ها و فناوری پیشرفته‌تری استفاده نمود. چنانچه ارتباط آماری معنی‌داری بین شاخص‌های آزمایشگاهی و بالینی کمبود به دست آید، دست‌اندرکاران بهداشت و سلامت سالمندان می‌توانند با غربالگری دوره‌ای آنان از نظر هموسیستئین و یا کوبالامین و اسید فولیک از بروز اختلالات عصبی ادراکی و روانی در آنان پیشگیری و از ناتوانی‌های دوران سالمندی بکاهند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت نهایت گونه همکاری در انجام پژوهش فوق و همچنین از سرکار خانم دکتر میرشجائیان دستیار روانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که در انجام آزمون‌ها و معاینات بالینی ما را یاری نمودند تشکر می‌گردد.

کریستوفر و همکاران در مقاله مروری خود در سال ۱۹۹۹ به محدودیت‌های همه روش‌های مورد استفاده برای سنجش کمبود کوبالامین و اسید فولیک اشاره می‌کنند و حساسیت و ویژگی آن‌ها حتی اندازه‌گیری متابولیت‌های سرم را کافی نمی‌دانند (۲۵). تیسما و همکاران به کاهش کاذب فولات گلبول قرمز در ۶۰٪ از بیماران مبتلا به آنمی پرنیسیوز اشاره می‌کنند که احتمالاً بدلیل کاهش کوبالامین اتفاق می‌افتد؛ زیرا کوبالامین در حمل طبیعی تتراهیدروفولیت از پلاسما به داخل گلبول قرمز لازم است (۲۶).

ارتباط بین شاخص‌های آزمایشگاهی و بالینی کمبود اسید فولیک و کوبالامین در مقالات گوناگون با هم مغایرت دارند و منطقی است که فرض کنیم که این مغایرت‌ها از طرفی به دلیل مرحله بیماری و درجه تظاهر علائم و از طرفی دیگر مربوط به تعداد نمونه و انتخاب نمونه است که از نظر آماری نمایانگر کل جمعیت مورد مطالعه است و از طرفی مربوط به تنوع آزمون‌ها و تکنیک‌های اندازه‌گیری شاخص‌های آزمایشگاهی است چرا تا کنون به طور استاندارد حداقل مقدار طبیعی مشخص نگردیده است. از سویی به نظر می‌رسد که هنوز آن حدی از کمبود کوبالامین و فولات که عملکرد سیستم عصبی را مختل می‌سازد شناسایی نشده است.

این مطالعه نشان داد که تمام بیماران دچار دمانس دارای هموسیستئین بالا هستند و نیز کاهش کوبالامین با اختلال در رفلکس‌های تاندونی عمقی ارتباط معنی‌دار دارد؛ ولی ارتباط آماری معنی‌داری بین کاهش کوبالامین و اسید فولیک و افزایش هموسیستئین سرم با شاخص‌های عصبی، ادراکی و روانی یافت نشد. سایر مطالعات نتایج ضد و نقیضی را نشان می‌دهند.

در این مطالعه ارتباط افزایش هموسیستئین $15 \mu\text{g/ml}$ > با کمبود کوبالامین و فولات مورد بررسی قرار دادیم و از آن جا که مطالعات زیادی بروز ضایعات مغزی عروقی ناشی از افزایش هموسیستئین را قطعی می‌دانند، در واقع خواستیم بطور غیر مستقیم ارتباط کمبود ویتامین با این اختلالات را بسنجیم و به این نتیجه رسیدیم که علیرغم ارتباط معنی‌دار افزایش

منابع

1. Bjorkegren K, Svardsudd K. population based intervention study on elevated serum levels of methylmalonic acid and total homocysteine in elderly people. *Journal of international medicine* 2004; 256: 446-52.
2. Sally P. Stabler and Robert H. Allen. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annual Review of Nutrition*. 2004; 24: 299-326.
3. Fakhrizadeh H, Ghotbi Sara. Total plasma homocystein, folate, and status in healthy Iranian adults. *BMC PUBLIC Health*. 2006; 6: 29.
4. Christopher F. Snow. Laboratory diagnosis of vitamin b12 and folate deficiency. *A RCH Intern Med*. 1999; 159:1289-1298.
5. Heaton EB, Savage DE, Brust JCM. neurological aspects of cobalamin deficiency. 1991; 70: 229-45.

6. Lee GR. Megaloblastic and nonmegaloblastic macrocytic anemias .In: Clinical Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger;1993, 745-90.
7. Meertens L, Solanol B. Vitamin B12, folic acid and mental function in the elderly. Invest clin 2005; 46: 53-63.
8. Clarke R, Grimley EJ, Schneede J. vitamin b12 and folate deficiency in later life. Age Aging .2004; 33: 34-41.
9. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH. Homocystein versus the vitamins folate, B6, and B12 as a predictor of cognitive Function. Am j Med 2005; 118: 161-7.
10. Shahar A, Feiglin L, Shahar DR, Levy S. High prevalence and impact of subnormal serum vitamin B12 levels in Israeli elders admitted to a geriatric hospital: J Nutr Health Aging. 2001; 5: 124-7.
11. Meertens L, Solanol B. Vitamin B12, folic acid and mental function in the elderly. Invest clin 2005; 46: 53-63.
12. Papakostas G.et al. serum folate, vitamin B12, and Hcy in major depressive disorder. j din psychiatry 2004; 65: 1090-5.
13. Nagga K, Rajani R, Mardh E. cobalamin, folate, MMA, Hcy and Gastritis markers in Dementia. Dement Geriatr Cogn Disord 2003; 16: 269.
14. Noorbala AA. Mental health survey of adult population in iran,the british journal of psychiatry; 2004,184: 70-3.
15. Mohammadi MR, Davidian H, Noorbala AA. An epidemiological survey of psychiatric disorders in Iran, clinical practice and epidemiology in mental health; 2005, 1: 16.
16. Mokhber N, Majdi MR, Salek M, prevalence of depression in an elderly population in iran, April 2008; 23: S296 European Psychiatry.
17. Selhub J, Jacques P, Wilson PW. Vitamin status and intake determinants of homocystein in an elderly population. JAMA 1993; 270: 2693-8.
18. Figlin B, Chetrist A, Shonor A. High prevalence of vitamin B12 & folate deficiency in elderly Israelis British. Journal of Hematology 2003; 123: 496-70.
19. Yao YL, Yao SL, Yao SS. Prevalence of vitamin B12 deficiency among Geriatric out patients Journal of family practice 1992; 35: 524-28.
20. Rajan S, Wallace JA, Shirley A. Screening for cobalamin deficiency in geriatric outpatients Journal of the American Geriatric society 2002; 50: 624-30.
21. Maikew, Hermann S, Andreas H. B vitamin status concentration of Hey & MMA in elderly German women. Am j clin Nutr 2003; 78: 765-72.
22. Brattstrom LE, Hultberg BL, Hardebo JE. Folic acid responsive postmenopausal homocysteinemia. Metabolism. 1985; 34:1073-77.
23. Hvas AM, Ellegaard J, Nexø E. Increased plasma methylmalonic acid level doesn't predict clinical manifestation of vitamins B12 deficiency. Arch Internal Med 2001; 161: 1534-41.
24. OH Robert, Brown DL. Vitamin B12 Deficiency. U. S. Army Health Clinic, Darmstadt, Germany 2003 March1; 67: 993-4.
25. Christopher F. Snow. Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency Arch Intern Med. 1999; 159: 1289-98.
26. Tisman G, Herbert V. B12 dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B12 deficiency. Blood .1973; 41: 465-69.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.