



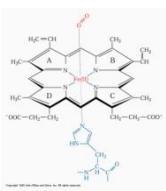
Glykovaný hemoglobin

Ing. Martina Podborská, Ph.D.

OKB FN Brno

Zpracováno s pomocí přednášek RNDr. Petra Breineka

Školní rok 2016/2017



Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c})

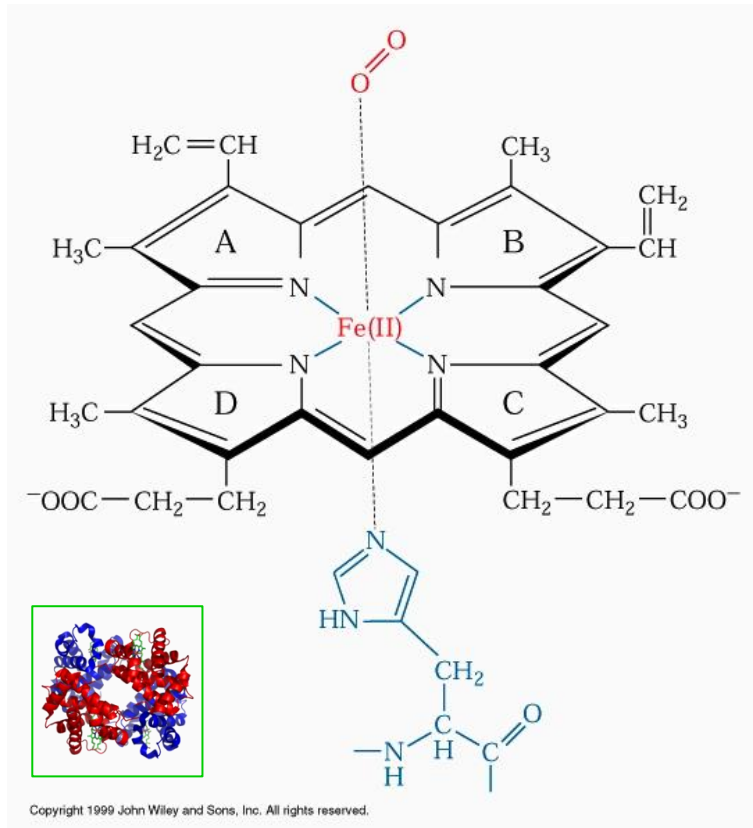
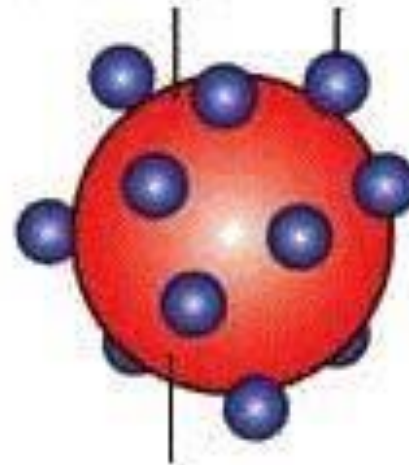
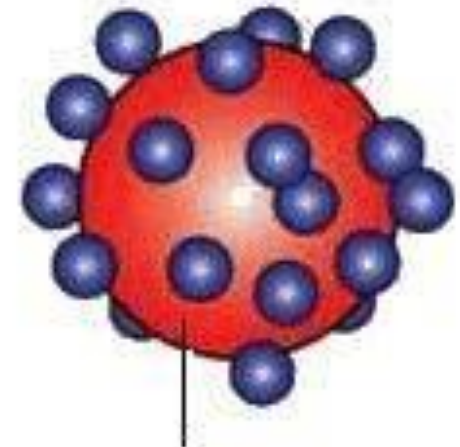


Schéma glykosylace hemoglobinu glukóza

molekula hemoglobinu



nízký stupeň glykace

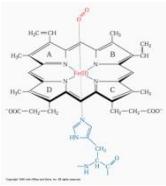


vysoký stupeň glykace

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

□ http://old.lf3.cuni.cz/diabetologie/lnz_Glykace.htm

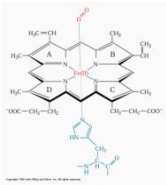
□ HbA_{1c} je základní vyšetření pro dlouhodobé sledování diabetu mellitu



HbA_{1c} – klinický význam

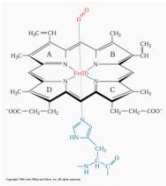
- ❑ rutinní a efektivní nástroj sledování průběhu DM (diabetu)
- ❑ HbA_{1c} ukazatel dlouhodobé průměrné koncentrace glukózy v krvi (období cca 6-8 týdnů nazpět) **→** umožňuje posoudit dlouhodobou kompenzaci diabetu
- ❑ diagnostické kritérium DM
- ❑ kontrola terapie
- ❑ včasné odhalení hrozících komplikací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

Hodnota HbA_{1c}	Interpretace výsledků
< 4,5 %	Dobrá kompenzace diabetu
4,5 – 5,3 %	Uspokojivá kompenzace diabetu
> 5,3 %	Neuspokojivá kompenzace diabetu



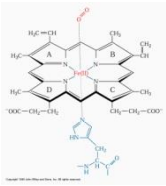
Glykace

- ❑ **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**



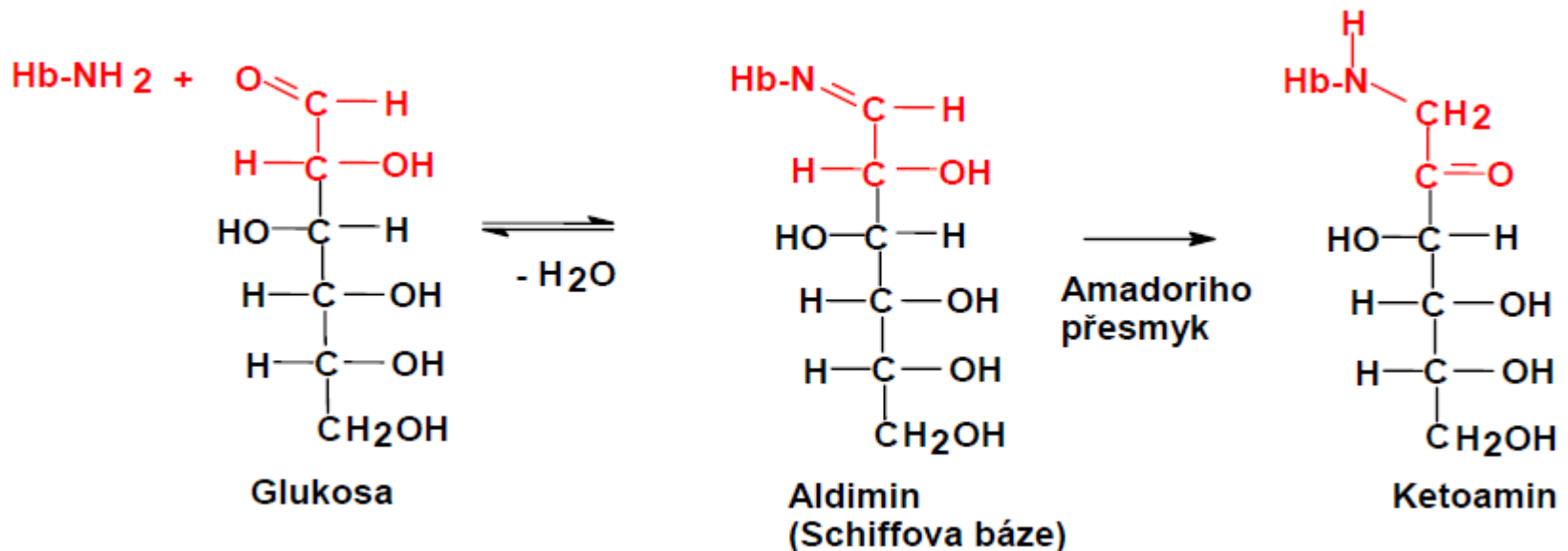
Glykace

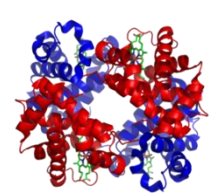
- ❑ **HbA_{1c}** („dlouhý cukr“) je látka, která vzniká v organismu neenzymatickou reakcí tzv. glykací mezi hemoglobinem (červené krevní barvivo) a glukózou (krevním cukrem)
- ❑ **GLYKACE:** je neenzymové navázání (adice) cukru na proteiny za vzniku fruktosaminu
- ❑ **faktory ovlivňující neenzymovou 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_{1c} – glykace

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

HbA₀



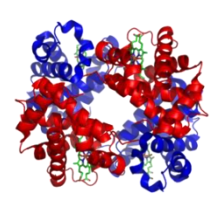
HbA_{1c}

Glykovaná je
první AK - Val



β -chain

- Zdroj: přednáška „HbA_{1c}“ RNDr. Petra Breineka



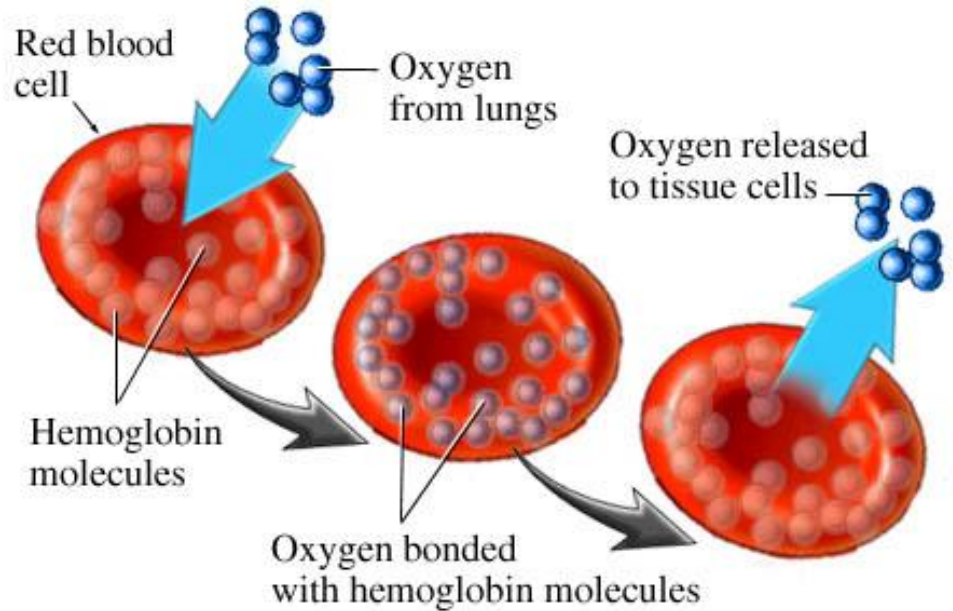
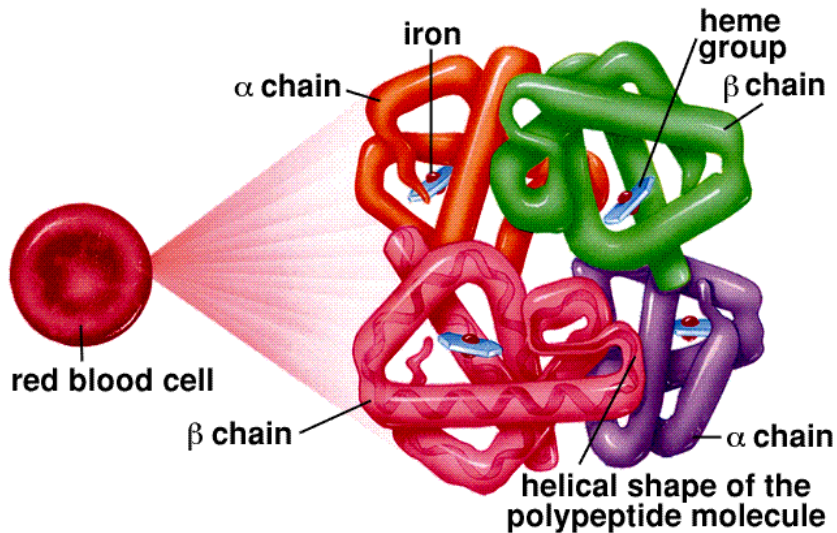
Hemoglobin

□ Složená bílkovina – hemoprotein:

- ✓ bílkovina – globin
- ✓ hem

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

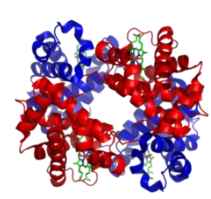
Hemoglobin Molecule



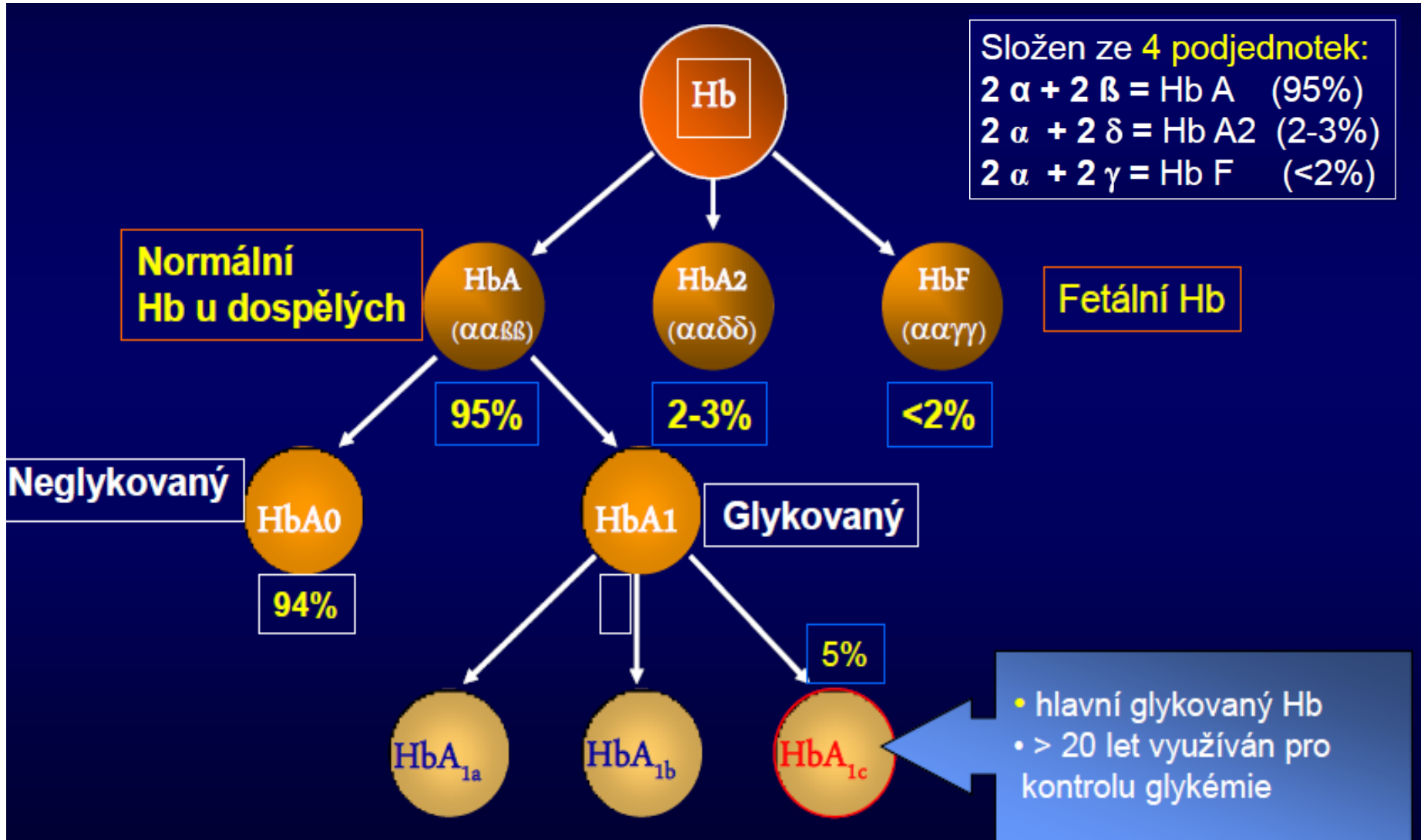
□ Illustration copyright 2000 by Nucleus Communications, Inc. All rights reserved. <http://www.nucleusinc.com>

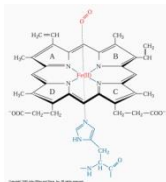
□ <https://fmss12ucheme.wordpress.com/2013/05/06/hemoglobin/>

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



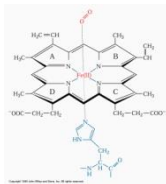
Hemoglobiny





Výhody stanovení HbA_{1c} 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_{1c}

- ❑ **není třeba konzervovat krev (větší stabilita)**
 - ✓ **od 1.1. 2012: mmol/mol** (např. 45 mmol HbA_{1c}/mol Hb)
 - ✓ **(%) DCCT (převážně v USA) (Diabetes Control and Complication Trial)**

- ❑ **2010, konsensus ADA, IFCC, IFD, EASD, ISPAP**



Rozhodovací meze HbA_{1c}

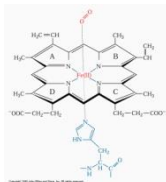
Referenční interval	20 – 42 mmol/mol
Rozhodovací meze Kompenzovaný diabetes (dospělí, negravidní)	43 – 60 mmol/mol

□ 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_{1c} v rutinních metodách

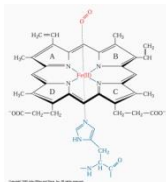


Požadavky na analytickou kvalitu měření

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

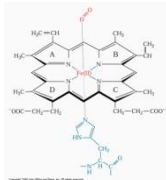
- Doporučení ČDS a ČSKB; vydáno v únoru 2012, aktuální korekce 18.2.2015

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)



HbA_{1c} – metody stanovení

1. Referenční metody:

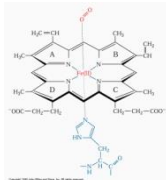
- ✓ izolace a hemolýza erytrocytů (+ odstranění labilních pre-HbA1c)
- ✓ enzymové štěpení hemoglobinu (endoproteináza Glu-C)
- ✓ analytické měření (detekce glykovaných hexapeptidů)

a) LC/ESI/MS:

Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) 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_{1c}.

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.

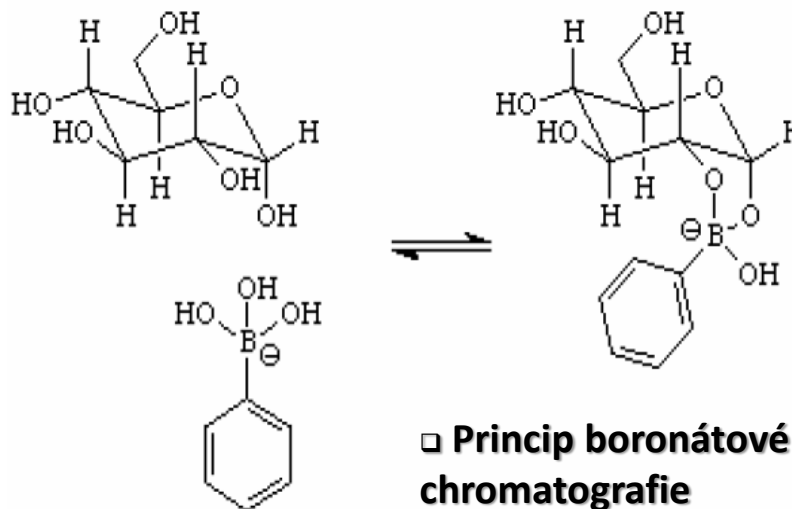
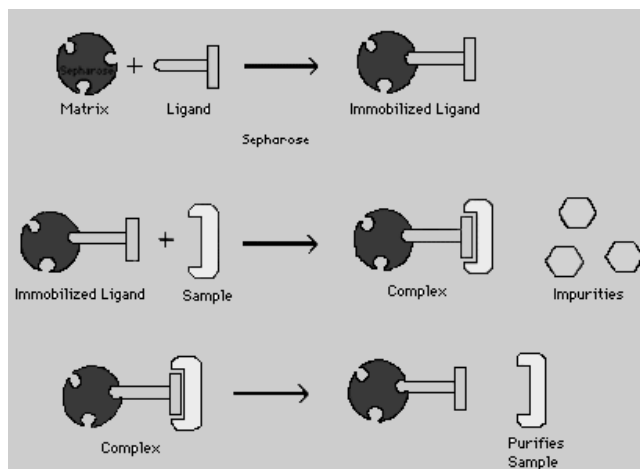


HbA_{1c} – metody stanovení

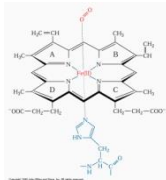
2. Doporučené rutinní metody - chromatografické:

a) Afinity 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_{1c} se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu



❑ Princip boronátové chromatografie



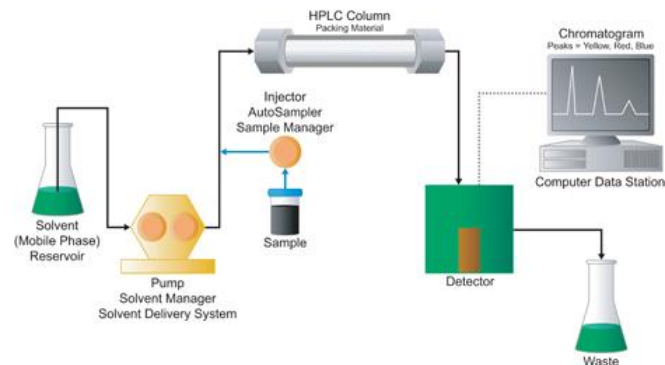
HbA_{1c} – metody stanovení

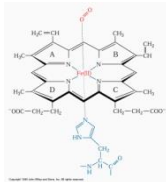
2. Doporučené rutinní metody - chromatografické:

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_{1c} se zjistí z velikosti plochy příslušného píku na chromatogramu podle kalibrační křivky pomocí softwaru chromatografu

c) HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)



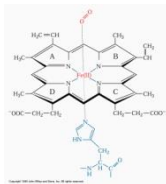


HbA_{1c} – metody stanovení

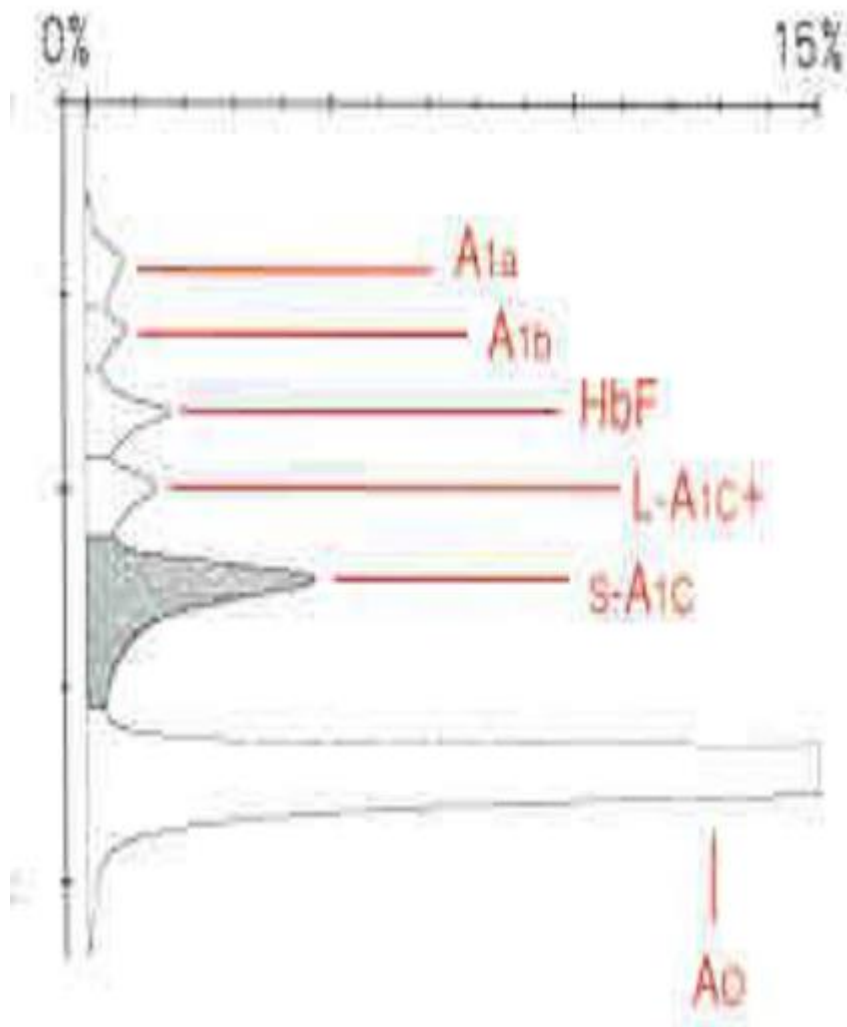
□ HPLC

Tosoh G8 System





HbA_{1c} – metody stanovení

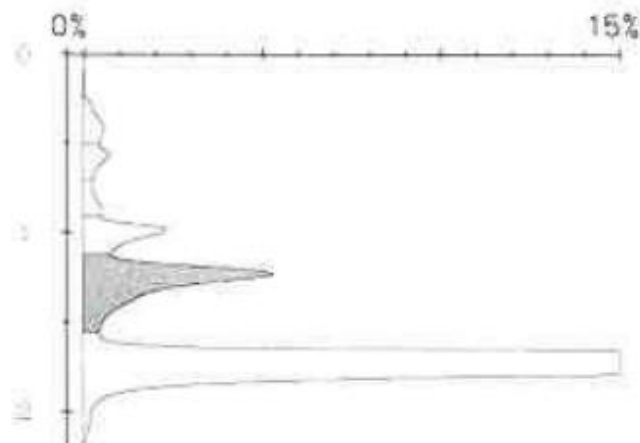


***** GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *****

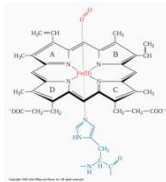
NO. 404 01020 1996/04/04 15:43
 SAMPLE ID 03 - 10
 CALIB Y = 1.0911X + 0.0765

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

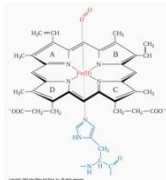


HbA_{1c} – metody stanovení

□ HPLC

Premier Hb 9210





HbA_{1c} – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - imunoanalytické:

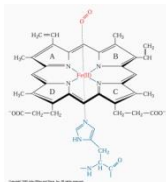
- založeny na vazbě protilátek proti β N-terminálně glykované tetrapeptidové nebo hexapeptidové skupině

□ Imunoturbidimetrie, imunonefelometrie:

- nejčastěji se používá stanovení TINIA
- k analyzovanému vzorku (lyzovaná krev) se přidá specifická protilátka proti HbA_{1c}; 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_{1c} v analyzovaném vzorku



□ CMIA



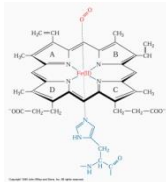
HbA_{1c} – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - imunoanalytické:

□ CMIA: např. Abbott Architect i2000 SR



- hemolýza erytrocytů, uvolnění HbA_{1c}
- inkubace s magnetickými mikročasticemi, navázání antigenu (HbA_{1c})
- promytí, odstranění nenavázaného antigenu
- přidání Anti-HbA_{1c} mab (konjugát) značený akridiniem
- vazba konjugátu na mikročastice
- promytí, odstranění nenavázaného konjugátu
- chemiluminiscence (po změně pH a přidání peroxidu)



HbA_{1c} – metody stanovení

2. Doporučené rutinní metody - elektroforetické:

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



Co může ovlivnit hodnocení vyšetření HbA_{1c}

- ❑ 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,...



Děkuji za pozornost.