

همگلوبین A₁C در بیماری دیابت شیرین

دکتر احمدشهباز فر

مقدمه

هموگلوبین گلیکولیزه (HbA₁) شکل تغییر فرم یافته ای از هموگلوبین بزرگسالان (HbA) است. از ترکیبات هموگلوبینهای طبیعی A₁ و A₂، طی عمرگوییچه های قرمز به کمک واکنش های غیر آنزیمی اجزاء ریزی بنام هموگلوبین های گلیکولیزه HbA_{1a}، HbA_{1b}، HbA_{1c} پدید می آید. میزان گلیکولیزه شدن بستگی به مقدار قند خون و طول عمر گویچه ای دارد (۲ +).

گلیکولیزه شدن هموگلوبین در زمان کوتاهی که قند خون افزایش میابد فقط بصورت یک ترکیب موقتی و قابل برگشت مشاهده میشود، تشکیل یک ترکیب غیر محلول و غیر قابل برگشت بعد از طی زمان بیشتری صورت میگیرد (۲×) بطوریکه میزان HbA₁ معیاری برای پی بردن به افزایش متوسط قند خون طی هفته های گذشته است.

در افراد مبتلا به بیماری قند متناسب با اختلال متابولیسمی (۸)، میزان HbA₁ به دوتا سه برابر مقدار طبیعی (که در حدود هفت درصد هموگلوبین است) میرسد (۶).

در عمل تعیین هموگلوبین گلیکولیزه امکان جدیدی برای نظارت طولانی مبتلایان به بیماری قند (۵) و زمینه بررسی دقیقتری برای اظهار نظر در مورد رابطه بین نحوه اختلال متابولیسمی و پیشرفتهای بعدی ناشی از این اختلال را میدهد (۲*).

روش کار

مقدار Hb-A₁ در ۲۲ بیمار مبتلا به بیماری قند و ۱۷ تن غیر دیابتی تعیین می شود. روش آزمایش بر مبنای کروماتوگرافی ستونی است**.

۶۰۰ میکرولیتر همولیزات از ۱۰۰ میکرولیتر خون کامل و ۵۰۰ میکرولیتر معرف همولیز، کننده تهیه میشود. بعد از مخلوط کردن دقیق لوله محتوی محلول در حرارت آزمایشگاه قرار میگیرد. با توجه به تعداد آزمایشها ستونهای یکبار مصرفی که کاملاً به صورت سوسپانسیون درآمده عموداً در جالوله ای قرار داده میشود و ۱۰۰ میکرولیتر همولیزات به آرامی در ستونهای پلاستیکی بر سطح بالای ذرات ریخته و به مدت ۵ دقیقه جهت نفوذ تا مل میشود. بعد از آن ۱۰ میلی لیتر محلول ظاهر کننده با احتیاط ابتدا قطره قطره بدان اضافه و مدت ۴۵ دقیقه جهت عبور الوآت به لوله یک بار مصرف سانتریفوژ در جای معین قرار میگیرد.

لوله های سانتریفوژ محتوی الوآت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و برای اندازه گیری مورد استفاده قرار میگیرد. همزمان مقدار ۲۰ میکرولیتر همولیزات را با ۱۰ میلی لیتر محلول ظاهر کننده خوب مخلوط کرده که از آن برای تعیین دانسیته هموگلوبین تام استفاده میشود. از دانسیته الوآت و محلول هموگلوبین تام که

* - دانشکده پزشکی دانشگاه تهران.

* - دانشکده پزشکی دانشگاه تهران.

نوشته و ترجمه از متن آلمانی

2. S.Panzer, G. Uroniv-1 W.Graninger

2. F.D. Goebel, H.Doerfer, Ch.Kolmer, P.Born

2. O.H. Wieland

* Arbeitsvorschrift des Institut fuer Labormedizin

Akademische Kliniken Darmstadt

Bio-Rad Laboratories, Munchen Deutschland

بررسی بعدی که اثرپذیری گویچه های قرمز در رابطه با HbA_{1c} و تعیین دقت آزمایشی انجام می‌گیرد. جهت مطالعه اثر پذیری گویچه های قرمز، خون محیطی کامل با غلظت های مختلف همگلوبین تهیه می‌شود: (هموگلوبین ۶/۹ گرم درصد برای حرارت آزمایشگاه A و یخچال B، هموگلوبین ۱۵/۱ گرم درصد برای حرارت آزمایشگاه C و برای یخچال D). جهت جلوگیری از تغییرات ناشی از آلودگی، خون کامل تهیه شده در لوله های متعددی تقسیم که قسمتی در حرارت اطاق (A و C) و قسمت دیگر در یخچال (B و D) جداگانه نگهداری که در روزهای پی در پی آزمایش می‌شود.

برای بررسی دقت آزمایشی سه نمونه خون کامل با غلظت های متفاوت (G, F, E) تهیه و به کرات آزمایش و پس از آن انحراف استاندارد (SD) و ضریب اختلاف (VQ) محاسبه می‌شود.

بوسیله فتومتر با طول موج ۴۰۵ اندازه گیری میشود میتوان مقدار درصد HbA_{1c} را محاسبه نمود.

اصول آزمایش بر مبنای همولیز گویچه های قرمز بوسیله معرف همولیز کننده و جدا نمودن هموگلوبین ها با مهاجرت سریع از بقیه بوسیله مواد تعویض کننده کاتیون هادر محیط اسیدی ضعیف است.

حرارت آزمایشگاه در طی انجام این آزمایش بین ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتیگراد می‌باشد ($Hb-A_{1c}$ در بیماران مبتلا به قند و در بیماران غیر دیابتی همچنین مقادیر قند خون بیماران دیابتی طی درمان بیمارستانی کرارا " به روش هگزوکیناز تعیین و متوسط آن در تمام بیماران در نظر گرفته میشود.

بیماران دیابتی بر مبنای حد متوسط قند خون به ۳ سه زیرگروه تقسیم میشوند: تا ۲۰۰ میلی گرم درصد - از ۲۰۱ تا ۲۵۰ میلیگرم درصد - بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم درصد.

نتایج

تعیین HbA_{1c} تفاوت واضحی را بین بیماران قندی و غیر دیابتی نشان میدهد (جدول ۱ و ۲) این تفاوت در تمام بیماران مبتلا به دیابت شیرین مشاهده میشود.

تعداد	درصد HbA_{1c}	قند متوسط	تعداد	HbA_{1c} درصد	قند متوسط
۱	۱۳/۴	۲۷۰	۱۲	۱۰/۴	۲۰۰
۲	۱۱/۳	۱۸۲	۱۳	۱۱/۰	۲۱۷
۳	۱۱/۶	۲۲۲	۱۴	۱۵/۲	۲۱۹
۴	۱۱/۴	۱۹۳	۱۵	۱۲/۷	۲۲۵
۵	۱۳/۷	۲۶۵	۱۶	۱۳/۸	۲۸۳
۶	۱۱/۲	۲۵۲	۱۷	۱۱/۱	۲۵۹
۷	۸/۲	۱۶۳	۱۸	۱۲/۵	۲۳۸
۸	۱۱/۷	۱۳۷	۱۹	۱۲/۷	۲۲۸
۹	۱۳/۱	۲۷۰	۲۰	۹/۴	۱۷۷
۱۰	۱۲/۸	۲۵۵	۲۱	۱۳/۹	۲۱۸
۱۱	۱۲/۴	۲۰۵	۲۲	۱۶/۶	۲۶۰

جدول ۱ = مقدار HbA_{1c} نزد بیماران دیابتی،

قند به میلی‌گرم درصد HbA_{1c} درصد - Hb متوسط = $14/4$ گرم درصد - متوسط HbA_{1c} ۱۲/۳% متوسط قند خون متوسط ۲۲۵ میلی‌گرم درصد متوسط

قند خون متوسط به میزان ۲۲۱ میلی گرم درصد - متوسط HbA_{1c} ۱۲/۷ درصد و در زیر گروه D_3 با یک متوسط قند متوسطی به میزان ۲۶۴ میلی گرم درصد متوسط HbA_{1c} ۱۳/۲ درصد است.

تقسیم بندی گروه بیماران مبتلا به دیابت شیرین به سه زیر گروه (D_1, D_2, D_3) افزایش HbA_{1c} را متناسب با افزایش متوسط قند خون نشان میدهد (جدول ۲، شمای ۲). در زیر گروه D_1 با متوسط قند خون متوسط ۱۶۲ میلی گرم درصد متوسط HbA_{1c} ۱۰/۴ درصد، در زیر گروه D_2 با متوسط

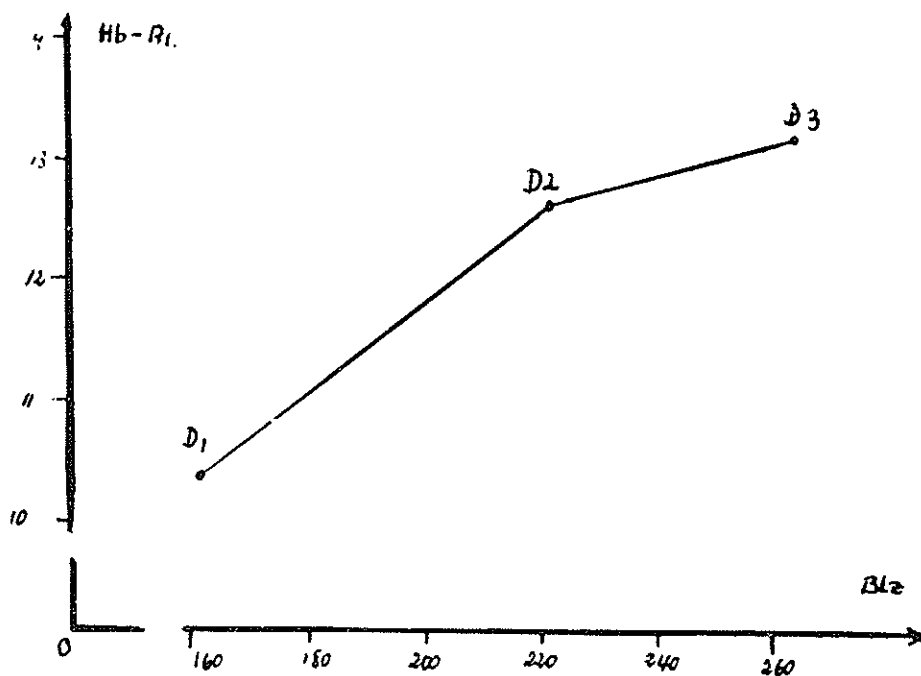
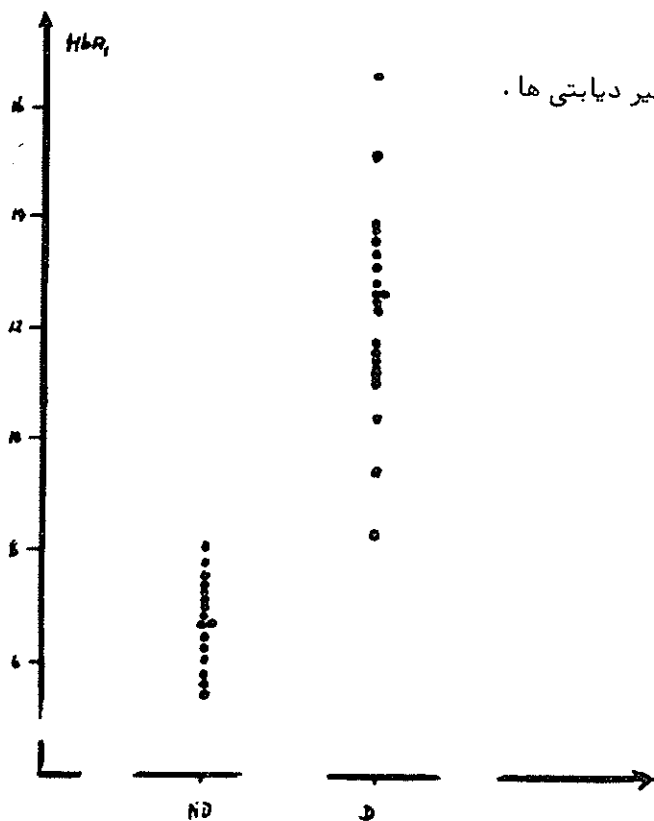
D_3			D_2			D_1			گروه
متوسط قند خون	درصد HbA_{1c}	تعداد	متوسط قند خون	درصد HbA_{1c}	تعداد	متوسط قند خون	درصد HbA_{1c}	تعداد	
۲۷۰	۱۳/۴	۱	۲۲۲	۱۱/۶	۱	۱۸۲	۱۱/۳	۱	
۲۶۵	۱۳/۷	۲	۲۰۵	۱۲/۴	۲	۱۹۳	۱۱/۴	۲	
۲۵۲	۱۱/۲	۳	۲۱۷	۱۱/۰	۳	۱۶۳	۸/۲	۳	
۲۷۰	۱۳/۱	۴	۲۱۹	۱۵/۲	۴	۱۳۷	۱۱/۷	۴	
۲۵۵	۱۲/۸	۵	۲۲۵	۱۲/۷	۵	۲۰۰	۱۰/۴	۵	
۲۸۳	۱۳/۸	۶	۲۳۸	۱۲/۵	۶	۱۷۷	۹/۴	۶	
۲۵۹	۱۱/۱	۷	۲۲۸	۱۲/۷	۷				
۲۶۰	۱۶/۶	۸	۲۱۸	۱۳/۹	۸				

جدول ۲ = گروههای دیابتی D_1 = قند خون تا ۲۰۰-۲۰۱ D_2 قند خون بین ۲۰۱-۲۵۰ میلی گرم درصد - D_3 = قند خون بالای ۲۵۱ میلی گرم درصد

افزایش HbA_{1c} در بیماران مبتلا به دیابت شیرین (بطور متوسط ۱۲/۳ درصد) به دو برابر مقدار آن نزد بیماران غیر دیابتی (بطور متوسط ۶/۷ درصد) میرسد (شمای ۱).

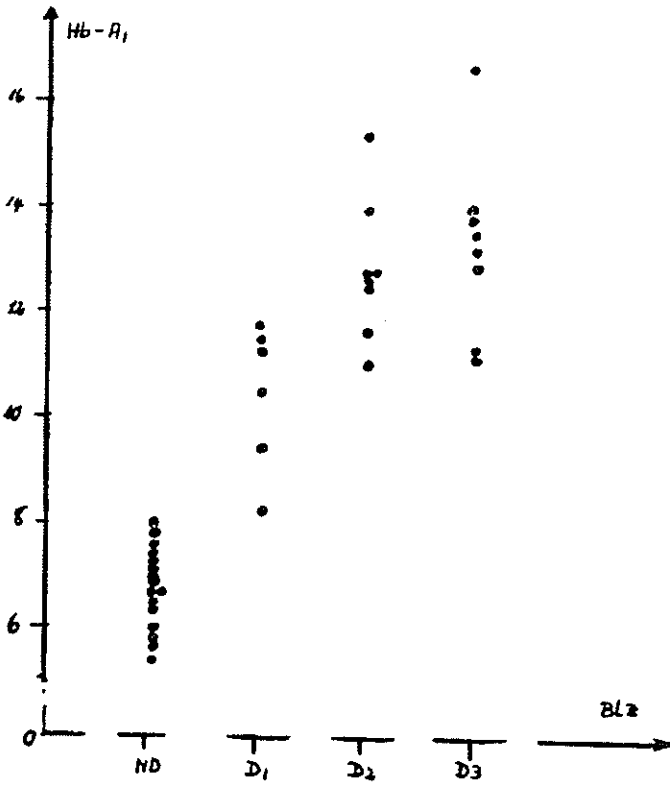
شماره ۱:

= نمایش نتیجه HbA_{1c} در بیماران مبتلا به دیابت شیرین و غیر دیابتی ها .
 (D=دیابتیها - ND= غیر دیابتی ها)
 (افقی = گروههای جداگانه ، عمودی = درصد HbA_{1c})

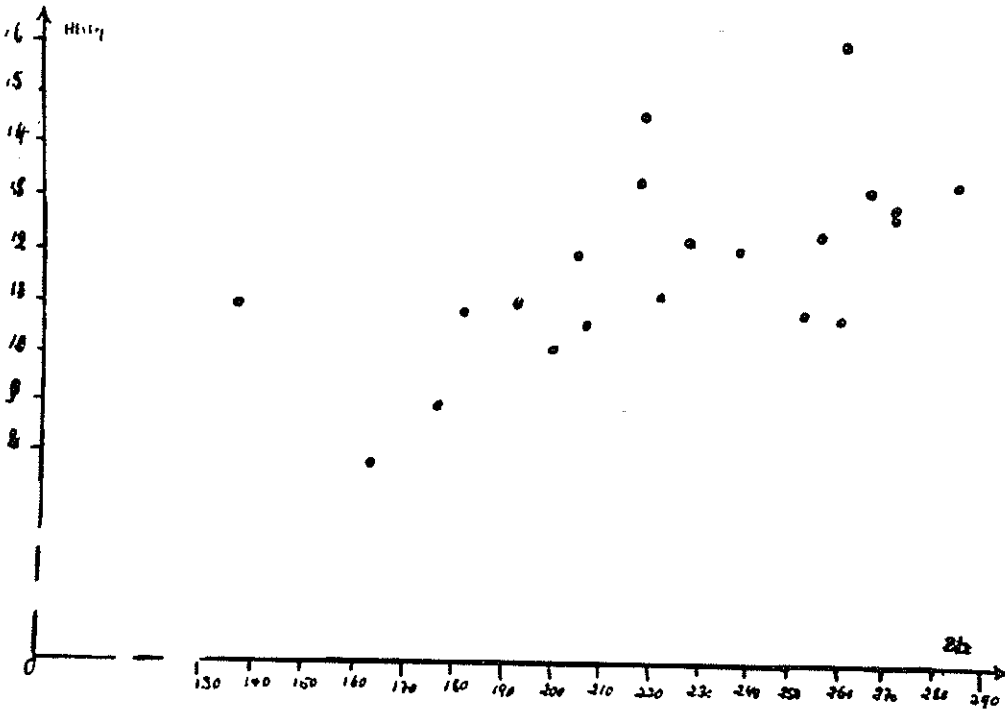


شماره ۲ = متوسط HbA_{1c} درصد در هر یک از گروههای بیماران مبتلا به دیابت شیرین :

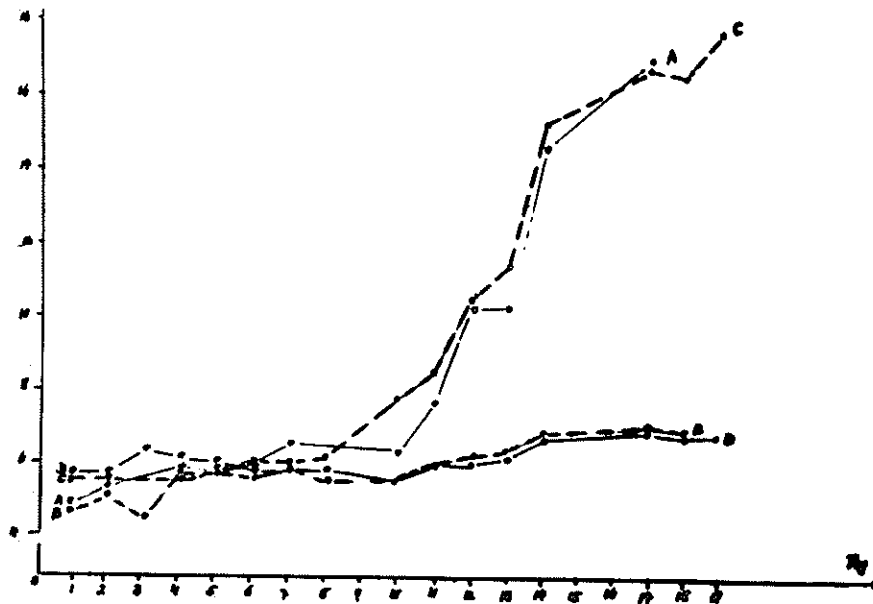
(افقی = متوسط قند خون متوسط هر زیر گروه - عمودی = متوسط HbA_{1c} درصد در زیر گروه های دیابت شیرین)



شماره ۳ = مطابقت تمام مقادیر HbA₁ در زیر گروه‌های دیابتی با گروه غیر دیابتی.



شماره ۴ = مقادیر HbA₁ نزد تمام بیماران دیابتی در رابطه با مقادیر متوسط قند خون آنان.



شمای ۵ = تاثیر پیری خون کامل با نگهداری نمونه خون در حرارت های متفاوت .

درصد	تعداد	درصد	تعداد
۷/۴	۹	۵/۵	۱
۷/۶	۱۰	۶/۷	۲
۶/۵	۱۱	۵/۸	۳
۷/۱	۱۲	۶/۹	۴
۸/۰	۱۳	۷/۸	۵
۶/۰	۱۴	۷/۲	۶
۶/۳	۱۵	۶/۷	۷
۵/۸	۱۶	۷/۵	۸

جدول ۳ = مقادیر Hb - A₁ در بیماران غیردیابتی با متوسط همگلوبین ۱۱/۴ گرم درصد و متوسط A₁ Hb ۶/۷ درصد .
 نتایج Hb - A₁ در زیر گروههای دیابتی افزایش بیشتری را در مقابل گروه غیردیابتی نشان می دهد (شمای ۳) . بعلاوه
 Hb - A₁ نزد بیماران دیابتی متناسب با میزان متوسط قند خون است (شمای ۴) .

در یخچال نگهداری شده است این تفاوت جزئی و از روز دهم آزمایش دیده میشود. افزایش واضح و تفاوت دو قسمت A و C بخصوص از روز نهم آزمایش مشاهده و در آخرین روزهای آزمایش به سه برابر مقدار اولیه میرسد.

بررسی اثر پیری در خون کامل محتوی ماده EDTA نشان میدهد که در دو قسمت C و A که در حرارت آزمایشگاه نگهداری شده است به مرور از روز هفتم تفاوت واضحی را نشان میدهد (جدول ۴ و شمای ۵). در دو قسمت D و B که

روز آزمایش	نمونه A HbA ₁ درصد	نمونه B HbA ₁ درصد	نمونه C HbA ₁ درصد	نمونه D HbA ₁ درصد
۱	۴/۷	۴/۹	۵/۶	۵/۷
۲	۵/۱	۵/۴	۵/۶	۵/۸
۳	۴/۵	۴/۶	۵/۶	۶/۴
۴	۵/۸	۵/۹	۵/۹	۶/۲
۵	۵/۸	۵/۸	۶/۱	۶/۱
۶	۶/۰	۵/۷	۶/۱	۵/۹
۷	۶/۶	۵/۹	۶/۲	۵/۹
۱۰	۶/۴	۵/۶	۷/۹	۵/۶
۱۱	۷/۸	۶/۱	۸/۷	۶/۱
۱۲	۱۰/۵	۶/۳	۱۰/۷	۶/۱
۱۳	۱۰/۵	۶/۵	۱۱/۷	۶/۳
۱۴	۱۵/۰	۷/۰	۱۵/۷	۶/۹
۱۷	۱۷/۵	۷/۲	۱۷/۳	۷/۱
۱۸	-	۷/۱	۱۷/۱	۷/۰
۱۹	-	-	۱۸/۳	۷/۰

جدول ۴ = تاثیر پیری خون: نتیجه اندازه گیری های تک تک در روزهای پی در پی.

A = هموگلوبین ۶/۹ گرم درصد در حرارت آزمایشگاه.

B = هموگلوبین ۶/۹ گرم درصد در حرارت یخچال.

C = هموگلوبین ۱۵/۱ گرم درصد در حرارت آزمایشگاه.

D = هموگلوبین ۱۵/۱ گرم درصد در حرارت یخچال.

F با HbA_1 متوسط ۹/۱۹ انحراف استاندارد ۵/۵۴۲ و در نمونه G با HbA_1 متوسط برابر با ۶/۵۱ انحراف استاندارد ۵/۲۴۲ مشاهده میشود (جدول ۶).

دقت آزمایشی با مقادیر مختلف HbA_1 نیز تا حدودی یکسان میباشد و انحراف استاندارد متوسطی معادل ۵/۳۶۴ دارد (جدول ۵)، بطوریکه نمونه E با یک HbA_1 متوسط ۶/۹۷ درصد انحراف استاندارد ۵/۳۵۸، در نمونه

دفعات اندازه گیری	نمونه E	نمونه F	نمونه G
۱	۷/۲۳	۹/۹۲	۶/۳۳
۲	۷/۲۰	۹/۳۹	۵/۸۴
۳	۶/۸۹	۹/۶۷	۵/۷۵
۴	۶/۷۰	۹/۸۳	۵/۶۲
۵	۷/۰۸	۸/۵۹	۵/۹۸
۶	۶/۳۶	۹/۲۶	۵/۸۹
۷	۷/۰۹	۸/۸۱	۶/۳۴
۸	۷/۲۳	۸/۸۲	۶/۰۴
۹	۶/۵۹	۹/۳۷	۶/۱۲
۱۰	—	۸/۳۲	۶/۱۸

جدول ۵ = نتایج اندازه گیری $Hb-A_1$ در نمونه های E و F و G.

نمونه	متوسط HbA_1 درصد	انحراف استاندارد	ضریب انحراف	گرم درصد هموگلوبین	HbA_1 درصد
E	۶/۹۷۲	۵/۳۵۸	۴/۴۲	۱۰/۰	۶/۹
F	۹/۱۹۸	۵/۵۴۲	۵/۸۹	۱۱/۶	۹/۱
G	۶/۰۱۳	۵/۲۴۲	۴/۰۲	۱۵/۹	۶/۱

جدول ۶ = تعیین مقدار متوسط، انحراف استاندارد و ضریب انحراف در نمونه های مختلف با هموگلوبین و یا HbA_1 درصد متفاوت.

خلاصه

در ۲۲ مورد بیماران مبتلا به دیابت شیرین و ۱۷ غیر دیابتی مقدار HbA_{1c} تعیین گردید. روش آزمایش بر مبنای کروماتوگرافی ستونی و در خون کامل محتوی EDTA با نتایج زیر بوده است:

مقدار HbA_{1c} در تمام بیماران مبتلا به دیابت شیرین افزایش داشته و این افزایش در زیر گروههای مختلف بیماران دیابتی متناسب با مقدار متوسط قند خون و بطور متوسط دو برابر مقدار HbA_{1c} در افراد غیر دیابتی بوده است.

آزمایش بعدی که بررسی تأثیر پیر شدن گوچه ها در خون کامل محتوی EDTA بود نمونه هائی با غلظت های متفاوت هموگلوبین تهیه و در حرارت اتاق آزمایشگاه و حرارت یخچال نگهداری و در روزهای پی در پی تعیین مقدار گردید و نشان داد که بعد از ۷ تا ۹ روز تغییراتی بوجود میآید که نتیجه آن افزایش تدریجی HbA_{1c} در نمونه هائی است که در حرارت آزمایشگاه نگهداری شده است بطوریکه در روز ۱۹ آزمایش مقدار HbA_{1c} در این نمونه به ۳ برابر مقدار آن در نمونه های نگهداری شده در یخچال میرسد.

دقت آزمایشی در غلظت های مختلف HbA_{1c} انحراف معیاری برابر با ۳۶۴/۰ داشته است.

بحث

آزمایشهای انجام شده افزایش HbA_{1c} را نزد بیماران مبتلا به دیابت شیرین مورد تأکید قرار میدهد (جدول-های ۲ و ۱، شمای ۲ و ۱). این افزایش با قند خون بیماران در رابطه است (شمای ۲ و ۳).

میزان قند خون و مدت بالا بودن آن فاکتور مهمی در تشکیل HbA_{1c} و یا به عبارت دیگر HbA_{1c} است (۲+).

افزایش HbA_{1c} متناسب با میزان متوسط قند خون در گروههای دیابتی مشاهده شده است (جدول ۲ و شمای ۳ و ۲) و بطور متوسط به ۲ برابر مقدار آن در افراد غیر دیابتی رسیده (جدول ۳ و شمای ۳ و ۱) و میتواند متناسب با همپیرگیسی تا ۳ برابر افزایش یابد (۸).

در باره تناسب بین میزان HbA_{1c} و قند پلاسما نزد بیماران دیابتی سرپائی در نمونه ناشتا در ۵۵ مورد نیز گزارش شده است (۷).

تعیین HbA_{1c} برای تنظیم قند خون نزد بیماران دیابتی اهمیت دارد (۳ و ۴ و ۵) ولی نه به عنوان یک تست بیماریابی برای تشخیص بیماری دیابت (۴).

آزمایش HbA_{1c} جهت تشخیص در بیماری دیابت شیرین به مفهوم یک نمودار متابولیسمی واقعی قابل گسترش است (۲×).

روش کروماتوگرافی ستونی که از سالها جهت جدا نمودن ترکیبات مشابه مورد استفاده است (۹) از یک دقت آزمایشی در حدود دستورالعمل با حرارت ثابت آزمایشگاه برخوردار است (۲) (جدول ۵ و ۶).

بررسی تأثیر پیر شدن نشان میدهد که آزمایش HbA_{1c} در خون کامل محتوی ماده EDTA در روز نمونه برداری و یا بصورت نمونه های جمعی با رعایت تکنیک های نگهداری مناسب انجام پذیر است.

Zusammenfassung

Es wurden Hb-A_{1c} bei 22 Patienten mit diabetischen Stoffwechsellage und 17 Nichtdiabetiker bestimmt. Die Bestimmungsmethode richtete sich nach Säulenchromatographie und im EDTA-Vollblut mit folgenden Ergebnissen:

Die Hb-A_{1c} war bei den Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage, gegenüber Nichtdiabetiker unterschiedlich erhöht festzustellen. Die Erhöhung in verschiedenen diabetischen Gruppen war etwa von den mittleren Blutzuckermittelwert abhängig und erreichte im Durchschnitt das doppelte Wert.

+ 2i W. Besges und G.E. Sonnenberg

+ 2i H. R. Heinrich, E. Setiakusuma, R. Sonnen, CH. Lemke

Eine weitere Untersuchung bestand in der Pruefung des Alterungseffektes im EDTA-Vollblut, wobei die Blutproben verschiedener Hb-Konzentrationen bei Zimmer-Temperatur und im Kuehlschrank aufbewahrt und an folgenden Tagen untersucht worden sind. Die Bestimmung des Hb-A₁ bei diesen Proben zeigte, dass nach 7-9. Untersuchungstag Veraenderungen auftreten und eine zunehmende Erhoehung bei den Proben, die im Zimmertemperatur aufbewahrt sind gegenueber der Proben im Kuehlschrank festzustellen ist, sodass am 19. Untersuchungstag das dreifache Wert erreicht wird. Die Intraassaygenauigkeit der Untersuchung lag bei verschiedenen Hb-A₁-Konzentrationen im Durchschnitt bei 0,364 Standard-Abweichung.

SUMMARY

Blood specimens from 22 insulin dependent diabetic patient and 17 nondiabetic subject were collected in EDTA-tubes. Quantitation of Hb-A₁ was performed by Column chromatography. The glycosylated hemoglobin component is increased in diabetic patient and found a significant correlation between Hb-A₁ concentration and blood glucose levels in all diabetic patients. The mean Hb-A₁ value for diabetic patients is twice as the mean value for nondiabetics.

The second part of experiment consist of aging blood-EDTA in ambient temperature and a 4°C cold room. A sample of each blood was analysed the following days for estimation of Hb-A₁ after 7 to 9 days and noticed a difference between the Hb-A₁ values in two specimens and increase of Hb-A₁ in both samples but after aging furthermore about 19 days, the concentration of Hb-A₁ in blood kept in ambient temperature was three times more than in blood kept in cold room.

Literaturangabe

1. W. David Hankins, Leslie Holladay; A. Temperature conversion nomogram for glycosylated hemoglobin analysis; Clinica Chimica acta 104(1980) 251-257.
2. Kuerzfassung der Vortraege; Tagung ueber Haemoglobin-A_{1c} Bestimmung, Muenchen 25/26 April 1980.

3. A. Roesler-Engelhardt; Haemoglobin Alc: Ein Indikator fuer Stoffwechselkontrolle bei Diabetikern; *Laboratoriumsmedizin* 4:85 (1980).
4. Richard F. Dods and Carlos Dolmey; Glycosylated hemoglobin Assay and oral Glucose Tolerance Test Compared for Detection of Diabetes melitus: *Clin. Chem.* 25/5, 764-768 (1979).
5. B. Gonen and A. H. Rubenstein; Hemoglobin Al and Diabetes mellitus; *Diabetologica* 15, 1-8 (1978).
6. Kenneth H. Gablay, Jay M. Sosenko, Grace A. Banichi, Michael J. Minnsohn and Ruedolf Flueckinger; Glucosylated Hemoglobin: increased Glycosylation of Hemoglobin A in Diabetic Patients, *Diabetes*, Vol. 28, April 1979, 336-340.
7. Sonia P. Tanega, David L. Horwitz, Boas Ganen, Arthur H. Rubenstein, Hyman Rochmann; Hemoglobin Al: An Indicator of the Metabolic Control of Diabetic Patient; *The Lancet*, October 8, 1977.
8. Richard A. Cole; How a new glucose index Can help you Control diabetes. *Modern Medicine* March 30-April 15 (1979), 72-79.
9. Bio-Rad Laboratories; Muenchen; Haemoglobin Al (Hb-Al) Saeulentest zur Bestimmung des prozentualen Anteils der glycosilierten Haemoglobine im Vollblut.