

# Glykovaný hemoglobin HbA1c

Petr Breinek

# Názvosloví

HbA1c

$\beta$ N-1-deoxyfruktosyl hemoglobin

DOF hemoglobin

stabilní adukt glukózy s N-terminální  
aminoskupinou valinu  $\beta$ -řetězce  
hemoglobinu

Návrh (IFCC-IUPAC C-NPU):

Hemoglobin beta chain(Blood)-N-(1-deoxyfructos-1-yl)hemoglobin beta chain

Jednotky: místo % → mmol/mol

# HbA1c

## **Vyšetření se užívá ke:**

- **Sledování stavu diabetu mellitu**
- **Kontrola účinnosti léčby**

# Cíl léčby diabetu

- **Udržet koncentraci glukózy co nejbliže fyziologickým – normálním hodnotám**
- **Snížit riziko diabetických komplikací** (zrak, ledviny, kardiovaskulární a nervové choroby)

# Co je vyšetřováno?

- ❖ **HbA1c odpovídá dlouhodobému stavu koncentrace glukózy v krvi** (průměrný poločas života erytrocytů je 60 dní → **koncentrace HbA1c odráží průměrnou koncentraci glukózy v průběhu předcházejících 2-3 měsíců**)
- ❖ **HbA1c neodpovídá aktuální hodnotě glykémie, jejímu poklesu nebo zvýšení** (glykémie může velmi kolísat beze změn HbA1c)

# Co může ovlivnit hodnocení vyšetření HbA1c

- ❖ Přítomnost abnormálního typu hemoglobinu (např. thalasemie)
- ❖ Hemolýza
- ❖ Těžké krvácení

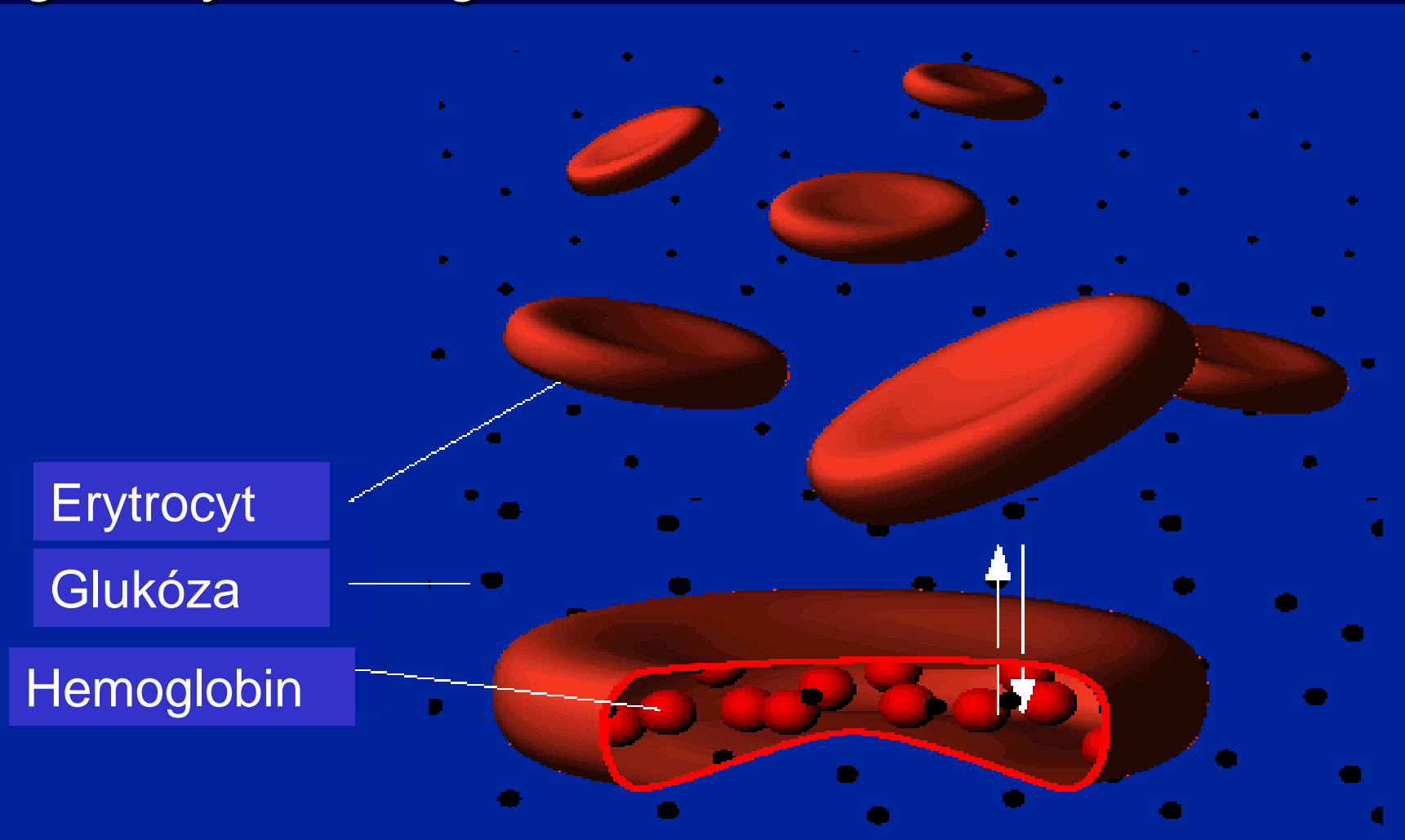
# Glykace proteinů

- chemická vazba sacharidů na N-koncové aminokyseliny proteinů (neenzymová reakce)
- in vivo- vznikají glykované (modifikované) proteiny se závažnými patobiochemickými důsledky
- in vitro- hnědnutí proteinů v přítomnosti sacharidů

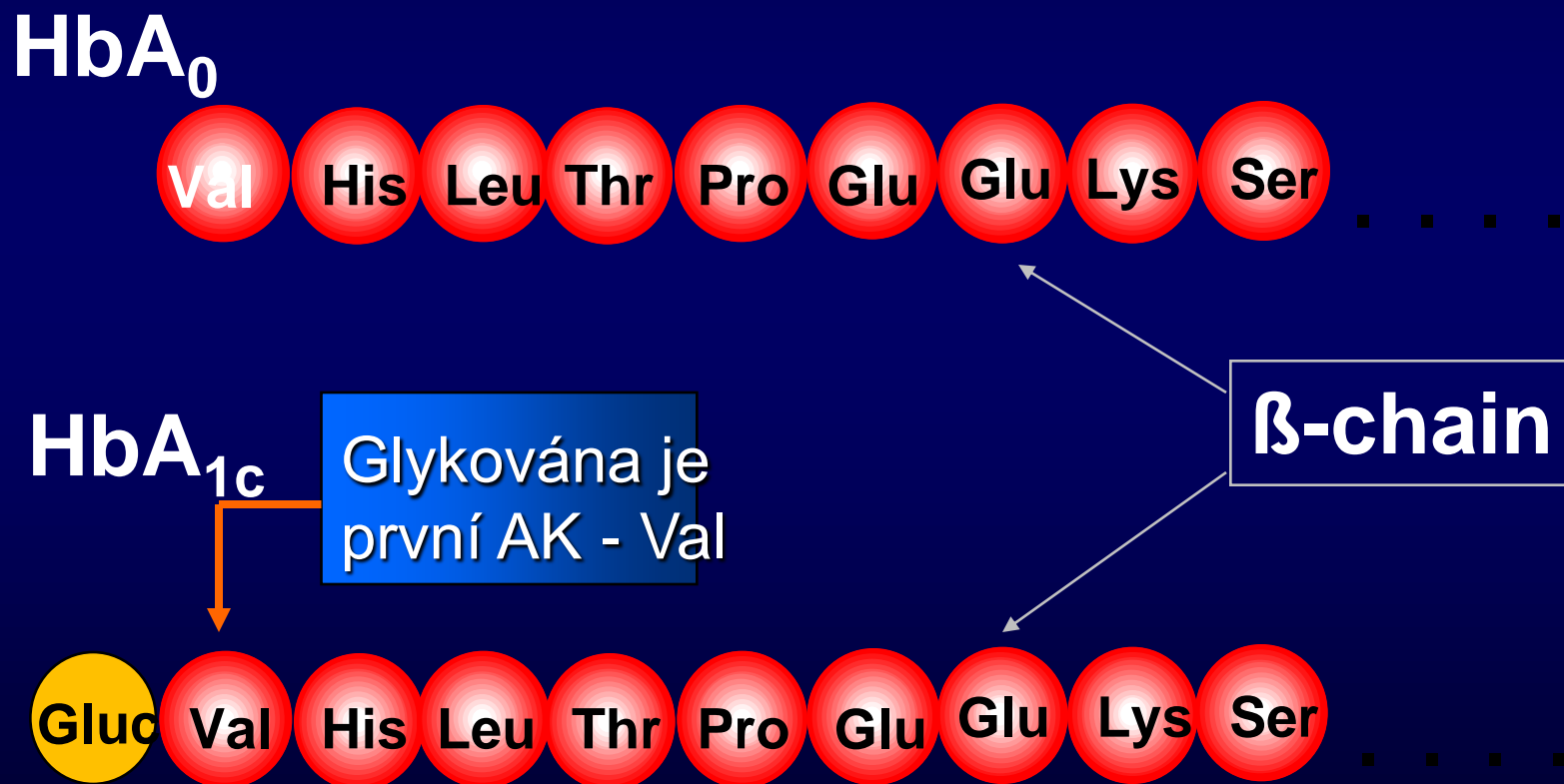


# Glykovaný hemoglobin

Vzniká glykací- neenzymovým navázáním  
glukózy k hemoglobinu

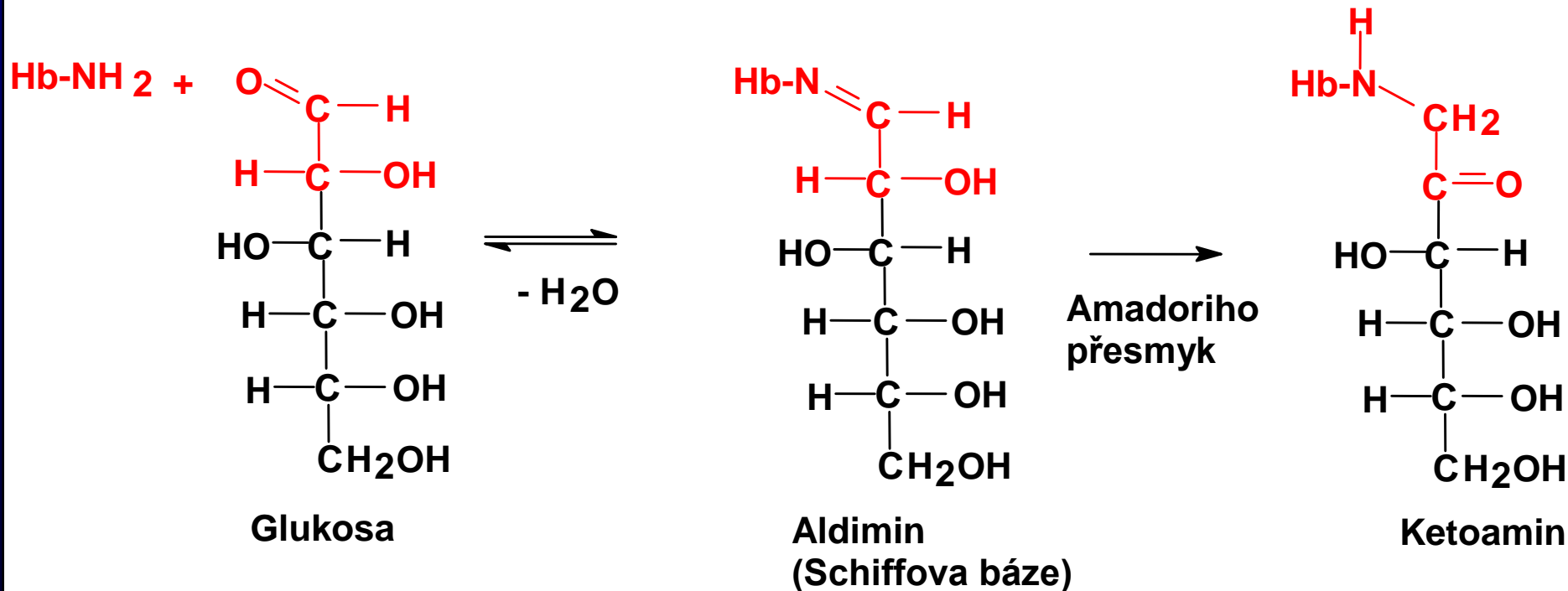


# HbA<sub>1c</sub> vzniká glykací na N-konci $\beta$ -řetězce hemoglobinu



# Glykace hemoglobinu

- rychlá tvorba labilní Schiffovy báze
- pomalý Amadoriho přesmyk za vzniku stabilního ketoaminu



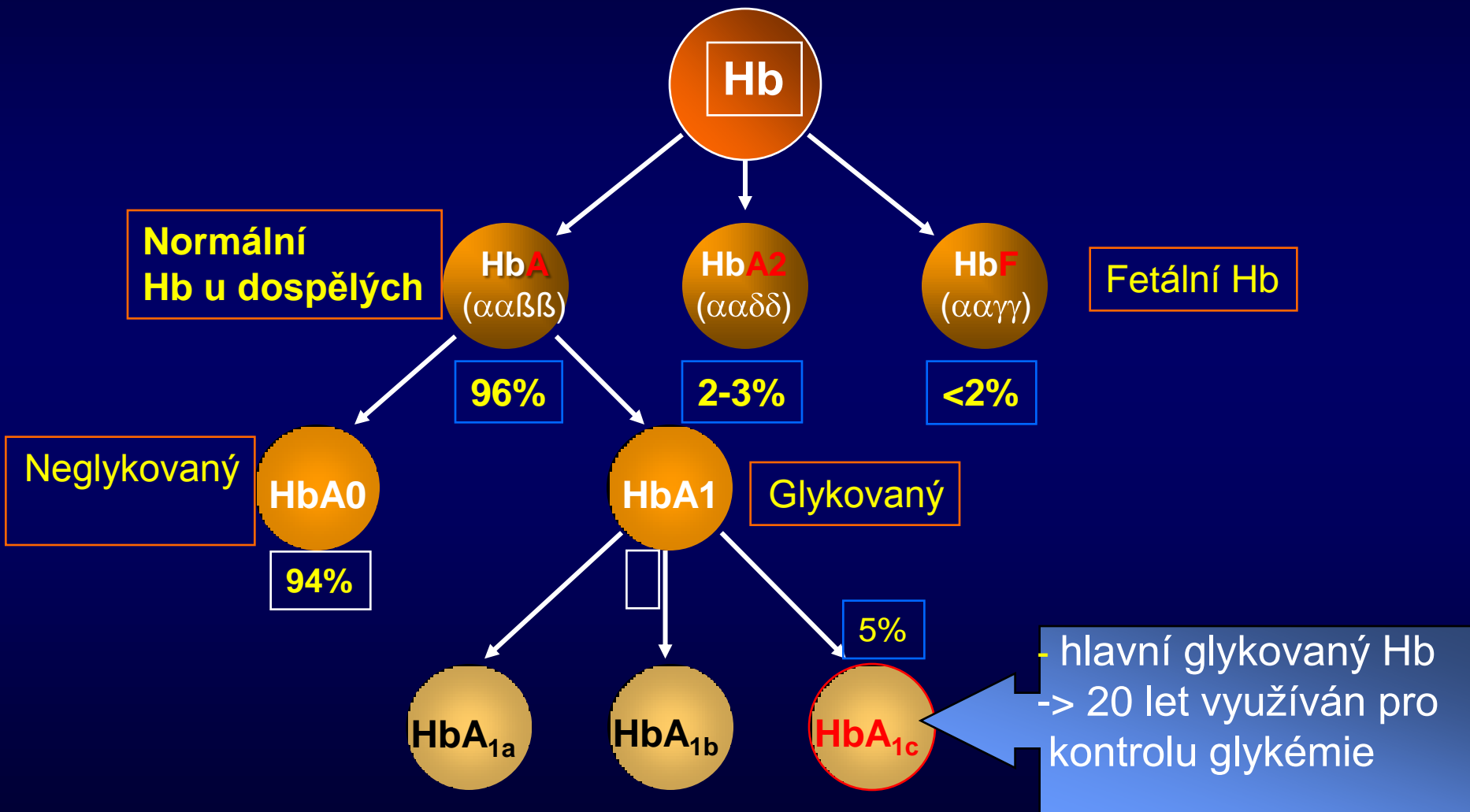
# AGE

Karboonylové skupiny produktů glykace zvolna reagují s aminoskupinami dalších proteinů za vzniku vysokomolekulárních tzv. **produktů pozdních fází glykace** (**AGE**, advanced glycation end-products)

# Faktory ovlivňující neenzymovou glykaci proteinů

- koncentrace sacharidů a proteinů a jejich kolísání  
(koncentrace proteinů v krvi relativně konstantní, rychlost glykace je úměrná koncentraci sacharidů)
- doba expozice
- biologický poločas daného proteinu
- teplota

# Hemoglobiny



# Odběr a analyzovaný materiál

- Krev (B) - odběr do EDTA

Stabilita:	2d	(+20 až +25°C)
	1t	(+4 až +8°C)
	1r	(<-20°C lépe při -80°C)

# Referenční meze

B-HbA1c

2,8-4,0 %

<b>Kompenzace diabetu</b>	<b>IFCC,2004</b>	do 2004
<b>Výborná</b>	<b>&lt; 4,5 %</b>	< 6,5 %
<b>Uspokojivá</b>	<b>4,5 - 6,0 %</b>	6,5 - 7,5 %
<b>Neuspokojivá</b>	<b>&gt; 6,0 %</b>	> 7,5%



# Jednotky měření (vyjadřování výsledků)

% (např. 4,5%)

mmol/mol (např. 45 mmolHbA1c/mol Hb)

# Metody stanovení

## 1. Referenční metody IFCC, 2002

Izolace a hemolýza erytrocytů (+ odstranění labilních pre-HbA1c)

Enzymové štěpení hemoglobinu (endoproteináza Glu-C)

Analytické měření (detekce glykovaných hexapeptidů)

**a) HPLC/ESI /MS**

**b) HPLC/CE**

**c) RM DCCT**

(Diabetes Control and Complication Trial, USA, v programu  
**NGSP**=The National Glycohemoglobin Standardization  
Program)

CRM: IRMM 466  
IRMM 467  
(směs čistých HbA0 a HbA1c)

### Přesnost měření a nejistota

Opakovatelnost  $CV=1,05\%$

Reprodukovatelnost  $CV=1,8\%$

Kombinovaná standardní nejistota primárních kalibrátorů  $0,63\%$

TMU (teoretická):  $4\%$

## 2. Doporučené metody:

### a) Chromatografické

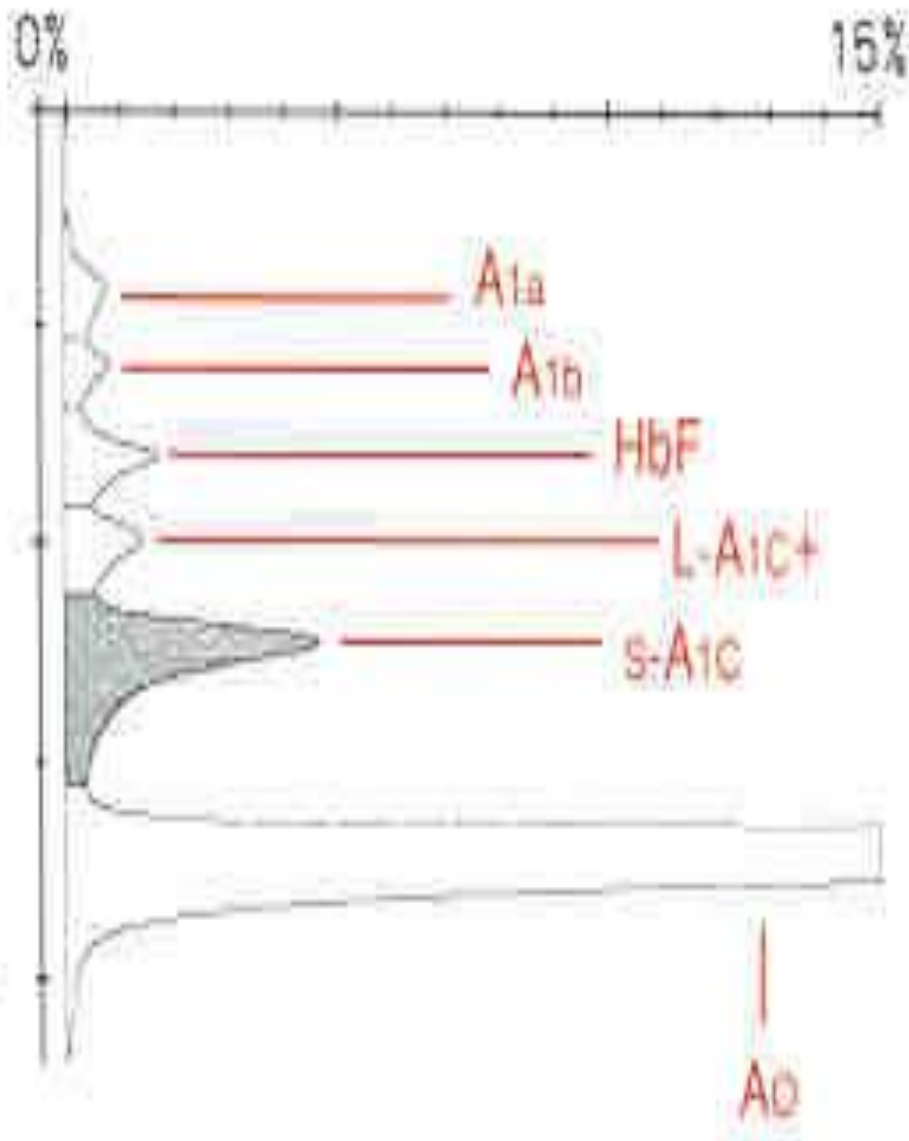
- ❖ HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
- ❖ LC (nízkotlaká kapalinová chromatografie)

Afinitní chromatografie (aminofenylboronátová)

IEC (kapalinová chromatografie s výměnou iontů)

# HPLC Tosoh



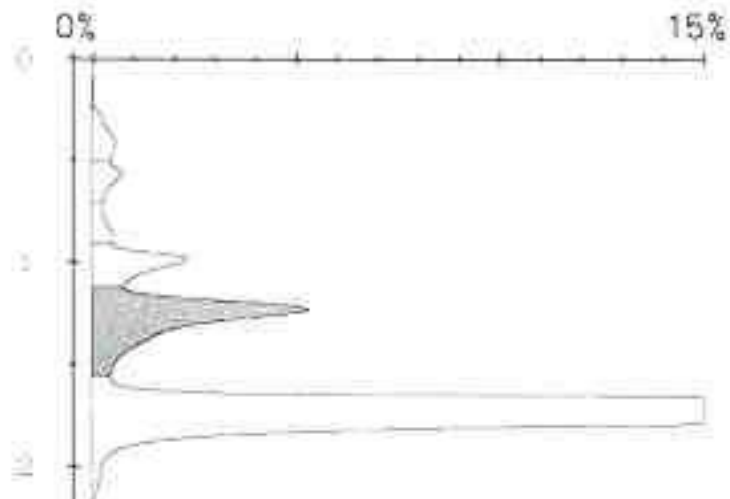


\*\*\*\*\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*\*\*\*\*

NO. 404 01D20 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



## b) Elektroforetické

ELFO (elektroforéza)

IEF (izoelektrická fokusace)

CE a HPCE (kapilární elektroforéza)

## c) Imunoanalytické

**IT** (imunoturbidimetrie)

**TINIA** (Turbidimetric Inhibition Immunoassay)  
(Imunoinhibiční turbidimetrie)

**IN** (imunonefelometrie)