

Glykovaný hemoglobin HbA1c

Petr Breinek

Glykovaný hemoglobin (HbA1c)

- Ukazatel dlouhodobé kompenzace diabetu
- Diagnostika onemocnění
- Kontrola terapie
- Včasné odhalení hrozících komplikací
- V roce 2009 ADA (USA) připustila užití HbA1c k diagnostice diabetu

Výhody proti glykémii

- 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

Návrh (IFCC-IUPAC C-NPU):

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

Jednotky: místo % → mmol/mol

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

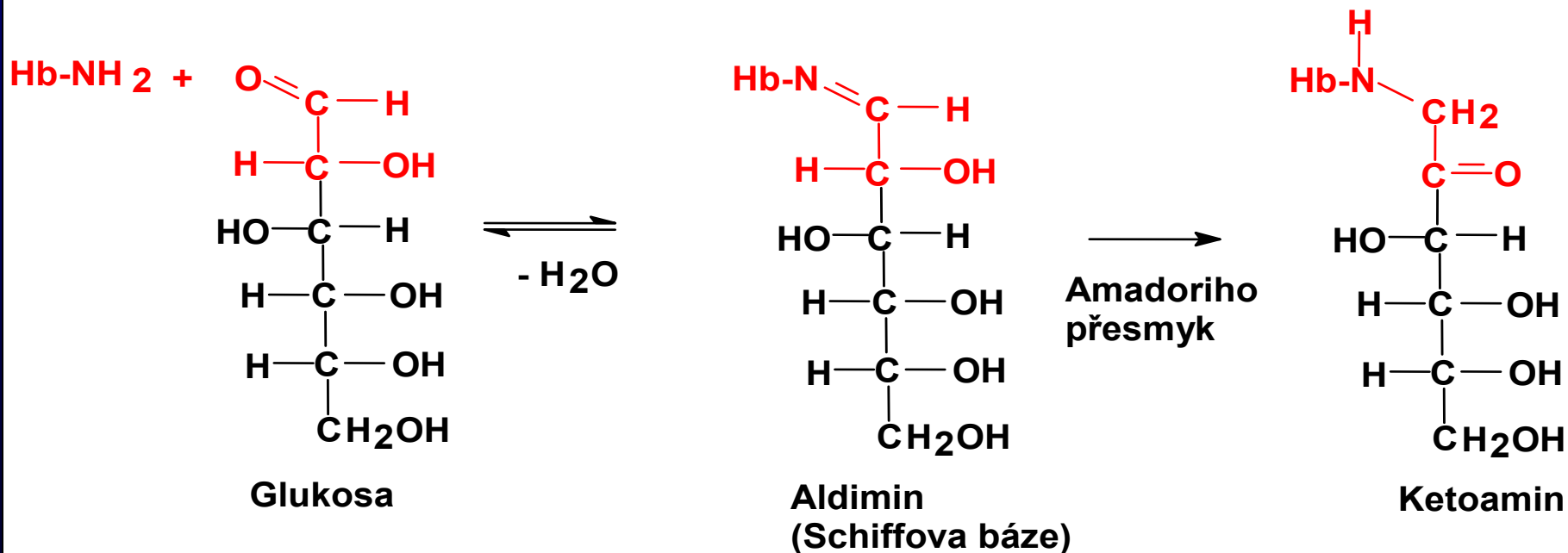
- ❖ Přítomnost abnormálního typu hemoglobinu (např. thalasemie)
- ❖ Hemolýza
- ❖ Těžké krvácení

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

Glykace hemoglobinu

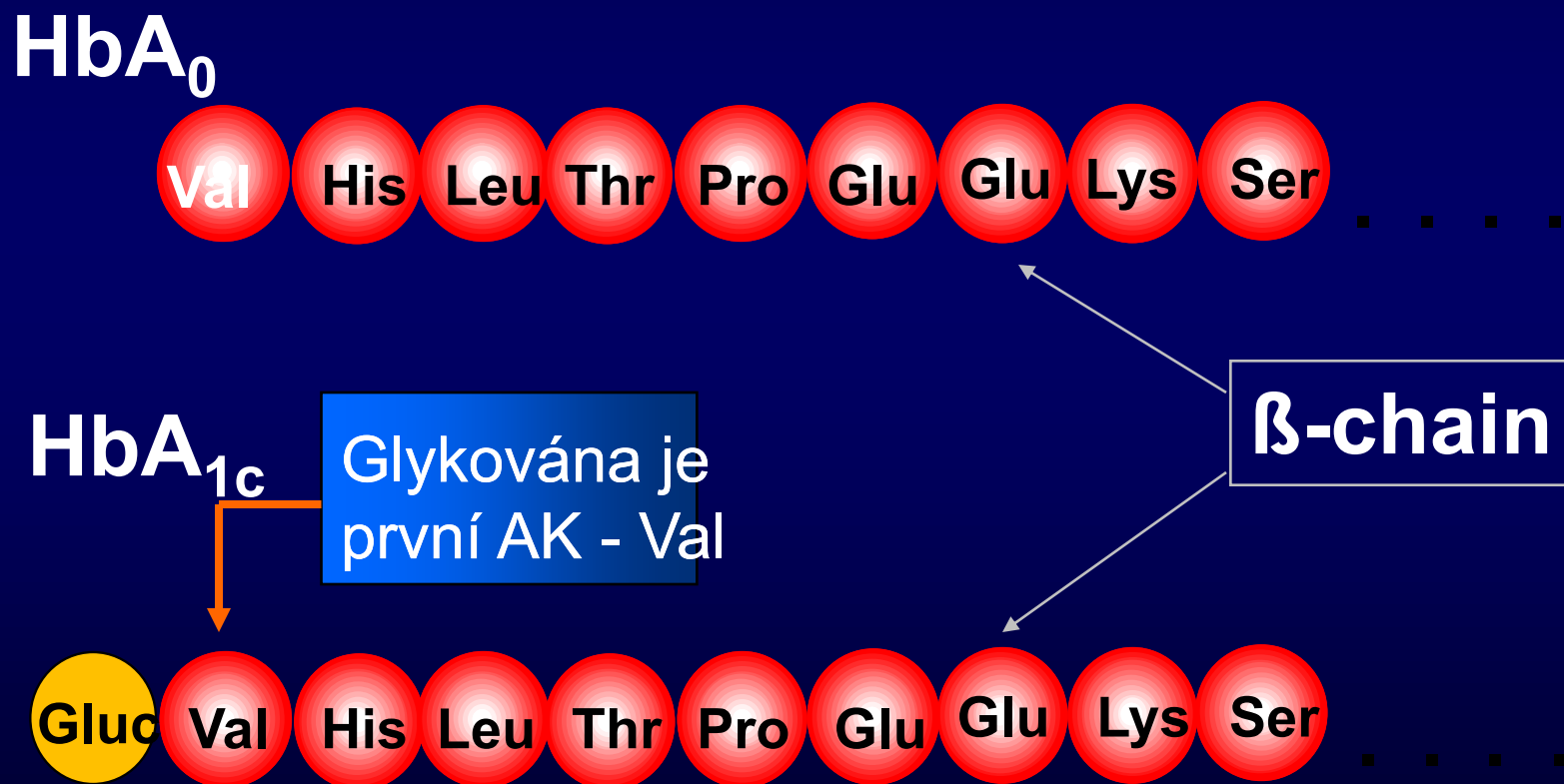
- rychlá tvorba labilní Schiffovy báze (aldimin)
- pomalý Amadoriho přesmyk za vzniku stabilního ketoaminu (ireversibilní)
- koncentrace závisí na koncentraci glukózy a poločasu života erytrocytů



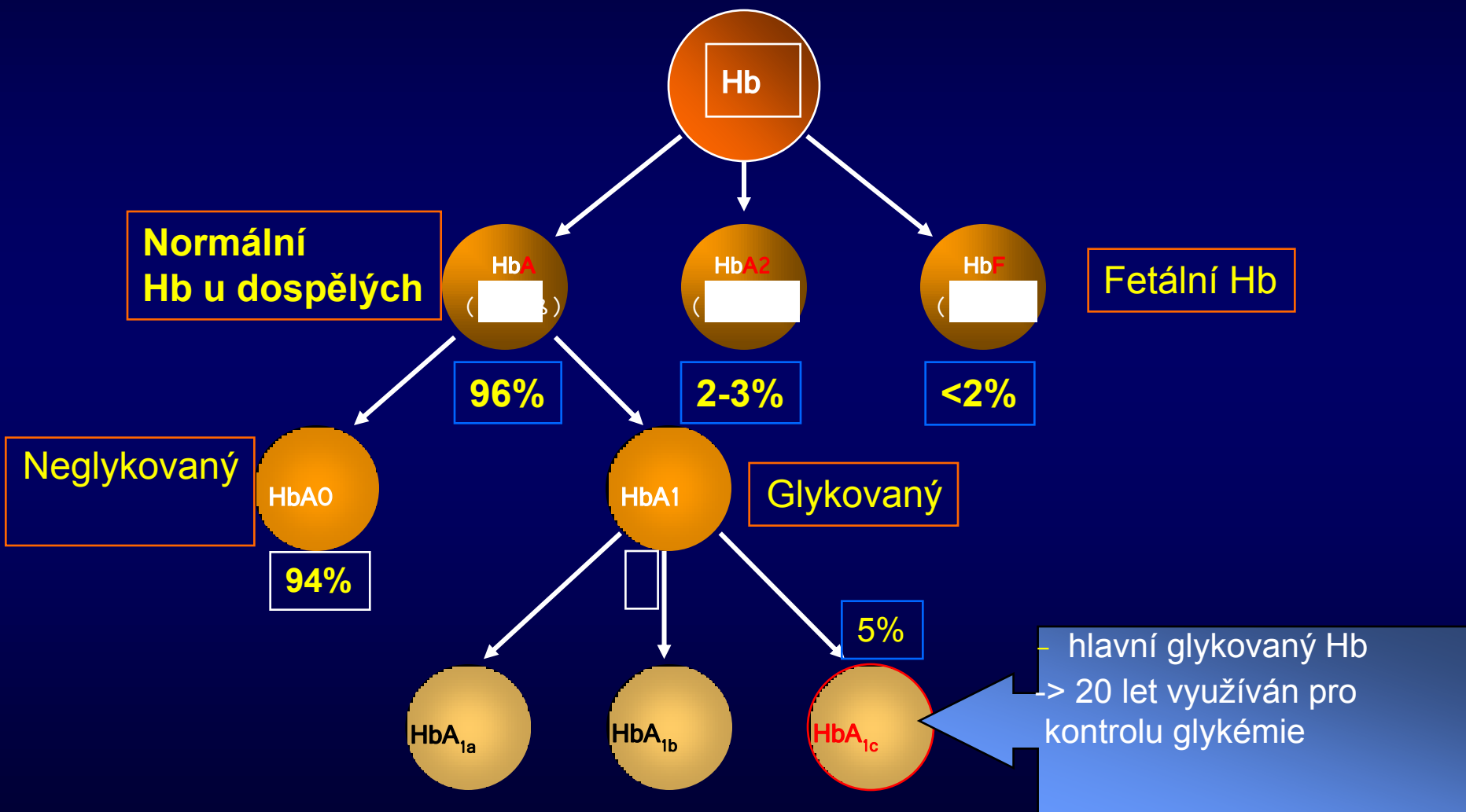
Faktory ovlivňující neenzymovou glykaci proteinů

- 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

HbA_{1c} vzniká glykací na N-konci β -řetězce hemoglobinu



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) |

- HbA1c by měl být stanovován u nemocných minimálně 2x ročně, optimálně 4x ročně
- DM 1.typu – 4x ročně
- DM 2.typu – 1x ročně, při léčbě perorálními antidiabetiky 2x ročně, inzulinem 4x ročně

Referenční meze

B-HbA1c

2,8-4,0 %

| Kompenzace diabetu | IFCC,2004 | do 2004 |
|---------------------------|--------------------|-------------|
| Výborná | < 4,5 % | < 6,5 % |
| Uspokojivá | 4,5 - 6,0 % | 6,5 - 7,5 % |
| Neuspokojivá | > 6,0 % | > 7,5% |

Referenční meze

| Klinický stav | IFCC,2004 % | IFCC mmol/mol |
|------------------------|----------------|------------------|
| Zvýšené riziko DM | 4,2 - 4,6 % | 42 - 46 |
| Diagnóza DM | ≥ 4,7% | ≥ 47 |
| Kompenzovaný DM | ≥ 5,3% | ≥ 53 |
| Indikace změny terapie | ≥ 6,4 % | ≥ 64 |

Přepočty výsledků

- $X_{\text{mmol/mol}} = 10 \cdot X_{\% \text{IFCC}}$
- $X_{\text{mmol/mol}} = (X_{\% \text{DCCT}} - 2,15) / 0,0915$

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 (HPLC)

(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**)

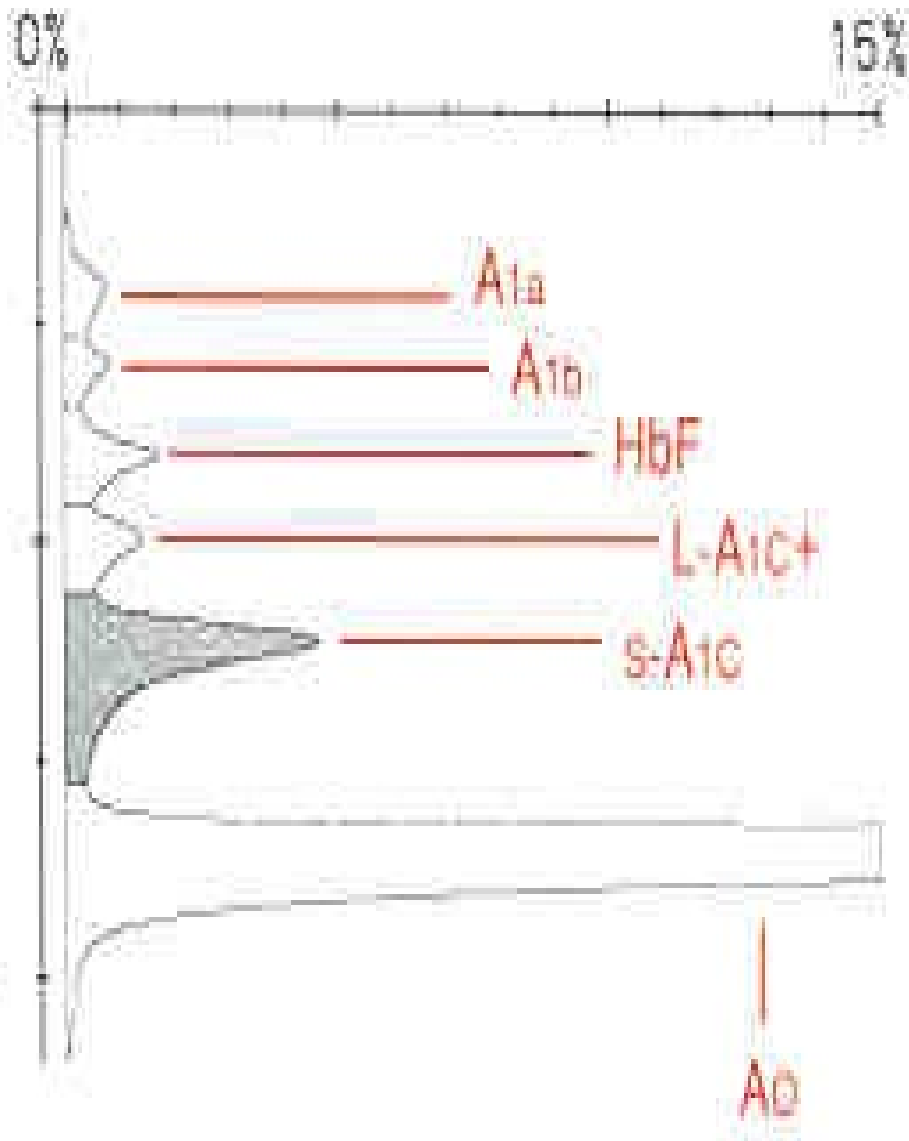
Princip (Tosoh G7)

Iontově výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- Hemolyzačním a promývacím roztokem se vzorek naředí a přivede na chromatografickou kolonu
- Používá se třístupňový gradient roztoků s různou koncentrací solí
- Na koloně dochází k výměně kationtů a rozdělení hemoglobinů
- Rozdělené frakce postupují k detektoru, kde se měří absorbance při 415nm
- Jednotlivé typy hemoglobinových frakcí jsou vyjádřené v % celkového množství hemoglobinu

HPLC Tosoh



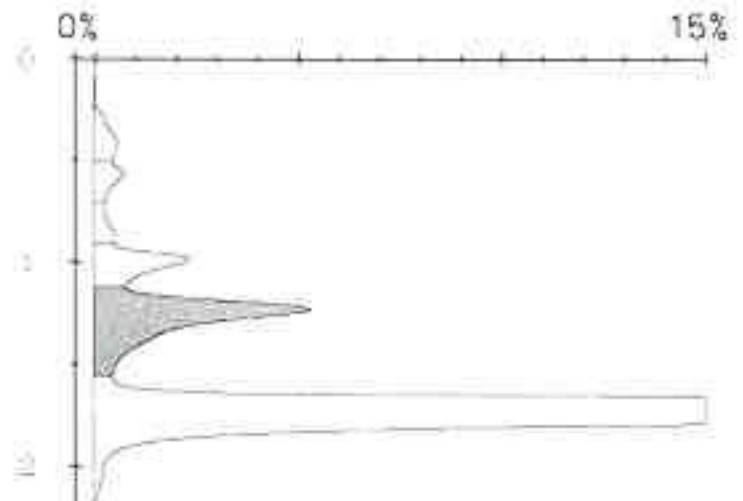


***** GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *****

NO. 404 01D20 1998/04/04 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)