

Vásárhelyi Barna
Semmelweis Egyetem Laboratóriumi
Medicina Intézet

Hemoglobin A1c és fruktózamin

néhány laboratórium-alapú
megfontolás

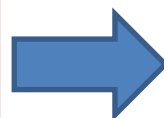
Előadás témája

- Glükóz nem enzimatikusan kapcsolódik a fehérjékhez.

Kötőszöveti fehérjék

Szérumfehérjék

Vörösvérsejtekben levő
fehérjék



AGE

Fruktózamin

Glikált hemoglobin

SAF: tényleg jelez

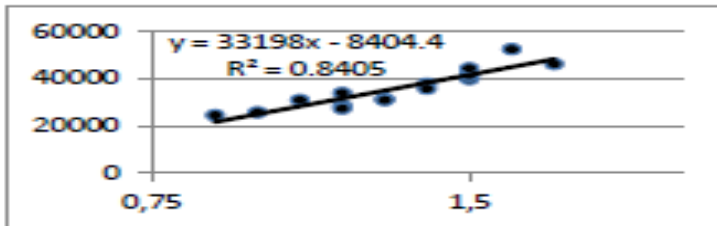


Figure 1a

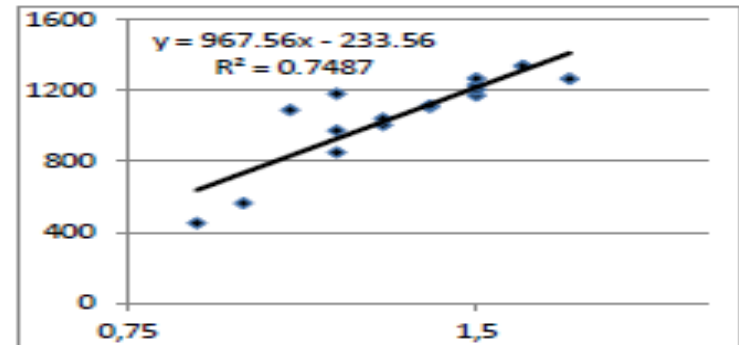


Figure 1b

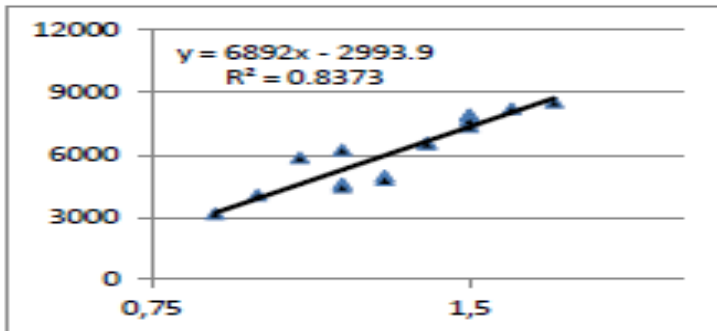


Figure 1c

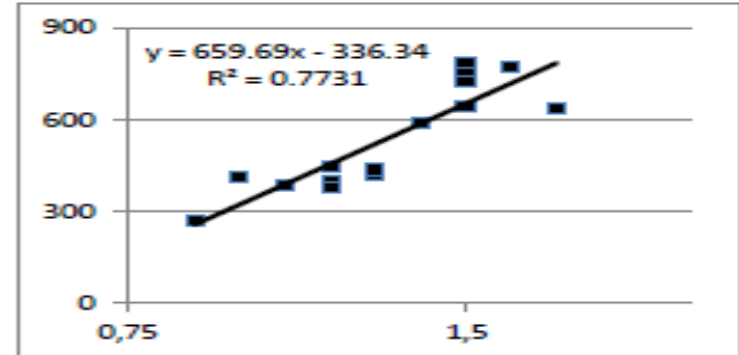


Figure 1d

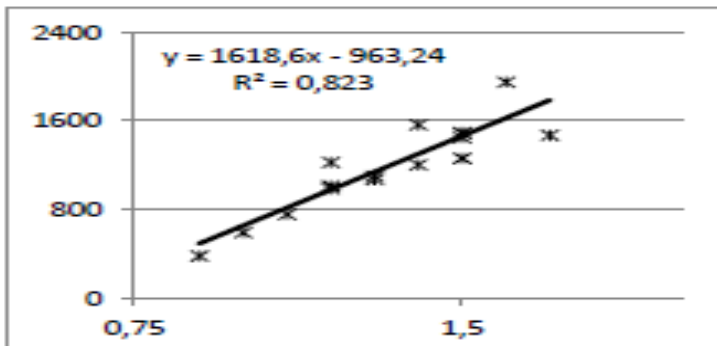


Figure 1e

glucuronsav (Fig 1 a)
3-indoxil-szulfát (Fig 1 b)
3-hidroxi-butirát (Fig 1 c)
fenol-szulfát (Fig 1 d)
pentozidin (Fig 1 e)

Sajnos, a helyzet nem ennyire rózsás:

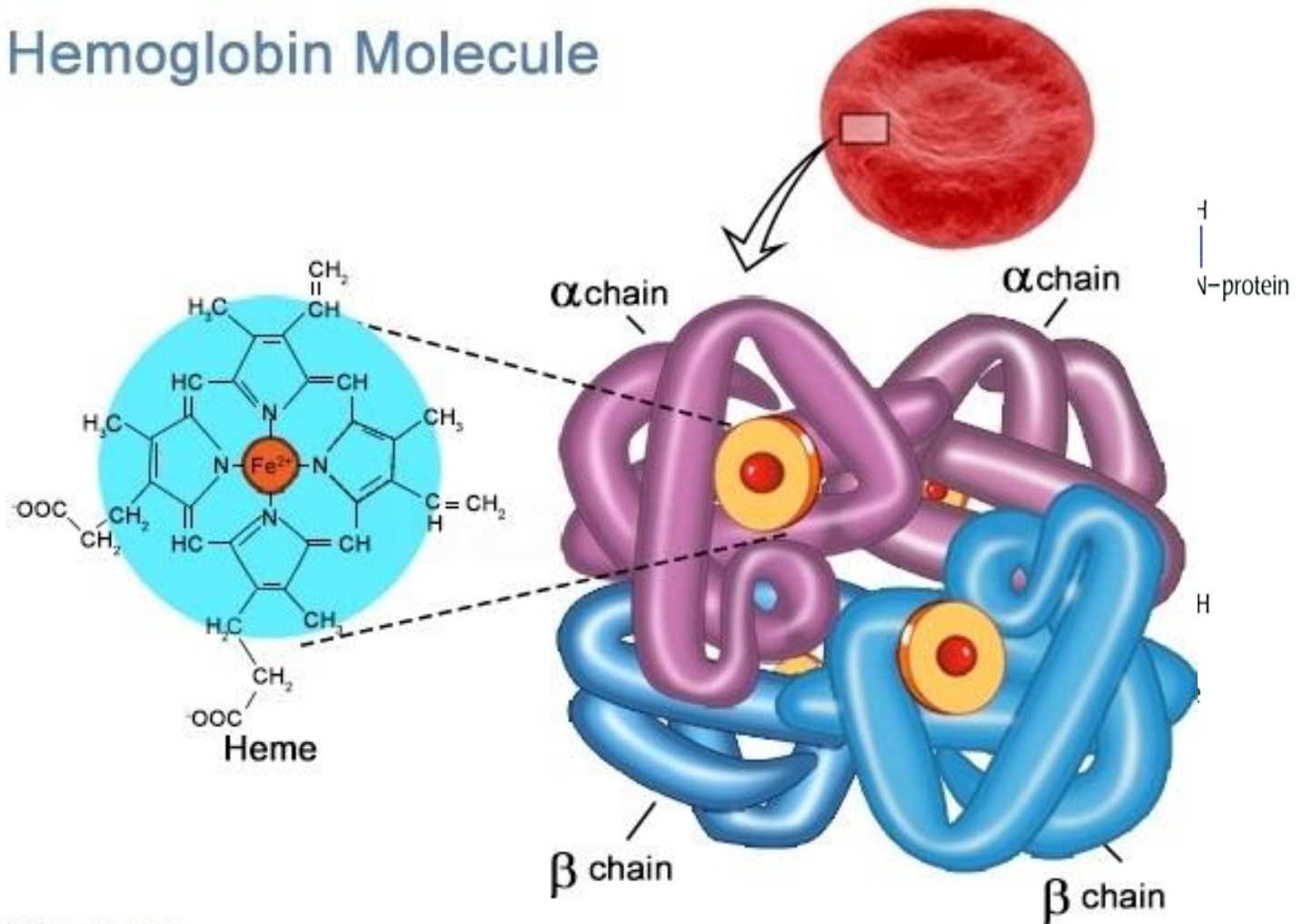


- standardizáció hiánya
- interferáló tényezők
- klinikai kimenetellel / paraméterekkel kapcsolat kevésbé ismert

EZÉRT helyettesítő markerre van szükség

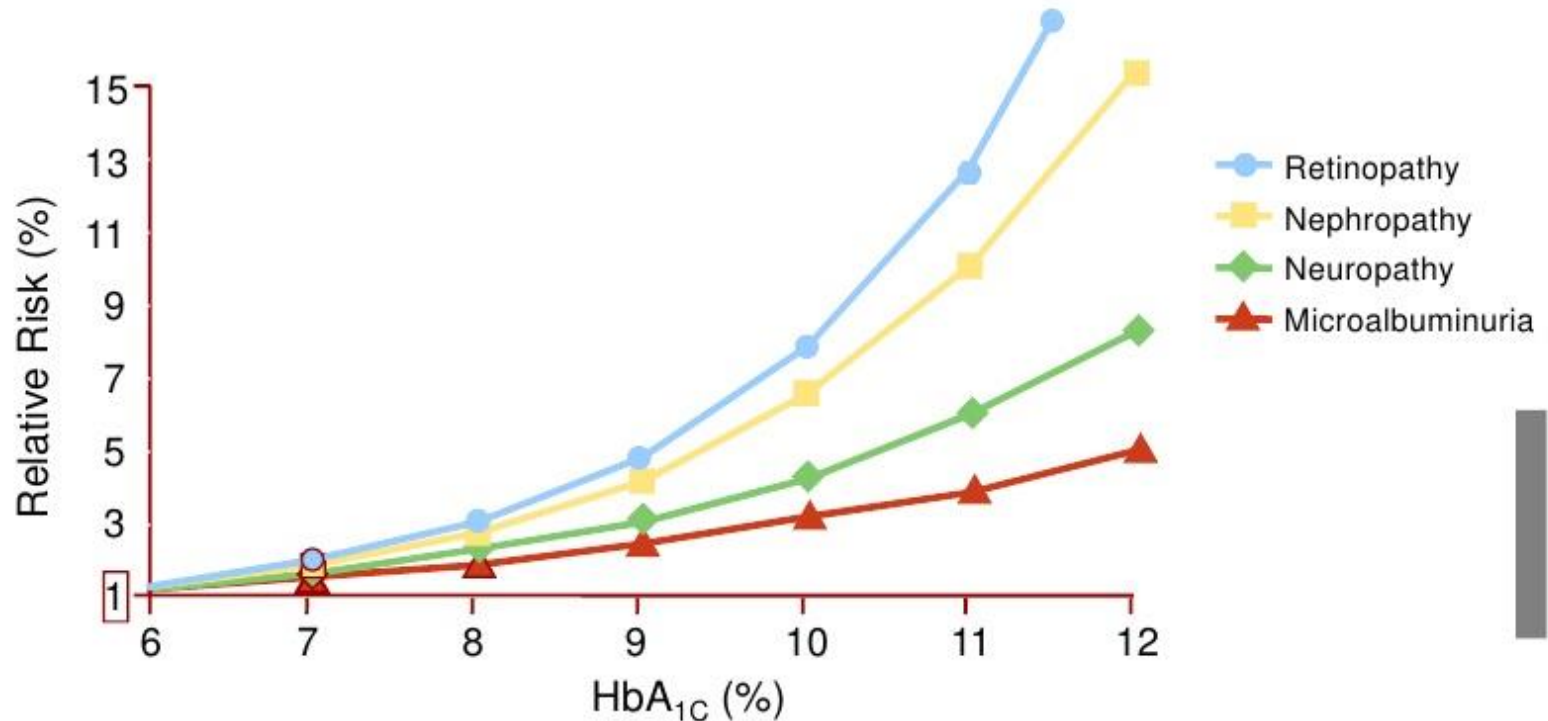
EZ A MARKER A GLIKÁLT HEMOGLOBIN

Hemoglobin Molecule



Relationship of HbA_{1c} to Risk of Microvascular Complications

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)



Mit is mérünk?

HEMOGLOBIN:

4 db (2 alfa, 2 béta) láncból áll

4 hem molekula

cca 250 – 300 millió Hb molekula / vvt

béta láncokon a valin nem enzimatikusan glükózt köt

HbA0 ($\alpha_2\beta_2$): 90%

HbA1

HbA1: N terminális valin, különböző cukorokkal glikálva

HbA1a1: fruktóz 1,6 difoszfát N terminális valin

HbA1a2: glükóz 6 foszfát N terminális valin

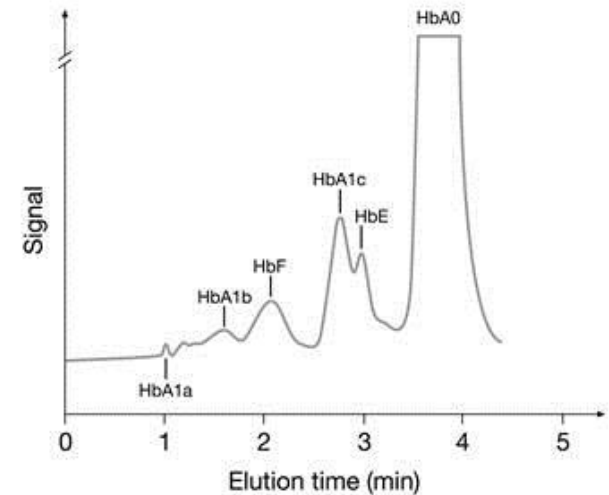
HbA1b: ismeretlen szénhidrát N terminális valin

HbA1c (60-80%): glükóz N terminális valinhoz való kapcsolódása
(beta-N-1-deoxi fructosil komponens)

HbA2 ($\alpha_2\delta_2$)

HbF ($\alpha_2\gamma_2$)

Össz glikált hemoglobin: HbA1c + nem N-terminális helyeken glikált Hb
(15 egyéb helyen; akár 40-50%-ért felelős)



Miből mérünk?

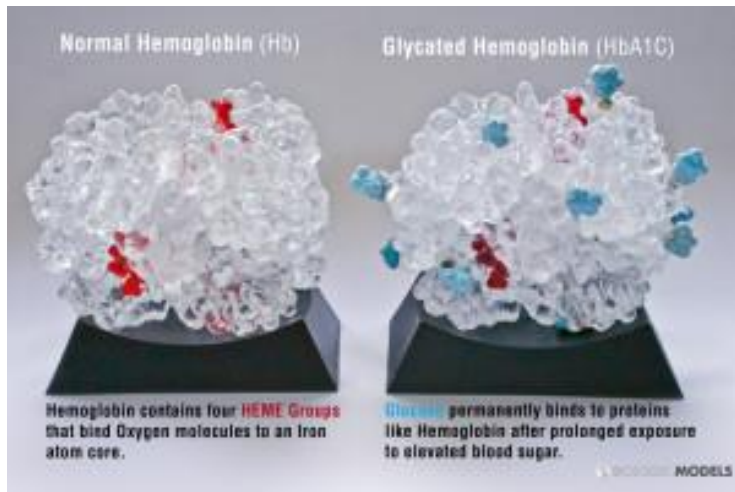
- EDTAs (lila kupakos) vér
- vénás és kapilláris vér egyaránt használható
- Esetleg: szűrőpapírra szárított vérminta
- a nap során bármikor levehető

Stabil:

- 2 – 8 °C-on 1 hétig
- -70 °C-on 1 évig.

- -20 °C-on való tárolás kerülendő

Mérés alapja

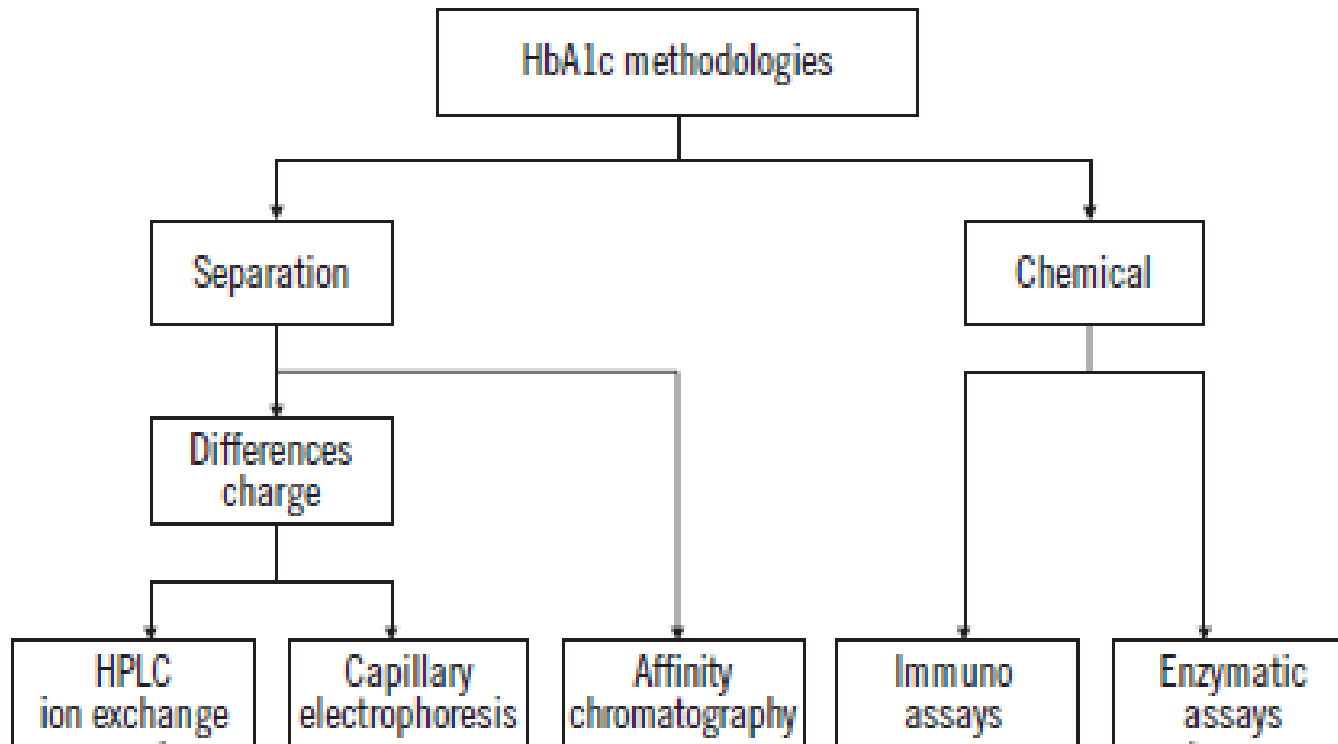


Glikáció következtében:

1. töltésviszonyok megváltoznak
2. antigenitás megváltozik
3. szerkezet megváltozik

Több mint 100 féle HbA1c mérő módszer

Főbb módszertípusok



Bio-Rad CDM System
CDM 5.1 VII TURBO Instrument

PATIENT REPORT
V2TURBO_A1c_2.0

Patient Data

Sample ID: Unknown-1-39
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 09/06/2010 18:55:19
Injection Number: 39
Run Number: 11
Rack ID: 0006
Tube Number: 2
Report Generated: 11/06/2010 14:35:46
Operator ID:

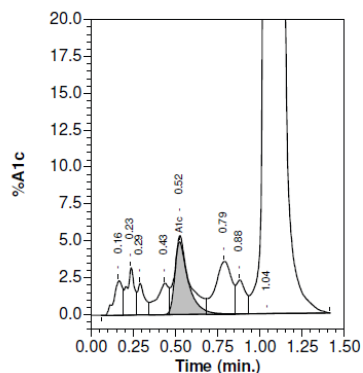
Comments:

Peak Name	IFCC mmol/mol	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	---	1.0	0.161	32941
A1b	---	---	1.2	0.232	39668
F	---	---	0.8	0.287	25659
LA1c	---	---	1.3	0.433	42133
A1c	30	4.9	---	0.523	109277
P3	---	---	3.0	0.786	95651
P4	---	---	1.1	0.877	35576
Ac	---	---	88.1	1.040	2814708

Total Area: 3,195,611

HbA1c (IFCC) = 30 mmol/mol

HbA1c (NGSP) = 4.9 %



3. *ábra*: Nem diabetikus (normál) minta

Bio-Rad CDM System
CDM 5.1 VII TURBO Instrument

PATIENT REPORT
V2TURBO_A1c_2.0

Patient Data

Sample ID: Unknown-1-38
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 09/06/2010 18:53:42
Injection Number: 38
Run Number: 11
Rack ID: 0006
Tube Number: 1
Report Generated: 11/06/2010 14:35:37
Operator ID:

Comments:

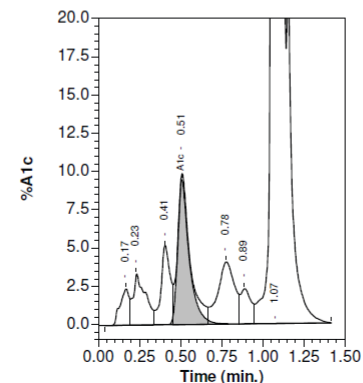
Peak Name	IFCC mmol/mol	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	---	1.4	0.165	31282
A1b	---	---	2.7	0.230	59971
LA1c	---	---	3.4	0.406	76905
A1c	80*	9.5*	---	0.508	159876
P3	---	---	4.4	0.775	99359
P4	---	---	1.5	0.887	33611
Ac	---	---	79.6	1.073	1797385

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,258,389

HbA1c (IFCC) = 80* mmol/mol

HbA1c (NGSP) = 9.5* %



4. *ábra*: Diabetikus minta, emelkedett HbA_{1c} szinttel

Zavaró tényezők

Hemoglobin variánsok – elválasztástechnikai módszerekkel esetén láthatóak

Béta-talasszémia: béta-láncok termelődése gátolt; HbF és HbA2 szintek nőnek

HbF szint emelkedés: 25% felett nem értékelhető a HbA1c (újszülöttnél ne kérjük...)

1%-os HbF emelkedés esetén

IA: relatív 1%-kal csökken;

AC: relatív 0,7%-kal nő.

IEC és CE általában elkülöníti.

Poszttranszlációs modifikáció: karbamilált Hb, pre-HbA1c

900 Hb variáns; 99% 4 fő kategória

S: fekete, mediterrán, indiai

C: fekete, indián

E: dél-ázsiai

D: általános

Szerencsére fentiek esetében is van valin, éppen úgy glikálódnak; ha nincs hemolízis, mérsékelt a zavaró hatás.

Bio-Rad CDM System
CDM 5.1 VII TURBO Instrument

PATIENT REPORT
V2TURBO_A1c_2.0

Patient Data

Sample ID: Unknown-1-39
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 09/06/2010 18:55:19
Injection Number: 39
Run Number: 11
Rack ID: 0006
Tube Number: 2
Report Generated: 11/06/2010 14:35:46
Operator ID:

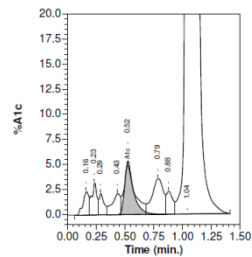
Comments:

Peak Name	IFCC mmol/mol	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	---	1.0	0.161	32941
A1b	---	---	1.2	0.232	39666
F	---	---	0.8	0.287	25659
LA1c	---	---	1.3	0.433	42133
A1c	30	4.9	---	0.523	109277
P3	---	---	3.0	0.796	95651
P4	---	---	1.1	0.877	35767
Ac	---	---	88.1	1.040	2814705

Total Area: 3,195,611

HbA1c (IFCC) = 30 mmol/mol

HbA1c (NGSP) = 4.9 %



3. ábra: Nem diabetikus (normál) minta

Bio-Rad CDM System
CDM 5.1 VII TURBO Instrument

PATIENT REPORT
V2TURBO_A1c_2.0

Patient Data

Sample ID: Unknown-1-38
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 09/06/2010 18:53:42
Injection Number: 38
Run Number: 11
Rack ID: 0006
Tube Number: 1
Report Generated: 11/06/2010 14:35:37
Operator ID:

Comments:

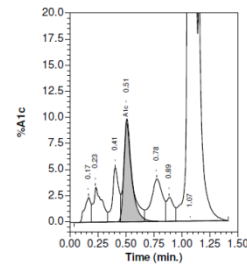
Peak Name	IFCC mmol/mol	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	---	1.4	0.165	31282
A1b	---	---	2.7	0.230	59971
LA1c	---	---	3.4	0.406	76905
A1c	80*	9.5*	---	0.508	159876
P3	---	---	4.4	0.775	39359
P4	---	---	1.5	0.887	33611
Ac	---	---	79.6	1.073	1797365

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,258,389

HbA1c (IFCC) = 80* mmol/mol

HbA1c (NGSP) = 9.5* %



4. ábra: Diabetikus minta, emelkedett HbA_{1c} szinttel

Bio-Rad CDM System
VARIANT II TURBO Instrument

PATIENT REPORT
V2TURBO_A1c_2.0

Patient Data

Sample ID: Unknown-1-4127
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 12/08/2008 16:39:46
Injection Number: 4127
Run Number: 118
Rack ID:
Tube Number:
Report Generated: 12/08/2008 16:46:02
Operator ID:

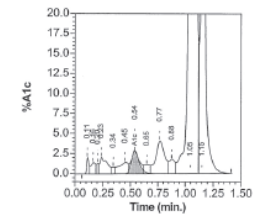
Comments:

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.5	0.110	13060
A1a	---	0.7	0.164	17811
Unknown	---	0.3	0.202	6393
A1b	---	1.7	0.234	41421
Unknown	---	0.3	0.341	7591
LA1c	---	1.2	0.448	30371
A1c	5.2	---	0.538	69572
Unknown	---	0.7	0.646	17213
P3	---	4.1	0.766	101523
P4	---	1.2	0.877	28772
Ac	---	50.2	1.046	1243867
Variant Window	---	36.7	1.150	909532

Total Area: 2,479,116

A1c Concentration =

5.2 %



5. ábra: Több kisebb mennyiségű komponens (ismeretlen csúcsok) integrálva
MESEJUTAS: A CDM 5.1 VII TURBO Instrument

Zavaró tényezők

Emelkedést okoz

Hipertrigliceridémia (IEC+)
hiperbilirubinémia (IEC+)
aspirin
Urémia
aplasticus anémia
életkor (10 évente 0,1%)
etnikum

Csökkenést okoz

HbC, HbS
E/C-vitamin
hemolitikus anémiák
terhesség
akut/krónikus vérvesztés
súlyos nefropátia
májbetegség
dialízis
malária

Eredmények értékelése

Klinikailag szignifikáns változás: 0,5%-os eltérés két egymást követő mintából.

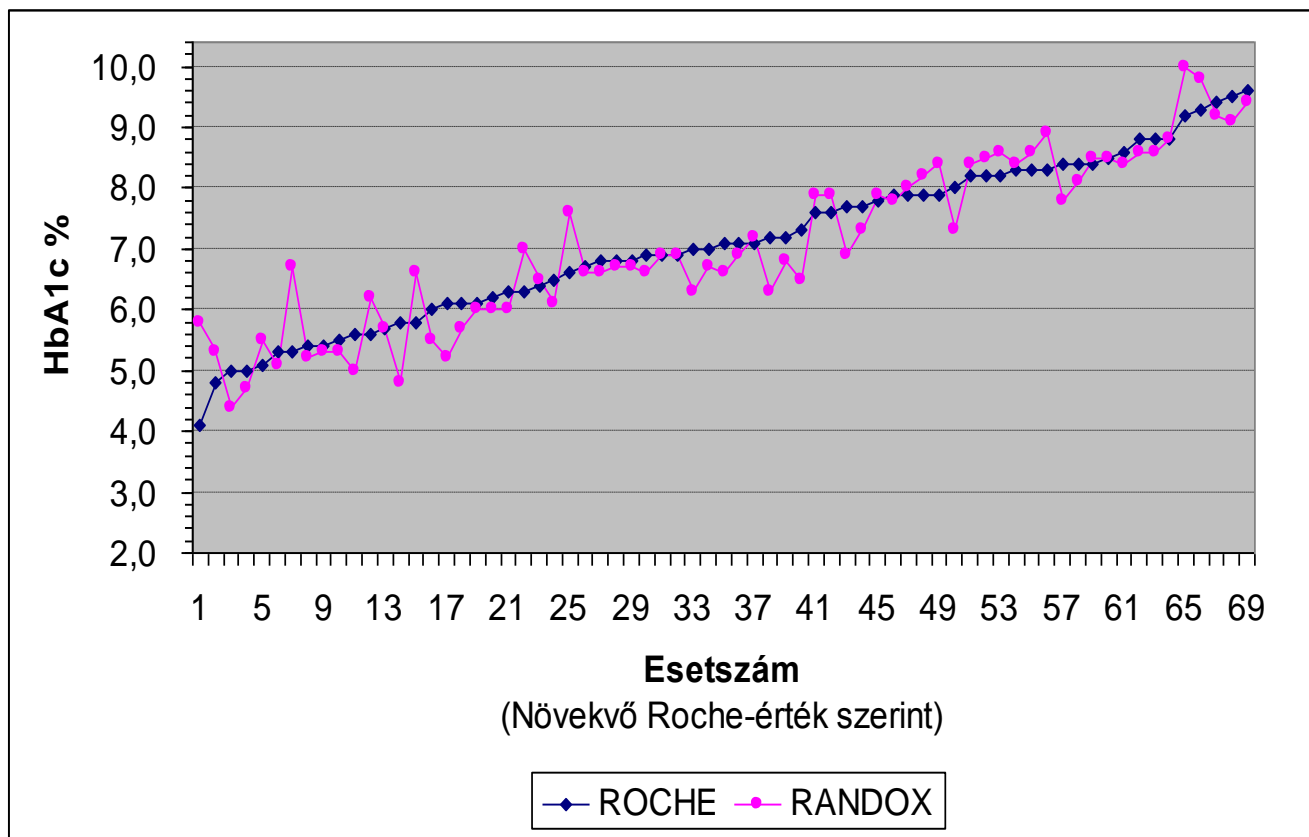
Ennek feltétele:

Az azonos mintákból történő ismételt mérések esetén a kapott eredmények között a relatív szórás (CV%)

- A laboron belüli <3%
- a laborok között különböző módszerek esetében <5%;
- egy módszer esetében <3%

Ez pedig korántsem magától értetődő

Roche Tina-quant és Randox HbA1c immunassay-vel kapott eredmények összevetése



[Beko G](#) [Introducing the new laboratory standard for HbA1c determination in Hungary].
[Orv Hetil.](#) 2011 Apr 3;152(14):555-8.

Megoldás: standardizáció

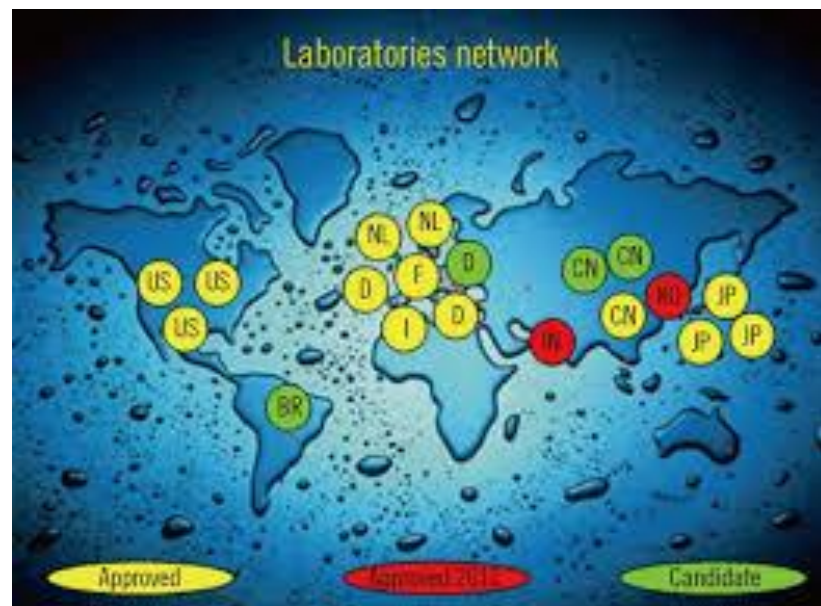
Világszerte egy referencia-eljáráshoz viszonyítják a tesztek (IFCC)

Referencia anyag kidolgozása: tiszta HbA1c standardot és

HbA0-t kevernek össze meghatározott arányban.

Ezután proteinázzal emésztik a keveréket. HPLC-CE-vel, vagy HPLC-MS-sel mérik.

Globálisan IFCC- referencia laboratóriumok. Gyártók standardjait erre vezetik vissza / ezekkel mérik össze.



<http://www.ngsp.org/>

Következmény

1. Összehasonlíthatóvá váltak a különböző módszerekkel kapott eredmények
2. Időben követhetővé váltak az egyes betegek
3. Lehetőség nyílt arra, hogy SI mértékegységre áttérjenek (mmol/mol)

Mértékegység

mmol/mol vagy %?

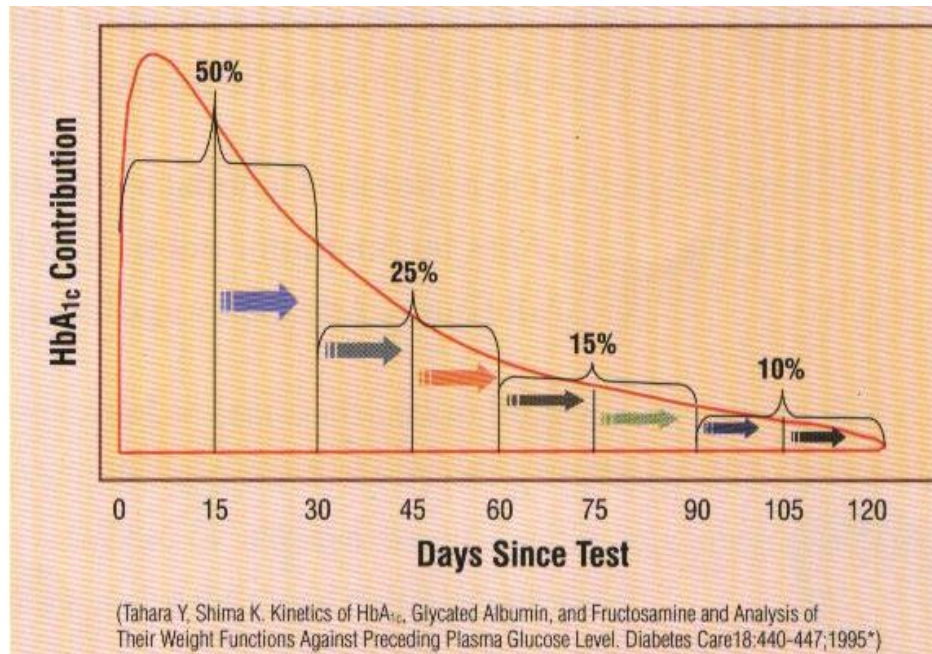
$NGSP\% = 0,0915 * IFCC \text{ mmol/l} + 2,15$
(%: ez NEM AZ a %)

$IFCC \text{ mmol/l} = 10,93 NGSP\% - 23,5$

HbA1c (%)	HbA1c (mmol/mol)
13	119
12	108
11	97
10	86
9	75
8	64
7	53
6	42
5	31

Mire használható az eredmény?

Anyagcsere-állapot monitorozása: a HbA1c az elmúlt 2 – 3 hónap átlagos vércukorszintjét tükrözi



A HbA1c 50%-a az első 30 napi, 40%-a 31-90. napi és 10 %-a a 91-120. napi glükózkoncentráció eredményeként jön létre

HbA1c és eAG

Becsült átlagos vércukor: eAG:

ADA, EASD & IDF támogatta ADAG vizsgálat

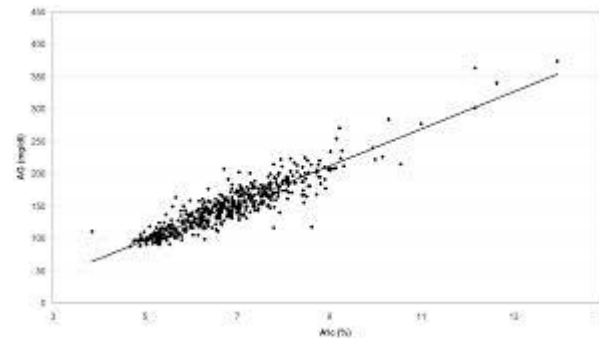
10 központban 507 T1DM, T2DM és kontroll egyén

Átlagos vércukor: legalább 2 nap CGM 4 alkalommal, legalább heti 3 nap otthoni vércukorszint-ellenőrzés

ADAG Study: "Translation" of HbA1c into eAG

HbA1c (%)	eAG	
	(mg/dl)	(mmol/l)
5	97	5.4
6	126	7.0
7	154	8.6
8	183	10.2
9	212	11.8
10	240	13.4

www.diabetes.org 1-800-DIABETES



$$\text{eAG(mg/dl)} = (28.7 * \text{HbA1c}) - 46.7, r^2 = 0.84$$

Probléma: kevés klinikai adat, különösen al csoportok esetében

HbA1c: célértékek és DM diagnosztika

Standard interpretation norm*	IFCC (mmol/mol)	NGSP (%)
Normal reference range	20-42	4-6

HbA1c vs. glükózsztint a DM diagnosztikában

HbA1c előnyei a glükózzal szemben:

1. mintavétel után stabil
2. betegen belüli ingadozás napok között: <2%
(éhomni glükóz esetében 10-15%)
3. stressz, akut betegség kevésbé befolyásolja
4. könnyű a mintavétel

általános célérték: <7%

<5,8%: alacsony kockázat

>6,4%: diabetes

5,8 – 6,4%: DM kockázata nő

HbA1c diagnosztikus értékével kapcsolatos kérdések

1. BIZTOSAN minden csoportban ugyanazok a vágóértékek?
2. Mérési bizonytalanság?
3. Mi van az átmeneti tartománnyal?
4. Egyéb (kór)állapotok befolyásoló hatása?
5. Hogyan változnak az eddigi besorolási határok (IGT, prediabetes)?
6. Milyen a pontos reláció az OGTT eredményéhez?

Standard interpretation norm*			IFCC (mmol/mol)	NGSP (%)
Normal reference range			20-42	4-6
Decision limits	Monitoring therapy	Target treatment	53	7
		Limit change therapy	64	8
Diagnosis		Low risk	<40	<5.8
		Increasing risk future diabetes	40-46	5.8-6.4
		Diabetes	>46	>6.4

Aktuálisan inkább kockázat, mint definitív diagnózis

HbA1c diagnosztikus értéke korlátozott az alábbi állapotokban

Csak akkor használható diagnózis felállítására, ha a következő állapotok kizárhatóak:

- terhesség
- 1-es típusú diabetes
- friss diabetes
- akut pancreasbetegség
- Gyógyszer indukálta hiperglikémia
- hemoglobinopátiák
- Súlyos anémia
- **veseelégtelenség**
- májelégtelenség
- dialízis
- HIV fertőzés

Ráadásul a pontos vágóérték (6,5%?) sem ismert.

HbA1c terápiás célértékeket befolyásolja

Célérték: nem egyértelmű. Egyedileg kell megállapítani.

- Alacsonyabb célérték: hosszabb életkilátás, kevésbé intenzív terápia
- Magasabb célérték: rosszabb általános állapot, hipoglikémiás hajlam, gyermek- és serdülőkor, előrehaladott érszövődmények
- Nagyon alacsony érték: akár még emeli is a vascularis szövődmények kockázatát

Mikor mérendő?

Javasolt mérési gyakoriság:

évi 2 alkalommal stabil állapotú diabeteses betegeknél;
évenként 4 alkalommal, ha rossz a diabetes kontroll, vagy ha
gyógyszerváltás történt.

Kórházi kezelés esetén – amennyiben a korábbi 3 hónapról nincs
eredmény – mérni kell diabeteses betegnél.

Ismétlendő a teszt (lehetőleg másik módszerrel):

klinikai képpel össze nem egyeztethető eredmények

HbA1c értéket befolyásoló kórképek

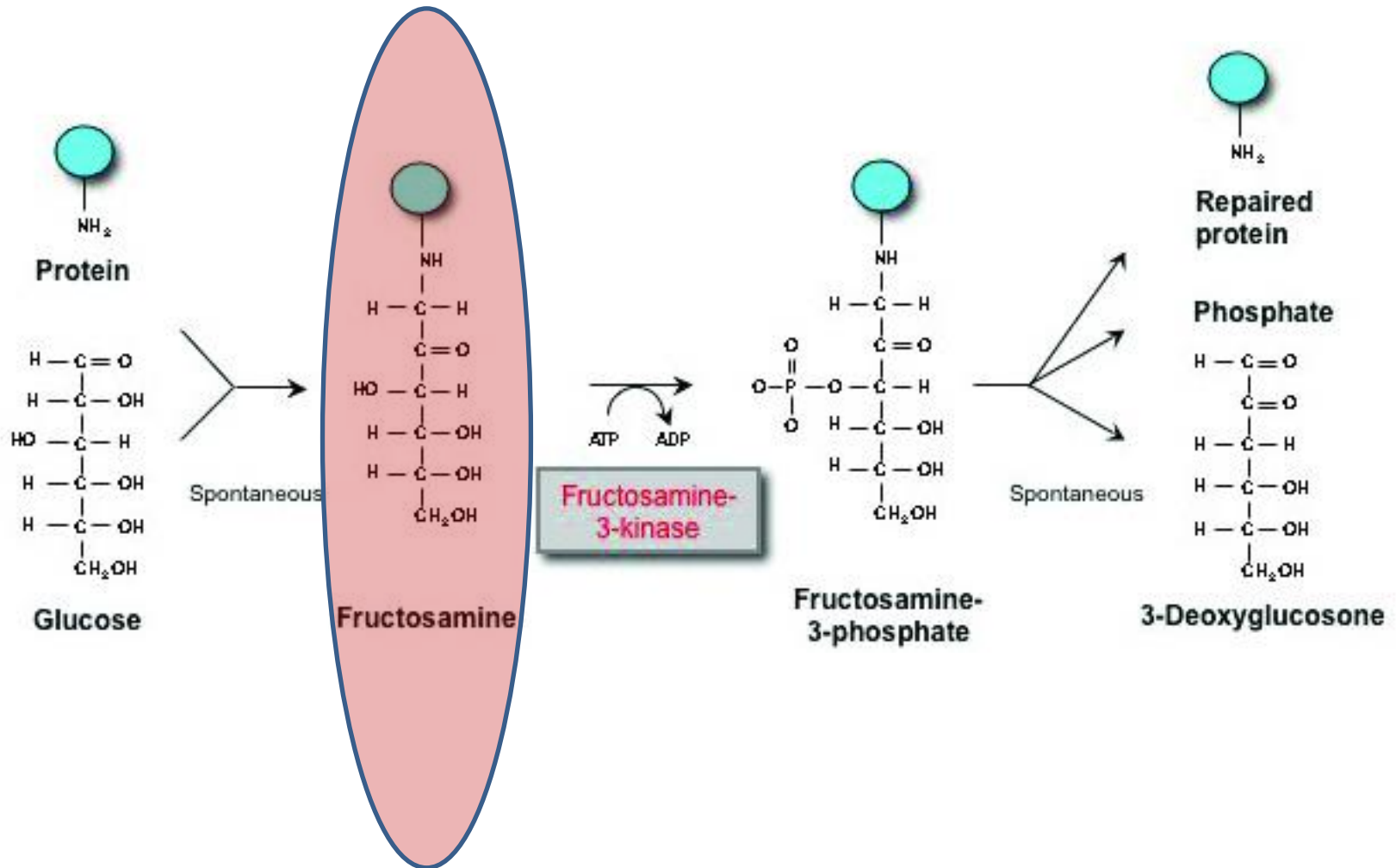
(nagyon alacsony értékek: hemolitikus anémia, vagy variáns jelenlétét
fel kell vesse)

OEP:

Évi kb. 1 milliárd Ft

3 hónapon belüli ismételt mérést nem támogat

Fruktózamin, amikor a HbA1c teszt nem használható



Fruktózamin

Kimutatására számos módszer

Hasonló jellegű standardizációs problémák, mint a HbA1c-vel

Aktuálisan: kolorimetriás módszerrel, kémiai reaktivitás alapján. Gyors eredmény

A fruktózamin és a HbA1c közötti erős az összefüggés

$$\text{HbA1c} = 0,017 * \text{fruktózamin } (\mu\text{mol/L}) + 1,61$$

Nem egyértelmű, hogy kell-e az összfehérje vagy albumin szintekre korrigálni

Minta: Natív cső

Az analit szobahőmérsékleten 7 napig, hűtőben 14 napig, fagyasztva 30 napig stabil.

Hemolizált minta: tévesen magas értékek

Eredményt befolyásolja: fehérje turnover változása

Májbetegségek

Nephrosis szindróma

Pajzsmirigybetegség

Paraproteinémia

Magas C-vitaminszint

Fruktózamin

Referenciatartomány: életkortól és nemtől függ

Nem diabeteses személyeknél: 175-280 $\mu\text{mol/L}$

Albumin szintre korrigálva: 4,7-6,5 $\mu\text{mol/g}$ albumin

Kisebb albuminszint – kisebb fruktózaminszint

Kontrollált diabetes: 210-421 $\mu\text{mol/L}$

Nem kontrollált diabetes: 268-870 $\mu\text{mol/L}$

Rendszeres mérés informatívabb

Útravaló

1. Glikált fehérjék biomarkerként történő alkalmazása tekintetében a legtöbb tapasztalat a HbA1c vonatkozásában van
2. HbA1c teszt: számos módszer áll rendelkezésre. Ezek eredménye a referens eljárás kidolgozása óta összehasonlítható. CAVE: POCT meghatározás
3. HbA1c eredményt befolyásolhatja: Hb variáns, vörösvérsejt-élettartam, kismértékben egyéb betegség
4. Célértékeket egyedileg kell kiválasztani
5. Ha nincs HbA1c: egyéb glikált fehérje (fruktózamin)