



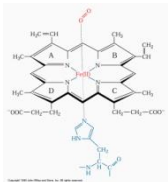
# **Glykovaný hemoglobin**

**Ing. Martina Podborská, Ph.D.**

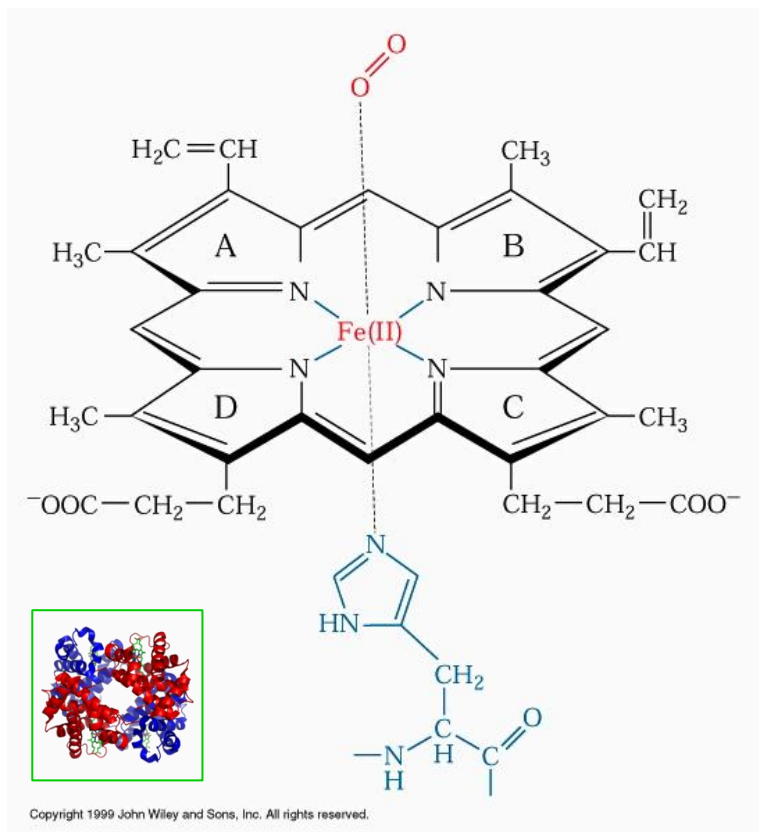
**OKB FN Brno**

**Zpracováno s pomocí přednášek RNDr. Petra Breineka**

**Školní rok 2015/2016**

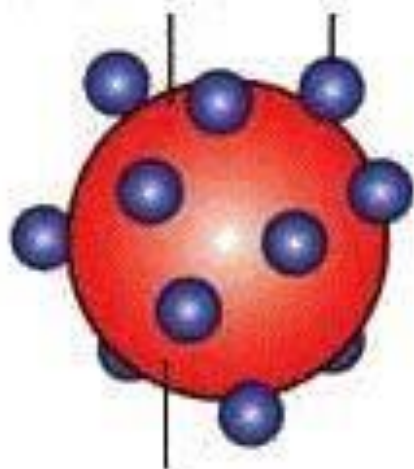


# Glykovaný hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>)

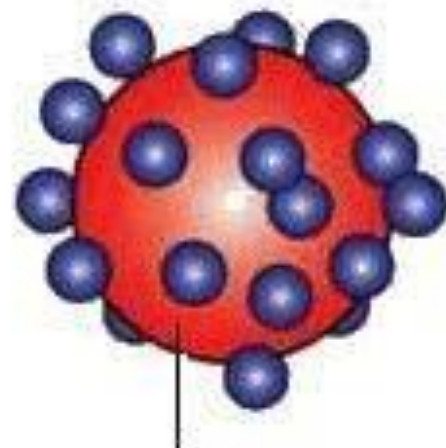


## Schéma glykosylace hemoglobinu glukóza

molekula hemoglobinu



nízký stupeň glykace

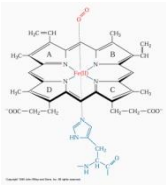


vysoký stupeň glykace

□ Hemoglobin [<http://sweet-about-me.webnode.cz>]

□ [http://old.lf3.cuni.cz/diabetologie/lnz\\_Glykace.htm](http://old.lf3.cuni.cz/diabetologie/lnz_Glykace.htm)

□ HbA<sub>1c</sub> je základní vyšetření pro dlouhodobé sledování diabetu mellitu



# HbA<sub>1c</sub> – klinický význam

- ❑ rutinní a efektivní nástroj sledování průběhu DM (diabetu)
- ❑ HbA<sub>1c</sub> ukazatel dlouhodobé průměrné koncentrace glukózy v krvi (období cca 6-8 týdnů nazpět) → umožňuje posoudit dlouhodobou kompenzaci diabetu
- ❑ diagnostické kritérium DM
- ❑ kontrola terapie
- ❑ včasné odhalení hrozících komplikací
- ❑ **hodnocení vyšetření:**

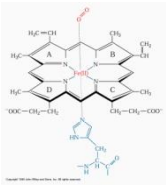
Hodnota HbA <sub>1c</sub>	Interpretace výsledků
< 4,5 %	Dobrá kompenzace diabetu
4,5 – 5,3 %	Uspokojivá kompenzace diabetu
> 5,3 %	Neuspokojivá kompenzace diabetu



# Glykace

---

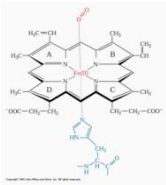
- ❑ **Glukóza je aktivní molekula – účastní se glykačních a autooxidačních reakcí → vznik reaktivních látek zvyšujících oxidační stres, které zasahují do mechanismů zánětlivé reakce**
- ❑ **Glykace bílkovin je založena na chemické vazbě glukózy na N-koncové aminokyseliny bílkovin:**
  - ✓ **aldehydická skupina glukózy reaguje s volnou aminoskupinou proteinů bez enzymové katalýzy za vzniku glykovaného proteinu**



# Glykace

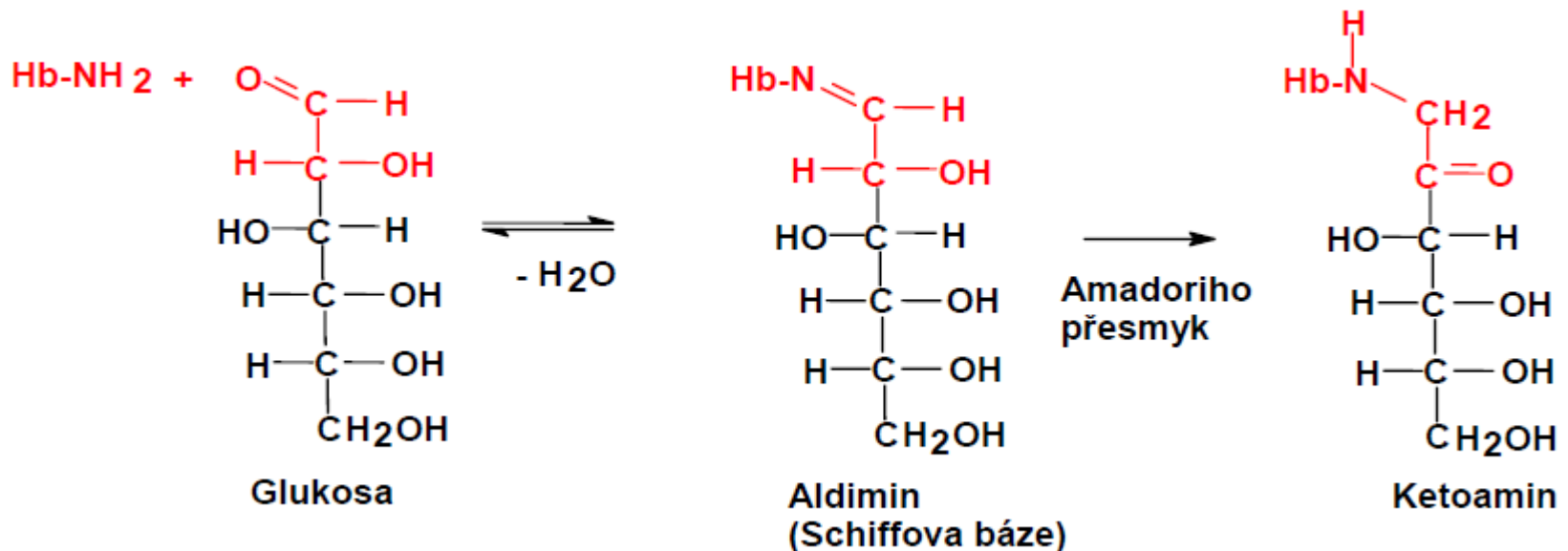
---

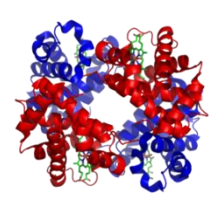
- ❑ **HbA<sub>1c</sub>** („dlouhý cukr“) je látka, která vzniká v organismu neenzymatickou reakcí tzv. glykací mezi hemoglobinem (červené krevní barvivo) a glukózou (krevním cukrem)
- ❑ **GLYKACE:** je neenzymové navázání (adice) cukru na proteiny za vzniku fruktosaminu
- ❑ **faktory ovlivňující neenzymovou glykaci proteinů:**
  - ✓ koncentrace sacharidů a proteinů a jejich kolísání (koncentrace proteinů v krvi je relativně konstantní, rychlost glykace je úměrná koncentraci sacharidů)
  - ✓ doba expozice
  - ✓ biologický poločas daného proteinu
  - ✓ teplota



# Glykace hemoglobinu

- rychlá tvorba labilní Schiffovy báze (aldimin)
- pomalý Amadoriho přesmyk za vzniku stabilního ketoaminu (ireversibilní)
- koncentrace závisí na koncentraci glukózy a poločasu života erytrocytů





# HbA<sub>1c</sub> – glykace

- HbA<sub>1c</sub> vzniká glykací na N-konci  $\beta$ -řetězce hemoglobinu

HbA<sub>0</sub>

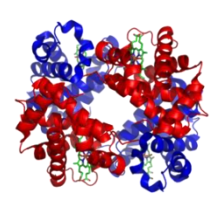


HbA<sub>1c</sub>

Glykována je první AK - Val







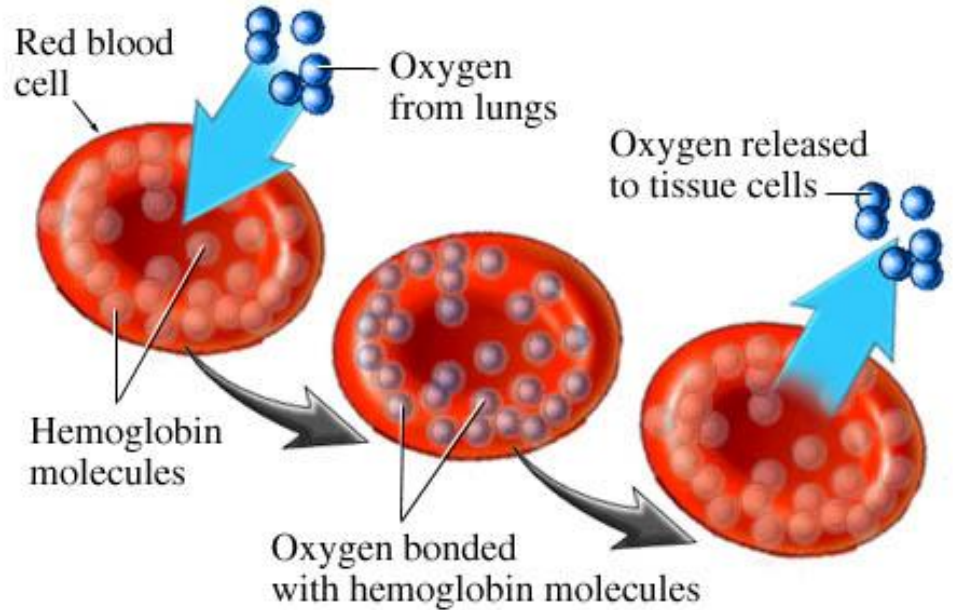
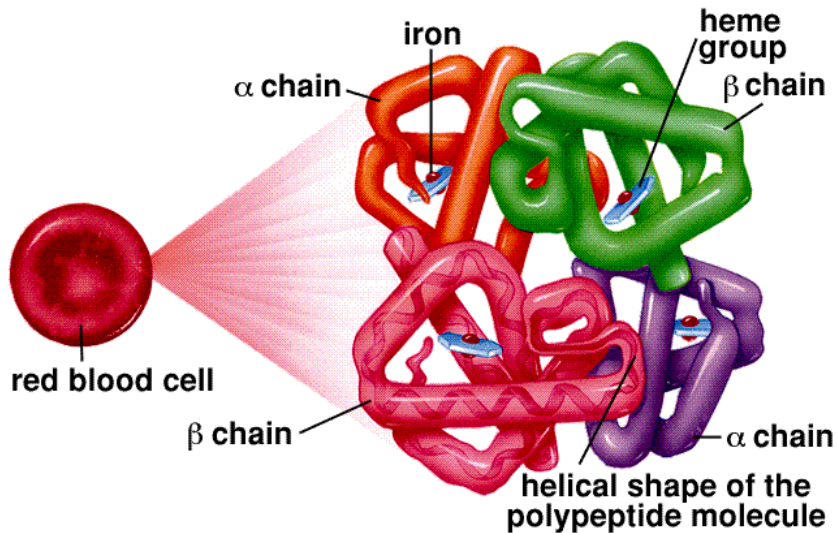
# Hemoglobin

## □ Složená bílkovina – hemoprotein:

- ✓ bílkovina – globin
- ✓ hem

Sylvia S. Mader, Inquiry into Life, 8th edition. Copyright © 1997 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

### Hemoglobin Molecule

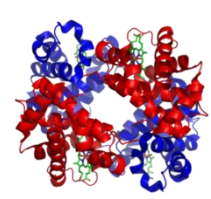


□ Illustration copyright 2000 by Nucleus Communications, Inc. All rights reserved. <http://www.nucleusinc.com>

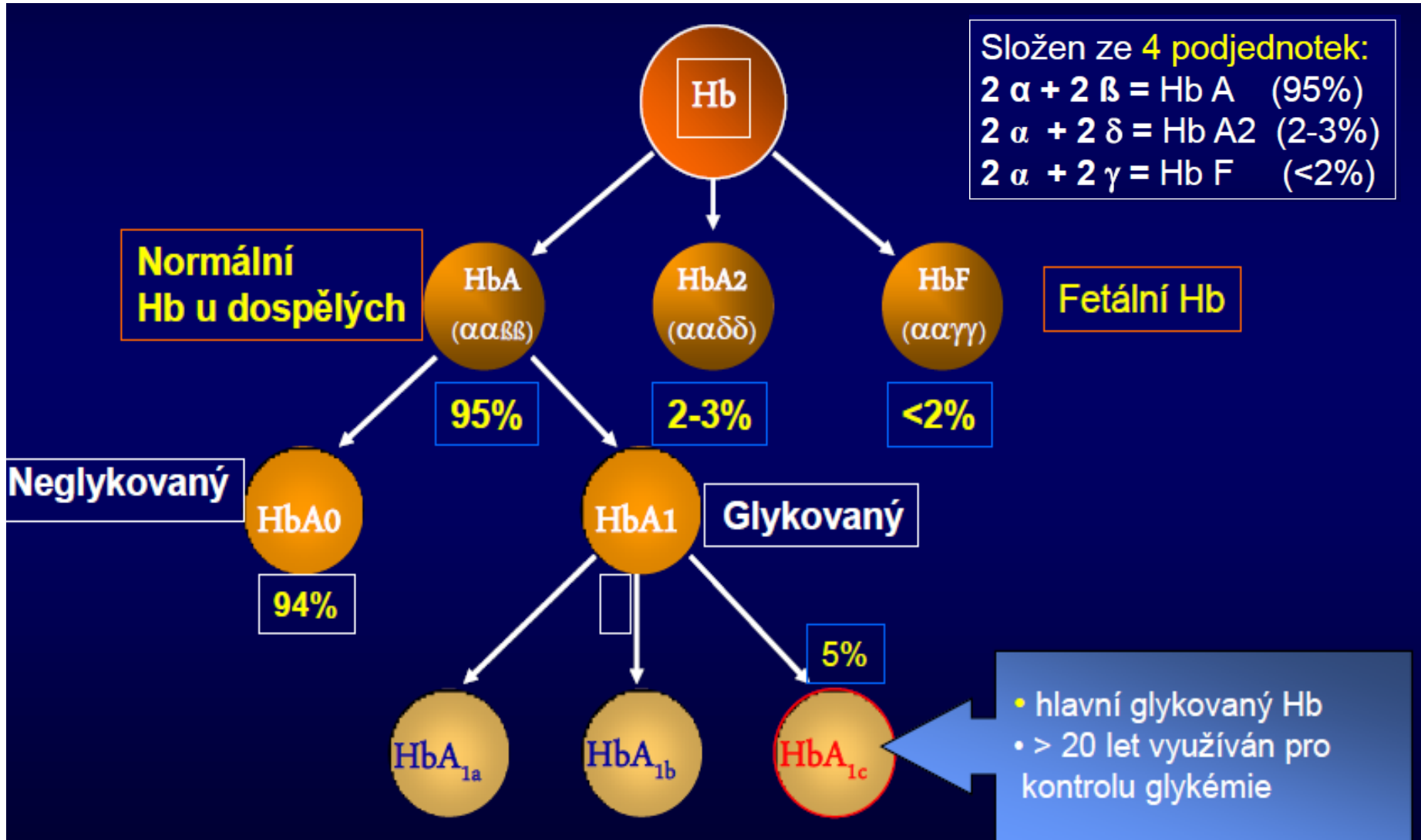
□ <https://fmss12ucheme.wordpress.com/2013/05/06/hemoglobin/>

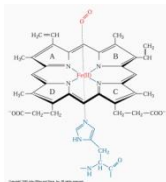
□ hlavní fce: je to transportní molekula plynů a tvoří 95 % objemu erytrocytů





# Hemoglobiny

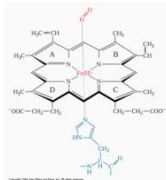




# Výhody stanovení HbA<sub>1c</sub> vs. glykémie

---

- ❑ není třeba konzervovat krev (větší stabilita)
- ❑ menší intraindividuální variabilita (CV<2%)
- ❑ HbA1c není ovlivněn krátkodobou glykemií
- ❑ nemocný nemusí být lačný
- ❑ využití pro diagnostiku i kontrolu léčby



# Vyjadřování výsledků HbA<sub>1c</sub>

---

- ❑ **není třeba konzervovat krev (větší stabilita)**
  - ✓ **od 1.1. 2012: mmol/mol** (např. 45 mmol HbA<sub>1c</sub>/mol Hb)
  - ✓ **(%) DCCT (převážně v USA) (Diabetes Control and Complication Trial)**
  
- ❑ **2010, konsensus ADA, IFCC, IFD, EASD, ISPAP**



# Rozhodovací meze HbA<sub>1c</sub>

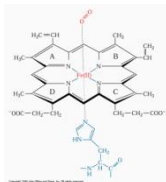
<b>Referenční interval</b>	<b>20 – 42 mmol/mol</b>
<b>Rozhodovací meze Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní)</b>	<b>43 – 60 mmol/mol</b>

## ❑ Preanalytické požadavky:

- ✓ **Analyzovaný materiál: B – odběr do EDTA**
- ✓ **stabilita: 2d (+20 až +25°C); 1 týden (+4 až +8°C); 1rok (<-20°C lépe při -80°C)**

## ❑ Poznámky:

- ✓ **snížená hodnota doby života erytrocytů**
- ✓ **hemoglobinopatie, karbamylace (uremičtí pacienti) – ovlivnění koncentrace HbA<sub>1c</sub> v rutinních metodách**

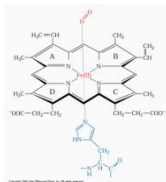


# Požadavky na analytickou kvalitu měření

<b>Mezilehlá preciznost</b>	<b>CV &lt; 1,0 %</b>
<b>Pravdivost (Bias)</b>	<b>B &lt; 1,5 %</b>
<b>Celková chyba</b>	<b>TE &lt; 6,9 %</b>
<b>Metrologická návaznost</b>	referenční metoda LC-ESI/MS

- Doporučení ČDS a ČSKB; vydáno v únoru 2012, aktuální korekce 18.2.2015

<b>Intraindividuální biologická variabilita</b>	<b>1,9</b>	<b>Preciznost odvozená z biologických variabilit</b>	<b>1,0</b>
<b>Interindividuální biologická variabilita</b>	<b>5,7</b>	<b>Pravdivost odvozená z biologických variabilit</b>	<b>1,5</b>
<b>Celková biologická variabilita</b>		<b>Celková chyba odvozená z biologických variabilit</b>	<b>3,1</b>

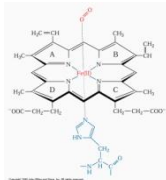


# Nejistota výsledků měření

---

- na základě kombinace dílčích nejistot odpovídajících preciznosti, hodnotě bias a hodnotě  $C_{vi}$  lze odhadnout výslednou kombinovanou nejistotu výsledků měření ( $U_c$ ) 6 až 9% (95% interval spolehlivosti)





# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

---

## 1. Referenční metody:

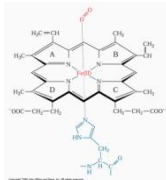
- ✓ izolace a hemolýza erytrocytů (+ odstranění labilních pre-HbA1c)
- ✓ enzymové štěpení hemoglobinu (endoproteináza Glu-C)
- ✓ analytické měření (detekce glykovaných hexapeptidů)

### a) LC/ESI/MS:

Glykovaný hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) je ze směsi peptidů separován, detekován, identifikován hmotnostní spektrometrií a kvantifikován na podkladě rozdílných hodnot  $m/z$ . Z poměru hodnot  $m/z$  analyzovaných vzorků a kalibrátorů se vypočítá hodnota HbA<sub>1c</sub>.

### a) CE/ESI/MS:

První separace se provede pomocí HPLC, jednotlivé frakce se sbírají, následuje další separace této směsi pomocí CE. Glykovaný a neglykovaný hexapeptid jsou odděleny na základě různých elektromigračních časů a kvantifikovány spektrofotometrickým detektorem.

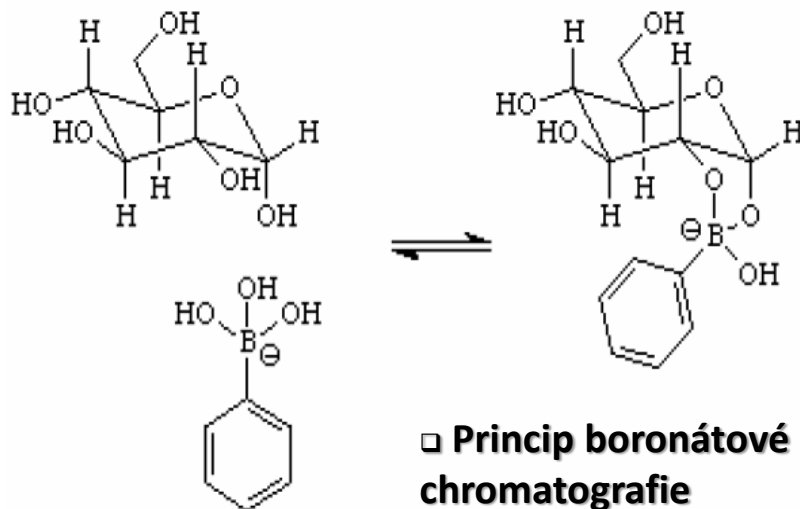
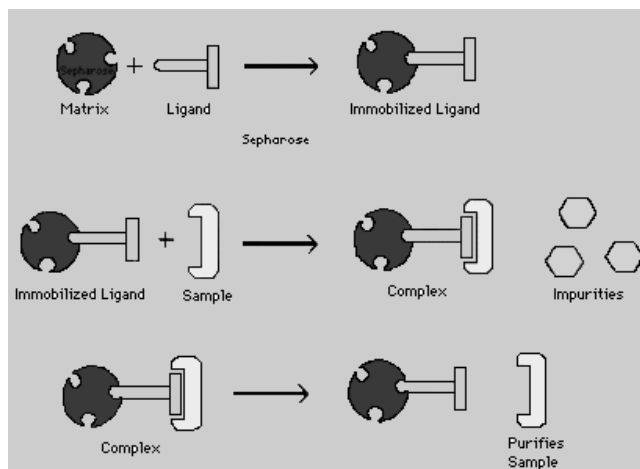


# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

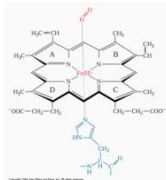
## 2. Doporučené rutinní metody - chromatografické:

### a) Afinitní chromatografie (aminofenylboronátová):

- ❑ založena na interakci glykovaného hemoglobinu s imobilizovaným boronátovým aniontem
- ❑ po eluci neglykovaných frakcí hemoglobinu, dojde k uvolnění vazby a po eluci se stanoví hemoglobinové frakce detektorem, který měří absorbance při 415 nm
- ❑ koncentrace HbA<sub>1c</sub> se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu



❑ Princip boronátové chromatografie



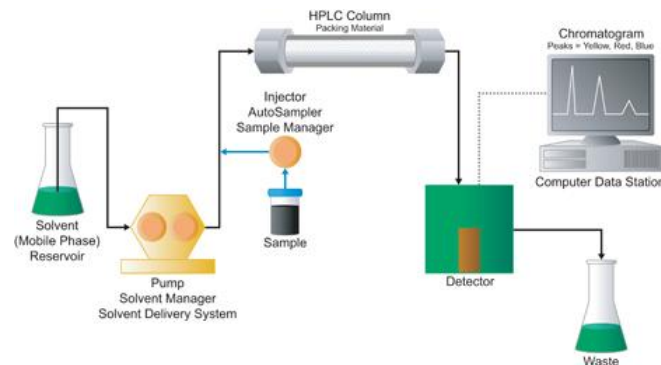
# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

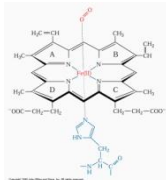
## 2. Doporučené rutinní metody - chromatografické:

### b) Kapalinová chromatografie s výměnou iontů (IEC)

- ❑ separace hemoglobinů a jeho složek na slabě kyselých ionexech
- ❑ jednotlivé frakce hemoglobinu jsou rozděleny podle jejich různých fyzikálně-chemických vlastností (velikost náboje) v měnícím se prostředí (změna koncentrace iontů, změna pH)
- ❑ frakce se po rozdělení detekují v mobilní fázi detektorem, který měří absorbance při 415 nm
- ❑ koncentrace HbA<sub>1c</sub> se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu podle kalibrační křivky pomocí softwaru chromatografu

### c) HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)



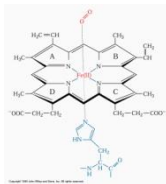


# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

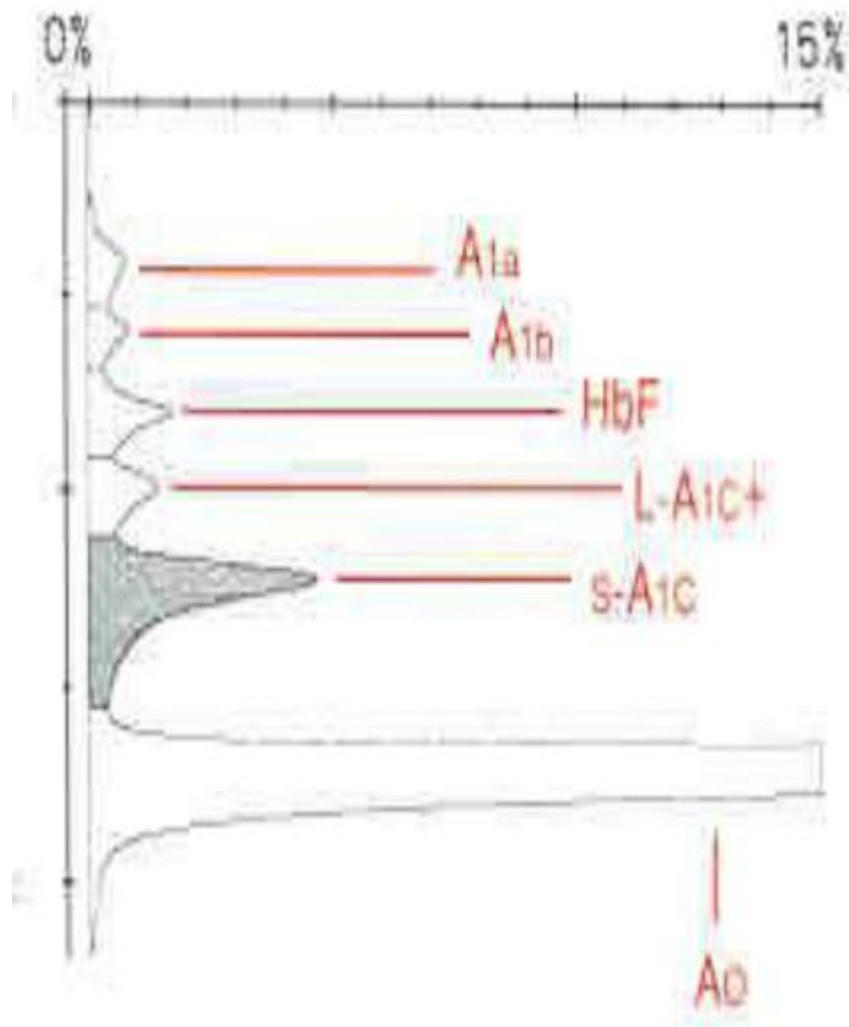
## □ HPLC

## Tosoh G8 System





# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

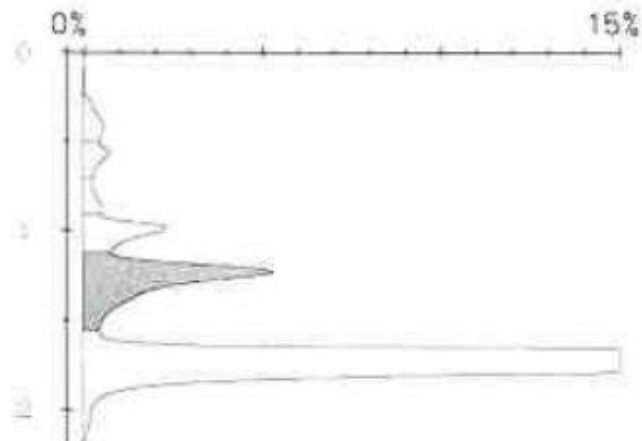


\*\*\*\*\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*\*\*\*\*

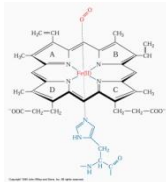
NO. 404 01020      1996/04/04 15:43  
 SAMPLE ID 03 - 10  
 CALIB Y = 1.0911X + 0.0765

NAME	%	TIME	AREA
A1A	0.6	0.43	13.70
A1B	0.5	0.57	12.19
F	0.4	0.89	9.21
LA1C+	1.6	0.99	36.68
SA1C	5.4	1.23	109.65
A0	92.0	1.69	2084.81

TOTAL AREA 2266.24  
 SA1C 5.4    TOTAL A1 6.5



□ HPLC



# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

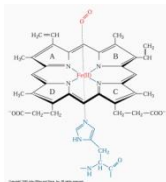
---

## □ HPLC

Premier Hb 9210







# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

## 2. Doporučené rutinní metody - imunoanalytické:

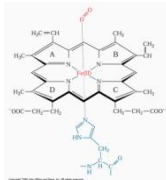
- ❑ založeny na vazbě protilátek proti β N-terminálně glykované tetrapeptidové nebo hexapeptidové skupině

### ❑ Imunoturbidimetrie, imunonefelometrie:

- ❑ nejčastěji se používá stanovení TINIA
- ❑ k analyzovanému vzorku (lyzovaná krev) se přidá specifická protilátka proti HbA<sub>1c</sub>; nenasázaná (přebytek) protilátka se stanoví po reakci s polyhaptenovým činidlem za vzniku nerozpustného komplexu
- ❑ rychlost reakce se stanoví turbidimetricky většinou při 340 nm a je nepřímo úměrná koncentraci HbA<sub>1c</sub> v analyzovaném vzorku



### ❑ CMIA



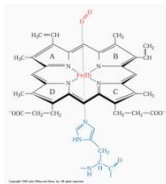
# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

## 2. Doporučené rutinní metody - imunoanalytické:

### □ CMIA: např. Abbott Architect i2000 SR



- hemolýza erytrocytů, uvolnění HbA<sub>1c</sub>
- inkubace s magnetickými mikročásticemi, navázání antigenu (HbA<sub>1c</sub>)
- promytí, odstranění nenavázaného antigenu
- přidání Anti-HbA<sub>1c</sub> mab (konjugát) značený akridiniem
- vazba konjugátu na mikročástice
- promytí, odstranění nenavázaného konjugátu
- chemiluminiscence (po změně pH a přidání peroxidu)

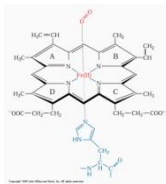


# HbA<sub>1c</sub> – metody stanovení

---

## 2. Doporučené rutinní metody - elektroforetické:

- elektroforéza v agarózovém gelu (ELFO)
- kapilární elektroforéza (HPCE)
- izoelektrická fokusace (IEF)



# Co může ovlivnit hodnocení vyšetření HbA<sub>1c</sub>

---

- ❑ **doba života erytrocytů ( $120 \pm 10$  d) !**
- ❑ **přítomnost vzácnějších typů hemoglobinu (1165 variant Hb, např. HbS, HbC, HbE, HbD)**
- ❑ **hemolýza, ikterus**
- ❑ **těžké krvácení**
- ❑ **věk, rasa, terapie,...**