

Glykovaný hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c})

Petr Breinek



Klinický význam stanovení HbA1c

Rutinní a efektivní **nástroj sledování průběhu DM** (diabetes mellitus)

- **Ukazatel dlouhodobé hodnoty koncentrace glukózy v krvi (kompenzace diabetu)**
- **Diagnostické kritérium DM**
- **Kontrola terapie**
- **Včasné odhalení hrozících komplikací**

Glykace

Glykace je neenzymové navázání (adice) cukru na proteiny za vzniku fruktosaminu.

Glykovaný albumin vzniká navázáním cukru na albumin

Faktory ovlivňující neenzymovou glykaci proteinů

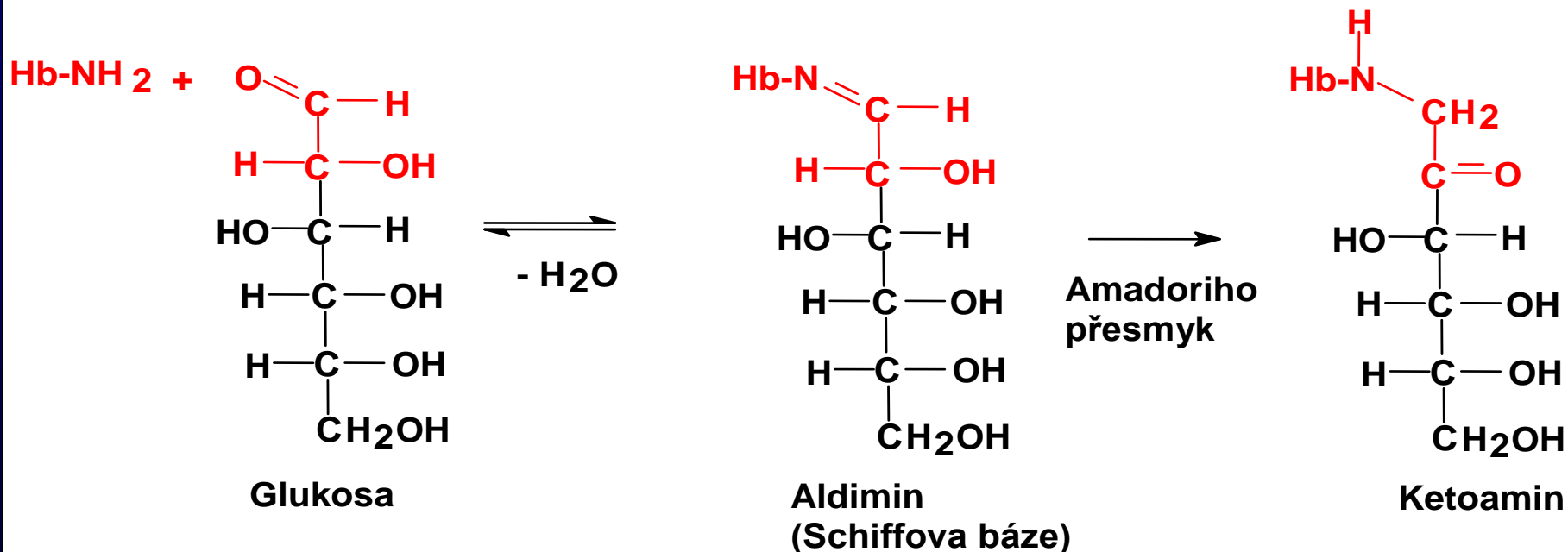
- **Koncentrace sacharidů a proteinů a jejich kolísání**

(koncentrace proteinů v krvi relativně konstantní, rychlost glykace je úměrná koncentraci sacharidů)

- Doba expozice
- Biologický poločas daného proteinu
- Teplota

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



Názvosloví

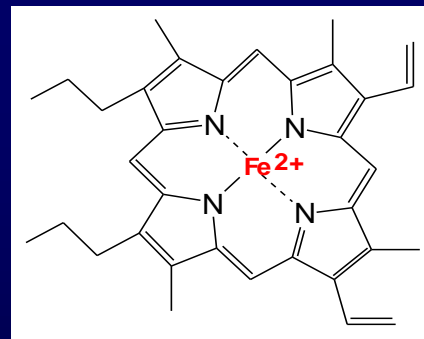
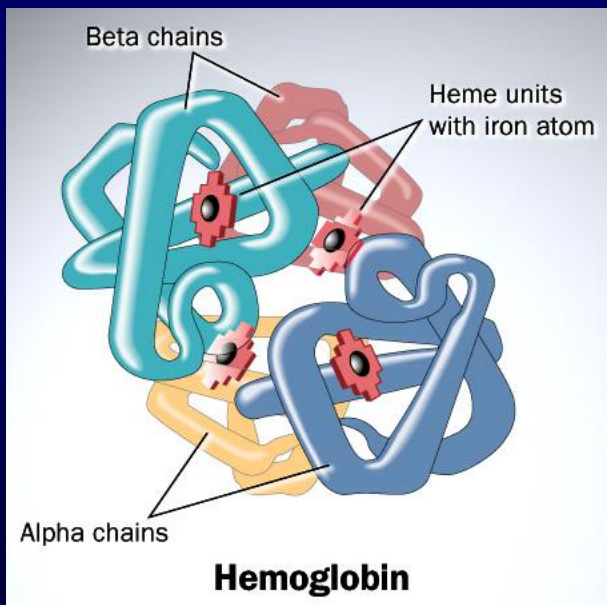
- HbA1c
- β N-1-deoxyfruktosyl hemoglobin
- DOF hemoglobin
- Hemoglobin beta chain(Blood)-N-(1-deoxyfructos-1-yl)hemoglobin beta chain

Hemoglobin (Hb)

Složená bílkovina – hemoprotein

- Bílkovina (globin)
- Hem

Tato transportní molekula plynů tvoří 95% objemu
krvinky



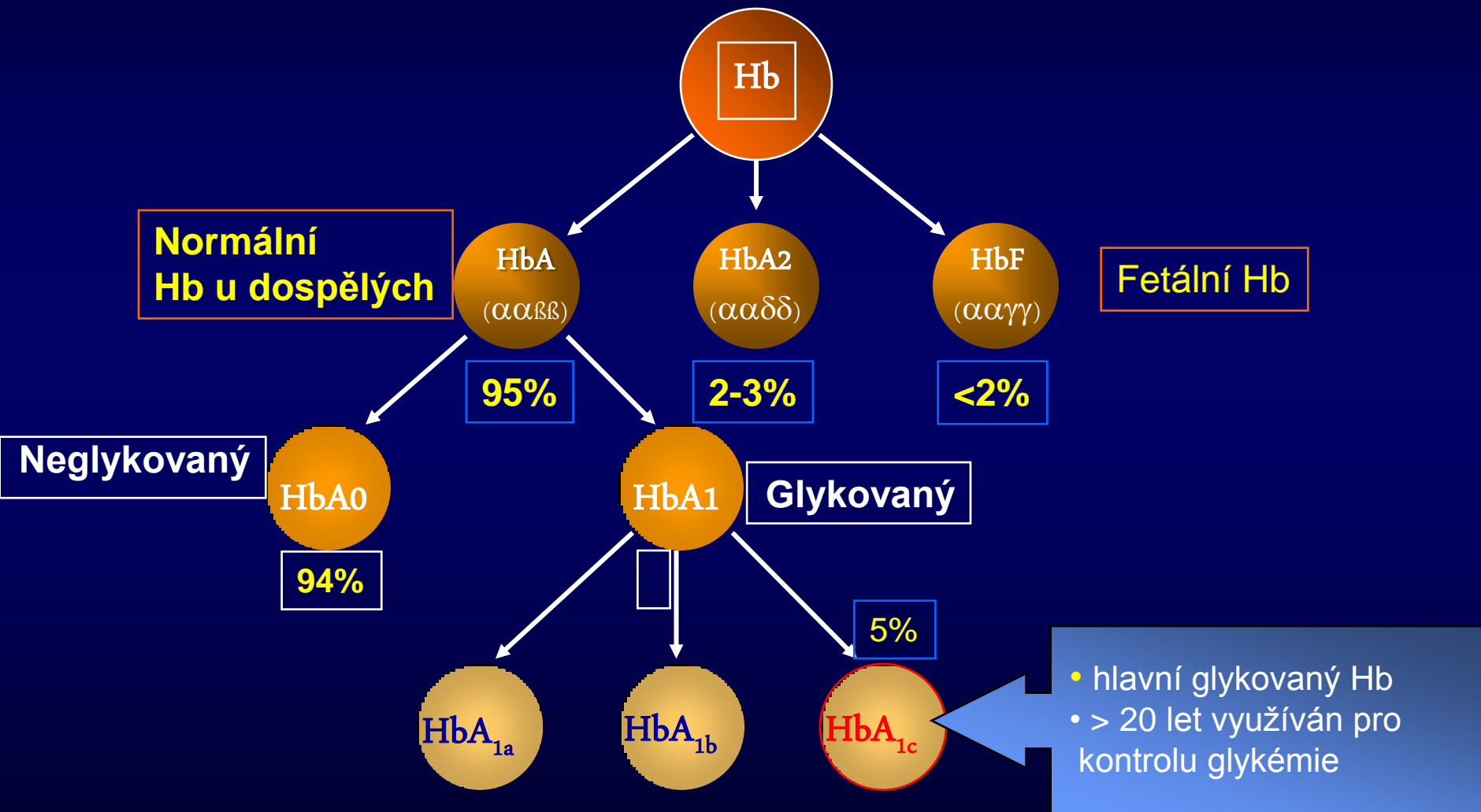
Složen ze **4 podjednotek:**

$2 \alpha + 2 \beta = \text{Hb A} \quad (95\%)$

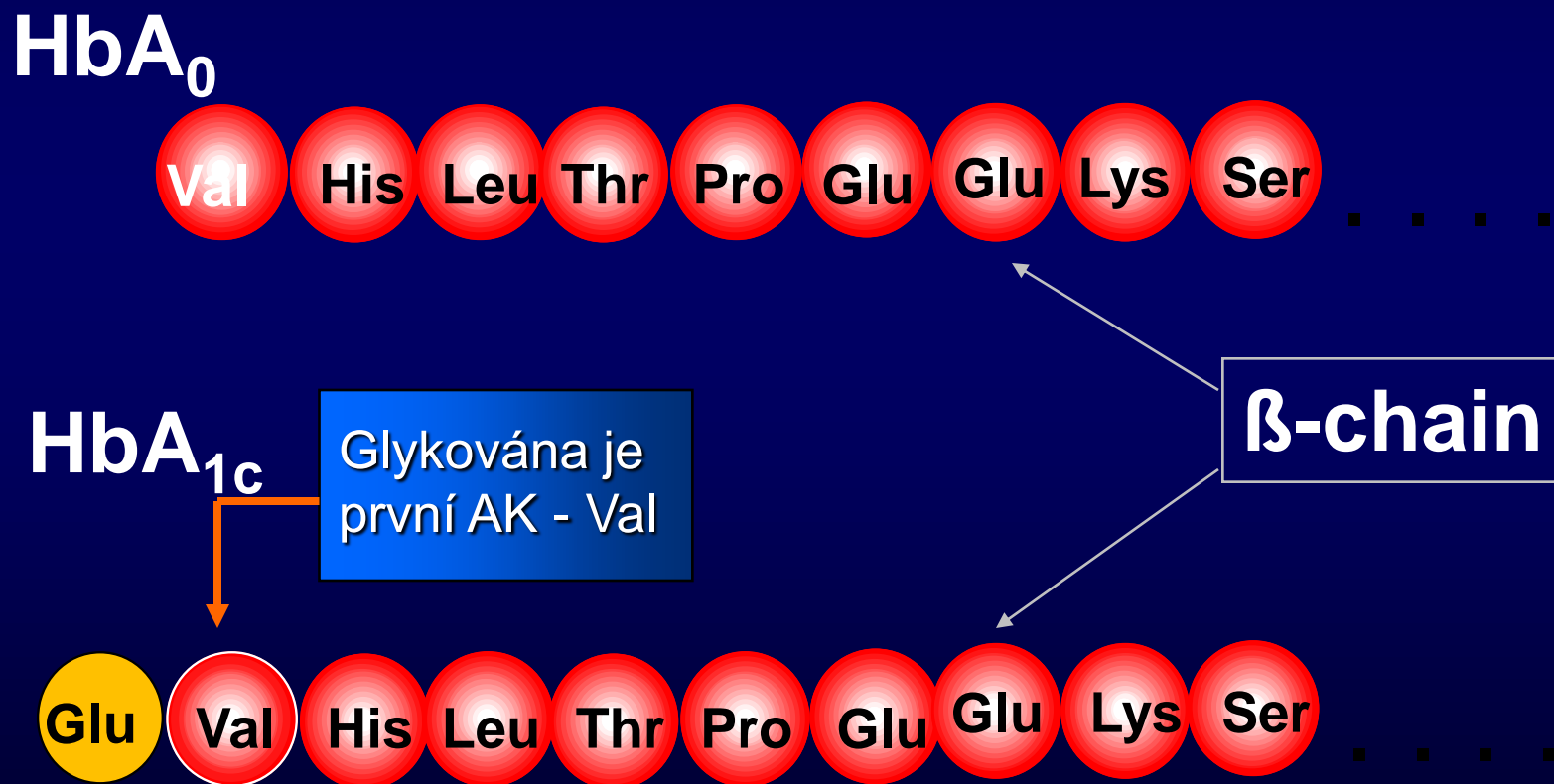
$2 \alpha + 2 \delta = \text{Hb A2} \quad (2-3\%)$

$2 \alpha + 2 \gamma = \text{Hb F} \quad (<2\%)$

Hemoglobiny



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



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

Vyjadřování výsledků

❖ od 1.1. 2012

mmol/mol (např. 45 mmolHbA1c/mol Hb)

❖ **%DCCT** (převážně v USA)

(Diabetes Control and Complication Trial)

2010, konsensus ADA, IFCC, IFD, EASD, ISPAP

Rozhodovací meze

| | |
|---|-------------------------|
| Referenční interval | 20 – 42 mmol/mol |
| Rozhodovací meze Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní) | 43 – 60 mmol/mol |

Preanalytické podmínky

- **Krev (B)** - odběr do EDTA
- **Stabilita:**
 - 2d (+20 až +25°C)
 - 1týden (+4 až +8°C)
 - 1rok (<-20°C lépe při -80°C)

Poznámky:

- snížená hodnota doby života erytrocytů
- Hemoglobinopatie, karbamylace (uremičtí pacienti),.....

Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost*

CV < 1,0 %

Pravdivost (bias)*

b < 1,5 %

Celková chyba*

TE < 3,1 %

Metrologická návaznost

**na referenční
metodu
LC-ESI/MS**

Intraindividuální biologická variabilita

1,9

Preciznost odvozená z biologických variabilit

1,0

Interindividuální biologická variabilita

5,7

Pravdivost odvozená z biologických variabilit

1,5

Celková biologická variabilita

Celková chyba odvozená z biologických variabilit

3,1

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)

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

b) CE/ESI/MS

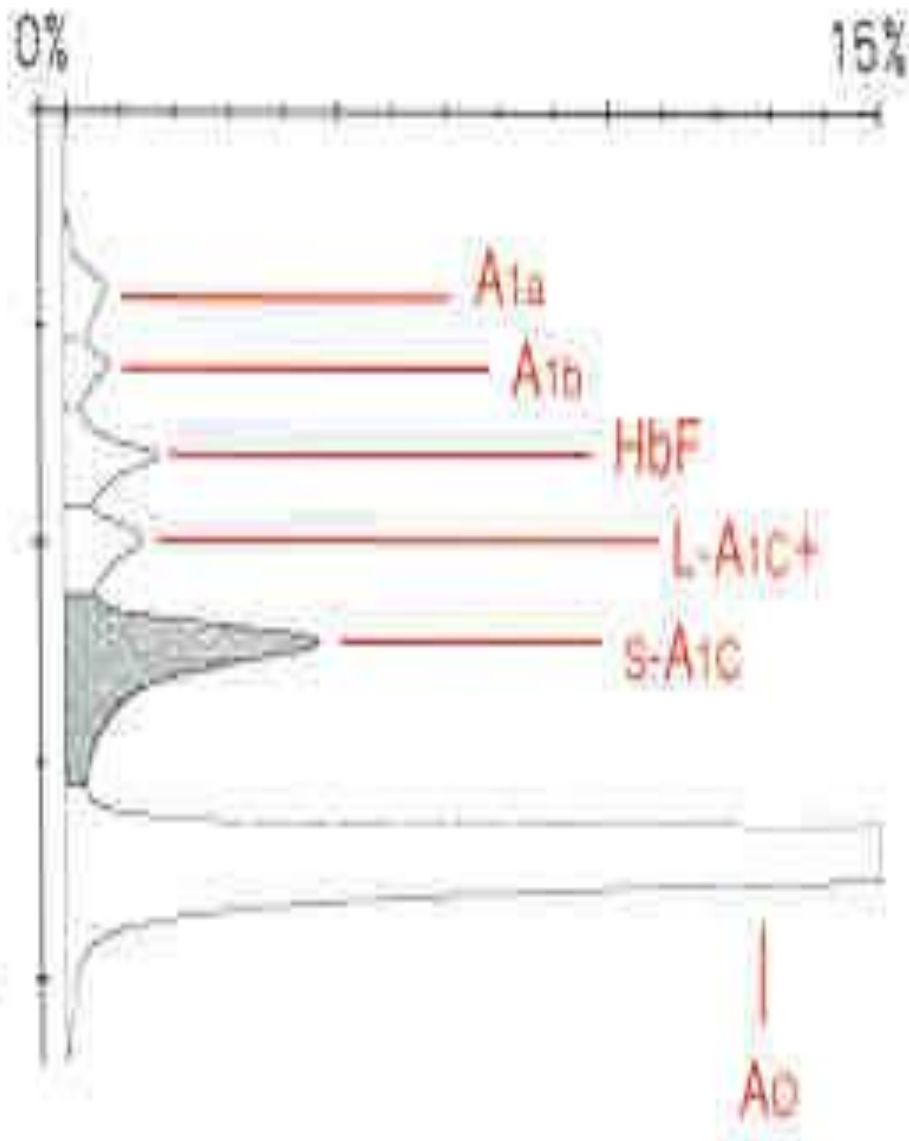
2. Doporučené metody

a) Chromatografické

- ❖ HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
- ❖ LC (nízkotlaká kapalinová chromatografie)
- **Afinitní chromatografie** (aminofenylboronátová)
- IEC (kapalinová chromatografie s **výměnou iontů**)

Tosoh G8 System



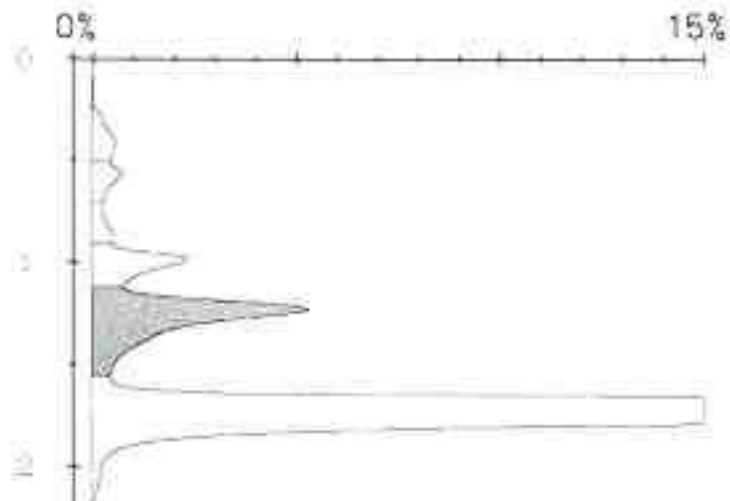


***** GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *****

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



Premier Hb 9210



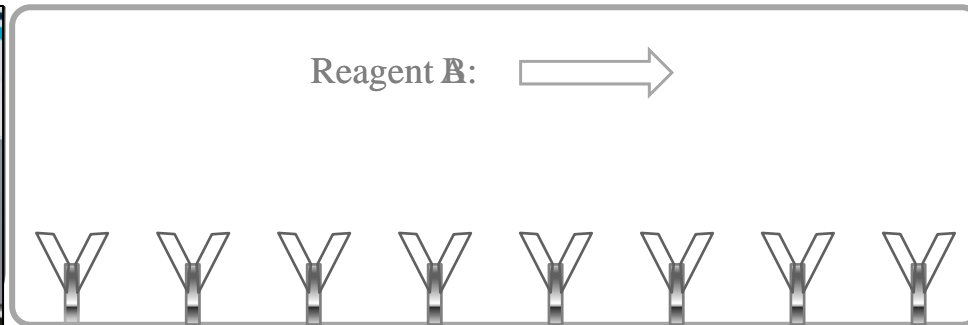
LC: Boronátová afinity chromatografie

Hb Hemoglobin

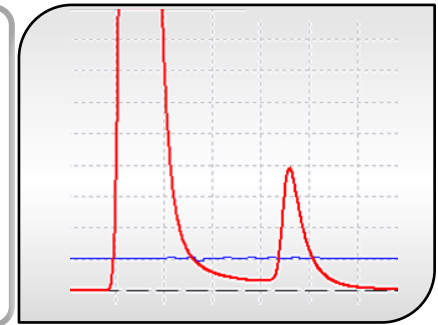
Hb
G Glykovaný hemoglobin



Dávkování vzorku



Kolona



Detektor

Kolona obsahuje aminofenylboronovou kyselinu navázanou na porézní gel
Hemolyzovaný vzorek je dávkován do kolony v mobilní fázi – pufr A
Glykovaná složka se váže na boronát, neglykovaná složka prochází kolonou na detektor
Glykovaná složka je eluována pufrém B

Glykovaná složka je eluována pufrém B

Co může ovlivnit hodnocení vyšetření HbA1c

- ❖ Doba života erytrocytů (120 ± 10 d) !
- ❖ Přítomnost vzácnějších typů hemoglobinu (1165 variant Hb, např. HbS, HbC, HbE, HbD)
- ❖ Hemolýza, Ikterus
- ❖ Těžké krvácení
- ❖ Věk, rasa, terapie,...

b) Elektroforetické

ELFO (elektroforéza)

IEF (izoelektrická fokusace)

CE a HPCE (kapilární elektroforéza)

c) Imunoanalytické

IT (imunoturbidimetrie)

TINIA (Turbidimetric Inhibition Immunoassay)
(Imunoinhibiční turbidimetrie)

IN (imunonefelometrie)

CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích)

CMIA (např. Abbott Architect i2000 SR)



- ✓ Hemolýza erytrocytů, uvolnění HbA1c
- ✓ Inkubace s magnetickými mikročasticemi, navázání antigenu (HbA1c)
- ✓ Promytí, odstranění nenavázaného antigenu
- ✓ Přidání Anti-HbA1c mab (konjugát) značený akridiniem
- ✓ Vazba konjugátu na mikročastice
- ✓ Promytí, odstranění nenavázaného konjugátu
- ✓ Chemiluminiscence (po změně pH a přidání peroxidu)

d) Spektrofotometrické Enzymové