

سنجش و اصلاح هموگلوبین A1c و g-Hb در تشخیص و پایش دیابت

● دکتر نادر وظیفه شیران

استادیار هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم

انتقال خون دانشگاه علوم پزشکی شهید

بهشتی، تهران، ایران



● مریم سادات شاکر طاهری

دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی

پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،

تهران، ایران



□ خلاصه

هموگلوبین A1c درصدی از هموگلوبین تام هست که طی دوران اریتروپوئز و در طول عمر ۱۲۰ روزه RBC به NH₃⁺ اسیدآمین و الین ابتدایی زنجیره بتا گلوبین متصل شده و با حذف بار مثبت باعث القای بار منفی و در نتیجه حرکت سریع آن در الکتروفورز هموگلوبین می شود. مقدار طبیعی HbA1c حدود ۶٪ بوده و افزایش آن شاخصی از دیابت، پایش درمان و مقدار تقریبی قند خون بیمار طی ۳ ماه گذشته می باشد. از آنجایی که در هموگلوبینوپاتی‌ها ممکن است یک یا هر دوی زنجیره بتا به گلوبین دیگر جهش پیدا کند، در نتیجه سهم هموگلوبین A کمتر شده و به هموگلوبین واریانت (X) افزوده می شود و بدین ترتیب مقدار HbA1c نیز کمتر می‌شود. در موارد هموزیگوت مثل S/S، مقدار هموگلوبین A و در نتیجه HbA1c به صفر رسیده و به جای آن HbS1c تشکیل می شود که در صورت استفاده از HPLC و کاپیلاری الکتروفورز می‌بایست مقدار HbA1c اصلاح شود. در این مقاله روش های اصلاح HbA1c با دو روش فوق، عوامل تداخلگر در

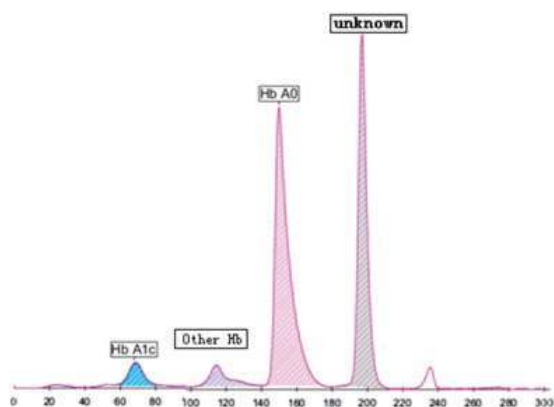
آن و همچنین روش های جایگزین آن معرفی و مورد بحث قرار خواهد گرفت.

کلمات کلیدی: دیابت، هموگلوبین AGE، A1c، کاپیلاری الکتروفورز، HPLC، فروکتوز آمین، آلبومین گلیک

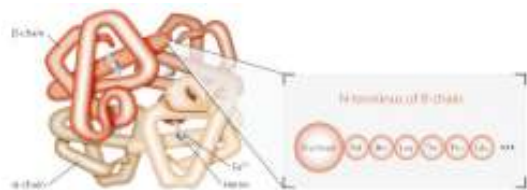
□ بیوسنتز گلوبین

Heme بعد از سنتز در میتوکندری از طریق پمپ FLVCR1 وارد سیتوزول شده و در شبکه اندوپلاسمی با گلوبین های تترامر (α₂β₂) ادغام شده و تشکیل HbA0 را می دهند، سپس وارد دستگاه گلژی شده تا فرآیندهایی مثل گلیکاسیون و استیلاسیون بر روی آن انجام شوند. اضافه شدن قندها و به خصوص گلوکز به ساختار هموگلوبین به سن سلول و غلظت گلوکز خون بستگی دارد، به طوری که این روند طی دوران اریتروبلاستی صورت گرفته و در دوران رتیکولوسیت و اریتروسیت بالغ به دلیل فقدان گلژی بسیار محدود و کم می شود. در این فرآیند، گلوکز بسته به شیب غلظت خود و بدون نیاز به انسولین، از طریق





شکل ۲: در HbA1C (قنددار) به دلیل اتصال گلوکز به NH_3^+ والین انتهایی NT، بار مثبت آن از بین رفته و هموگلوبین اندکی منفی تر شده و لذا سریع تر حرکت می کند، ولی در HbA1a به دلیل اتصال قند فسفات دار منفی، نه تنها بار مثبت هموگلوبین کم می شود، بلکه بار منفی فسفات نیز بر آن افزوده شده (۲ بار منفی تر) و خیلی سریع تر از HbA1C حرکت نموده و در کنار Hb-Barts قرار می گیرد. امروزه به جای الکتروفورز قلیایی بر روی استات سلولز، از HPLC (راست) یا کاپیلاری الکتروفورز (CE) استفاده می شود که در کاپیلاری الکتروفورز زون HbA0 و HbA1c و HbA2 را در جایگاه ۱۵۰ و ۷۰ و ۲۴۰ نشان می دهد ولی اگر بیماری همزمان دارای واریانت HbX نیز باشد، دو باند گلیکته A1c و X1c تشکیل می شود که X1c باند جدیدی برای خود ایجاد می کند و می بایست جمع آن ها به عنوان HbA1c نهایی گزارش شود و در عین حال وجود یک هموگلوبین واریانت نیز گزارش شود. دستگاه های امروزی قادرند همه هموگلوبین های قندی را بر اساس افینیتی و خاصیت آنتی ژنی آن ها شناسایی کنند.



شکل ۳: گلیکته شدن هموگلوبین در ابتدای NT زنجیره های بتا نشان داده شده است. لازم به ذکر است که

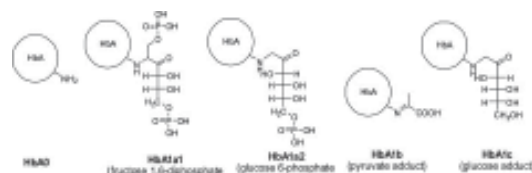
پروتئین های GLUT-1 وارد نورموبلاست شده و بدون نیاز به آنزیم خاصی به والین ابتدایی NT زنجیره گلوبین β وصل و تشکیل هموگلوبین های گلیکته HbA1 را می کند. در مقابل HbA1 گلیکته، به HbA بی که تازه در شبکه اندوپلاسمی مونتاژ شده و هنوز گلیکته نشده است، HbA0 گفته می شود. پس در برابر هموگلوبین A2 هم نمی توان برای HbA بالغین از عبارت هموگلوبین A1 استفاده کرد، چرا که این اصطلاح منحصر برای بیان هموگلوبین های A گلیکته به کار می رود که ۸٪ از کل HbA می باشد. خود HbA1 به انواع مختلف تقسیم بندی می شود:

● HbA1a که به قند گلوکز ۶- فسفات (G6P) یا فروکتوز ۱ و ۶ دی فسفات (F1,6DP) وصل می شود و کمتر از ۲٪ (۱/۶٪) از HbA را تشکیل می دهد. امروزه این واریانت خود به دو زیرگروه A1a1 و A1a2 تقسیم می شود که به ترتیب به فروکتوز ۱ و ۶- دی فسفات (F1,6DP) و گلوکز ۶- فسفات (G6P) متصل می شود.

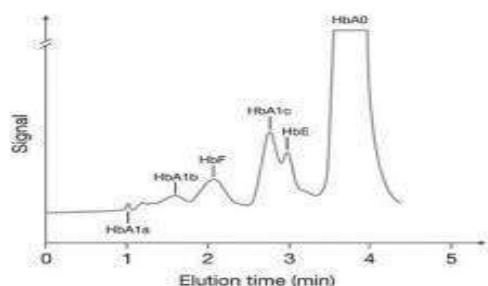
● HbA1b که به پیرووات وصل شده و کمتر از ۱٪ از HbA را تشکیل می دهد. امروزه این واریانت خود به سه زیرگروه A1b1، A1b2، و A1b3 تقسیم می شود.

● HbA1c که به قند گلوکز وصل می شود و کمتر از ۵٪ از HbA را تشکیل می دهد.

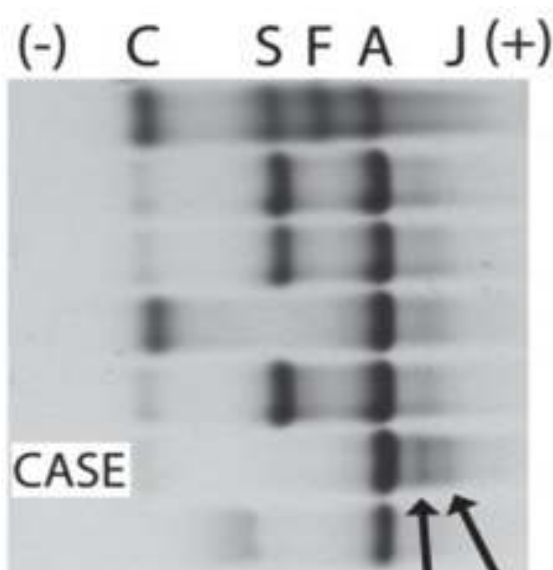
● HbA1d که به قند نامشخصی وصل شده و امروزه خود به سه زیرگروه A1d1، A1d2، و A1d3 تقسیم می شود.



شکل ۱: ساختار انواع HbA



NGSP در بیوشیمی^۱ نیز برای بیان مقدار و گزارش آن، دستورالعمل‌های اختصاصی بیان نموده است که در ادامه به آن‌ها نیز پرداخته خواهد شد.



شکل ۴: دکتر ساموئل رهبر (۱۹۶۸-۲۰۱۲) دانشمند ایرانی و متولد همدان که علاوه بر HbA1C یازده هموگلوبین دیگر را نیز شناسایی و نامگذاری نموده‌اند. دکتر رهبر در الکتروفورز قلیایی از هموگلوبین بیماران دیابتی یک باند سریع تر از A را مشاهده کرده بود که در الکتروفورز اسیدی دیده نمی‌شد. تصویر سمت چپ نیز مربوط به دکتر آنتونی سرامی هست که نقش به‌سزایی در ارتباط بالینی HbA1C و HbA1c با بیماری‌های عروقی و آترواسکلروتیک ایفا نموده است.

گلوکز بعد از اتصال به والین و تشکیل باز شیف، به فرم آمادور 2-deoxyfructose-valine تبدیل می‌شود. حدود ۶۰٪ از گلیکاسیون در Val ابتدایی NT و ۴۰٪ مابقی بر روی ۸-۷ Lys+ سطح گلوبین صورت می‌گیرد که HbA1c بیشتر دسته اول را شامل شده و به مجموع دو دسته، g-Hb گفته می‌شود. دسته اول اغلب دائمی و غیر قابل برگشت بوده ولی دسته دوم بیشتر موقتی و ناپایدار می‌باشد که گاهی طی شرایط هیپرگلیسمی بر گلیکاسیون قابل برگشت NT:Val نیز افزوده می‌شود، در نتیجه HbA1c به دو دسته پایدار (Stable-A1c) و ناپایدار (Labil-A1c) تقسیم می‌شود که منظور از HbA1c اصلی، نوع S-A1c می‌باشد و L-A1c در شرایط تغذیه قندی افزایش موقت می‌یابد که فقط برخی دستگاه‌های HPLC نوع Tosoh-G7/8 قادر به افتراق این دو هستند. ۵۰٪ از گلیکاسیون A1c در دوران نورموبلاستی و مابقی در طول عمر RBC صورت می‌گیرد، لذا کاهش هر کدام از دوره‌ها در آنمی‌های هیپرپرولیفراتیو (مثل آنمی همولیتیک و هموگلوبینوپاتی‌ها) باعث کاهش کاذب آن (بدون کاهش واقعی قند خون) و افزایش دو دوره در آنمی‌های هیپرپرولیفراتیو (مثل آنمی فقر آهن، مگالوبلاستیک و آپلاستیک) باعث افزایش کاذب آن می‌شود.

هموگلوبین سریع A1c اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط Huisman و Meyering و به روش کروماتوگرافی جداسازی شد. سپس در سال ۱۹۶۸ دکتر ساموئل رهبر افزایش آن در بیماران دیابتی کنترل نشده را اثبات و یک سال بعد، ساختار آن را نیز شناسایی نمود. در سال ۱۹۷۵ واکنش شیمیایی و غیرآنزیماتیک قندی شدن هموگلوبین (واکنش آمادوری تشکیل دهنده Schiff) توسط Bunn مطرح گردید تا اینکه در سال ۱۹۷۶ آقای Anthony Cerami اندازه‌گیری منظم A1c را برای شناخت و پایش منظم بیماری دیابت مطرح نمودند. البته همانند ICSH در هماتولوژی، ADA، IFCC و

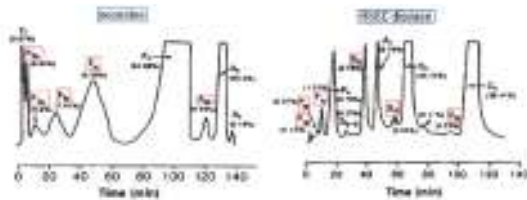
1- National Glycohemoglobin Standardization program of US (NGSP), Japanese Diabetes Society/ Japanese Society of Clinical Chemistry (JDS/JSCC), and Mono-S in Sweden, United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), American Diabetes Association (ADA), European Association for the study of Diabetes (EASD), and International Diabetes Federation working group (IDFWG)



هموگلوبین های مینور

به واریانت های هموگلوبینی ناشی از تغییرات پس از ترجمه گلوبین ها که در آن ها توالی نوکلئوتیدی ژن های گلوبینی دست نخورده باقی می ماند، هموگلوبین مینور گفته می شود، از آن جمله می توان به گلیکاسیون غیرآنزیماتیک، استیلاسیون، پیرواسیون، S-گلوکاتایوناسیون و اضافه شدن استالدهید و کرپامیل (مشق اتانول) اشاره نمود. این تغییرات می توانند روی تمامی هموگلوبین های طبیعی A, F, A₂ و غیرطبیعی C و S ایجاد شوند. دیابت، اورمی، آنمی و آپلازی اریتروئیدی، بیماری های واسکولار، ایدز و مصرف داروهایی مثل آسپرین و پنی سیلین، قادر هستند روی میزان هموگلوبین های مینور تاثیر بگذارند. برای فرم گلیک هبA عبارت از HbA_{1a-d}، برای فرم خام HbA عبارت از HbA₀، برای فرم گلوکاتایون هبA عبارت HbF₀، برای فرم خام HbF عبارت از HbF_{1a-d}، برای فرم استیله HbF عبارت از HbF₁، برای فرم خام HbS عبارت از HbS₀ و برای فرم گلیک هبS عبارت از HbS_{1a-d} استفاده می شود که همه A₁ها جلوتر از A₀، همه S₁ها جلوتر از S₀ حرکت می کنند (شکل ۲۹). HbA_{1c} شایع ترین هموگلوبین مینور خون محسوب می شود که توسط تکنیک CE (کاپیلاری الکتروفورز)، Cation Exchange or Affinity HPLC، بورونات افینیتی، بیوسنسور، روش های آنزیماتیک، الیزا، HPLS یا MS (مس اسپکترومتری) شناسایی می شود. استیلاسیون هموگلوبین ها توسط آنزیم استیل ترانسفراز، در حضور استیل کوآنزیم A و اغلب در آلانین NT پروتئین ها انجام می شود، از طرفی دیگر، هموگلوبین برای عملکرد نرمال به NT آزاد نیاز دارد که بلوک شدن آن با گلوکز یا استیل، روی عملکرد آن (مثل اتصال به 2,3DPG) اثر منفی گذاشته و باعث افزایش میل آن به O₂ می شود. از آنجایی که عمده استیلاسیون در HbF و در زنجیره γ انجام می شود، از این رو به HbF استیله، HbF₁ و به فرم گلیک هب آن HbF_{1a-d} گفته می شود. در اورمی ناشی از افزایش اوره خون، ترکیبی به نام سیانات تشکیل می شود که به صورت غیر قابل برگشت به گروه آمینوی NT هر دو گلوبین

α و β متصل می شود، در این افراد، هموگلوبین کرپامیله نیز تا ۴٪ افزایش می یابد. گلوکاتایون هبA_{III} در Cys:93 باعث کاهش P50 و اثر تعاون می شود که اغلب در افراد دیابتی و میکروآنژیوپاتی افزایش می یابد. اضافه شدن استالدهید به ریشه آمینوی Lys و Val گلوبین β (حتی به فرم گلیک) نیز همانند افزوده شدن گلوکز، فرآیندی غیرآنزیماتیک بوده و ۲۵-۱۵٪ از تغییرات پس از ترجمه هموگلوبین را به خود اختصاص می دهد. فعلا تکنیکی برای سنجش آن وجود ندارد ولی با کروماتوگرافی می توان آن را از دو هموگلوبین A_{1a} و A_{1b} افتراق داد.

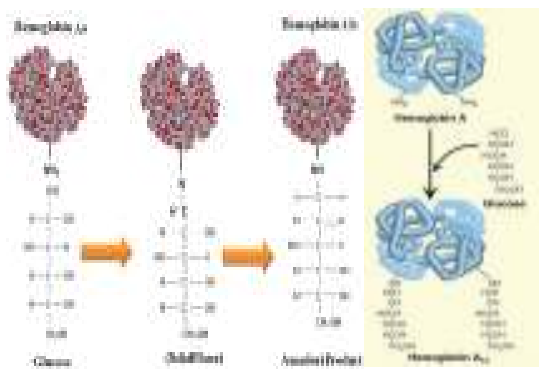


شکل ۵: موقعیت انواع مختلف

هموگلوبین های گلیکوزیله A, F, C و S

گلوکز طی واکنش غیرآنزیماتیک میلارد (گلیکاسیون) و به صورت غیر قابل برگشت به ریشه NT زنجیره بتا در HbA_{1c} متصل می شود که در ابتدا منجر به شکل گیری سریع و برگشت پذیر ماده ناپایداری موسوم به Schiff Base یا Pre-A_{1c} (Aldimine) شده و سپس به آرامی به کتوآمین پایداری به نام A_{1c} تبدیل می شود (شکل ۲۹). این گلوکز توانایی حضور در متابولیسم کربوهیدرات ها را نداشته و در صورت نیاز بدن به گلوکز، تجزیه و مصرف نمی شود. چه در حالت نرمال و چه در بیماری دیابت، جزء A_{1c} بیشترین مقدار هموگلوبین A₁ را تشکیل داده و پس از آن به ترتیب اجزاء A_{1a} و A_{1b} قرار دارند. به جز والین NT:NH₃⁺، گلوکز قادر است با سرین، لایزین و آسپارژین بدون بار هر دو گلوبین α و β نیز پیوند کوالان ایجاد کند ولی تفاوت این نوع گلیکاسیون در الکتروفورز قابل افتراق و تشخیص نیست. از آنجایی که گلیکاسیون وابسته به گذر زمان و غلظت قند محیط است، از این رو هرچه عمر یک سلول یا دوره ترنآور پروتئینی بالا باشد (مثل آپلازی رده اریتروئیدی و آنمی آپلاستیک)،

LDL می شود که با خاصیت اکسیدانی خود باعث تولید ROS و Ox-LDL و اکسیداسیون HDL، Apo-A1، گلوتاتیون پراکسیداز و LCAT شده و بدین ترتیب باعث کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی آن ها و ترانسپورت معکوس کلسترول می شود. در شرایط دیابتیک ($HbA1c > 6.5$)، بیان CD163 کاهش بیشتری دارد که در صورت همزمانی فنوتیپ بیمار با Hp-2-2 می تواند باعث تشدید لوپ معیوب فوق و افزایش ۱۰ برابری ریسک بیماری های کرونر قلب (CHD) نسبت به افراد $HbA1c < 6.5$ با ژنوتیپ HP1-1 شود. برهمکنش مقادیر بالای AGE با رسپتور AGER1 باعث ایجاد سیگنال های التهابی (JAK-STAT، MAPK و NF-KB و ...) و استرس اکسیداتیو ناشی از Nox/Phox شده ولی مقادیر کم باعث بروز خاصیت اسکاونجری و پاکسازی AGE ها می شود. سیگنال التهابی با آسیب قلبی عروقی باعث بروز نارسایی قلبی، کلیوی، نورپاتی، اختلال بینایی و واسکولیت نیز می شود.



شکل ۶: ترکیب ابتدایی و قابل برگشت گروه آلدئیدی یا کربونیلی گلوکز با گروه آمین والین در هموگلوبین که باعث تشکیل باز شیف (نوعی آلدیمین یا Aldimine ناپایدار) می شود (طی چند ساعت) که در صورت تداوم شرایط هیپرگلیسمی به سمت راست پیش رفته و با جابجایی باند مضاعف از حالت $C=N$ به $C=O$ باز شیف به کتوآمین آمادوری تبدیل می شود (طی چند روز) که $HbA0$ را به $HbA1c$ تبدیل می کند. این واکنش نیز قابل برگشت بوده ولی در صورت تداوم هیپرگلیسمی طی چند هفته و ماه و بر اساس اصل لوشاتلیه، به مرور محصولات نهایی و پیشرفته گلیکاسیون (AGE) نیز تشکیل می شوند.

مقدار گلیکاسیون و غلظت $HbA1c$ نیز افزایش می یابد، از طرفی دیگر، هر چه غلظت قند بیشتر شود، زنجیره β با سرعت و تعداد سایت بیشتری نسبت به زنجیره α گلیکه می شود. گلیکاسیون مزمن (چند ماهه)، انواع مختلفی از پروتئین های دیگر مثل آلبومین، غشاء RBC، کریستالین عدسی چشم و حتی هموگلوبین را به نوعی دیگر و با فندهای غیر متعارف گلیکه می کند که به مجموع آن ها، AGE یا advanced glycation endproducts و به هموگلوبین مربوطه که در اثر تغییرات دراز مدت و ترن اور طولانی ایجاد می شود، HbAGE گفته می شود (نسل جدیدی از هموگلوبین های A1) که مقدار آن در افراد نرمال ۰/۴۲٪ و در افراد دیابتی، ۰/۷۵٪ بوده و مازاد آن با عوارض جدی میکروواسکولار و ماکروواسکولار همراه می باشد. AGE ها می توانند به صورت اندوژن در داخل بدن تولید شده یا توسط مواد غذایی پخته یا سیگار وارد بدن شوند. در سطح سلول های بدن رسپتور مخصوص AGE به نام AGER1 یا R-AGE (از نوع IgSF) وجود دارد که در پاک سازی آن ها نقش دارد ولی تجمع AGE ها می تواند از طریق همین رسپتورها باعث بروز عوارض عروقی شود. این سلول ها با تجزیه AGE باعث تولید نسل دومی LMW-AGE می شوند که با ترشح در خون از مسیر کلیوی دفع می شوند. این رخداد وابسته به سن بوده و با افزایش سن، میزان کلیرانس کمتر و تجمع آن ها بیشتر و عوارض قلبی-عروقی و آلزایمر آن ها بیشتر می شود که بسته به نوع بافت، تجمع خاصی از AGE (اغلب CML و پنتوزیدین) دیده می شود.

با لیز گلبول های قرمز، Hb آزاد شده و با اتصال به هاپتوگلوبین، توسط اسکاونجر CD163 کبد پاکسازی شده و باعث اینواژینه شدن و کاهش بیان CD163 نیز می شود. در بدن سه نوع هاپتوگلوبین HP1-1، HP2-1 و HP2-2 وجود دارد که نوع Hp-2 (ناشی از داپلیکاسیون آگزون ۳ و ۴ و افزایش قطعه 1.7kb در ژن آن) در اتصال به HbAGE هم دچار کاهش میل به CD163 و هم دچار کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی و افزایش فعالیت اکسیداتیو می شود، این روند باعث تجمع کمپلکس $Hp2:HbAGE/A1c$ در خون و اتصال آن به HDL



و طی چندین هفته تشکیل می شوند که افزایش دما، ROS ها، غلظت قند و کاهش کلیرانس آن ها باعث تسریع آن ها در حد چند روز می شود. برخی از AGE/ALE ها خاصیت کموتاکتیک هم داشته و باعث فراخوان مونسیتها و ماکروفاژها و ایجاد شرایط التهابی هم می شوند. AGE ها هم میل به اتصال و تجمع در ECM را داشته و هم بین آن ها اتصالات متقاطع ایجاد کرده و باعث کاهش الاستیسیته آن ها می شوند، هم باعث اختلال عملکرد آن ها شده و هم با اتصال به رسپتور RAGE/AGER1 باعث بروز التهاب در منطقه می شوند.

□ سنجش هموگلوبین های گلیکته (gHb)

امروزه برای تشخیص دیابت، علاوه بر سه تست FBS یا FPG بالای 126mg/dl، PG یا RPG² بالای 200mg/dl و 2hpp یا 2hPG بالای 200mg/dl خوردن 75gr گلوکز از دو تست GTT (تست تحمل گلوکز) و HbA1c نیز استفاده می شود. در واقع از سال ۱۹۹۷، کمیته بین المللی خبرگان (IEC) متشکل از انجمن دیابت آمریکا (ADA)، انجمن اروپایی مطالعات دیابت (EASD)، فدراسیون بین المللی دیابت (IDF) و فدراسیون بین المللی شیمی بالینی (IFCC) استفاده از $HbA1c > 6.5$ را به عنوان معیاری قطعی از تشخیص دیابت مطرح نمود و در سال های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰ نیز این نظریه را مجدداً تکرار و تایید نمود. نتایج نهایی نیز می بایست یا بر اساس برنامه ملی استاندارد سازی گلیکوهموگلوبین (DCCT/NGSP) به صورت درصد، یا بر اساس نظر IFCC به صورت mmol HbA1c/mol total Hb (SI) گزارش شود که برای تبدیل آن ها به همدیگر فرمول محاسباتی یا سایت اینترنتی www.hba1cnet.com وجود دارد. در این سایت با وارد کردن درصد HbA1c می توان هم معادل IFCC (توصیه اصلی) و هم میانگین گلوکز

تخمینی (eAG) یا ABG را نیز به دست آورد (فرم پیشرفته تر از HbA1c برای ارزیابی وضعیت قند خون طی ۳-۲ ماه گذشته). همچنین با استفاده از یک جدول، می توان از درصد HbA1c برای تعیین میزان قند خون بیمار نیز استفاده نمود (بر اساس mg/dl یا mmol/L). برای تعیین HbA1c هرگز استفاده از دستگاه های POC توصیه نمی شود. ADA و WHO مقدار HbA1c کمتر از ۵/۷٪ را نرمال، مقدار ۶/۴-۵/۷٪ را پره دیابتیک و مقادیر بالای ۶/۵٪ را دیابتیک می داند که در افراد پره دیابت، ریسک ابتلا به دیابت ۳-۸ برابر افراد نرمال می باشد. این تست پایداری و ارتباط بالینی زیاد، ضریب تغییرات درون فردی و بین فردی و خطاهای پره آنالیتیکال و آنالیتیکال پایینی داشته و نیاز به نمونه ناشتا نیز ندارد و توسط روش های مختلف و مورد تایید www.ngsp.org.asp سنجیده می شود ولی در حاملگی، آنمی همولیتیک، از دست دادن خون، اسپلنکتومی، نارسایی کلیوی، آنمی آپلاستیک، آنمی فقر آهن، مگالوبلاستیک، هموگلوبینوپاتی و ... تعدادی محدودیت دارد که در ادامه به آن ها پرداخته خواهد شد.

$$NGSP\% = [0.09148 \times IFCC$$

$$(mmol/mol)] + 2.152$$

$$eAG (mg/dl) = [28.7 \times HbA1c\%] - 46.7$$



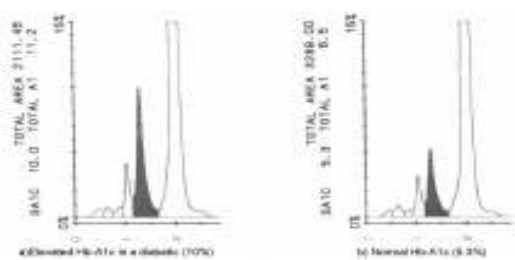
شکل ۱۰: سایت آنلاین Diagnosis System یا DiaSys برای تبدیل NGSP به IFCC^۳

3- Fasting or Random Plasma Glucose (FPG or RPG)

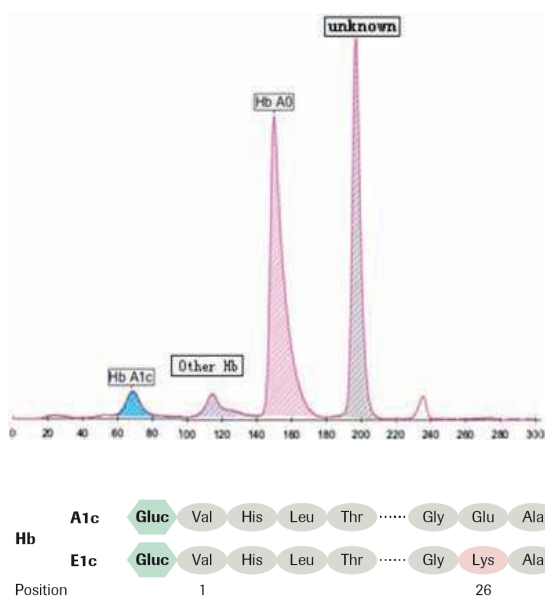
4- DCCT, NGSP, IFCC, In future, IFCC results should be reported in mmol/mol (SI unit) and derived NGSP units in % using the IFCC-NGSP master equation.



داشت و میزان تداخل هموگلوبین واریانت در بتا تالاسمی بیشتر از آلفا خواهد بود. این در حالی است که در تالاسمی اینترمدیا و ماژور همواره به دلیل اریتروپوئز غیر موثر و همولیز (کاهش عمر RBC) و همچنین به دلیل افزایش شدید HbF و کاهش HbA، دچار کاهش کاذب HbA1c می‌باشیم. در بررسی HbA1c در بیماران تالاسمی ماژور تزریق خون اخیر نیز می‌بایست مد نظر قرار بگیرد.



شکل ۱۲: نتیجه HbA1c در دو شرایط دیابتیک (a) و نرمال (b) با تکنیک CE-HPLC [۱۳]



شکل ۱۳: تاثیر وجود هموگلوبین واریانت در کپیلاری الکتروفورز معمولی که باعث دو تکه شدن HbA1c+HbX1c نیز می‌شود.

A1C Test Results	BLOOD GLUCOSE		STATUS	HbA1c	
	mmol/L	mg/dL		%	mmol/mol
Diabetes Mellitus	5.4	97	Normal	5	35
	7.0	126		6	42
	6.0	108	Pre-Diabetes	7	53
Prediabetes	10.2	184	Diabetes	8	64
	11.8	212	Diabetes	9	75
	13.4	241		10	86
Normal (Non-Diabetic)	14.8	268	Diabetes	11	97
	16.5	297		12	109
	18.1			13	119

شکل ۱۱: تبدیل میزان A1C (درصد یا SI) به میزان قند خون

علی‌رغم این که HbA1c یک باند سریع قابل سنجش در جلوی باند A0 ایجاد می‌کند، ولی به دلیل دقت پایین، برای سنجش HbA1c از روش‌های آنزیمی، ایمونواسی (مثل TINA)، Cation Exchange-HPLC و Boronate Affinity-HPLC استفاده می‌شود که فقط ۳ روش Immuno-Assay، آنزیماتیک و Affinity-HPLC قادر به شناسایی هموگلوبین‌های واریانت گلیک‌ه بوده و CE فاقد این توانایی می‌باشد. در واقع، در بیمارانی که هموگلوبین واریانت دارند، اگر فرد هتروزیگوت باشد، بسته به درصد هموگلوبین واریانت (مثلاً ۳۰٪ HbE یا ۴۵٪ HbS)، از مقدار HbA و در نتیجه HbA1c کاسته می‌شود و در شرایط هموزیگوت که مقدار HbA صفر شده و کل هموگلوبین از نوع HbE یا HbS می‌شود، دیگر HbA1c وجود نداشته و ملاک HbE1c و HbS1c خواهد بود که دستگاه‌های CE قادر به گزارش آن نبوده و کارشناس مجرب آزمایشگاه می‌بایست آن را ارزیابی و استخراج کند. در موارد هتروزیگوت B/E یا B/S نیز می‌بایست جمع A1c+E1c به‌عنوان عدد نهایی گزارش گردد. بتا تالاسمی مینور باعث افزایش سهم هموگلوبین واریانت (و کاهش سهم HbA) و آلفا تالاسمی مینور باعث کاهش سطح هموگلوبین واریانت (و افزایش سهم HbA) می‌شود، به طوری که مقدار HbS در همزمانی بتا تالاسمی به حدود ۶۰٪ و در همزمانی آلفا تالاسمی به حدود ۲۵٪ می‌رسد، لذا مقدار HbA1c در همزمانی تالاسمی مینور بتا با هموگلوبین واریانت، کاهش و در مینور آلفا افزایش خواهد

5- Turbidimetric Inhibition Immuno Assay (TINIA)

آن‌ها در الکتروفورز استات سلولز همخوانی دارد. کاربرد HPLC در شناسایی واریانت‌های هموگلوبین به این حقیقت بستگی دارد که هر هموگلوبین طبیعی و یا واریانت، در هر سیستم و دستگاه اختصاصی (مثل دستگاه BioRad و Tosoh-G8)، پس از زمان معین از ستون خارج شده و وارد محلول الوشن می‌شود (زمان احتباس) که بدین ترتیب بسیاری از واریانت‌های هموگلوبین از یکدیگر قابل جداسازی هستند. البته امکان بروز هم پوشانی و تداخل میان بعضی از هموگلوبین‌ها هنوز هم وجود دارد [۱۴].

بعضی از هموگلوبین‌هایی که توسط الکتروفورز استات سلولز در pH قلیایی قابل جداسازی از هم نیستند (مثل باند‌های GSD)، توسط HPLC قابل تفکیک هستند، به عنوان مثال هموگلوبین‌های D-Punjab/LosAngeles و G-Philadelifia به کمک تکنیک HPLC از HbS و از یکدیگر قابل تشخیص می‌گردند. سرعت آهسته‌تر جریان بافر که با تغییر آهسته غلظت کاتیونی همراه می‌باشد، جداسازی انواع هموگلوبین‌های با زمان احتباس مشابه را بهبود می‌بخشد، اما زمان انجام کلی آزمایش HPLC را افزایش می‌دهد. در این دستگاه، هموگلوبین‌هایی که از ستون شسته شده و خارج می‌شوند، به صورت مصور نمایش داده شده و به طور خودکار توسط اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری می‌شوند. زمان احتباس هر هموگلوبین مجهول بر اساس زمان احتباس (RT) هموگلوبین‌های معلوم و استاندارد کنترل‌های تجاری طبیعی یا غیرطبیعی تعیین می‌شود. در دستگاه Bio-Rad VII مقدار RT برای HbA1c حدود ۱/۵-۰/۲۸ (متوسط ۰/۱۱) بوده و اغلب منجر به تشکیل پیک مینور و ریپید P2' می‌شود. در این دستگاه هموگلوبین‌های F← هموگلوبین A گلیکولیزه یا P2'← هموگلوبین A تغییر یافته یا P3' ← A ← A2 ← D← S و ← C، به ترتیب هموگلوبین‌هایی هستند که از ستون خارج می‌شوند و مجموع سه پیک P3'+P2'+A به عنوان مقدار کمی HbA گزارش می‌شود. میزان RT برای HbA حدود

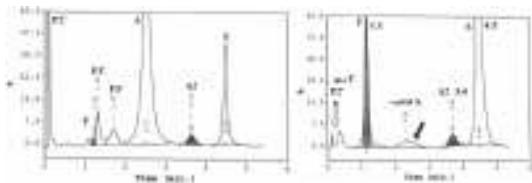
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت تعویض کاتیون (CE-HPLC یا HPLC) تکنیکی مشابه CE است که طی آن مخلوطی از هموگلوبین‌های طبیعی و واریانت که بار شبکه‌ای مثبت داشته و در pH اسیدی قرار دارند، از طریق اتصال و جذب به فاز ثابت با بار منفی (آنیون) در ستون کروماتوگرافی، به اجزاء تشکیل دهنده خود تفکیک می‌شوند و سپس یک فاز متحرک آن‌ها را شست و شو و از ستون مربوطه خارج می‌سازد. فاز متحرک بافری با غلظت در حالت افزایش کاتیون‌ها است که در طول ستون جریان دارد و از افزوده شدن تدریجی بافری با غلظت کاتیونی بسیار بالا (بافر A) به بافر اسیدی با غلظت کاتیونی پایین (بافر B) تشکیل می‌شود. در این تکنیک، کاتیون‌های موجود در فاز متحرک با پروتئین‌های جذب شده به ستون، بر سر اتصال به آنیون‌های ستون رقابت نموده و باعث جدا شدن و خارج شدن پروتئین‌های تعویض شده می‌شوند. بنابراین مولکول‌های جذب شده هموگلوبین که دارای بار مثبت هستند، از ستون شسته شده و با سرعتی متناسب با تمایل خود نسبت به فاز ثابت، وارد فاز مایع شده و از ستون خارج می‌شوند که به بازه زمانی مابین شروع تست تا خروج هر نوع هموگلوبین، زمان احتباس یا رتنشین تایم (RT) آن هموگلوبین گفته می‌شود که بر اساس نوع دستگاه، نوع بافر، نوع هموگلوبین، میزان گلیکوزیلاسیون یا استیلاسیون آن، برای هر هموگلوبین اختصاصی می‌باشد. در مرحله بعد، پس از اینکه جداسازی بدین طریق انجام شد، هموگلوبین‌های تفکیک شده از طریق بررسی نوری در بافر مربوطه شناسایی می‌شوند که شناسایی هموگلوبین‌ها بر اساس زمان احتباس آن‌ها و اندازه‌گیری هموگلوبین‌ها بر اساس محاسبه مساحت زیر پیک به دست آمده از آن صورت می‌گیرد. بین زمان احتباس هر هموگلوبین در ستون HPLC و حرکت آن‌ها در الکتروفورز استات سلولز (pH قلیایی)، تاحدودی همخوانی وجود دارد. هموگلوبین‌های با بیشترین بار مثبت (مثل HbC, HbS) زمان احتباس طولانی‌تری دارند که با حرکت آهسته‌تر

6- Cation-exchange high performance liquid chromatography (CE-HPLC or HPLC)

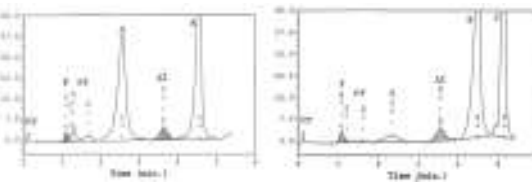
7- retention time



درصد HbA گلیکوزیله ممکن است موجب افزایش کاذب مقدار HbF گردد. آرتیفکت های خاصی نیز وجود دارند که در تفسیر نتایج HPLC ایجاد مشکل کرده و باید مورد شناسایی قرار بگیرند. به عنوان مثال افزایش بیلی روبین پلاسما ممکن است موجب بروز یک پیک واضح در محل مربوط به HbH، هموگلوبین بارتز و HbF استیله شود (شکل ۵۴-۴۶).



شکل ۱۴: شکل سمت راست: کروماتوگرام مربوط به دستگاه Bio-Rad HPLC. این بیمار همزمان به آنمی سلول های داسی شکل و دیابت مبتلا بوده و در خون دارای HbS گلیکوزیله با زمان احتباس معادل HbA (فلش مشکی) و HbF استیله (فلش سفید) می باشد که S-گلیکوزیله آن ممکن است حضور HbA کاذب و در نتیجه تشخیص نادرست خصیصه داسی شکل را تداعی کند. شکل سمت چپ: کروماتوگرام Bio-Rad Variant II- HPLC. این بیمار دارای خصیصه سلول های داسی، آنمی همولیتیک، برفان و بیلی روبین معادل 970 mmol/l بوده و یک پیک کاذب را در ناحیه مربوط به هموگلوبین بارتز و P2' با RT=0.11 نشان می دهد. از چپ به راست، پیک ها به بیلی روبین، HbF، HbA تغییر یافته یا P3' (دو پیک)، A، HbA2 و S مربوط می شوند.



شکل ۱۵: شکل سمت راست: کروماتوگرام مربوط به دستگاه Bio-Rad HPLC. این بیمار مبتلا به HbC/S می باشد و به دلیل فقدان هموگلوبین A، دو باند P2' و P3' آن نیز کاهش شدید دارد. باند A کاذب بوده و

1.90-3.10min است که در دستگاه Bio-Rad به طور میانگین، زمان ۲/۵ min به عنوان پیک تشخیصی HbA در نظر گرفته می شود. هموگلوبین های E، Lepore، KorIBu، Kenya با پیک A2، هموگلوبین D-Iran، Zurich، Tacoma با پیک A، هموگلوبین های D-پنجاب/ Koln و لوس آنجلس و G-فیلادلفیا با پیک D، هموگلوبین پلی مورفیسم B2(A2') با پیک S، هموگلوبین کنستانت اسپرینگ با پیک C و هموگلوبین های سریعی مثل I، J، Hope، K و N با پیک های P2' و P3' حرکت می کنند و HPLC هنوز هم قادر به تفکیک آنها نیست. HPLC تنها برای شناسایی و اندازه گیری هموگلوبین های واریانت، بلکه برای اندازه گیری هموگلوبین های A، F، A2 نیز مورد استفاده قرار می گیرد.

هموگلوبین های واریانت گلیکوزیله زمان های شویبش (یا زمان احتباس) متفاوتی نسبت به انواع غیر گلیکوزیله داشته و حدود ۲ دقیقه سریع تر از نوع غیر گلیکوزیله خود از ستون خارج می شوند، مثلاً HbA با RT=2.5min و HbA گلیکوزیله با RT=0.11 (معادل P2') یا HbS با RT=4.5min و HbS گلیکوزیله با RT=2.5 (معادل HbA) از ستون خارج می شوند. همین طور انواع استیله هموگلوبین (مانند HbF که تا حدی استیله می باشد) در مقایسه با انواع غیر استیله زمان احتباس متفاوت و سریع تری دارند. همچنین، یک هموگلوبین واریانت ممکن است زمان احتباس معادل یک هموگلوبین واریانت دیگر یا حتی یک هموگلوبین طبیعی داشته باشد، به عنوان مثال HbE، HbKorleBu و HbLepore ممکن است با HbA2 هم پوشانی داشته باشند. HbA2 نیز در حضور HbS ممکن است به طور کاذب افزایش نشان دهد. گلیکوزیله ممکن است زمان احتباس معادل و یا بسیار مشابه HbA داشته باشد، بنابراین ممکن است بیمار مبتلا به آنمی سلول های داسی، شبیه فردی به نظر برسد که مقدار بسیار کمی HbA دارد و بدین ترتیب با یک فرد هتروزیگوت A/S اشتباه گرفته شود. در بعضی از دستگاه ها، ممکن است HbF با پیک ناشی از HbA گلیکوزیله (P2') ترکیب شده و هنگامی که مقداری معادل ۰/۰۶٪ و یا کمتر داشته باشد، مورد شناسایی قرار نگیرد. در مقابل، بالا بودن

بیمار ۱/۳٪ HbF و ۴/۱٪ HbA2 دارد. شکل سمت چپ: کروماتوگرام Bio-Rad Variant II-HPLC. این بیمار دارای خصیصه سلول های داسی بوده و دارای علائم آزمایشگاهی زیر می باشد.

Sickledex is POSITIVE; HbF: 1.0%; HbA: 38.7%; HbA2: 4.4%; HbS: 56.1% و Peripheral smear with 2+ sickle cells .



شکل ۱۶: دستگاه CE-HPLC BioRad سری D10 اتوماتیک و سری جدید D100 و دستگاه Tosoh Bioscience نسل G7 که تا نسل G11 نیز توسعه یافته است.

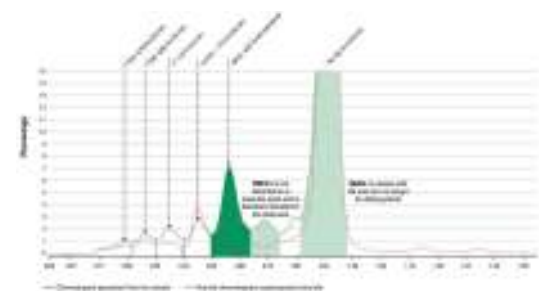
برخلاف دستگاه Bio-Rad در دستگاه Tosoh، از اسامی متفاوتی برای فراکسیون های مختلف HPLC استفاده شده است که شامل FP، A1A، A1B، F، LA1C و SA1C می باشند. سنجش HbA1 یا بر اساس شارژ و بار آن (مثل روش کاپیلاری الکتروفورز روی جریان الکترواوسموتیک با ولتاژ و رانینگ تایم بالا و CE-HPLC در ستون کاتیونی) یا بر اساس ساختار و قدرت آنتی ژنی آن (مثل روش بورونات با افینیتی نسبت به دی اول قند و یا روش TINA با آنتی بادی ضد ۴ اسید آمینه ابتدایی گلیک) می باشد و توصیه می شود برای سنجش دقیق، از دو روش مختلف (یکی شارژ و یکی ساختار) استفاده شود تا همزمان حضور هموگلوبین واریانت نیز مورد پایش قرار بگیرد. روش بورونات تمامی g-Hb ها را سنجش نموده و اختصاصی A1C نیست.



شکل ۱۷: رپورت کروماتوگرام پرینت شده دستگاه Tosoh-G8 از فرد سالم و دیابتیک و تالاسمیک که این دستگاه ها قادرند Stable-A1c ناشی از دیابت را از Labiel A1c ناشی از هیپرگلیسمی موقت افتراق دهند و HbA1 را به انواع A، B و C تفکیک کنند. همچنین قادرند وجود برخی هموگلوبین های واریانت را شناسایی و فلاگ بدهند. از انکوباسیون ۲ ساعته خون با گلوکز ۵۵ میلی مولار، سدیم سیاناید ۱۰ میلی مولار و استالدهید ۱۰ مولار به ترتیب HbA1c لایبل، Hb کرنامیل و Hb استیل حاصل می شود. هر چه سرعت جریان ستون کمتر و رزولوشن دستگاه بالاتر باشد، بازه زمانی عبور از ستون نیز از ۲ دقیقه تا ۷ دقیقه (تصویر سمت چپ) افزایش یافته و جداسازی باندها از هم بهتر می شود.



$$\% \text{HbA1c} = \frac{\text{Area (sA1c)} - \text{area (HbX)} - \text{area (HbX1c)}}{\text{Total area} - \text{area (HbX)} - \text{area (HbX1c)}} \times 100$$



شکل ۱۸: رپورت کروماتوگرام دستگاه Tosoh-G8 فرد HbE هتروزیگوت که هیچ باند اضافی، RT نابجا یا فلاگ خاصی را نشان نمی دهد و در آن مقدار A1C حدود ۶،۰۷٪ و جمع هموگلوبین های گلیک A1 نیز LA1c+A1A+A1B نیز ۷،۸۲٪ اعلام شده است. این در حالی است که بیمار واریانت HbE داشته و با SA1C الوت شده است (فقدان کاذب HbX و HbX1)، لذا مقدار A1C گزارش شده کاهش کاذب دارد، چرا که مخرج معادله به



$$\% \text{HbA1c} = \frac{\text{Area sA1c}}{\text{Total area} - \text{area (HbS1c)} - \text{area (HbS0)}} * 100$$

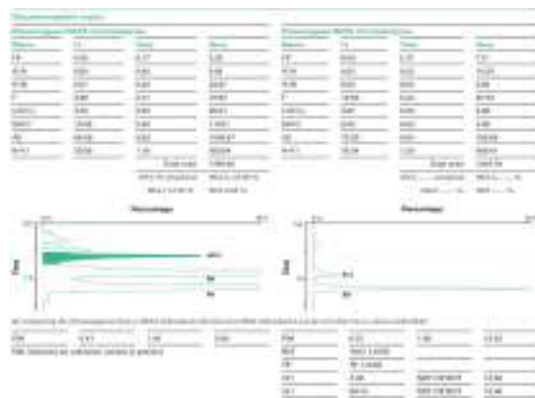
It is not possible to exclude HbS1c in the calculation of HbA1c as it co-elutes with HbA0

شکل ۱۹: اگر یک فرد HbS/S هموزیگوت را مورد بررسی قرار دهیم، متوجه می شویم که باند HbS آن (یا HbVAR1 یا HV1) در تایم ۱,۲ پیک اصلی را ایجاد کرده و باند HbS1c آن در تایم ۰,۹۴ یعنی در جایگاه پیک HbA0 ایجاد پیک می کند، لذا S1c و A0 با همدیگر حرکت نموده و وجود HbA0 باعث ماسکه شدن S1c می شود. در واقع در افراد هتروزیگوت HbA/S دو پیک مجزای A0 و S0 و یک پیک A1c در تایم ۰,۶ ایجاد شده و پیک مجزای S1c پشت A0 مخفی شده و باعث کاهش کاذب A1c می شود. چراکه در مخرج فرمول فوق، مساحت HbX1c کم نشده و مخرج بزرگ می شود. در گزارش HbA1c در بیماران HbA/S بهتر است سهم A1c از کل $(A0+A1+A2+F)-(S+S1c)$ Total Hb به عنوان HbA1c نهایی گزارش شده و کلا HbS و HbS1c از محاسبات حذف شده و درصد A1c از کل totalHb-HbS گزارش شود. در نظریه دوم جمع A1c+S1c به عنوان صورت فرمول و جمع Total Hb به عنوان مخرج^۱ فرمول قرار گرفته و لذا جمع همه گلیکوهموگلوبین ها (A1c+S1c) به نیابت و معادل HbA1c گزارش شود. در روش دوم چون S1c و A0 با هم حرکت می کنند، امکان تعیین S1c برای جمع کردن آن با A1c وجود ندارد و لذا روش اول بهتر خواهد بود. در مثال A/S فوق اگر فرمول فوق را محاسبه کنیم، عدد ۹/۵٪ کاذب حاصل می شود (چون S1c مخرج نامعلوم بوده و قابل کاهش نیست) ولی دستگاه با برخی اصلاحات رقم ۱۰,۹۸٪ را گزارش نموده است.

گاهی دستگاه پیک های ناشناسی را شناسایی می کند که به آن ها P00 می گوید. این پیک ها در شکل بالا یکی در تایم ۱,۴ (کروموگراف HbS/A) و یکی در تایم ۱,۰۶ (کروموگراف HbS/S) دیده می شوند که چون دستگاه

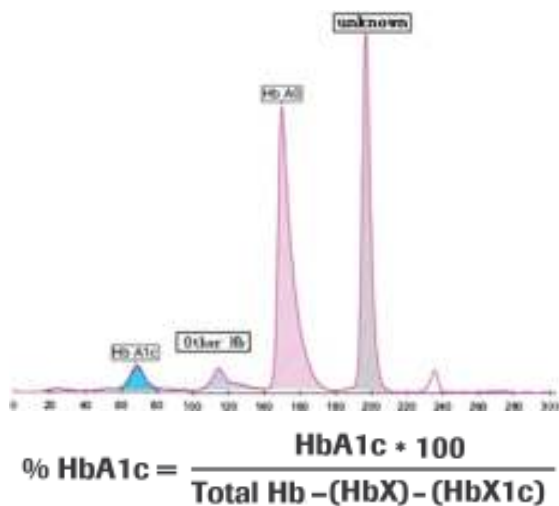
دلیل وجود باند HbE افزایش نشان می دهد. در واقع هیچ کدام از HbE و HbE1c باند جداگانه نداشته (HbE0 با A0 الوت شده و HbE1c نیز در پشت باند A1c یک پیک کوچک غیرقابل تشخیص خلق می کند) ولی حضور نامحسوس آن ها باعث افزایش Total Area می شود که باعث کاهش کاذب A1c (نرمال کاذب) و کاهش حساسیت تست می شود. برای مشاهده جزئی تر پیک ها از پیانو-کروماتوگرام همان بیمار در تصویر پایین استفاده شده است که در آن خط قرمز نشانگر یک گراف نرمال بوده و لذا این بیمار در زون ۰,۷۲ یک پیک نامحسوس HbE1c را نشان می دهد که با افزایش مساحت تام باعث بزرگی مخرج می شود. لازم به ذکر است که HbJ نیز همانند HbE دارای اثرات کاهش کاذب بر روی HbA1c می باشد. نیاز به بررسی Post Analytical جواب های HPLC و لذا افزایش حجم و هزینه آزمایش باعث شده تا این روش در برابر دو روش دیگر (بر اساس TINA و Affinity-HPLC) از قدرت کمتری برخوردار باشد ولی مزیت آن توانایی شناسایی همزمان هموگلوبینوپاتی ها می باشد. البته این ضعف نه تنها در Tsoh-G7/8، بلکه در Bio-RAD و Arkray و دیگر CE-HPLC ها نیز دیده می شود و الزاما نتایج نهایی می بایست با بررسی چشمی پیک های غیرطبیعی تایید شوند.

$$\% \text{HbA1c} = \frac{(\text{Area sA1c} - \text{area HbE1c})}{(\text{Total area} - \text{area HbE})} * 100$$



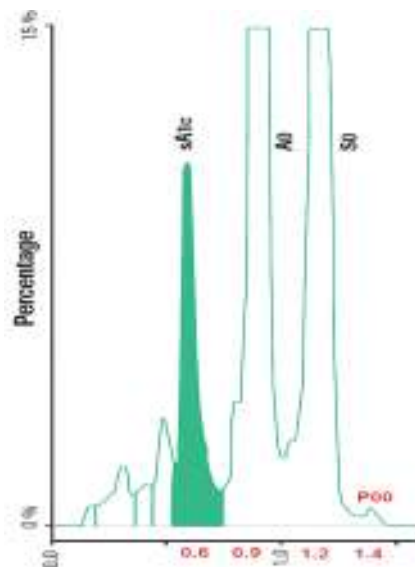
8- Numerator/denominator

شکل ۲۰: گاهی دستگاه پیک های ناشناسی را شناسایی می کند که به آن ها P00 می گوید. این پیک ها در شکل بالا یکی در تایم ۱,۴ (کروموگراف HbS/A) و یکی در تایم ۱,۰۶ (کروموگراف HbS/S) دیده می شوند که چون دستگاه آن ها را به عنوان HbX نمی شناسد، لذا از مخرج کم نکرده و به دلیل بزرگی مخرج باعث کاهش کاذب مقدار HbA1c می شود. در P00 با Time:1.4 میزان Area:5.06 می باشد که به سهم خود باعث بزرگی مخرج فرمول از ۱۷۹۰,۵۲ به ۱۷۹۵,۶۸ می شود. در واقع در بررسی A1c باید همه هموگلوبین های پاتولوژیک حذف و هموگلوبین های فیزیولوژیک باقی بمانند، لذا عدم شناسایی P00 در یکی از این دو دسته باعث کاهش کاذب A1c خواهد شد که این نوع HPLC قادر به اصلاح آن نمی باشد.



شکل ۲۱: در مورد CE های معمولی نیز در صورت مشاهده پیک HbX بهتر است درصد HbA1c نسبت به کل هموگلوبین (بجز X0+X1c) گزارش شود. دستگاه های سیبا کشور فرانسه برای کشورهای اندمیک هموگلوبینوپاتی شدیداً توصیه می شود، چرا که همزمان مقدار HbA2 و وجود هموگلوبین واریانت را نیز نشان می دهد. این دستگاه ها به حضور HbA1c کاذب و ناپایدار (L-A1c) ناشی از هیپرگلیسمی و نه دیابت اخیر (تا ۵٪)، کرمامیل هموگلوبین ناشی از بیماری اورمی (تا ۷٪)، استیل هموگلوبین ناشی از حاملگی، الکل و مصرف آسپرین (تا ۵٪)، HbF (تا ۱۵٪)، تریگلیسرید و شیلومیکرومی (تا ۱۶۰۰)، یرقان (تا ۱۷) غیر حساس بوده و تحت تاثیر

آن ها را به عنوان HbX نمی شناسد، لذا از مخرج کم نکرده و به دلیل بزرگی مخرج باعث کاهش کاذب مقدار HbA1c می شود. در P00 با Time:1.4 میزان Area:5.06 می باشد که به سهم خود باعث بزرگی مخرج فرمول می شود. در واقع در بررسی A1c باید همه هموگلوبین های پاتولوژیک حذف و هموگلوبین های فیزیولوژیک باقی بمانند، لذا عدم شناسایی P00 در یکی از این دو دسته باعث کاهش کاذب A1c خواهد شد. البته بیش از ۹۵,۵٪ هموگلوبین های واریانت تداخلی در نتایج HbA1c با دستگاه Tosoh ندارند. گاهی هموگلوبین های مینور دیگر مثل هموگلوبین کرمایله (در بیماران اورمی) و هموگلوبین استیله (در مصرف آسپرین، پنسیلین، الکل و حاملگی)، مقادیر بالای HbF، مصرف Vit-E، داپسون، داروهای آنتی ویرال و وجود HbA1c ناپایدار و قابل برگشت ناشی از هیپرگلیسمی (Labiell-A1c) نیز باعث تداخل در نتایج تست A1c می شوند که این نوع از دستگاه ها قادرند به میزان قابل قبولی آن ها را شناسایی و اصلاح کنند.



Item	Value
HbA1c	5.06
HbA2	0.00
HbF	0.00
HbS	0.00
HbX	0.00
HbX1c	0.00
HbX2c	0.00
HbX3c	0.00
HbX4c	0.00
HbX5c	0.00
HbX6c	0.00
HbX7c	0.00
HbX8c	0.00
HbX9c	0.00
HbX10c	0.00
HbX11c	0.00
HbX12c	0.00
HbX13c	0.00
HbX14c	0.00
HbX15c	0.00
HbX16c	0.00
HbX17c	0.00
HbX18c	0.00
HbX19c	0.00
HbX20c	0.00
HbX21c	0.00
HbX22c	0.00
HbX23c	0.00
HbX24c	0.00
HbX25c	0.00
HbX26c	0.00
HbX27c	0.00
HbX28c	0.00
HbX29c	0.00
HbX30c	0.00
HbX31c	0.00
HbX32c	0.00
HbX33c	0.00
HbX34c	0.00
HbX35c	0.00
HbX36c	0.00
HbX37c	0.00
HbX38c	0.00
HbX39c	0.00
HbX40c	0.00
HbX41c	0.00
HbX42c	0.00
HbX43c	0.00
HbX44c	0.00
HbX45c	0.00
HbX46c	0.00
HbX47c	0.00
HbX48c	0.00
HbX49c	0.00
HbX50c	0.00
HbX51c	0.00
HbX52c	0.00
HbX53c	0.00
HbX54c	0.00
HbX55c	0.00
HbX56c	0.00
HbX57c	0.00
HbX58c	0.00
HbX59c	0.00
HbX60c	0.00
HbX61c	0.00
HbX62c	0.00
HbX63c	0.00
HbX64c	0.00
HbX65c	0.00
HbX66c	0.00
HbX67c	0.00
HbX68c	0.00
HbX69c	0.00
HbX70c	0.00
HbX71c	0.00
HbX72c	0.00
HbX73c	0.00
HbX74c	0.00
HbX75c	0.00
HbX76c	0.00
HbX77c	0.00
HbX78c	0.00
HbX79c	0.00
HbX80c	0.00
HbX81c	0.00
HbX82c	0.00
HbX83c	0.00
HbX84c	0.00
HbX85c	0.00
HbX86c	0.00
HbX87c	0.00
HbX88c	0.00
HbX89c	0.00
HbX90c	0.00
HbX91c	0.00
HbX92c	0.00
HbX93c	0.00
HbX94c	0.00
HbX95c	0.00
HbX96c	0.00
HbX97c	0.00
HbX98c	0.00
HbX99c	0.00
HbX100c	0.00





شکل ۲۲: در روش TINA از آنتی بادی ضد چهار اسید آمینه ابتدایی و گلیکزه زنجیره بتا استفاده می شود. در این روش ابتدا RBC های حجم مشخصی از خون تام لیز شده و مقدار Total Hb آن محاسبه می شود. سپس آنتی بادی Anti-GlycoHb به همولیزانت افزوده می شود تا با اتصال به اسید آمینه های چهارتایی قنددار، کمپلکس محلولی را تشکیل دهد. در مرحله بعد با افزودن پلی هاپتن، این مولکول ها باعث تشکیل شبکه ای کدر از آنتی بادی های آزاد متصل نشده به Glyco-Hb می شوند که به روش توربیدومتری قابل سنجش می باشد. لذا هرچه مقدار HbA1c یا HbX1c ها بیشتر باشد، کمپلکس پلی هاپتن آنتی بادی کمتری تشکیل شده و مقدار توربیدیتی نیز کمتر می شود (نسبت عکس). در این تست چون سنجش Total-Hb و HbX1c همگی در یک کوت انجام می شود، لذا به *technology* twin-test^۲ نیز معروف است. گلوکز بعد از اتصال به والین و تشکیل باز شیف، به فرم آمادور 2-deoxyfructose-valine تبدیل می شود.

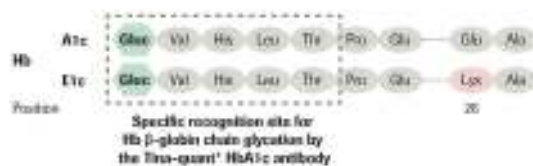
جدول ۱: تعدادی از هموگلوبین های واریانت که جهش در اسید آمینه های ابتدایی آنها شکل می گیرد (۱۷ مورد از کل ۱۵۸۵ واریانت شناخته شده در جهان)

Allele name	Sequence	Position	Description
Ala1	Ala	β 1	Found in the Indian population
Ala2	Ala	β 2	Found in the Indian population
Ala3	Ala	β 3	Found in the Indian population
Ala4	Ala	β 4	Found in the Indian population
Ala5	Ala	β 5	Found in the Indian population
Ala6	Ala	β 6	Found in the Indian population
Ala7	Ala	β 7	Found in the Indian population
Ala8	Ala	β 8	Found in the Indian population
Ala9	Ala	β 9	Found in the Indian population
Ala10	Ala	β 10	Found in the Indian population
Ala11	Ala	β 11	Found in the Indian population
Ala12	Ala	β 12	Found in the Indian population
Ala13	Ala	β 13	Found in the Indian population
Ala14	Ala	β 14	Found in the Indian population
Ala15	Ala	β 15	Found in the Indian population
Ala16	Ala	β 16	Found in the Indian population
Ala17	Ala	β 17	Found in the Indian population

در روش Affinity HPLC، از رزین های حاوی بورونات برای اتصال اختصاصی به HbA1c و HbX1c استفاده می شود. در نتیجه طی الونشن اول، هموگلوبین های A0+X0 (پیک ۱) و سپس گلیکوهموگلوبین های A1c+X1c (پیک

حضور آن ها قرار نمی گیرد، این در حالی است که موارد فوق در HPLC اثرات تداخلی بالایی دارند (در Sebia-CE با LA1c با A0 حرکت نموده و قابل تشخیص و تداخل نیست). لازم به ذکر است که هیپرگلیسمی و گلوکز ۱۰۰۰ است L-A1c یک فرد سالم را از ۱/۴ به ۵/۳٪ افزایش دهد ولی مقدار S-A1c فرد در ۵/۱٪ ثابت بماند. از طرفی دیگر، مقدار HbA2 در روش A1c دستگاه تا ۰/۳٪ کمتر از روش الکتروفورز هموگلوبین بوده و لذا مقادیر بالای ۲/۸٪ (نه بالای ۳/۳٪) به عنوان بتا تالاسمی مینور فرض می شود. در HPLC برخلاف CE باند A2 همراه A0 حرکت نموده و قابل سنجش نیست. در صورت مشاهده HbVAR یا باید اصلاحات انجام شود یا اینکه از ایمونواسی استفاده شود.

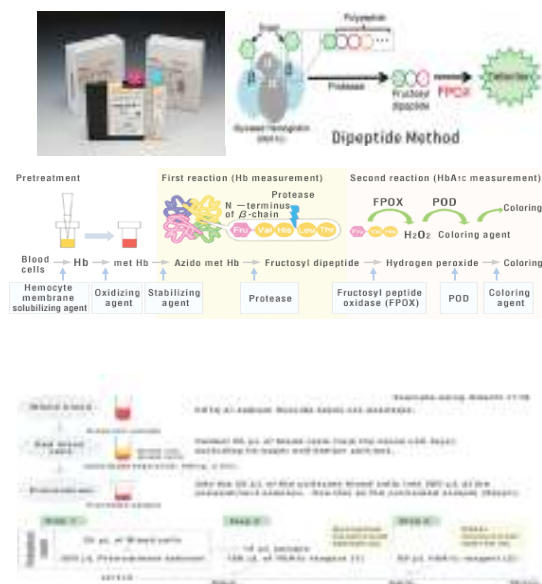
در تکنیک ایمونواسی به روش مهار توربیدومتری (TINA) شرکت Roche از آنتی بادی ضد چهار اسید آمینه ابتدایی و گلیکزه زنجیره بتا استفاده می شود. در این روش ابتدا RBC های حجم مشخصی از خون تام لیز شده و مقدار Total Hb آن محاسبه می شود. سپس آنتی بادی Anti-GlycoHb به همولیزانت افزوده می شود تا با اتصال به اسید آمینه های چهارتایی قنددار، کمپلکس محلولی را تشکیل دهد. در مرحله بعد با افزودن پلی هاپتن، این مولکول ها باعث تشکیل شبکه ای کدر از آنتی بادی های آزاد متصل نشده به Glyco-Hb می شوند که به روش توربیدومتری قابل سنجش می باشد. لذا هر چه مقدار HbA1c یا HbX1c ها بیشتر باشد، کمپلکس پلی هاپتن-آنتی بادی کمتری تشکیل شده و مقدار توربیدیتی نیز کمتر می شود (نسبت عکس). البته تعدادی از هموگلوبین های واریانت که در ۴ اسید آمینه ابتدایی دچار موتاسیون هستند، ممکن است در این روش شناسایی نشوند.



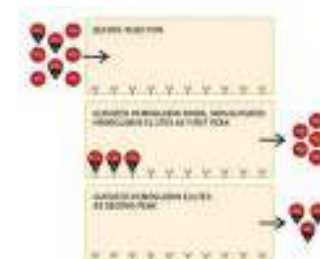
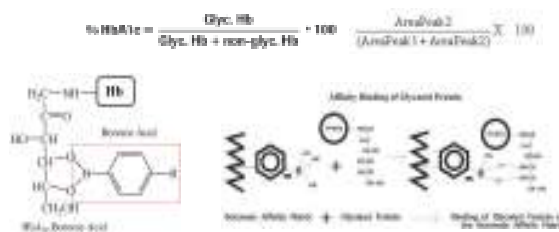
9- polyhapten (or agglutinator; a synthetic polymer with multiple copies of the immunoreactive portion of HbA1c) for freely available HbA1c-specific polyclonal antibodies.

از طریق گروه دیول خود به ستون متصل شده و HbA0 از ستون خارج (Elution) و در ۴۱۳nm قرائت می شود. سپس A1c از طریق بافر Exchange از ستون شسته شده (Re-elution) و نسبت آن ها با هم مورد محاسبه قرار می گیرد.

برخلاف روش های وابسته به افینیتی، دو روش CE و CE-HPLC نیاز به ارزیابی وجود HbX داشته و الزاما باید مقدار HbA1c اصلاح شود (با حذف HbX و HbX1c و غیرفیزیولوژیک از مخرج معادله و محاسبه نسبت و درصد A1c به کل هموگلوبین های فیزیولوژیک طبیعی). در واقع برای محاسبه دقیق HbA1c می بایست تمامی واریانت های غیرفیزیولوژیک از محاسبه نهایی حذف شوند، لذا عدم شناسایی یک باند یا حرکت همزمان آن با یک هموگلوبین فیزیولوژیک باعث بزرگی مخرج و کاهش کاذب HbA1c خواهد بود و توصیه می شود در این دو روش وجود یا عدم وجود HbX همواره به صورت چشمی بررسی شود (افزاینده حجم و هزینه کاری) یا با روش های دقیق، سریع و گاه گرانتر افینیتی محور (TINA و Affinity HPLC) جایگزین شود. روش TINA در ۲۳ ماه می سال ۲۰۱۳ گواهی FDA خود را با CV<1.4% برای تشخیص دیابت در ۵۰۰ میلیون بیمار هموگلوبینوپاتی گسترده در جهان (فراوانی کلی ۰.۷٪) دریافت نموده است.



از ستون خارج شده و نسبت گلیکوهموگلوبین ها به هموگلوبین تام مورد محاسبه قرار می گیرد. البته به دلیل اتصال برخی هموگلوبین های غیر از گلیکوهموگلوبین به ستون، مقدار این روش اغلب کمی بالاتر از مقدار واقعی قرائت می شود. از دستگاه های معروف HPLC در این زمینه می توان به ترینیتی بیوتک Premier سری Ultra-2 و Hb9210 اشاره نمود.

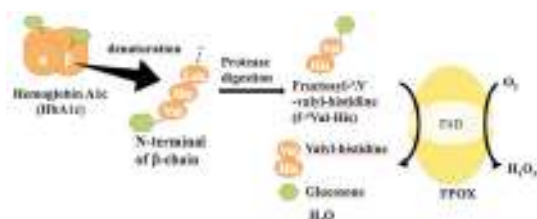


شکل ۲۳: هموگلوبین و پروتئین های قنددار به دلیل داشتن گروه ۱-۲-سیس دیول توانایی اتصال به ستون های ژله ای بورونات (مثل آمینوفیل بورونیک اسید) را داشته و از پروتئین های غیرگلیکولیزه تفکیک داده می شوند. بدین ترتیب HbA1c/X1c حین عبور از ستون حاوی بورونات،



نکند. در HbF از ۱۰ اسید آمینه ابتدایی فقط ۴ مورد شبیه بتا بوده و لذا HbF در مقادیر پایین با روش های افینیتی تداخل نمی آفریند.

$$\text{HbA1c(NGSP \%)} = 98.2 \times \text{HbA1c}(\mu\text{mol/L}) / \text{Hb}(\mu\text{mol/L}) + 1.97$$



شکل ۲۵: خلاصه روش آنزیماتیک مستقل از هموگلوبین واریانت



شکل ۲۶: دستگاه POC شرکت SIEMENS DCA-2000 مورد استفاده در سنجش HbA1c که با یک قطره خون EDTA دار کار کرده و خون ابتدا بعد از لانسیت زدن توسط Capillary holder حاوی EDTA برداشته شده و مثل یک خشاب سوار بر کارت ریج اپتیکال شده و وارد جایگاه مخصوص دستگاه می شود. ابتدا Hb توسط فری سیانید پتاسیم به M-Hb اکسید شده و سپس در حضور تیوسیانات به تیوسیان-مت هموگلوبین تبدیل و در داخل DCA Vantage در ۵۳۱nm مقدار هموگلوبین توتال سنجیده می شود. سپس آنتی بادی ضد لاتکس

شکل ۲۴: در روش آنزیماتیک (کیت Norudia N HbA1c)، ابتدا RBCها لیز شده و هموگلوبین به مت هموگلوبین اکسید شده و سپس با افزودن محلول R1 (حاوی سدیم آزاید) و تشکیل آزیدو مت هموگلوبین، مقدار هموگلوبین تام در ۵۷۰nm سنجش می شود. در مرحله بعد محلول R2 حاوی پروتئاز، دی پپتید فروکتوزیله را از انتهای NT زنجیره بتا جدا می کند که در حضور FPOX (فروکتوزیل پپتید اکسیداز)، O₂ و آب، تولید گلوکوزون، دی پپتید و H₂O₂ می کند. مقدار آب اکسیژنه در طول موج 660nm و در حضور ماده کروموفرنیک و پراکسیداز (POD) سنجیده می شود که مقدار آن با مقدار هموگلوبین گلیکوزیله نسبت مستقیم دارد. این کیت قابل نصب روی اتوآنالایزهای بیوشیمی مثل هیتاچی ۹۱۷ و ۷۱۷۰ نیز می باشد. وجود بیلی روبین، اسکوربیک اسید، شیلومیکرون و همچنین هموگلوبین واریانت، کربامیل و استیل و تزریق اخیر سرم قندی روی تست اثر ندارند. نمونه اولیه شامل خون EDTA دار یا هپارینه است که تا ۷ روز در یخچال پایدار بوده و بعد از تیمار با محلول شماره یک، تا ۸ ساعت در RT و تا ۲۴ ساعت در یخچال (و نه فریزر) پایدار است. در این تست خون را ۵ دقیقه در 800g سانتریفوژ کرده و سپس 25ul از قسمت پک سل آن برداشته و با 500ul از محلول Pretreatment مخلوط کرده و در ادامه ۱۲ لانداز آن را با 180ul محلول شماره یک مخلوط و هموگلوبین آن را سنجش می کنند (ΔOD 480-800 و ΔOD 660-800). سپس 60ul نیز از محلول شماره ۲ افزوده و رنگ ایجاد شده را اندازه گیری می کنند (ΔOD 660-800). مقدار نرمال هموگلوبین 90-310 μmol/L است که در مقادیر بالاتر از ۳۱۰، مقدار بافر پره تریتمنت را دو برابر و در مقادیر زیر ۹۰ مقدار بافر را نصف می ریزیم. بافرها می بایست دور از نور باشند و شست و شوی ظروف می بایست در حجم بالای آب باشد تا سدیم آزاید با فلزات ایجاد بخارات اسیدی

10- In the second reaction, hydrogen peroxide is produced by the action of fructosyl peptide oxidase (FPOX) on glycosylated dipeptide, and then causes color development by 10-(carboxymethyl aminocarbonyl)-3,7-bis (dimethylamino) phenothiazine sodium (coloring agent) in the presence of peroxidase (POD).

11- HbA1c: The absorbance is 0.050–0.100/min per 10 μmol/L of HbA1c. Hb: The absorbance is 0.10–0.30/min per 100 μmol/L of Hb

شکل ۲۷: استفاده از روش ELISA در سنجش مقدار HbA1c که در آن آنتی بادی مونوکلونال ضد HbA1c را به کف پلیت کوت کرده و پس از افزودن همولیزانت و اتصال A1c به آن ها، آنتی بادی ضد اپی توپ دیگر را پس از شست و شو و به صورت ساندریجی به آن می افزایند، در ادامه AHG ثانویه نشاندار با آنزیم گلوکز اکسیداز یا فلوروکروم را به پلیت افزوده و شدت رنگ یا فلورسنت را مورد سنجش قرار می دهند. در تصویر پایین که از چپ میکروآرای استفاده می کند، به موازات HbA1c، هموگلوبین تام نیز از طریق اپی توپ های عمومی مورد سنجش قرار می گیرد، سپس از طریق نسبت gHb/tHb درصد HbA1c مورد محاسبه قرار می گیرد.

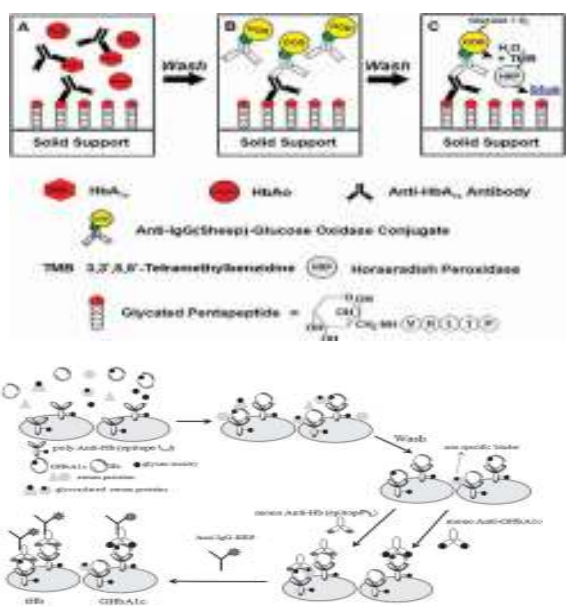
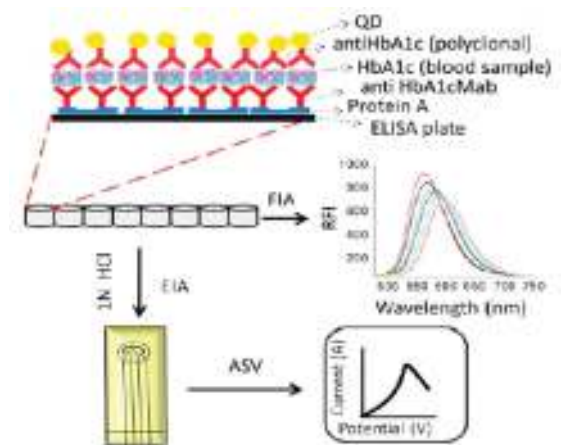


شکل ۲۸: روش دیگر در سنجش HbA1c استفاده از بیوالکترو آنالیزها هست که از بیوسنسورهای اوبتیکیال، میکروفلوپیدی، آمپرومتريک، الکتروشیمیایی و الکترودها و نانومتريال های نانوتیوب کربن و Nitrogen Doped grapheme (CSMB) و Core shell magnetic bionano particle (CSMB) Interdigitated Array (IDA) و ... استفاده می کند.



شکل ۲۹: در سنجش A1c به روش لاتکس، از آنتی بادی های ضد g-Hb (یا HbA1c) سوار بر لاتکس استفاده می شود، به طوری که حضور HbA1c و اتصال آن به آنتی بادی های مذکور باعث آگلوتیناسیون لاتکس ها می شود و

حاوی تترامر NT بتاگلوبین گلیکه در حضور A1c (حاوی تترامر گلیکه) خنثی شده و از قدرت آگلوتیناسیون آن کم می شود و هر چه مقدار A1c بیشتر باشد، مهار آنتی بادی و در نتیجه توانایی آگلوتیناسیون آن با لاتکس کمتر شده و باعث افزایش پراکنش نور در طول موج ۵۳۱ nm می شود که با مقدار قند و A1c نسبت مستقیم دارد (روش مشابه ایمنواسی TINA). اگر اندیکاتور کارتریج قرمز شد یا بیش از ۹۰ روز در RT ماند یا به دمای بالای ۴۰ درجه رسید، باید اوت شود. کارتریج در یخچال تا ماه ها پایدار بوده ولی قبل مصرف الزاما باید هم دمای محیط شود و تا یک ساعت بعد باز شدن حتما مصرف شود.



HbA1c پایین تر از مقدار واقعی خواهد بود. در مقابل، با افزایش سن گلبول های قرمز، تغییر جزئی دیگری نیز در هموگلوبین رخ داده و در جایگاه ۹۳ زنجیره بتا، گلوکاتیون به سیستمین متصل می شود که از آن به عنوان هموگلوبین AIII یاد می شود. در این هموگلوبین، با احتساب موارد فوق، هموگلوبین تغییر نیافته و تازه سنتز شده را می توان به صورت HbA0 نشان داد.

پس در کل چهار نوع HbA وجود دارد:

HbA0: هموگلوبین بدون تغییر تازه سنتز شده

HbA1: هموگلوبین گلیکه

HbA2: هموگلوبین بالغین نوع ۲ که از آلفا و دلتا

تشکیل شده است.

HbA: HbAIII یی که در گذر زمان، 93: Cys آن به گلوکاتیون متصل می شود که این نوع هموگلوبین توانایی بالایی در اتصال به NO دارد.

در برابر گلیکاسیون، یک روند دفاعی دگلیکاسیون توسط آنزیم فروکتوز آمین ۳ کیناز نیز وجود دارد که با فسفریلاسیون ریشه های فروکتوز لایزین و ناپایدار کردن آن باعث متلاشی شدن پروتئین مذکور و حذف پروتئازومی آن می شود. لذا در دیابت به دلیل بالا بودن روند فوق، تخریب پروتئینی داخل سلولی افزایش و سلول ها بیشتر تجزیه و لیز می شوند.

جهت افزایش میزان HbA1c نیاز به مدت ها افزایش گلوکز خون بوده و بسیار بعید و حتی غیر ممکن است که تزریق فرضا یک سرم قندی و یا افزایش حاد ولی موقت گلوکز قادر باشد میزان S-A1c را به میزان زیادی بالا برد ولی در مقابل میزان L-A1c به صورت موقت افزایش می یابد. به هر حال چون در افراد دیابتی میزان هموگلوبین SA1c بیش از افراد طبیعی می باشد، از آن جهت کنترل طولانی مدت بیماری استفاده می شود. از آن جایی که میزان بالای هموگلوبین A1c در افراد دیابتی،

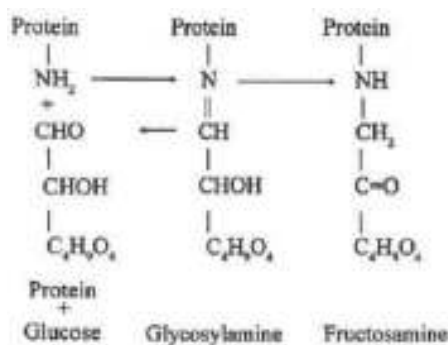
دیابت را مرتبط به این پدیده می دانند. از آنجایی که (i) نیمه عمر گلبول های قرمز به طور شاخص ۶۰ روز بوده و (ii) گلیکاسیون هموگلوبین نیز در دوران نورموپلاستی و اریتروسیستی انجام می شود و (iii) از آنجایی که آزمایش های قند خون ناشتا (FBS)، قند خون دو ساعته (2h.pp) و تست تحمل گلوکز (GTT) مقدار قند خون بیمار و میزان افزایش آن را تنها در لحظه نمونه گیری نشان می دهند، لذا اندازه گیری میزان HbA1c انعکاسی از متوسط غلظت گلوکز خون بیمار طی ۶ تا ۸ هفته قبل (یا ۲ ماه اخیر) بوده و اطلاعات با ارزشی را در مورد کنترل بیماران دیابتی فراهم می آورد، به همین دلیل آزمایش HbA1c به مراتب ارجح تر و نتایج آن تفسیر بهتری از وضعیت قند خون بیمار را به پزشک ارائه می نماید، ولی خطای ۱٪ در میزان A1c با تغییر 1.6mmol/L متوسط قند بیمار همراه می باشد^{۱۱}.
دیابت I (فقدان انسولین مترشحه از جزایر لانگرهانس) نیاز به غربالگری نداشته ولی دیابت II (مقاومت به انسولین) در افراد ۷۰-۴۰ ساله چاق و کم تحرک نیاز به غربالگری سالانه (بر اساس نظر سرویس پیشگیری و سلامت) یا هر سه سال یک بار (بر اساس نظر ADA) دارد. طبق تعریف، به کسی که دارای HbA1c > 6.5، GTT(75gr Glu) > 200، BS > 200، FBS > 126 و علائم بالینی پرنوشی، پرادراری، تاخیر ترمیم زخم، تاری دید، رخوت، کاهش وزن، بی حسی، بیماری های قلبی-عروقی و نوروپاتی باشد، دیابتیک گفته می شود که از ریسک فاکتورهای دیابت نیز می توان به چاقی، کم تحرکی، افت HDL، افزایش تری گلیسرید، سن بالای ۴۵، اختلال خواب، کبد چرب، تجویز کورتون، درمان ضد افسردگی، هیپر تانسیون و ... اشاره نمود.

با توجه به مطالب فوق، غلظت HbA1c بستگی مستقیم به طول عمر گلبول قرمز و غلظت قند در ۳-۲ ماه اخیر دارد، لذا در افرادی که طول عمر گلبول های قرمز آن ها کاهش می یابد (مثل آنمی های همولیتیک)، میزان

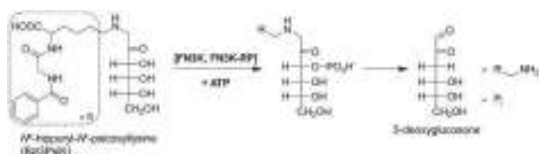
12- HbA1c deviation of 1% reflects a change of 1.4 – 1.9 mmol/L in average blood glucose concentration.



کربن سوم، باعث ناپایداری و جدا شدن آن از پروتئین می شود و لذا نیمه عمر کمتری دارد (۲۰ روز). علی رغم مزایای محدود تست فروکتوز آمین، مقدار آن به ندرت از نظر بالینی (حتی در افراد مبتلا به هموگلوبینوپاتی یا سایر اختلالات سلول های قرمز) اندازه گیری می شود چراکه نیمه عمر آن ۴-۱ هفته ای بوده ولی داروهای دیابت به چندین ماه زمان برای پایدار شدن نیاز دارند (به استثناء بارداری که نیازهای دارویی می تواند سریع تر تغییر کند). دوم اینکه، فروکتوز آمین دارای تغییرات بالاتری نسبت به آزمایش های A1c می باشد. سوم اینکه، اکثریت مطالعات در مورد مراقبت از دیابت بر اساس سنجش A1c انجام می شود که می تواند نتایج فروکتوز آمین برای تفسیر آن را مشکل سازد. چهارم این که، آزمون A1c به خوبی استاندارد شده و به دلیل استفاده تقریباً جهانی، قابل اعتماد است ولی برای پایش دیابت خیلی اخیر، یا پایش دیابت در بیماران کلیوی (ESRD) و حامله در کل آلبومین گلیک به تست فروکتوز آمین بهتر پاسخ می دهد.



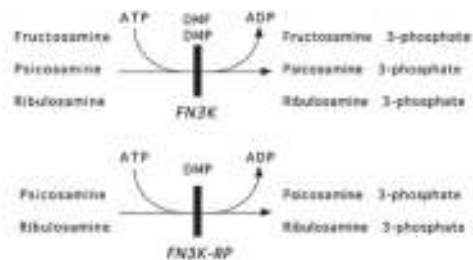
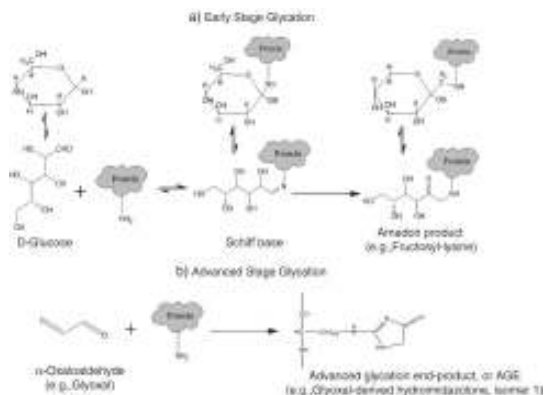
شکل ۳۱: روند تشکیل فروکتوز آمین



13- fructosamine, glycated serum albumin or self-monitoring of blood glucose

14- Fructosamine 3-kinase (FN3K) and FN3K-related protein (FN3K-RP), an enzyme that phosphorylates psicosamines and ribulosamines, but not fructosamines, on the third carbon of their sugar moiety. Protein-bound psicosamine 3-phosphates and ribulosamine 3-phosphates are unstable, decomposing at pH 7.1 and 37 °C with half-lives of 8.8 h and 25 min respectively, as compared with 7 h for fructosamine 3-phosphates.

مقادیر ناچیز هموگلوبین های A1a و A1b موجود در گلبول های قرمز را تحت الشعاع قرار می دهد، لذا می توان به جای اندازه گیری HbA1c، مجموعه هموگلوبین های سریع را اندازه گیری نمود. هر چند درصد هموگلوبین های سریع و یا A1 را می توان با روش کروماتوگرافی تعویض یونی (میکروستون) یا حتی HPLC اندازه گیری نمود اما، روش های بیوشیمیایی نفولومتری به دلیل افینیتی نسبت به g-Hb دقیق تر بوده و دستگاه و کیت های تجارتي آن نیز در بازار موجود می باشند. یکی از معایب مهم همه تکنیک های سنجش g-Hb، بیماری های خونی می باشند که کاهش یا افزایش عمر RBC بر روی آن ها تاثیر می گذارد. در واقع وقتی که در آنمی همولیتیک، عمر RBC به زیر ۲۵ روز کاهش یافته و فرصت گلیکاسیون هموگلوبین کمتر می شود، با هر روشی هم که بخواهیم HbA1c را بسنجیم، مقدار آن کاهش خواهد داشت، لذا می بایست از یک پارامتر دیگر مثل آلبومین گلیک به جای هموگلوبین گلیک، از آلبومین گلیک (GSA) و روش فروکتوز آمین و پایش روتین قند خون^{۱۳} برای مونیورینگ دیابت استفاده نمود. البته تست فروکتوز آمین پایش قند خون در دوره کوتاه تری از گذشته (۳-۱ هفته بعد) انجام داده و همانند A1c پایش ۳-۲ ماهه را نمی کند. A1c حدود ۶٪ معادل قند خون 120mg/dl بوده و هر ۱٪ تغییر در آن معادل 30mg/dl تغییر در قند خون می باشد. مقدار نرمال فروکتوز آمین به شرط آلبومین نرمال 5g/dl حدود 200-285 umol/L می باشد که معادل A1c آن برای هر غلظت در جدول ۴ نشان داده شده است. در واقع هر 75mol تغییر در فروکتوز آمین معادل ۲٪ تغییر در HbA1c و 60mg/dl تغییر در قند خون هست. آنزیم FN3K (و تا حدودی FN3K-RP)^{۱۴} با فسفریلاسیون فروکتوز آمین در



شکل ۳۲: روند تجزیه مجدد فروکتوز آمین و مولکول های مشابه به 3DG و Pi و لایزین

شکل ۳۳: ساختار آلبومین گلیکه (GSA) و انواع AGEs (در صورت تداوم هایپرگلیسمی تشکیل شده و باعث بروز ناهنجاری های مختلفی از جمله عوارض بینایی، زخم پا، پلاک آترواسکلروز و افزایش استرس اکسیداتیو می شوند). فروکتوز آمین ترکیبی تشکیل شده از قند و پروتئین است که از واکنش غیر آنزیمی گلوکز با گروه های آمین پروتئین ها تشکیل و ترکیبات واسطه ای به نام آلدیمین ها (Aldimine) را می سازد. این آلدیمین ها، کتو آمین های پایداری به نام فروکتوز آمین ها را تشکیل می دهند. میزان گلیکاسیون غیر آنزیمی پروتئین ها در داخل بدن متناسب با غلظت گلوکز در طول عمر پروتئین است. از آنجایی که آلبومین فراوان ترین پروتئین سرم است، لذا GA می تواند نسبت بالایی از فروکتوز آمین ها را تشکیل دهد. آلبومین گلیکه به عنوان بیومارکر جایگزین برای HbA1c پیشنهاد می شود. GA یک شاخص کنترل گلیکاسیون است که بسیاری از معایب بیومارکر HbA1c را ندارد و انتظار می رود که با جمع آوری مشاهدات بیشتر در مطالعات تحقیقاتی بزرگ و بررسی فاکتورهای اثر گذار روی GA، این بیومارکر به عنوان یک شاخص بررسی وضعیت گلیکاسیون جایگزین HbA1c شود. GA هم می تواند بازتابی از تغییرات گلوکز پلاسما ولی در مدت زمان کوتاه تر (طی ۲-۳ هفته گذشته) باشد که این ویژگی حساسیت آن را نسبت به تغییرات سریع سطح گلوکز خون نشان می دهد. اما در شرایطی که بیمار با اختلالات متابولیسم آلبومین مانند سیروز کبدی، اختلالات تیروئید، سندروم نفروتیک، هیپراوریسمی، افزایش تری گلیسیرید، مصرف

جدول ۴: تبدیل مقادیر A1C و فروکتوز آمین به یکدیگر

Approximate Comparison of Glucose, Fructosamine, & A1C		
Glucose (mg/dl)	Fructosamine (umol)	A1C (%)
90	212.5	5.0
120	250	6.0
150	287.5	7.0
180	325	8.0
210	362.5	9.0
240	400	10
270	437.5	11.0
300	475	12.0
330	512.5	13.0
360	550	14.0
390	587.5	15.0

جدول ۴: کاربرد روش های مختلف پایش A1C و دیابت در شرایط مختلف بالینی

اساس تست	افراد نرمال	هموگلوبین واریانت و تالاسمی	بیماری های اریتروسیستی	نقص متابولیسم فروکتوز و پایش مزمن
HPLC و CE	+	-	-	+
ایمونواسی و آنزیم اسی	+	+	-	+
فروکتوز آمین	+	+	+	-



و هموگلوبین خون ندارد. همچنین می توان در شرایطی خاص و به عنوان جایگزین، از GA به روش فروکتوزآمین برای بررسی دیابت استفاده کرد که در اندازه گیری GA نیز باید به وجود بیماری هایی که روی متابولیسم و میزان آلبومین اثر گذار هستند، توجه شود که با در نظر گرفتن همزمان شرایط بیمار و نتایج تست ها، می توان وجود نتیجه کاذب را در هر دو تست مشخص نمود. با مطالعات انجام شده می توان نتیجه گرفت که حتی بیومارکر GA نیز می تواند در شرایطی خاص نامعتبر باشد و بازتاب درستی از وضعیت گلیکاسیون را به ما نشان ندهد و به دلیل استانداردسازی های انجام شده روی تست HbA1c، با وجود ارائه نتایج کاذب، همچنان این تست برای پایش دیابت در اولویت قرار دارد.

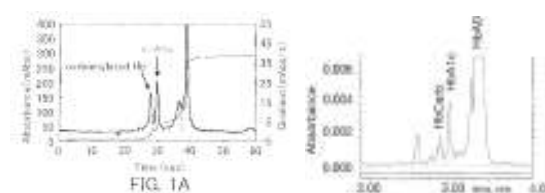
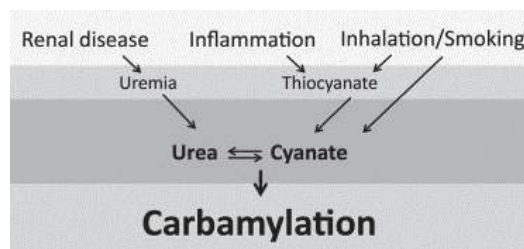
تفسیر نتایج

از آنجایی که علاوه بر دیابت، در بیماران اسپلنکتومی (منجر به افزایش عمر RBC) و همچنین در بیماران که به علت نارسایی مزمن کلیه دیالیز می شوند، مقادیر HbA1c و AGE ها به دلیل عدم کلیرانس و تجمع آن ها، افزایش می یابد، لذا در تفسیر نتایج به دست آمده باید جانب احتیاط را رعایت نمود. کربامیل هموگلوبین ناشی از اورمی بیماران کلیوی یا ناشی از تیوسیانات التهاب و دخانیات نیز به دلیل نزدیکی پیک کربامیل هموگلوبین به HbA1c اغلب می تواند باعث تداخل و افزایش کاذب A1c شود. البته در بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیه که هنوز به حد دیالیز نرسیده و یا دیالیز آن ها دیر شده باشد، ممکن است مقادیر به دست آمده کمتر از میزان واقعی باشند. هموگلوبین F نیز همانند HbA1c دارای اندکی شارژ مثبت بوده و به همراه A1c، ستون کروماتوگرافی تعویض یونی را ترک می کند، لذا مقادیر هموگلوبین های سریع به دست آمده از روش فوق در بیماران که دارای مقادیر بالای HbF هستند (مثل تالاسمی ماژور، نوزادان، بیماری HPFH و دیگر تالاسمی های اینترمدیا)، افزایش کاذبی خواهد داشت. آنمی های هیپوپرولیفراتیوی مثل آپلاستیک، آنمی فقر آهن و آنمی مگالوبلاستیک به دلیل افزایش عمر RBC و یرقان یا افزایش تری گلیسرید به

گلوکورتیکوئیدها و ... همراه باشد و سطح آلبومین سرم نیز تغییر کند، همانند HbA1c می تواند نتایج کاذبی را به ما نشان دهد. با وجود مزایای محدود تست فروکتوزآمین برای اندازه گیری GA، مقدار آن به ندرت در آزمایشگاه اندازه گیری می شود. همچنین به دلیل اینکه معمولاً مطالعات برای کنترل دیابت براساس سنجش HbA1c انجام می شود، تفسیر نتایج تست فروکتوزآمین را کمی مشکل می سازد ولی در شرایطی، برای پایش دیابت در بیماران کلیوی و افراد باردار به دلیل تغییر سریع نیازهای دارویی می توان از آن به عنوان جایگزین استفاده کرد. برای بررسی میزان تاثیر آنمی فقر آهن روی سطح GA مطالعات گسترده ای انجام شد، در یکی از این پژوهش ها با استفاده از روش مطالعه مورد-شاهدی بین افراد غیر دیابتی با آنمی فقر آهن و بدون آنمی فقر آهن، نمونه خون محیطی سیاهرگی از افراد انتخاب شده (۸-۱۰ ساعت ناشتا) گرفته شد و با روش های آزمایشگاهی و تست های آماری مخصوص نتایج در جدولی گردآوری و تفسیر نتایج اعلام شد. با توجه به نتایج اعلام شده، سطح آلبومین ارتباط مستقیم با سطح هموگلوبین خون دارد، بنابراین می توان مطرح کرد که در آنمی فقر آهن به دلیل وضعیت تغذیه، سطح آلبومین سرم هم کاهش یابد. آلبومین از گلیکاسیون در برابر پروتئین های آزاد دیگر مثل انسولین و آپومیوگلوبین محافظت می کند و لذا افزایش سطح آلبومین پلاسما، به صورت رقابتی از گلیکاسیون دیگر پروتئین ها مانند هموگلوبین جلوگیری می شود. وقتی سطح آلبومین آزاد طی آنمی فقر آهن کاهش می یابد، سطح GA و HbA1c بالا می رود، در صورتی که میزان گلوکز خون در محدوده طبیعی خود قرار دارد. بنابراین میزان GA نیز می تواند به دلیل آنمی فقر آهن به طور کاذب افزایش یابد. در نتیجه وقتی برای بررسی و کنترل قند خون، HbA1c درخواست می شود، بهتر است در افرادی که با بیماری های خونی و به ویژه انواع آنمی ها مواجه هستند، به دلیل تاثیر گذاری کاهش یا افزایش عمر RBC ها روی نتایج، میزان هموگلوبین هم ارزیابی شود تا با مقایسه داده ها، مشخص شود که تغییرات سطح HbA1c نشان دهنده وضعیت گلیکاسیون آن ها توسط قند خون بوده و ارتباطی با کاهش یا افزایش عمر اریتروسیت ها

صورت کاذب باعث افزایش مقدار HbA1c شده و در مقابل، سوء تغذیه، خونریزی، نارسایی مزمن کبد، آنمی همولیتیک، حاملگی، درمان AIDS (افزاینده HbF) و تجویز ویتامین های آنتی اکسیدان E/C می توانند باعث کاهش مقدار HbA1c شوند. به طور کلی، با هر روشی که کروماتوگرافی تعویض یونی صورت پذیرد، (خواه به روش ماکرو و خواه با تکنیک میکرو)، غلظت یونی و pH بافر از اهمیت بسیار ویژه ای برخوردار بوده و باید کاملاً دقت شود که کوچک ترین تغییری در مقادیر آن‌ها خواه در اثر ورود وسایل آلوده و خواه به علت ماندن در حرارت اطاق روی ندهد. محدوده کمتر از ۵/۷٪ آن به عنوان نرمال، محدوده ۶/۴-۵/۷٪ به عنوان شرایط پره دیابتیک و محدوده بالای ۶/۵٪ به عنوان شرایط دیابتیک شناخته می شوند.

به گلوکز باعث کاهش مقدار HbA1c می شوند، این در حالی است که غلظت بقیه هموگلوبین های مینور مثل HbF1c یا HbS1c افزایش می یابد. در چنین مواردی استراتژی تعیین مقدار HbA1c نادرست بوده و می بایست یا مجموع هموگلوبین های گلیکه (A1c+X1c) مورد سنجش قرار بگیرند یا اینکه از روش های آنزیماتیک و ایمونواسی یا معادل های دیگر گلیکه مثل آلبومین گلیکه و فروکتوز آمین استفاده شود. هموگلوبین های گلیکه برخی مواقع می توانند باعث اشتباهات و سردرگمی های تشخیصی نیز بشوند مثلاً ممکن است در تکنیک HPLC، یک هموگلوبین گلیکه خصوصیات یکسانی با دیگر هموگلوبین های نرمال یا واریانت نشان بدهد (مثل S1c و A0) و به همین ترتیب ممکن است HbS گلیکه خیلی نزدیک به HbA شویش شده و به دلیل رتشنن تایم مشابه، با آن اشتباه گرفته شود.



شکل ۳۴: کربامیل هموگلوبین با زمان الوشن ۲/۸۸ دقیقه ای در روش HPLC با رزولیشن بالا می تواند به راحتی از A1c با زمان الوشن ۳/۰۱ دقیقه تفکیک شود. این بیمار دیابتیک و اورمیک با سطح اوره 54mmol/L می باشد. گلیکاسیون امری غیر قابل برگشت بوده اما با این وجود، اثر عمده ای روی عملکرد هموگلوبین ندارد ولی میل اکسیژنی آن به خاطر معیوب شدن برهمکنش آن با 2,3DPG مختصری افزایش پیدا می کند. نه تنها HbA بلکه سایر هموگلوبین های نرمال و واریانت نیز می توانند گلیکه شوند که گاهی این حالت به دلیل رقابت بر سر اتصال

جدول ۵: علل افزایش و کاهش واقعی و ظاهری درصد HbA1c		
درصد کاهش یافته	درصد افزایش یافته	
افراد نرمال یا تحت درمان	دیابت ملیتوس	واقعی
حضور انواع واریانت های هموگلوبین که باعث کاهش باند A و تشکیل باند واریانت می شوند. مثل: HbS, HbC, Hb Takamatsu, HbG-Szaha, Hb Himemeyi, HbO-Padova, Hb-Camden, HbG-Coushatta	حضور هموگلوبین واریانت با زمان احتباس برابر با HbA1c که با آن همیشانی دارد.	کاذب (ظاهری)
کاهش طول عمر گلبول های قرمز و رتیکولوسیتوز (آنمی همولیتیک) با منشاء ایمون و غیرایمون (ممبرانوپاتی، آنزیموپاتی، هموگلوبینوپاتی، مالاریا و ...) خونریزی درمان با آریتروپوئیتین اسپلنومگالی و هیپراسپلینسم انتقال خون اخیر حاملگی آر تریت روماتوئید افزایش تری گلیسرید درمان HIV با داروهای آنتی ویرال بیماری مزمن کبدی تجویز دوز پایین آسپرین تجویز ویتامین E و C برخی داروها (داروهای اکسیدان مثل داپسون و ریباویرین)	آنمی فقر آهن عفونت با HIV حضور جمعیت مسن از گلبول های قرمز مثل آنچه در ابتلاء به آپلازی خالص گلبول های قرمز دیده می شود که در آن عمر گلبول های قرمز بالا می رود. اسپلنکتومی الکلیسم (افزایش سطح گلیکاسیون و کربامیلاسیون) نارسایی کلیوی و اورمی افزایش بیلی روبین و تریگلیسرید* دوز بالای آسپرین هیپرگلیسمی و افزایش LA1c (گاها) برخی داروها	حقیقی

* احتمالاً به دلیل ناپایداری هموگلوبین و بروز همولیز یا به دلیل تغییر اسید آمینه هایی که مورد هدف گلیکوزیلاسیون قرار می گیرند. در کل هموگلوبینوپاتی ها بسته به نوع، می توانند هم باعث کاهش و هم افزایش کاذب A1c شوند. * در برخی منابع، افزایش TG با افزایش کاذب A1c ذکر شده است. همان طوریکه اشاره شد، در بیماران مبتلا به آنمی



همولیتیک، میزان HbA1c نسبت به مقدار طبیعی آن کاهش دارد، چرا که گلیکاسیون با متوسط عمر گلبول های قرمز در ارتباط بوده و طی گذر زمان افزایش پیدا می کند، به عبارتی طی عمر ۲۰ روزه گلبول های قرمز، به تدریج هموگلوبین های داخل آن گلیکه می شوند، از این رو، تخریب زودرس اریتروسیت ها در اثر آنمی همولیتیک و تولید سلول های جدید با سطح هموگلوبین گلیکه پایین، باعث کاهش مقدار کلی HbA1c می شود. در اریتروبلاستوپنی گذرای کودکان و آنمی آپلاستیک که عمر جمعیت سلولی گلبول های قرمز افزایش پیدا می کند، میزان HbA1c بیشتر از حد طبیعی می شود. در آنمی فقر آهن و عفونت با ویروس HIV نیز میزان آن به صورت قابل توجهی افزایش پیدا می کند (۵/۹۱±۰/۲ در برابر ۷/۴±۰/۲ نرمال). مقدار

Hb-S1c (گلیکه) در بیماران دیابتی مبتلا به آنمی سلول های داسی حدود ۷۵٪ از کل هموگلوبین های گلیکه بوده و مابقی آن ها را HbF1c و HbA2c تشکیل می دهند. در این بیماران، هر چند مقدار HbS1 تا ۲ برابر افراد غیر دیابتی افزایش دارند، ولی در کل به دلیل نیمه عمر پایین سلول های داسی و بروز آنمی همولیتیک، مقدار کلی هموگلوبین های گلیکه نصف افراد دیابتی غیر مبتلا به آنمی داسی شکل می باشد. مقدار HbA1c در نوزادان نارس (30-36W) کمتر از نوزادان رسیده و فول ترم (40W) می باشد. به طور مشابه، میزان استیلاسیون HbA نیز در نوزادان نارس کمتر بوده ولی با افزایش سن سلول و افزایش تعداد F سل ها، میزان آن افزایش می یابد.

References:

- 1- Sacks DB. A1C versus glucose testing: A comparison. *Diabetes Care* 2011;34:518–23.
 - 2- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lennmark A, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2023;46:151–99.
 - 3- Rhea JM, Molinaro R. Pathology consultation on HbA(1c) methods and interferences. *Am J Clin Pathol* 2014;141:5–16.
 - 4- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2015;38:8–16.
 - 5- Chen Z, Shao L, Jiang M, Ba X, Ma B, Zhou T. Interpretation of HbA1c lies at the intersection of analytical methodology, clinical biochemistry and hematology (Review). *Exp Ther Med* 2022;24:707.
 - 6- Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R. Glycosylated hemoglobins (GHb): An index of red cell survival. *Blood* 1982;59:1348–50.
 - 7- Polgreen PM, Putz D, Stapleton JT. Inaccurate glycosylated hemoglobin A1C measurements in human immunodeficiency virus-positive patients with diabetes mellitus. *Clin Infect Dis* 2003;37:53.
 - 8- Brown JN, Kemp DW, Brice KR. Class effect of erythropoietin therapy on hemoglobin A(1c) in a patient with diabetes mellitus and chronic kidney disease not undergoing hemodialysis. *Pharmacotherapy* 2009;29:468.
 - 9- Ng JM, Cooke M, Bhandari S, Atkin SL, Kilpatrick ES. The effect of iron and erythropoietin treatment on the A1C of patients with diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes Care* 2010;33:2310–13.
 - 10- Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005;51:776–78.
 - 11- Lo C, Lui M, Ranasinha S, Teede HJ, Kerr PG, Polkinghorne KR, et al. Defining the relationship between average glucose and HbA1c in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;104:84–91.
 - 12- Kohne E. Hemoglobinopathies: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:532–40.
 - 13- Thachil J, Owusu-Ofori S, Bates I. Haematological diseases in the tropics. *Manson's Tropical Infectious Diseases* 2014;65:894–932.
 - 14- Tirthankar S, Viswanathan M, Ranjit U. An unusual case of nonmeasurable glycosylated hemoglobin (HbA1c) by high-performance liquid chromatography in a type 2 diabetes. *Journal of Diabetology* 2022;13:129–32.
 - 15- Hegde SN, Srikousthubha MS, Anupama YJ. A case of undetectable glycated hemoglobin (HbA1C). *QJM* 2018;111:567–68.
 - 16- John J, Sakarde A, Chafle J, Amle D, Jose J, Sakhare V, et al. An assessment of the utility of serum fructosamine in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *Cureus* 2023;15:33549.
 - 17- Effect of Iron Deficiency Anemia on Glycated Albumin Levels: A Comparative Study in Nondiabetic Subjects with Iron Deficiency Anemia. *Journal of Laboratory Physicians*. 2023 Jun; 15(2): 253–258.
 - 18- Chromatographic Pattern of Glycated Hemoglobin Seen in a Patient Population at the Outpatient Clinic of a Nigerian Tertiary Hospital. *IOSR Journal of Dental and Medical Science*. 2013 November – December; PP 55-59
 - 19- Albumin Abundance and Its Glycation Status Determine Hemoglobin Glycation. *ACS Omega*. 2018 October;12999–13008
 - 20- Non-enzymic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients. *Clin Chem*. 1987 Dec; 33(12):2220-4
- Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2022 May;61(3):296-304