



## HAEMOGLOBIN A<sub>1C</sub> BEDUTUNG BEI DIABETES MELLITUS

DR. MED. AHMAD SCHAHBAZ FAR

### Einleitung

Haemoglobin A<sub>1</sub> (Hb-A<sub>1</sub>) Oder glycosiliertes Haemoglobin, ist eine modifizierte Form des Erwachsenen Haemoglobins (Hb-A).

Bestandteile des normalen Haemoglobins sind neben dem genetisch determinierten Typen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>, die sogenannten Mikrokomponenten HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> und HbA<sub>1c</sub>, glycohaemoglobine welche im laufe der Erythrocytenueberlebenszeit durch eine nichtenzymatische Reaktion entstehen. Das Ausmasz der Glycosilierung ist von der durchschnittlichen Blutzucker-Konzentration, integriert ueber die Erythrocyten-Ueberlebenszeit abhaengig (2; S. Panzer, G. Kronik, W. Graninger). Die Glycosilierung von Haemoglobin findet auch bei kurzfristiger Blutzuckererhoehung statt, allerdings nur in Form einer labilen, reversible Bindung. Die Bildung einer unloeslichen irreversible Verbindung erfolgt erst in weiterem Zeitabhaengigem Schritt, (2; F. D. Goebel, H. Defer, Chr. Kolmar, P. Born), soda-

---

Facharzt fuer Laboratoriums Medizin/-Diagnostik Dozent  
der Med. Fakultetaet Universitaet Tehran

sz Hb A1-Wert musste Rueckschlusze auf die mittlere Blutzuckererhoehung in den Zurueckliegenden Wochen vor der Bestimmung zulassen.

Bei Personen mit Diabetes Mellitus kann der Prozentsatz des Hb-A1 um das doppelte bis dreifache (Norm etwa 7% des Gesamt Hb), (6) Je nach dem Grad der metabolischen Stoffwechsellage betragen (8).

In Praktisch Diagnostischer Hinsicht eroeffnete die Bestimmung des glycosilierten Haemoglobins neue Moeglichkeiten zur langfristigen, Ueberwachung von Diabetiker(5) und schuft gleichzeitig eine objektivere Basis fuer die Beurteilung des Zusammenhanges zwischen Stoffwechselfuehrung und die Entwicklung von Spaetkomplikationen, (2;0. H.Wieland).

#### Methodik

Es weden Hb-A1 Messungen bei 22 Diabetiker und 17 Nichtdiabetischen Patienten durchgefuehrt. Die Bestimmungsmethode richtet sich nach dem Prinzip von Saeulenchromatographie\*.

Es wird ein 600 µl Haemolysat aus 100 µl Vollblutprobe und Haemolysenreagenz hergestellt. Nach sorgfaelltigem Mischen steht das Reagenzglas in Raumtemperatur.

Inzwischen entsprechend der Anzahl, pro Blutprobe werden Einmal-Saeulen vollstaendig resuspendiert und senkrecht auf die vorgesehene Staender aufgesetzt.

Dann wird 100 µl Haemolysat tropfenweise in die Plastiksaerule ueber das Harzbett geschichtet und 5 Minuten lang zweck Einsickern stehen gelassen.

---

\*- Arbeitsvorschrift des "Institut fuer Labormedizin"  
Akademische Kliniken Damstadt, Deutschland.  
Bio-Rad Laboratories, Muenchen Deutschland.

Dannach wird 10 ml Entwicklungsloesung vorsichtig zuerst jedoch tropfenweise hinzugegeben und waehrend einem 45 minutigen Ablaufen des Eluates in ein Einmal-Zentrifuegenroehrchen abgefangen. Die Roehrchen werden 10 Minuten lang bei 2000 U/Min. zentrifuegiert und zur Messung verwendet. Gleichzeitig wird 20 µl Haemolysat mit 10 ml Entwicklungsloesung gut gemischt und zur Extintionsmessung des Gesamthaemoglobins benutzt.

Aus Extintionen von Eluat und des Gesamthaemoglobins, welche mit Eppendorffphotometer bei 405 nm gemessen werden, wird der prozentuale Anteil des Hb-A1 ermittelt.

Das Prinzip der Bestimmung basiert auf die haemolyse der Blutzellen durch Haemolysen-Reagenz und Trennung der Schnellwandernde Haemoglobine von den langsamen Fraktionen, durch das schwach saure Kationenaustauscherharz.

Die Raumtemperatur waehrend der Untersuchung betraegt 19 bis 21 Grad. C. (1) Die Hb-A1 werden bei Diabetiker und Nichtdiabetischen Patienten untersucht mbd Blutzuckerwerte bei Diabetiker waehred der stationaeren Behandlung mehrmals mittels Hexokinasenmethode bei LKB bestimmt und den Mittelwert bei den einzelnen Patienten beruecksichtigt.

Die patienten mit diabetischer stoffwechsellage werden nach der Hoehe des Blutzuckermittelwertes in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt; (Blutzuckermittelwert bis 200mg% Blutzuckermittelwert von 201 bis 250 mg% und Blutzuckermittelwert ueber 250 mg%: Eine weitere Untersuchung dient das Alterungseffekt in Vollblut zu pruefen, sowie die Intraassaygenauigkeit bei der Bestimmung festzustellen.

Fuer die Ermittlung des Alterungseffektes wird das EDTA-Vollblut in unterschiedliche Haemoglobinkonzentra-

tionen hergestellt; (Hb= 6,9 g% A und B, Hb= 15, 1g% C und D). Um die Veraenderung durch Verunreinigungen auszuschliessen, werden diese in mehrere getrennte Roehrc-  
hen abgefuehrt, ein Teil bei Zimmertemperatur (A und C) und ein Teil im Kuehlschrank (B und D) aufgehoben und in Abstaenden von Tagen untersucht.

Um die Intraassaygenauigkeit bei der Untersuchung zu beurteilen, werden drei Vollblutproben mit verschiedenen Hb- und Hb-A1-Konzentrationen (E,F und G) hergestellt und haeufig gemessen, dann Standard-Abweichung sowie Variationskoeffizient errechnet.

### Ergebnisse

Die Bestimmung des Hb-A1 zeigt die deutliche Abweichung bei den Patienten mit diabetischer Stoffwechsella-  
ge gegenueber Nichtdiabetiker (Tab.1 und 3).

Diese Abweichung ist bei allen Diabetikern zu beobachten.

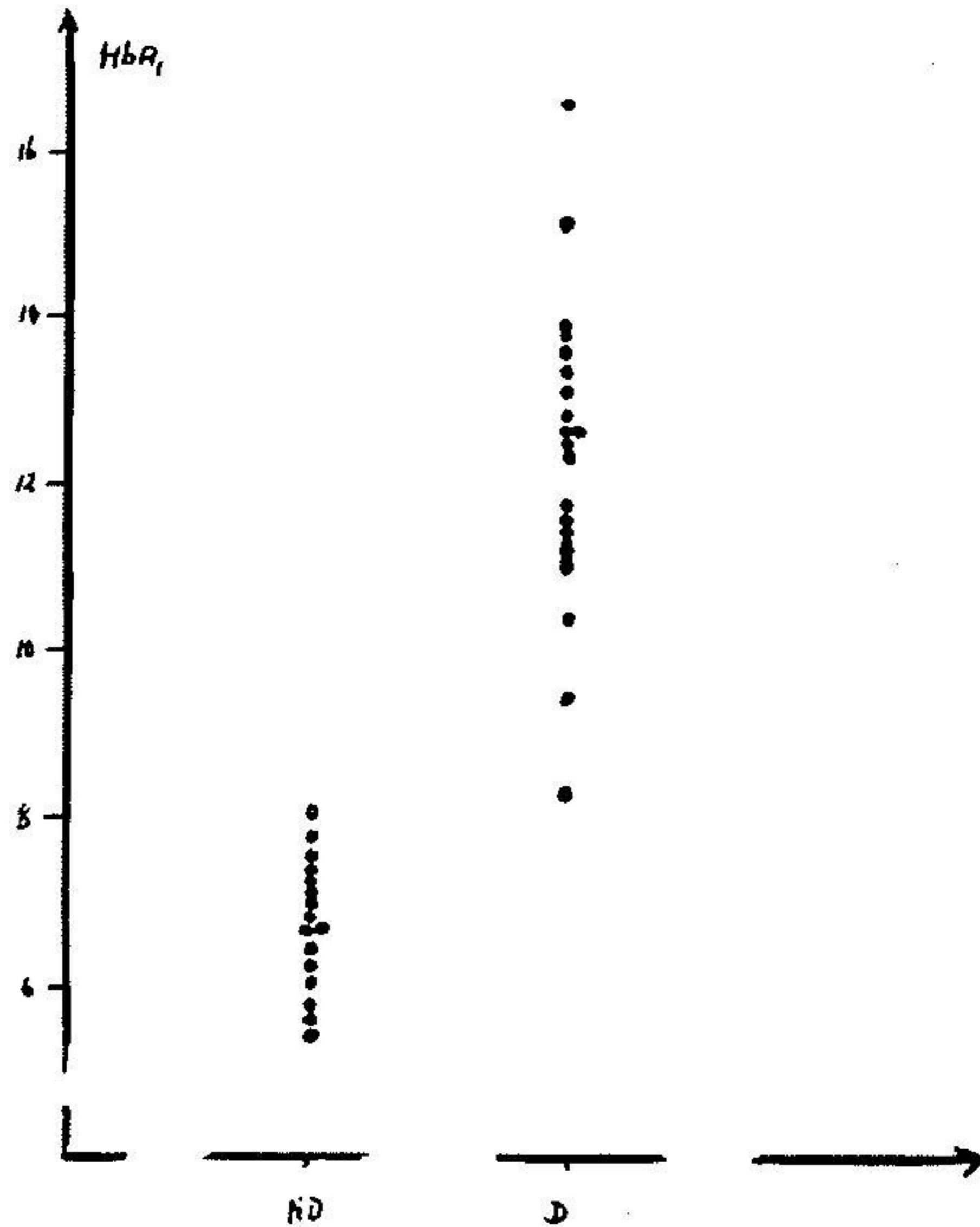
U.Nr.	Hb-A1	Blz.Mw	U.Nr.	Hb-A1	Blz.Mw
1	13,4	270	12	10,4	200
2	11,3	182	13	11,0	217
3	11,6	222	14	15,2	219
4	11,4	193	15	12,7	225
5	13,7	265	16	13,8	283
6	11,2	252	17	11,1	259
7	8,2	163	18	12,5	238
8	11,7	137	19	12,7	228
9	13,1	270	20	9,4	177
10	12,8	255	21	13,9	218
11	12,4	205	22	16,6	260

Tab.1) ;Hb-A1 Befunde bei Diabetiker,  
(Mittleres Hb-A1=12,3% Mittlerer Blutzuckermit-  
telwert=225 mg%, Mittleres Haemoglobin = 14,4 g%)  
(U.Nr.=Untersuchungsnummer, Blz.Mw=Blutzuckermit-  
telwert)

N	D1		D2		D3	
	Hb-A1	Blz.Mw	Hb-A1	Blz.Mw	Hb-A1	Blz.Mw
1	11,3	182	11,6	222	13,4	270
2	11,4	193	12,4	205	13,7	265
3	8,2	163	11,0	217	11,2	252
4	11,7	137	15,2	219	13,1	270
5	10,4	200	12,7	225	12,8	255
6	9,4	177	12,5	238	13,8	283
			12,7	228	11,1	259
			13,9	218	16,6	260

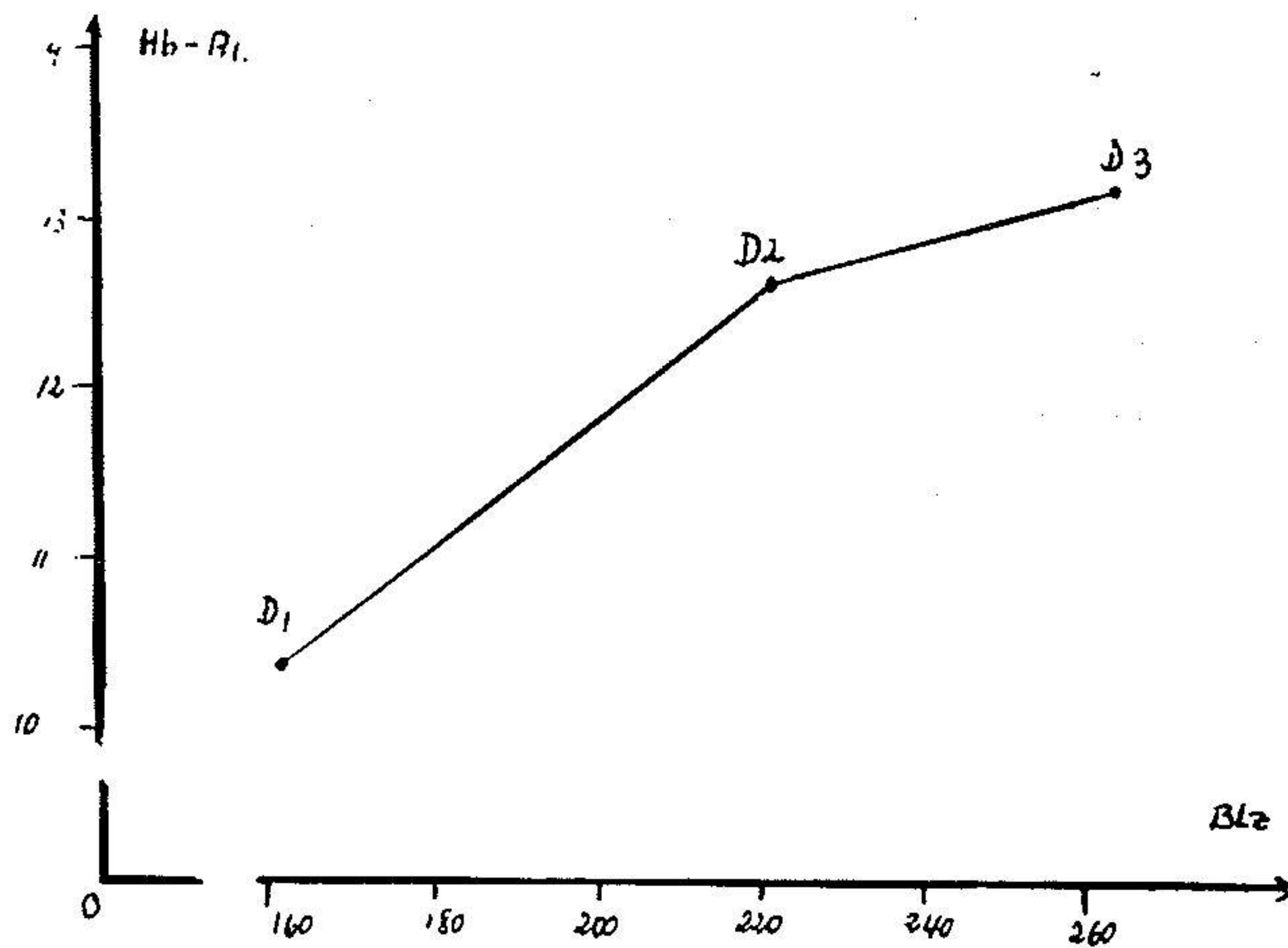
Tab.2); Diabetiker in getrennte Gruppen (D1=Blz.Mw bis 200 mg%, D2=Blz. Mw von 201 mg% bis 250 mg%, D3=Blz.Mw ueber 251mg%). (N=Anzahl der Patienten, Blz.Mw= Bluzuckermitelwert)

Das erhoehte Hb-A1 bei Diabetiker erreicht(im Mittel) 12,3% gegeneber den Nichtdiabetiker (im Mittel 6,7 %) um das Doppelte Wert (Schema 1).



Schema 1);Darstellung der Hb-A1 Resultate bei Diabetiker und Nichtdiabtiker. (D=Diabetiker, ND = Nichtdiabetiker) (Ordinate=Getrennte Gruppen, Absziesz = Hb-A1%)

Eine Unterteilung der Diabetischen Gruppe (D1,D2,D3) zeigt die ansteigende Hb-A1 nach mittlerem Wert des Blutzuckermittelwertes (Tab.2 und Schema 2). Die Gruppe D1 mit einem mittleren Blutzuckermittelwert von 162 mg% hat ein Hb-A1 im Durchschnitt von 10,4%, bei der Gruppe D2 mit einem mittlerem Blutzuckermittelwert von 221 mg% ergibt ein mittleres Hb-A1 von 12,7% und bei der Gruppe D3 mit einem mittlerem Blutzuckermittelwert von 264 mg% ein mittleres Hb-A1 von 13,2%.



Schema 2); Hb-A1 Mittelwert der einzelnen Diabetischen Gruppe, (Ordinate: Mittleres Blutzuckermittelwert, Absziesz: Hb-A1 Mittelwert)

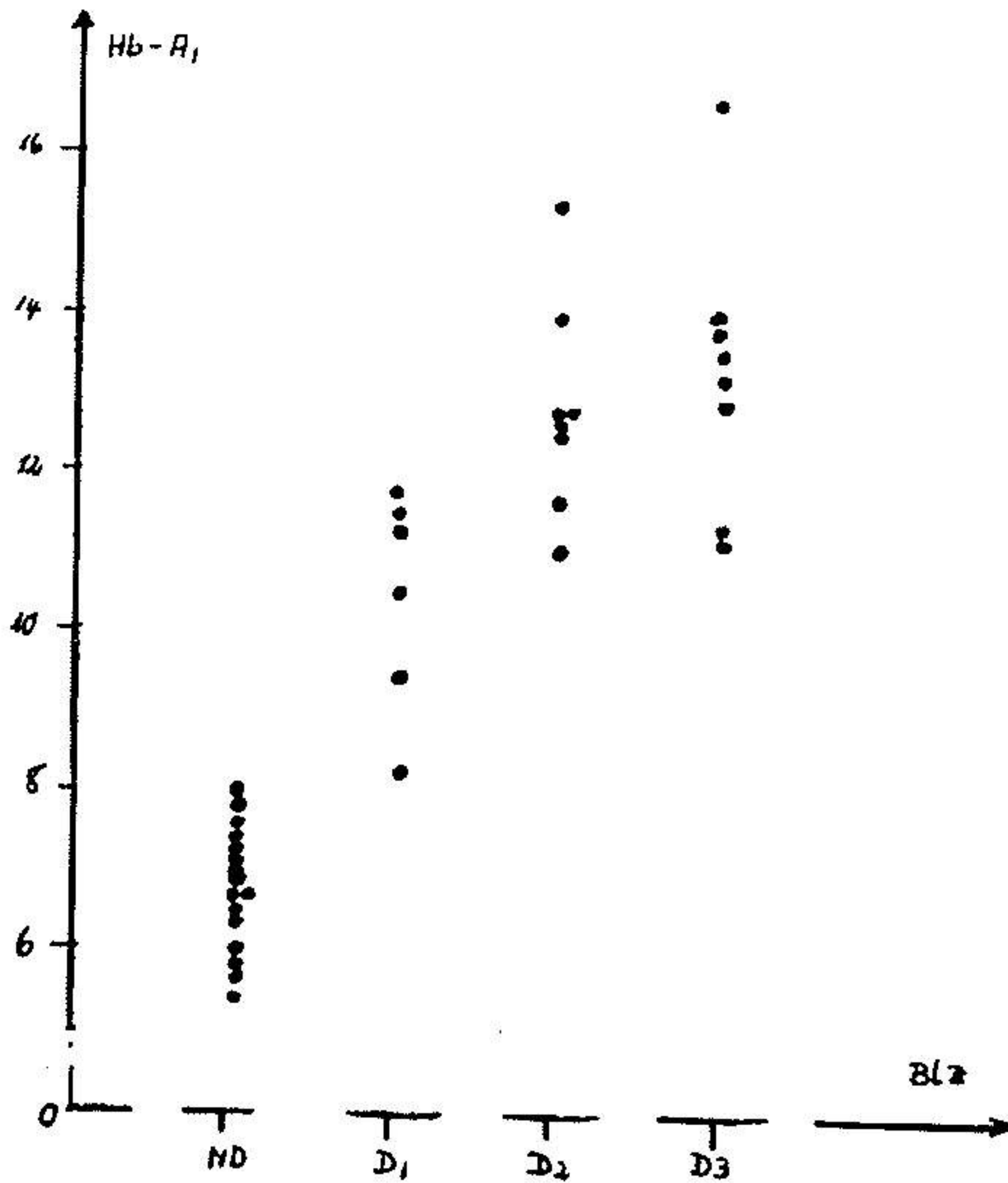
U.Nr.	Hb-A1	U. Nr.	Hb-A1
1	5,5	9	7,4
2	6,7	10	7,6
3	5,8	11	6,5
4	6,9	12	7,1
5	7,8	13	8,0
6	7,2	14	6,0
7	6,7	15	6,3
8	7,0	16	5,8

Tab.3); Hb-A1 Bestimmung Bei Nichtdiabetiker (Mittleres Hb von 11,4g% Mittleres Hb-A1 von 6,7%)  
(U.Nr.=Untersuchungsnummer)

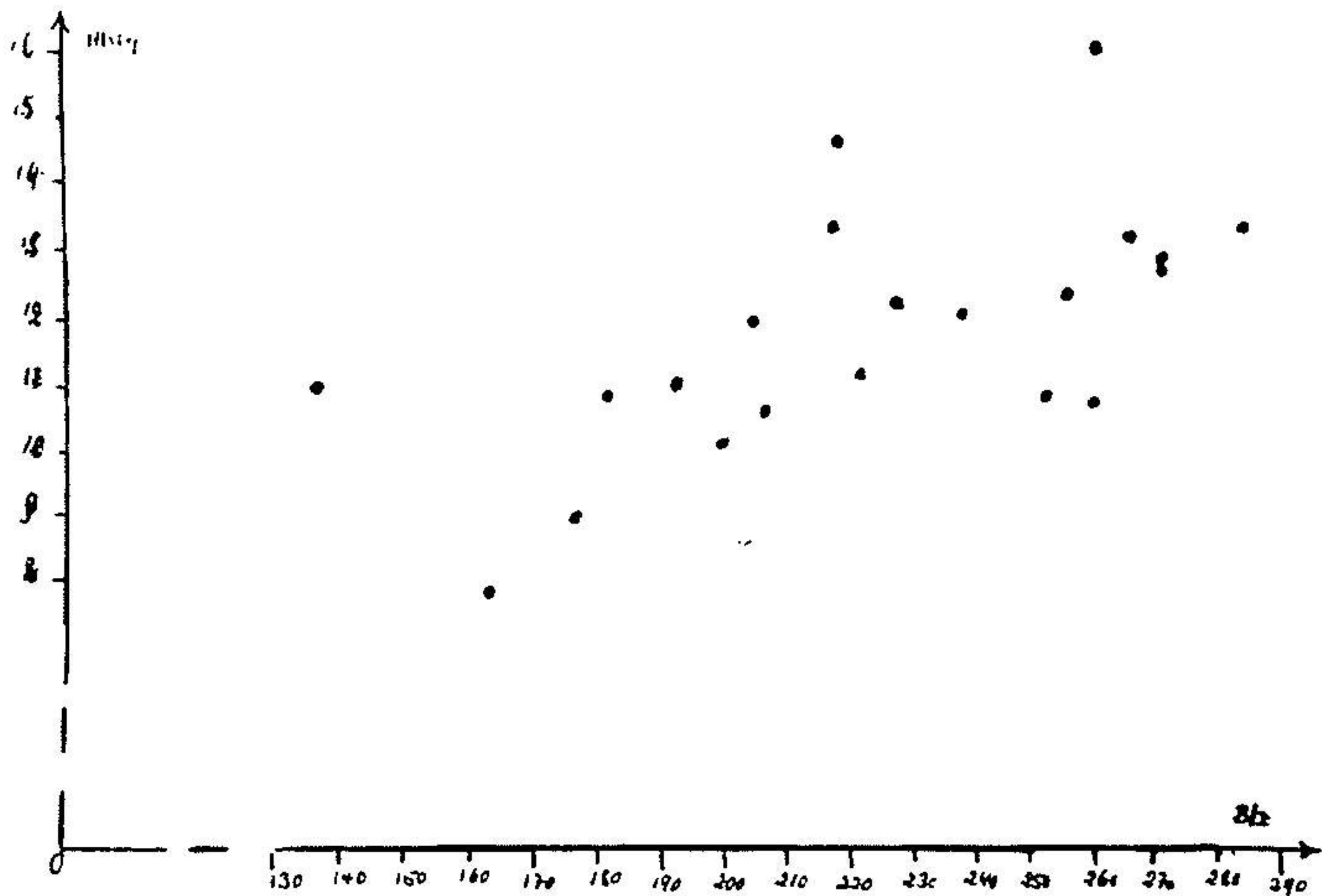
Die Hb-A1 Ergebnisse der Patienten aus der Diabetischen-Untergruppen zeigen ebenso entsprechende Erhoehung, gegenueber Nichtdiabetiker (Schma 3).

Auszerdem zeigt Hb-A1 Wert bei Diabetischen Patienten Abhaengigkeit von derem Blutzuckermittelwert (Schema 4).





Schema 3); Vergleich des einzelnen Hb-A1 Wertes bei Diabetischen Gruppen mit Nichtdiabetiker.



Schema 4); Hb-A1 Wert der einzelnen Patienten der Diabetischen Gruppe in Abhängigkeit von deren Blutzuckermittelwert.

Die Untersuchung des Alterungseffektes im EDTA-Vollblut zeigt, dass beide Teile A und C, welche bei Raumtemperatur aufbewahrt sind, ab 7. Untersuchungstag eine zunehmende Abweichung aufweisen. (Tab. 4, Schema 5). Bei beiden Teilen B und C, welche im Kuehlschrank aufgehoben sind, die Abweichung ist leicht und erst ab 10. Tag festzustellen. Die erhöhte Resultate bei den Teilen A und C ist ab 9. Tag besonders deutlich, wobei am Ende der Untersuchungstagen das dreifache wert erreicht wird.

Tab. 4) ; Alterungseffekt;  
Die Eizellmessungen an  
verschiedenen Tagen.

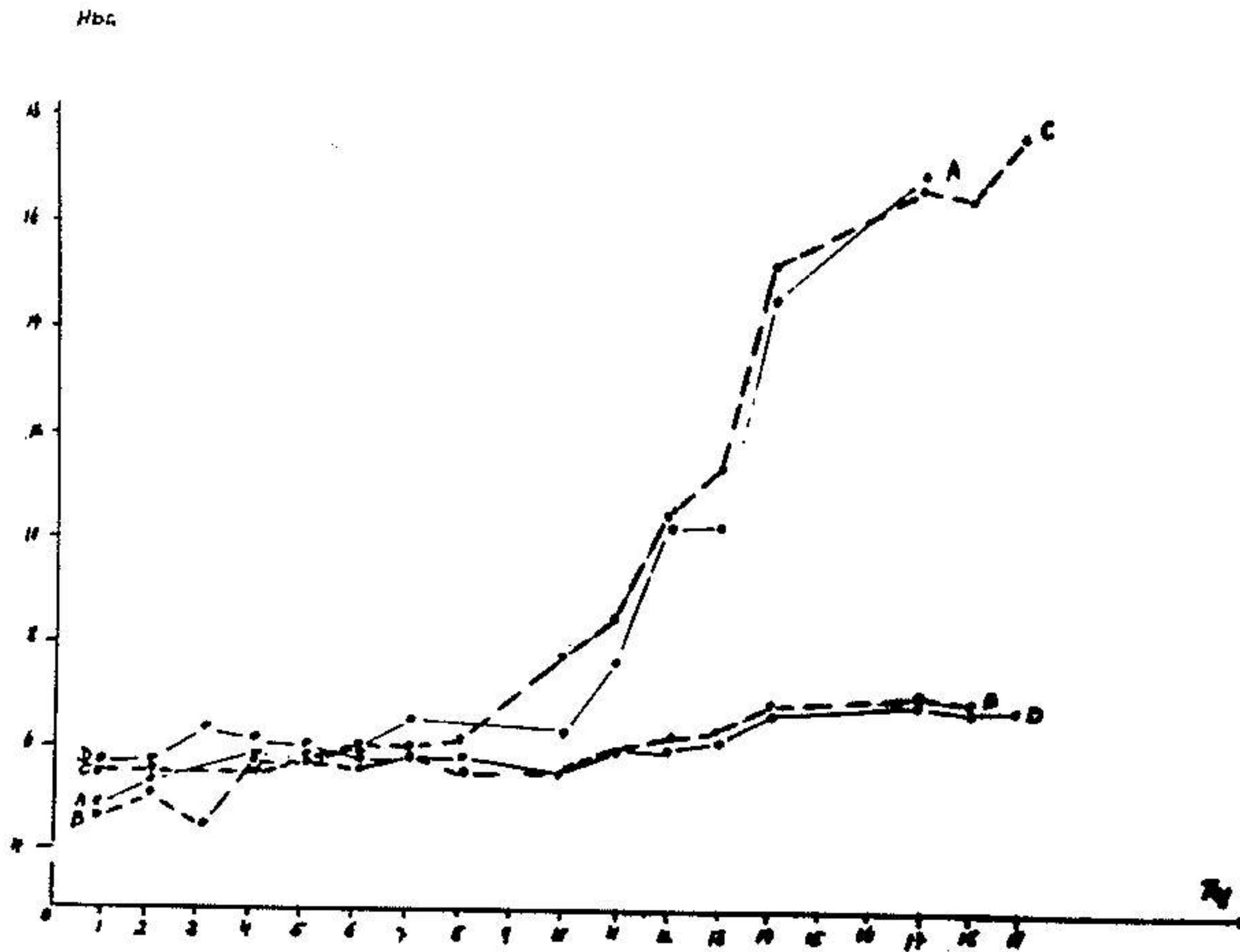
(A=Hb von 6,9 g  
und Aufbewahrung  
bei Zimmertemperatur

B=Hb von 6,9 g  
und Aufbewahrung  
im Kuehlschrank;

C=Hb von 15,1 g  
und Aufbewahrung  
bei Zimmertemperatur;

D=Hb von 15,1 g  
und Aufbewahrung  
im Kuehlschrank)

Tag	Hb-A1	Bei A	Hb-A1 bei B	Hb-A1 bei C	Hb-A1 bei C
1	4,7		4,9	5,6	5,7
2	5,1		5,4	5,6	5,8
3	4,5		4,6	5,6	6,4
4	5,8		5,9	5,9	6,2
5	5,8		5,8	6,1	6,1
6	6,0		5,7	6,1	5,9
7	6,6		5,9	6,2	5,9
10	6,4		5,6	7,9	5,6
11	7,8		6,1	8,7	6,1
12	10,5		6,3	10,7	6,1
13	10,5		6,5	11,7	6,3
14	15,0		7,0	15,7	6,9
17	17,5		7,2	17,3	7,1
18			7,1	17,1	7,0
19				18,3	7,0



Schema 5); Darstellung des Alterungseffektes bei Aufbewahrung des Vollblutes in verschiedenen Temperaturen.

Die Intraassaygenauigkeit bei verschiedenen Hb-A1 ist etwa gleich und liegt bei 0,364 Standard-Abweichung im Durchschnitt (Tab.5), wobei bei dem Teil E mit einem mittlerem Hb-A1 von 6,97% eine Standard-Abweichung von 0,308 bei dem Teil F mit einem mittlerem Hb-A1 wert von 9,19% eine Standard-Abweichung von 0,542 und bei dem Teil G mit einem Hb-A1 von 6,01% eine Standard- Abweichung von 0,242 (Tab.6), zu beobachten ist.

	Mittelwert	SD-Abweichung	Variationskoeff.	Hb	Hb-A1
E	6,972	0,308	4,42%	10,0	6,9
F	9,198	0,542	5,89%	11,6	9,1
G	6,013	0,242	4,02%	15,9	6,1

Tab 6); Bestimmung des Mittelwertes, Standard-Abweichung und Variationskoeffizienz, bei verschiedenen Hb bzw. Hb-A1 (Hb-Haemoglobin g%, Hb-A1 Mittelwert in% von Hb).

N	E	F	G
1	7.23	9.92	6.33
2	7.20	9.39	5.84
3	6.89	9.67	5.75
4	6.70	9.83	5.62
5	7.08	8.59	5.98
6	6.36	9.26	5.89
7	7.09	8.81	6.34
8	7.23	8.82	6.04
9	6.59	9.37	6.12
10	-	8.32	6.18

Tab.5); Ergebnisse der Einzellbestimmungen bei E,F,G.

(N=Anzahl der Messungen bei E Reihe, F Reihe und G Reihe).

### Zusammenfassung

Es wurden Hb-A1 bei 22 Patiententen mit diabetischer Stoffwedrsellge und 17 Nichtdiabetiker bestimmt. Die Bestimmungsmethode richtete sich nach Saeulenchromatographie und im EDTA-Vollblut mit folgenden Ergebnissen;

Das Hb-A1 war bei den Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage,gegenueber Nichtdiabetiker unterschiedlich erhoeht festzustellen.Die Erhoehung in verschiedenen diabetischen Gruppen waren etwa von den mittleren Blutzucker mittelwert abhaengig und erreichte im Durchschnitt das doppelte Wert.

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, dasz 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, sodasz am 19.Untersuchungstag das dreifache Wert erreicht wird.

Die Intrassaygenauigkeit der Untersuchung lag bei verschiedenen Hb-A1-Konzentrationen im Durchschnitt bei 0,364 Standard-Abweichung.

### Diskussion

Die durchgefuehrte Untersuchung bestaetigt die Erhoehung des Hb-A1 levels bei den Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage (Tab.lu.2 sowie Schemalu.2). Die Erhoe-

hung ist dem Blutzucker abhaengig(Schema 2,3,4).

Die Blutzuckerhoehe und Zeitdauer der Blutzuckereinwirkung sind wichtigsten determinanten der Hb-A1 resp. Hb-Alc Bildung (2;W.Berger und G.E.Sonnenberg). Es wurde ein erhoehtes Hb-A1 entsprechend dem Blutzuckermittelwert bei der diabetischen Gruppe beobachtet(Tab.2,Schema 2,3) und erreichte im Durchschnitt das doppelte Wert der Nichtdiabetikern (Tab.3, Schemal,3),und kann je nach Grad der Hyperglycaemie bis dreifache betragen (8). Ueber eine Korrelation zwischen dem Hb-A1 und Nuechtern Plasma glucose bei 55 ambulaten diabetischen Patienten wurde berichtet(7).

Die Bestimmung von Hb-A1 level findet fuer die regulation des Blutzuckers der Diabetikern(3,4,5)Bedeutung aber nicht als eine Screeningstechnik fuer Diabetes Mellitus(4). Hb-A1 Bestimmungen sind geeignet, die Diagnostik des Diabetes Mellitus im Sinne eines Objektiven, integralen Stoffwechselmonitors zu erweitern(2;H.R.Heinrichs E. Setiaveusuma R. Sonnen,CH.Lemke).

Die Saeulenchromatographische Bestimmungsmethode, welche seit vielen Jahren zur Trennung struktuell aehnlichen Materialien verwendet werden(9), hatte eine Intraassaygenauigkeit (Tab.5,6) etwa dem angegebenen Testmerkmal entsprechendes Ergebniss, bei konstantem Temperatur des Untersuchungsraumes(1). So. das Ergebniss des Akterungseffektes zeigt, die Untersuchung des Hb-A1 im EDTA-Vollblut erfolgt am Tag der Blutentnahme oder in Form von Sammelproben bei entsprechendem Aufbewahrungstechnik.

#### Literaturangabe

1. W.David Hankins, Leslie Holladay; A. Temperature conv-

- ersion nomogram for glycosylated hemoglobin analysis; Clinica Chimica acta 104(1980) 251-257.
2. Kuerzfassung der Vortraege; Tagung ueber Haemoglobin-Alc 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 A1 and Diabetes mellitus; Diabetologica 15,1-8 (1978).
  6. Kenneth H. Gablay, Jay M. Sosenko, Grace A. Banichi, Michael J. Minnsohn and Ruedolf Flu-eckinger; 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 A1: An Indictor of the Metabolic Control of Diabetic Patient; The Lancet, october 8, 1977.
  8. Richard A.Cole; How a New glucose index Can help you Contol diabetes, Modern Medizine Mar-



ch 30-April 15 (1979), 72-79.

9. Bio-Rad Laboratories; Muenchen; Haemoglobin A<sub>1</sub> (Hb-A<sub>1</sub>)  
Saeulentest zur Bestimmung des prozentualen Anteils der glycosilierten Haemoglobine im Vollblut.

#### Summary

Blood specimens from 22 insulin dependent diabetic patient and 17 nondiabetic subject were collected in EDTA-tubes. Quantitation of Hb-A<sub>1</sub> was performed by Column chromatography. The glycosylated hemoglobin component is increased in diabetic patient and found a significant correlation between Hb-A<sub>1</sub> concentration and blood glucose levels in all diabetic patients. The mean Hb-A<sub>1</sub> value for diabetic patients is twice as the mean value for nondiabetics.

The second part of experiment consist of aging blood-EDTA in ambient temerature and a 4°C cold room. A sample of each blood was analysed the following days for estimation of Hb-A<sub>1</sub> after 7 to 9 days and noticed a difference between the Hb-A<sub>1</sub> values in two specimens and increase of Hb-A<sub>1</sub> in both samples but after aging furthermore about 19 days, the concentration of Hb-A<sub>1</sub> in blood kept in ambient temperature was three times more than in blood kept in cold room.