

Προσδιορισμός της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (Hb A1c) Συγκριτική μελέτη των τιμών της με τρεις μεθόδους

Περίληψη

Δ. Κλέτα-Παναγιωτίδου
Α. Πελετίδου-Αραμπατζοπούλου,
Ο. Νταγκούμα
Ε. Κωνσταντίνου
Μ. Οικονόμου-Αντωνιάδου
Α. Χατζηπέτρου

Η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c)^{1,13} είναι δηλωτική ρύθμισης του σακχάρου διαβητικών ασθενών. Σχηματίζεται από την είσοδο²⁸ σακχάρου στο ερυθροκύτταρο και την μη ενζυμική ένωσή του με το μόριο της αιμοσφαιρίνης. Η μεγάλη ποικιλία^{3,4} των μεθόδων που δίνεται από τα διάφορα εργαστήριά μας οδήγησε σε μια σύγκριση τιμών της HbA1c. 1. Με τη μέθοδο «δέσμευσης ιόντων» με το IMX⁵. 2. Με μια χρωματογραφία⁹ ανταλλαγής ιόντων και 3. Με μια μέθοδο⁷ αναστολής συγκολλητινοαντίδρασης. Προσδιορίστηκε η HbA1c σε μια ομάδα ασθενών με διαβήτη (ομάδα Α) με τις τρεις μεθόδους, προκειμένου να συγκριθούν και να αξιολογηθούν οι μέθοδοι. Επίσης προσδιορίστηκε η HbA1c, σε μία ομάδα φυσιολογικών ατόμων (ομάδα Β) προκειμένου να προσδιορισθεί το εύρος των δικών μας φυσιολογικών τιμών. Από τα ευρήματά μας προκύπτει ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των τριών μεθόδων.

Η επαναληψιμότητα ενός δείγματος 10 φορές (N = 10) (within assay), και τριών δειγμάτων την 1η, 3η, 5η και 8η μέρα (Between assay), ήταν καλύτερη με την αυτοματοποιημένη μέθοδο. Επίσης για την ομάδα Β η επαναληψιμότητα στο IMX της ABBOTT ήταν καλύτερη (CV% μικρότερο των άλλων CV%) και το εύρος των τιμών της ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων που όριζε και η μέθοδος. Από τη μελέτη μας προκύπτει ότι και οι τρεις μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση διαβητικών ασθενών. Πλεονεκτεί η μέθοδος στο IMX της ABBOTT λόγω του αυτοματισμού της για μεγάλα κλινικά εργαστήρια.

Εισαγωγή

Οι γλυκοαιμοσφαιρίνες² (glycohemoglobins) είναι παράγωγα μη ενζυμικής γλυκοζύλιωσης της HbA και περιέχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδατάνθρακα ή φωσφορικό μονοσακχαρίτη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η HbA1c η οποία σχηματίζεται ύστερα από αντίδραση της αμινομάδας (-NH₂) της αμινοτελικής βαλίνης των β-αλυσών της HbA (H₂N-βA) με γλυ-

κόζη σχηματίζοντας πρώτα αλδιμίνη (βάση Schiff) η οποία με ανακατανομή Amadori (Amadori reagengement) δίνει κετοαμίνη.

Οι γλυκοαιμοσφαιρίνες HbA1a2 και HbA1a1 προκύπτουν από αντίστοιχες αντιδράσεις της HbA με 6-φωσφορική γλυκόζη και 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη.

Υλικό και Μέθοδοι

Το υλικό της μελέτης μας απετέλεσαν 64 ασθενείς με διαβήτη από τα εξωτερικά ιατρεία του Διαβητολογικού Κέντρου του Νοσοκομείου μας (ομάδα Α) και 45 φυσιολογικά άτομα, αιμοδότες από τη Μονάδα Αιμοδοσίας (ομάδα Β).

Προσδιορίστηκε η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) με τρεις μεθόδους προκειμένου να συγκριθούν και να αξιολογηθούν οι μέθοδοι.

Αναλυτικότερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Αυτοματοποιημένη μέθοδος³ με το όργανο IMX της ABBOTT. IM (Immuno-) X (X-οειδές).

Το IMX είναι ένα από τα νεότερα μέλη των αυτομάτων αναλυτών της ABBOTT. Εισάγει τον αυτοματισμό σε μία μεγάλη κατηγορία ανοσοενζυμικών εξετάσεων. Η εξέταση IMX γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (IMX GHb) βασίζεται στην τεχνολογία «δέσμευσης ιόντων» (ion capture).

Στην τεχνολογία αυτή, οι γυάλινες ίνες της μήτρας του υποδοχέα αντίδρασης (ion capture reaction cell) επικαλύπτονται με υψηλού μοριακού βάρους τετρασθενείς ενώσεις αμμωνίου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την θετική φόρτιση της μήτρας η οποία αιχμαλωτίζει αρνητικά φορτία σύμπλοκα. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης τα αρνητικά σύμπλοκα (πολυανιόν + G Hb) που σχηματίζονται, αιχμαλωτίζονται στην κατιοντική μήτρα λόγω ηλεκτροστατικής επίδρασης.

Η εξέταση IMXGHb χρησιμοποιεί ένα πολυανιόν το οποίο συνδέεται ειδικά με την GHb λόγω της συγγενικής έλξης του βορονικού με το σάκχαρο της GHb. Η GHb στη συνέχεια διαχωρίζεται από τη μη GHb δια μέσου της ηλεκτροστατικής επίδρασης μεταξύ του συμπλόκου (πολυανιόν + GHb) και της κατιοντικής επιφάνειας της μήτρας.

2. Μέθοδος χρωματογραφίας⁶ ανταλλαγής ιόντων σε στήλες ρητίνης του Glyco-sep/HbA1c Jr. CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS.

Μία ποσότητα αιμολύματος αφήνεται να

επικαθίσει στην επιφάνεια της ρητίνης της στήλης χρωματογραφίας. Η HbA 1c και HbA εκλύεται με ένα Buffer έκλουσης αφού πρώτα εκπλυθούν και απομακρυνθούν με ένα Wash Buffer όλα τα υπόλοιπα παράγωγα της HbA1 και οι ασταθείς Hb.

3. Αναστολή συγκολλητινοαντίδρασης⁷ με αναλυτή DCA 2000 TM της Bayer.

Για τη μέτρηση της HbA 1c χρησιμοποιείται αναστολή της συγκόλλησης με Latex. Ένας συγκολλητής (συνθετικό πολυμερές που περιέχει πολλαπλά αντίγραφα ανοσοενεργού τμήματος της HbA 1c) προκαλεί τη συγκόλληση των Latex που είναι επικαλυμμένα με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (ποντικού) έναντι της HbA 1c. Αυτή η συγκόλληση προκαλεί την αύξηση του φωτός που μετράται σε μήκος κύματος 531 nm. Η HbA1c στα δείγματα αίματος ανταγωνίζεται τον αριθμό θέσεων συνδέσεως αντισώματος, προκαλώντας έτσι αναστολή της συγκόλλησης με τελικό επακόλουθο την ελάττωση της απορρόφησης του φωτός.

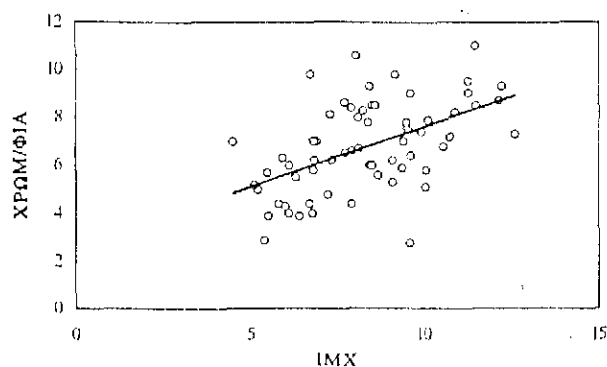
Η στατιστική ανάλυση της μελέτης περιλάμβανε τους προσδιορισμούς¹².

- των μέσων τιμών (\bar{X})
- της τυπικής απόκλισης (SD)
- του συντελεστή μεταβλητότητας (CV)
- του συντελεστή συσχέτισης (r)

Αποτελέσματα

Στον πίνακα 1 δίδεται ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των δύο μεθόδων της μέτρησης στο IMX και της χρωματογραφίας. Ο συντελε-

Πίνακας 1. Σύγκριση τιμών HbA1c μεταξύ χρωματ/φίας και IMX



Intercept = 2.62, Slope = 0.5, $r = 0.52$

Αριθ. Δειγμ. = 64

στής συσχέτισεως για 64 δείγματα ($N = 64$) είναι 0,52.

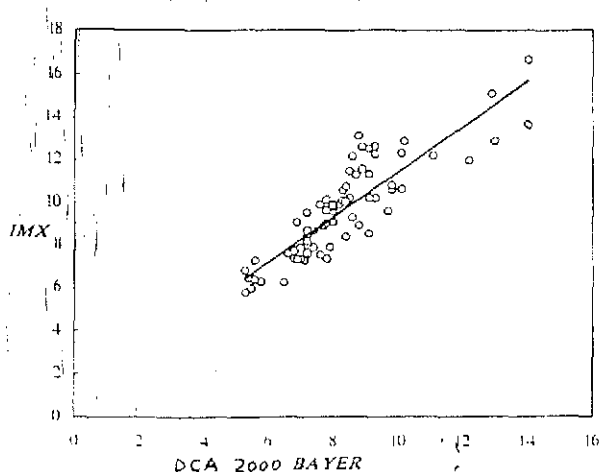
Η τιμή μας 0,52 σημαίνει ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Στον πίνακα 2 γίνεται σύγκριση των τιμών της HbA_{1c} με το IMX και το DCA 2000 (Bayer). Η τιμή του r για 70 δείγματα ($N=70$) είναι $r = 0,873$.

Η συσχέτιση των δύο μεθόδων κρίνεται ικανοποιητική.

Η επαναληψιμότητα ενός δείγματος 10 φορές (whithin assay) δίδεται από τον προσδιορισμό του CV%.

IMX: CV% = 3,79%.

Πίνακας 2. Σύγκριση τιμών HbA_{1c} μεταξύ και (Bayer) και IMX (Abbott)



Intercept = 0.823433. Slope = 1.061972, $r = 0.8734$
Αριθ. Δειγμ. = 70

Χρωμ.: DCA 2000 CV% = 4,5 (Πίν. 3).

Για τον έλεγχο επαναληψιμότητας τριών δειγμάτων την 1η, 3η, 5η και 8η ημέρα (Between assay) ο συντελεστής επαναληψιμότητας φαίνεται στον πίνακα 4.

Για την ομάδα Β (φυσιολογικά άτομα) η συγκριτική μελέτη έγινε μεταξύ της χρωματογραφίας και των τιμών στο IMX, και καθορίστηκαν οι φυσιολογικές τιμές της HbA_{1c} του εργαστηρίου μας με τις δύο μεθόδους.

Οι μέσες τιμές, η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής επαναληψιμότητας δίδονται στον πίνακα 5.

Συζήτηση

Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη και κυρίως το HbA_{1c} κλάσμα της αποτελούν έναν άριστο δείκτη ελέγχου του σακχάρου στον ορό διαβητικών ασθενών⁹. Η τιμή γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης είναι ενδεικτική της μέσης συγκέντρωσης σακχάρου του αίματος τους τελευταίους 1-3 μήνες.

Στην καθημερινή κλινική πράξη θα πρέπει να γίνεται έλεγχος των διαβητικών ασθενών κάθε

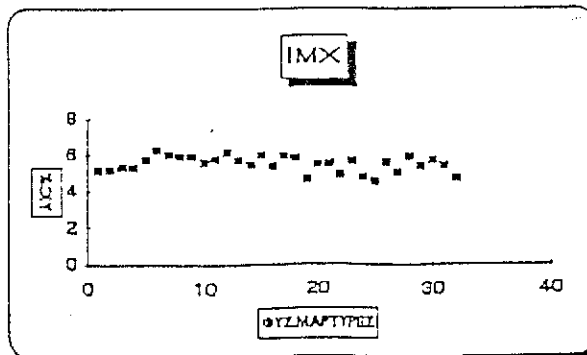
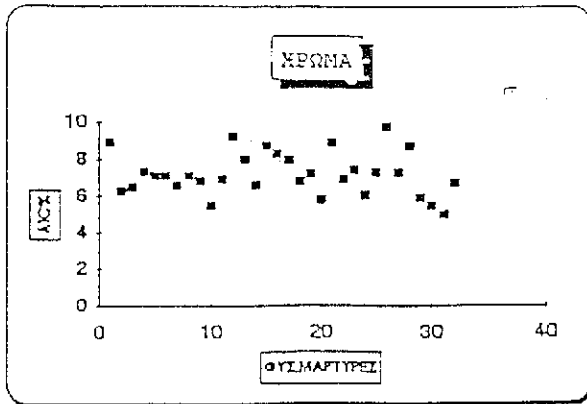
Πίνακας 3. Μελέτη επαναληψιμότητας ενός δείγματος για κάθε μεθοδολογία

	\bar{X}	S.D.	C.V.%	N
IMX	5,94	0,22	3,79	10
Χρωματογραφία	6,19	0,36	5,77	10

Πίνακας 4. Επαναληψιμότητα τριών δειγμάτων την 1η, 3η, 5η και 8η ημέρα

1ο δείγμα	1η ημέρα	3η ημέρα	5η ημέρα	8η ημέρα	M.O.	S.D.	C.V.%
IMX	7,40	7,56	7,60	7,74	7,58	0,14	1,85
Χρωμ.	7,5	7,4	6,25	7,1	7,1	0,59	8,25
2ο δείγμα	1η ημέρα	3η ημέρα	5η ημέρα	8η ημέρα	M.O.	S.D.	C.V.%
IMX	9,11	9,66	9,90	10,13	9,70	0,44	4,51
Χρωμ.	6,1	6,1	6,9	8,1	6,9	0,9	13,8
3ο δείγμα	1η ημέρα	3η ημέρα	5η ημέρα	8η ημέρα	M.O.	S.D.	C.V.%
IMX	12,40	13,97	13,70	13,83	13,48	0,73	5,38
Χρωμ.	10,2	11	11	10,9	10,5	0,68	6,4

Πίνακας 5. Μέσες τιμές ($m \pm SD$) των τιμών HbA_{1c} των μαρτύρων με τις δύο μεθόδους



IMX: $5,46 \pm 0,43$ CV% = 7,9
 Χρωμ: $7,19 \pm 1,16$ CV% = 16,13

3-4 μήνες.

Ο σχηματισμός της HbA_{1c} είναι μία μη ενζυμική διεργασία δύο σταδίων^{2,10}. Αρχικά έχουμε μία ανάστροφη αντίδραση μεταξύ της γλυκόζης και της NH₂ - της τελικής βαλίνης της β-αλυσίδας της HbA, σχηματιζόμενης μιας αλδιμίνης ή βάσεως του Schiff (ασταθής HbA_{1c}). Η ασταθής HbA_{1c} είτε υφίσταται αναδιάταξη κατά Amadori σχηματίζοντας σταθερή HbA_{1c} ή ξανασχηματίζει γλυκόζη και HbA.

Οι διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της HbA_{1c} προσβλέπουν στο να ανιχνεύσουν μόνο το σταθερό κλάσμα της HbA_{1c} και να απομακρύνουν το ασταθές κλάσμα, για να αποφεύγονται τα ψευδώς υψηλά επίπεδα της HbA_{1c}¹¹. Το κλινικό ενδιαφέρον για τον ακριβή και αξιόπιστο προσδιορισμό της HbA_{1c}, ο μεγάλος αριθμός των τυποποιημένων μεθόδων που κυκλοφορεί στο εμπόριο και η ανάγκη κατακύρωσης μεθόδου και φυσιολογικών τιμών στο κάθε εργαστήριο μας οδήγησε στη μελέτη αυτή.

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων¹ σε στήλες ρητίνης χρησιμοποιείται από πολλά εργαστήρια με πολύ καλά αποτελέσματα. Απαιτεί βέβαια ιδιαίτερη προσοχή, σχολαστικότητα, καλή γνώση εργασιτηρίου και αρκετό χρόνο για την εκτέλεση μεγάλου αριθμού εξετάσεων.

Η αυτοματοποιημένη τεχνική της δέσμευσης ιόντων (ion capture) με το μηχάνημα IMX⁵ έχει κύριο πλεονέκτημα την αυτοματοποίηση της με σημαντικό κέρδος αφ' ενός στο χρόνο και αφ' ετέρου στην ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων που έχει μία μέθοδος που δουλεύεται από ανθρώπινο χέρι.

Τέλος η μέθοδος αναστολής της συγκολλητινοαντίδρασης με Latex πιστεύουμε ότι είναι μέθοδος τύπου "Screening test" για μια πρώτη και άμεση εκτίμηση τιμής HbA_{1c} σε ένα εξωτερικό Διαβητολογικό Ιατρείο.

Από τα δεδομένα της μελέτης μας προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μέθοδοι που συγκρίνουμε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της HbA_{1c} με τις προϋποθέσεις που ανέφεραμε.

Ωστόσο για ένα κλινικό εργαστήριο με μεγάλο αριθμό προσδιορισμού η μέθοδος με το IMX κρίνεται η καταλληλότερη και για τον αυτοματισμό της αλλά και για την καλύτερη επαναληψιμότητα τιμών που έδωσε.

Summary

Kleta-Panagiotidou D, Peletidou-Arabatzopoulou O, Konstantinou E, Economou-Antoniadou M, Hatzipetrou A. Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) determinations. Results from three methods comparative study. Hellen Diabetol Chron 1995; 7: 73-77.

The glycated hemoglobin refer to a group of hemoglobin fractions which are formed with the entrance of some sugars in the red cell and their non enzymic combination with the particle of hemoglobin. The fraction A_{1c} of the glycated Hb is an excellent index for the control quality of diabetic patients during last two months. The great deviation of the values A_{1c} given by various laboratories led to a comparison of values of HbA_{1c} with the method of "ion capture" with the IMX of ABOTT, with a chromatography exchange of ions and with a method suspension of adhesive-reaction of Bayer. The material of our study was patients with diabetes from the

outpatient's department of our hospital as well as healthy persons, blood donors of the Blood Transfusion Center. It results from our study that all three methods can be used for the follow-up of diabetic patients. As most advantageous is considered IMX of ABBOTT due to its automation.

Βιβλιογραφία

1. Kennedy L. Labile glycosylated haemoglobin - Is it clinically important? *Diabetic Med* 1985; 2: 86.
2. Τρακατέλλης Α. Γλυκοαιμοσφαιρίνες. Βιοχημεία. Τόμος Β'. Μέρος 1ο, κεφ. 5, 69-70, 1992.
3. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W. Glycohaemoglobin: comparison of 12 analytical methods, applied to lyophilised haemolysates by 101 laboratories in an external quality assurance programme. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 169-174.
4. Goldstem et al. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986.
5. Wilson DH, et al. Fully automated assay for glycated hemoglobin on the Abbott IMX analyzer utilizing novel approaches for separation and detection *Clin Chem* Sept. 1993.
6. Τρακατέλλης Α. Χρωματογραφία. Βιοχημεία. Τόμος Α, έκδοση 2η, 1987: 73-90.
7. Craine JE. Latex agglutination immunoassays *American Laboratory*. May/June 1987: 34.
8. Kennedy L, Lyons TJ. Non-Enzymatic Glycosylation. *Br Med Bull* 1989; 45: 174-190.
9. Gabbay KH, et al. Glycosylated Hemoglobins and Long-Term blood Glucose Control in Diabetes Mellitus *J Clin Endocrin Metab* 1977; 44: 859.
10. Bunn HF. Nonenzymatic Glycosylation of Protein. Relevance to Diabetes. *Amer J Med* 1981; 70: 325.
11. Huismann W, et al. Unstable glycosylated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1982; 118: 303.
12. Ευσταθίου Κ. Αναλυτική διακύμανση αποτελεσμάτων. Αξιοπιστία εργαστηριακών αποτελεσμάτων στην κλινική χημεία. Σεμινάριο 1992.
13. Καραγιάνη-Καραγιάντων Η. Εργαστηριακή διάγνωση και παρακολούθηση σακχαρώδη διαβητικού ασθενούς. Μικροβιολογικά χρονικά 1987.
14. Roth M. "Glycated Hemoglobin", Not "Glycosylated" or "Glucosylated". *Clin Chem* 1983; 29: 1991.