زهرا رخشیدن: کارشناس آزمایشگاه و کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز بهداشت شهرستان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
سپیده اصول دینی: کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت شهرستان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
خلیل خندان: کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت شهرستان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

گذری بر روش های اندازه گیری هموگلوبینA1c

دیابت یا هیپرگلیسمی مزمن، می تواند منجر به ناهنجاری های پایداری مانند: رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی شود. در سایه ی دگرگونی در شیوه زندگی مردمان جهان، این بیماری به یک اپیدمی جهانی تبدیل شده است. شدت عوارض دیابت دارای وابستگی مستقیمی به اندازه ی میانگین قندخون و با غلظت HbA1c، است. بدین روی غلظت HbA1c ابزار تشخیصی باارزشی جهت پایش کنترل درازمدت قندخون بشمار می رود. روش های سنجش غلظت HbA1c به گونه ی گونه گونی گسترش یافته است. با همه ی تنوع این روش ها، بسیاری از این روش ها دارای دقت و صحت مورد پذیرشی دارند. این افزایش کیفیت روش ها، باعث شده است که آزمون اندازه گیری HbA۱c ، به طور روزافزون در تشخیص دیابت و کنترل دقیق بیماران دیابتی زنان باردار استفاده شود. بی گمان انجام آن در آزمایشگاه ها، دارای اعتبار بیشتری از انجام آن در محل مراقبت از بیماران دارد.

نمونه گیری برای اندازه گیری غلظت HbA1c

♦برخلاف نمونه‌های گلوکز، نمونه‌های HbA۱ را می‌توان به راحتی جمع آوری و ذخیره کرد. خون را می‌توان هر زمان بدون احتیاط از بیماران گرفت. خون گرفته شـــده از ورید یا خون گرفته شده از انگشت به وسیله لوله‌های موئینه، مناسب است. ضد انعقاد باید EDTA باشد، مگر اینکه شرکت سازنده ماده خاصی را مشخص کند. پایداری نمونه بستگی به روش مورداستفاده دارد.

♦روش HPLC بسیار حساس به اثر زمان است. حتی اگر نمونه اندکی همولیز داشته باشد برخی آزمون‌های POC نمی‌توانند اندازه گیری کنند.

♦خون معمولاً به مدت ۱ هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار است. خون ذخیره شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد به مدت ۱ سال پایدار است. ذخیره خون در ۷۰- درجه سانتیگراد دارای اثرات مضر بوده و باید اجتناب شود.

روش‌های اندازه گیری غلظت HbA1c

۱- روش جداسازی فراکسیون هموگلوبین

HbA1c و شکل غیرگلیکوزیله هموگلوبین خواص شیمیایی متفاوتی دارند که اجازه جداسازی فراکسیون‌ها و تعیین کمیت HbA1c را می‌دهد. این اصل و اساس در کروماتوگرافی تعویض یونی (IES)، الکتروفورز موئینه (CE) و کروماتوگرافی تمایلی (AC) کاربرد دارد.

➢ **کروماتوگرافی تعویض یونی (IES)**

PH ایزوالکتریک (PI) HbA1c و Hb به مقدار ۰/۰۲ واحد با هم اختلاف دارند. این تفاوت جهت جداسازی HbA1c از Hb غیرگلیکوزیله با روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) کافی است. با IEC، هموگلوبین جنینی (HbF)، هموگلوبین جزئی سریع (HbA1a/b) و Hb کربامیله (HbCarb) و واریانت‌های ژنتیکی مثل Hb سلول داسی شکل را می توان مشاهده کرد.

➢ **الکتروفورز موئینه (CE)**

این روش از اختلاف بارالکتریکی بین HbA1c و دیگر فراکسیون‌های Hb استفاده می‌کند. جداسازی از راه میدان الکتریکی با ولتاژ بالا و جریان الکترواسموتیک امکان پذیر است.

کروماتوگرافی تمایلی(AC)

در این روش، هنگامی که Hb غیرگلیکوزیله آزادانه از ستون بسته بندی شده با ذرات پوشیده از اسید بوریک، رد می‌شود، HbA1c به علت تمایل مولکول‌های Hb گلیکوزیله به اسید بوریک در ستون باقی می‌ماند که اساس جداسازی است. افزون بر والین انتهای N-ترمینال زنجیره β (HbA1c)، گلوکز اً به ۱۵ ریشه لیزین موجود در Hb نیزمتصل می‌شود. درمجموع، این Hb های گلیکوزیلهء نصف تمام مولکول‌های HbA1c قابل تشخیص را تشکیل می دهند.

۲- روش‌های شیمیایی

در تست‌های شیمیایی، غلظت HbA1c بر پایه ی واکنش شیمیایی اختصاصی والین گلیکوزیله ی انتهای N-ترمینال زنجیره β، اندازه گیری می‌شود. غلظت تام Hb نیز هم راستا با HbA1c ، به روش فتومتری اندازه گیری می‌شود، بنابراین دو تست مستقل، تست HbA1c و تست Hb تام، جهت محاسبه غلظت HbA1c موردنیاز است. این روش اساس سنجش‌های ایمونوشیمیایی و آنزیمی است.

۳- سنجش ایمنی(IA)

در IA، مقدار زیادی آنتی بادی ضد- HbA1c به نمونه همولیز اضافه می‌شود. پس از اتصال آنتی بادی به HbA1c، آنتی بادی اضافی آگلوتینه می‌شود. کدورت کمپلکس‌های ایمنی حاصله با استفاده از کدورت سنج یا نفلومتر به روش نورسنجی اندازه گیری می‌شود. به طور موازی غلظت Hb تام به روش دورنگی در فاز پیش انکوباسیونی اندازه گیری می‌شود.

٤- سنجش آنزیمی

در این روش یک پروتئاز زنجیره β را برش داده و پپتیدها را آزاد می‌کند. پپتیدها(معمولاً دی پپتید) با فروکتوزیل پپتید اکسیداز واکنش داده و پراکسید هیدروژن حاصله جهت سنجش HbA1c استفاده می‌شود. به طور موازی غلظت Hb تام نیز به روش نورسنجی اندازه گیری می‌شود.

مزایا و معایب روش های اندازه گیری غلظت HbA1c

♦ غلظت HbA1c یک پارامتر طولی است. بیماران طی سال‌ها یا حتی دهه‌ها پایش می‌شوند. بنابر درست آزمایی و تکرارپذیر در دوره طولانی مدت لازم است.

♦ برای راحتی، اندازه گیری HbA1c ، بهتر است که هنگام ویزیت بیمار در دسترس پزشک باشد، یا حتی در جلوی بیمار انجام شود.

♦ تعیین غلظت HbA1c، تستی با حجم بالا هست و بنابراین کارایی، ظرفیت پذیرش بالا، قدرت و بهره وری هزینه، طلب می‌کند.

♦ روش انتخاب شده وابسته به ساختار سازمانی است. از آنالیزرهای عمومی شیمی، ابزار آزمایشگاهی مستقل و مناسب، تا ابزار سریع و درجا (POC) در مطب پزشک گسترده ست. اولویت با توجه به وضعیت متفاوت خواهد بود بنابراین بار نمونه، باید بسته به قدرت و ضعف سیستم در نظر گرفته شود.

♦ روش IEC از ظرفیت، پذیرش، کیفیت و قدرت بالایی بر خوردار است. واریانت های Hb دیده می شوند که می‌توان آنها را برای تشخیص حاملین در مشاوره ژنتیک در نظر گرفت. زمان اجرای روش بسیار طولانی است، ولی به جدایی بهتر اجزا منجر می‌شود، با این وجود جهت رسیدن به ظرفیت پذیرش بالا، باید موئینه‌های موازی بکار گرفته شوند. روش‌های شیمیایی این مزیت را دارند که می‌توان آزمون ها را به سادگی با استفاده از آنالیزرهای عمومی شیمی انجام داد. هرچند نیاز به دو آزمون مستقل ممکن است اثر منفی بر کیفیت آنالیز داشته باشد، علوه بر این واریانت ها آشکار نشده و در سنجش مداخله نمی‌کنند.

♦ اصول آنالیز توصیف شده برای هم ابزار آزمایشگاهی و هم POC به کار می‌رود. مزیت POC سهولت استفاده ازآن است، بعنوان مثال نیازی به مراجعه بیمار به آزمایشگاه نیست.

مداخله گرها در اندازه گیری غلظت HbA1c

مداخله گرهای بسیار شایع واریانت های Hb، مقدار افزایش یافته HbF و مشتقات می‌باشند. واریانتهای ساختاری Hb جهش‌های نقطه ای در زنجیره‌های پروتئینی دارند. ۹۰۰ واریانت شناسایی شده‌اند، اما ۹۹٪ آن‌ها در چهار گروه قرار می‌گیرند:

۱- S : شیوع بالایی در سیاهپوستان آفریقا و آمریکا، نژاد ر مدیترانه ای و هندوها دارد.

۲- C: دارای شیوع بالا در سیاهپوستان آفریقا و آمریکا

۳- E: دارای شیوع بالا درآسیای جنوب شرقی

٤- D: شیوع یکسانی در همه جای دنیا دارد.

واریانت های سنتزی از تغییرات ژنتیکی معین در ظرفیت ساخت زنجیره‌های Hb ناشی می‌شوند. در β-تالاسمی، سنتز زنجیره‌های β مهار شده است. زمانی که مولکول Hb مونتاژ می‌شود، زنجیره β بوسیله زنجیره γ یا δ جایگزین می‌شود، بدین ترتیب مقدار HbF و HbA۲ افزایش می‌یابد که مقدار طبیعی آن‌ها بسیار کم است. مشتقات از تغییرات پس ترجمه ای Hb حاصل می‌شوند.

شکل‌های هتروزیگوس S، C، D و E سبب بیماری‌های همولیتیک نمی‌شود. NGSP (برنامه ملی استانداردسازی گلیکوهموگلوبین) به گونه ی پیوسته بسیاری از روش‌ها

را ارزیابی می‌کند، و بازبینی دوره ای به روز را می‌توان بر روی وبسایت یافت. نظر به اینکه HbF زنجیره β ندارد و زنجیره γ بجای والین انتهایی گلیسین دارد، HbF فقط می‌تواند در ریشه‌های لیزین گلیکوزیله شود، درنتیجه میزان گلیکوزیلاسیون آن تقریباً یک سوم HbA است. با IA، غلظت HbA۱c، به مقدار ۱٪ و با AC مقدر آن ۰/۰۷٪ به ازای ۱٪ هموگلوبین F کاهش خواهد یافت. هردوی IEC و CE به‌طور کلی می‌توانند HbF را از HbA1c سوا کنند. PI(PH ایزوالکتریک) HbCarb و پیش- HbA1c تقریباً با HbA1c برابر است. در روش IEC قدیمی، هر دوی HbCarb و پیش- HbA1c همراه با HbA1c از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند. بسیاری از ابزار های در دسترس موجود در بازار کارایی خوبی در جداسازی آنها دارند.

تفسیر نتایج

نتایج زیر حد پایین مرجع، باید با تکرار آزمون تأیید شوند. در صورت تأیید، متخصص باید در مورد احتمال وجود واریانت هموگلوبین، یا اریتروسیت با طول عمر کوتاه اطلاع دهد. نمونه‌های دارای نتایج بسیار بالا (<۱٤۰ mmol/ mol or > ۱۵٪) و نمونه‌هایی که نتایج آن‌ها با سیمای بالینی بیمار همخوانی ندارند، باید دوباره آزمایش شوند. تکرار آزمون با روش آنالیتیکی متفاوت می‌تواند در شناخت علت بیماری غیرمنتظره و یا نتایج مرتبط با روش، کمک کند.

منابع:

1. Cas Weykamp: HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects. Ann Lab Med 2013;33:393-400 http://dx.doi.org/10.3343/alm.2013.33.6.393.

2. Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. J Diabetes Sci Technol 2009;3:439-45.

3. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002;40:78-89.

4. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham JL. Enzyme immunoassay--a new technique for estimating haemoglobin A1c. Clin Chem 1993;39: 663-6.

5. Liu L, Hood S, Wang Y, Bezverkov R, Dou C, Datta A, et al. Direct enzymatic assay for % HbA1c in human whole blood samples. Clin Biochem 2008;41:576-83.

6. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem 1993; 39:1717-23.

7. . Jeppsson JO, Jerntorp P, Sundkvist G, Englund H, Nylund V. Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. Clin Chem 1986;32:1867-72.

9. Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, Connolly S, Hanson S. Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement: evaluation of five different high performance liquid chromatography methods. Diabetes Technol Ther 2007;9:36-42.

10. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. Clin Chem 2011;57:205-14.

فرم اشتراک ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی ۱۳۹۸

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦تکمیل تمام موارد فوق الزامی است ♦

اشتراک یکساله (با پست عادی)	۱,۵۶۰,۰۰۰ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی)	۷۸۰,۰۰۰ریال
اشتراک یکساله (با پست سفارشی)	۱.۶۸۰,۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی)	۸٤۰,۰۰۰ ریال

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۳۶۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۷۲۲٤-۸۲۸۷-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸٤۲۳٤-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com **تلفن:** ۰۹۱۲۷۳۳۳٤۰۷- ۸۸۹۸۷۵۰۱ **نمابر:** ۸۹۷۷۶۷۶۹