

VILNIAUS UNIVERSITETAS MEDICINOS FAKULTETAS
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

CUKRINIO DIABETO MONITORAVIMO LABORATORINIŲ RODIKLIŲ
METODOLOGINĖ ANALIZĖ

Magistrantė DIANA ŽILYTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas:
Mokslo darbuotojas Dalius Vitkus _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

TURINYS

TURINYS	2
ĮVADAS	3
SUTRUMPINIMAI	4
TIKSLAI IR UŽDAVINIAI	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Cukrinio diabeto patogenezė.....	7
1.2. Hiperglikemija.....	11
1.3. Glikozilintas hemoglobinas.....	13
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS.....	19
2.1. Tiriamoji medžiaga	19
2.2. Gliukozės koncentracijai nustatyti naudotos analizinės sistemos	19
2.2.1. ROCHE–HITACHI 917 analizinė sistema	19
2.2.2. Analizatorius EBIO compact	20
2.2.3. Gliukozės analizatorius BIOSEN C line Cline	21
2.2.4. Automatinis analizatorius SUPER.....	21
2.3. Glikozilinto hemoglobino nustatymui naudotos analizinės sistemos	22
2.3.1. ROCHE–HITACHI 917 analizinė sistema	22
2.3.2. BAYER – ADVIA 1650 analizinė sistema.....	24
2.3.3. DADE BEHRING-DIMENSION R x L analizinė sistema.....	25
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
IŠVADOS	47
SUMMARY.....	48
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	49

ĮVADAS

Cukrinis diabetas yra viena iš labiausiai paplitusių ir grėsmingiausių lėtinių ligų ir medicinos problemų. Dažnai cukrinis diabetas vadinamas civilizacijos liga. Įvairiose šalyse cukriniu diabetu serga 1 – 5 % žmonių. Sergančiųjų šia liga pasaulyje kasmet daugėja ir ji įgauna epidemijos pobūdį. Prognozuojama, kad 2025 metais sirgs 300 mln. žmonių. Kartu daugėja ir cukrinio diabeto sukeltų komplikacijų skatinančių nedarbingumą, negalią, ankstyvą senėjimą ir mirtį. Diabetas ir jo komplikacijos – viena iš didžiausių ir sunkiausių klinikinės medicinos problemų, o kaip mirties priežastis yra trečioje vietoje [60]. Tinkamas, efektyvus ir savalaikis gydymas gali atitolinti šias komplikacijas ilgam laikui [60]. Prognozuojama kad 2010 metais cukrinis diabetas pirmąją priežastimi aplenks širdies ir kraujagyslių ligas, bei vėžį [60].

Gliukozė vienas pagrindinių parametru diagnozuojant cukrinį diabetą, bet jis parodo gliukozės koncentraciją tuo metu, kada buvo paimtas ėminys. Glikozilintas hemoglobinas paprastai taikomas ilgalaikiai glikemijos kontrolei. Glikozilinto hemoglobino koncentracijai išmatuoti pasaulyje ir Lietuvoje naudojama keletas skirtingais matavimo principais besiremiančių metodų. Be to egzistuoja trys HbA1c matavimų standartizavimo sistemos: DCCT (Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimai), IFCC (Tarptautinė klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija) ir NGSP (Nacionalinė glikohemoglobino standartizacijos programa). Iškyla problema vertinant rezultatus, skirtingi įvairiose laboratorijose naudojami tyrimo metodai nulemia cukriniu diabetu sergančių pacientų HbA1c rezultatų skirtumus. Tai aktualu kai pacientas perkeliamas į kitą ligoninę, ar konsultuojamas poliklinikoje, kuri turi laboratoriją, arba didesnėse laboratorijose, kur taikomos kelios analizinės sistemos. Kyla sunkumų lyginant gautus rezultatus.

Pacientams, sergantiems cukriniu diabetu dėl sukeltų komplikacijų, labai dažnai tenka kreiptis į įvairias gydymo įstaigas, todėl ypač svarbu, kad rezultatai gauti vienoje ar kitoje laboratorijoje būtų tapatūs. Tai – rimta analizinė ir diagnostinė problema, kurios sprendimas reikalauja bendrų pastangų ir mokslinių tyrinėjimų.

SUTRUMPINIMAI

Ala – alaninas;

ATP-azė – adenzintrifosfatazė;

CTL – citotoksiniai T limfocitai;

CV – variacijos koeficientas;

DCCT (angl. *Diabetes Control and Complications Trial*) – Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimas;

DNR – dezoksiribonukleino rūgštis;

GAD – gliutamino rūgšties dekarboksilazė;

GLUT – gliukozės transporto sistema;

GOD – gliukozės oksidazė;

Hb – hemoglobinas;

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas A1c;

HbF – fetalinis hemoglobinas;

HNF (angl. *Hepatocyte Nuclear Factor*) – hepatocitų branduolio faktorius;

HPLC (angl. *High Performance Liquid Chromatography*) – didelio efektyvumo skysčių chromatografija;

IDDM (angl. *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) - nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas;

IFCC (angl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) – Tarptautinė klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija;

IFN γ - gama interferonas;

LT – leukotrienai;

MHC (angl. *major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas;

MODY (angl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*) – suaugusiu tipo diabetas jauniems asmenims;

NGSP (angl. *National Glycohemoglobin Standardization Program*) – Nacionalinė glikohemoglobino standartizacijos programa;

PEPCK – fosfoenolpiruvatkarboksikinazė;

POD – peroksidazė;

SD – standartinis nuokrypis;

TGF- β (angl. *Transforming Growth Factor* – β) – transformuojantis augimo faktorius – β ;

UKPDS (angl. *United Kingdom Prospective Diabetes Study*) – Jungtinės Karalystės prospektyvinė diabeto studija;

Val – valinas;

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenai.

TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

Tikslas:

Išanalizuoti cukriniu diabetu sergančių pacientų glikozilinto hemoglobino tyrimų metodologinių ypatumų įtaką HbA1c rezultatams.

Uždaviniai:

1. Ištirti glikozilinto hemoglobino koncentraciją trimis analizinėmis sistemomis.
 - 1.1. ROCHE-HITACHI 917
 - 1.2. BAYER – ADVIA 1650
 - 1.3. DADE BEHRING-DIMENSION RxL
2. Išanalizuoti gautus rezultatų skirtumus.
3. Palyginti gautus rezultatus su vidutine gliukozės koncentracija.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Cukrinio diabeto patogenezė

Cukrinis diabetas – metabolinis sutrikimas, kurio metu pasireiškia lėtinė hiperglikemija kartu su angliavandenių, riebalų ir baltymų apykaitos sutrikimu, atsirandančiu dėl insulino sekrecijos ar jo veikimo sutrikimų, arba dėl šių abiejų priežasčių [41][43].

Cukrinis diabetas skirstomas į pirmo ir antro tipo cukrinį diabetą, gestacinį diabetą ir kitus specifinius cukrinio diabeto tipus, tarp jų genetinius, atsiradusius dėl kasos ligų, endokrinopatijų, infekcijų, autoimuninių sindromų [48].

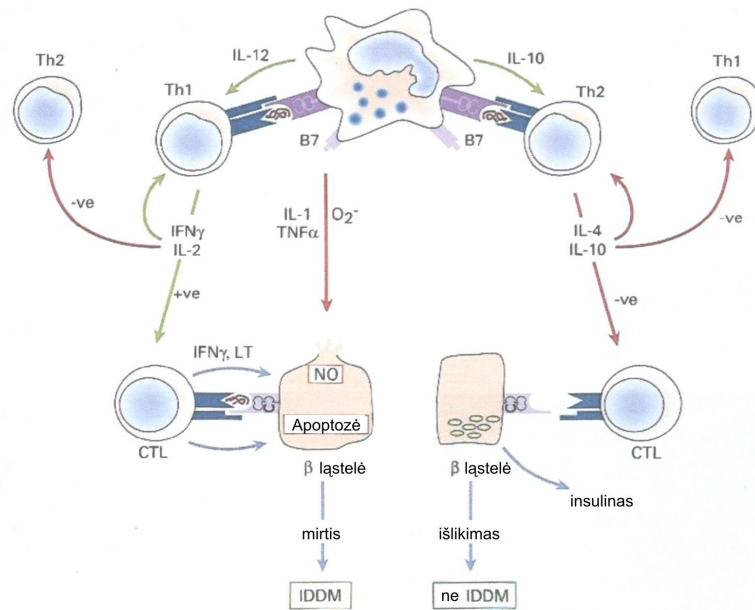
Pirmo tipo cukrinio diabeto atveju dažniausiai pažeidžiamos kasos Langerhanso salelių beta (β) ląstelės, proceso eigoje jos suardomos ir tuomet kraujyje lieka tik minimalus C peptido kiekis arba visai jo nelieta [37].

C peptidas – baltymas sudarytas iš 31 amino rūgšties liekanos – tai proinsulino struktūrinė dalis [52].

Langerhanso salelių, β ląstelių pažeidimas išsivysto veikiant tarpusavyje susijusiems mechanizms: genetiniam, autoimuniniam, aplinkos faktorių sukeltam.

Autoantikūniai insulinui (arba jo pirmtakui proinsulinui), gliutamino rūgšties dekarboksilazei (GAD) – imuninio pažeidimo žymenys [4]. Autoimuninę ligą rodo pažeistų ląstelių limfocitų infiltracija [13][4]. Eksperimentiškai įrodyta, kad limfocitų infiltratą pagrindinai sudaro CD8 T limfocitai, taip pat įvairūs CD4 T limfocitų ir makrofagų kiekiai [53][4]. Beta (β) ląstelės gali būti nevienodai jautrios uždegiminiams mediatoriams, tokiems kaip laisvieji deguonies radikalai arba azoto oksidai (1 pav.) [13].

Limfocitų aktyvumą gali sukelti infekcijos, tokia kaip raudonukė, infekcinė mononukleozė [3]. Virusai gali pažeisti beta (β) ląsteles, po kurio organizmo imuninė sistema atpažįsta kaip svetimas [21]. Tokia autoimuninės reakcijos priežastis gali būti siejama su padidėjusia ŽLA I klasės molekulių ekspresija ir ŽLA II klasės molekulių ekspresija beta (β) ląstelėse – pasekmė vietiškai išskiriami citokinai [4]. Pvz.: gama interferonas ($\text{IFN-}\gamma$), išsiskiriantis iš aktyvių T ląstelių. Ar pakitusi MHC genų ekspresija yra limfocitų infiltracijos priežastis, ar pasekmė, dar neišaiškinta. Taip pat imuninis atsakas gali atsirasti prieš viruso baltymą, kuris turi bendras aminorūgščių sekas su beta (β) ląstelių baltymu [21]. Infekcijų agentai, padidinantis galimybę cukrinio diabeto raidai, priklauso atsitiktiniams atvejams [3].



1 pav. Sąveika tarp Th1 ir Th2 nulemia T limfocitų įtaka beta ląstelėms.

Th, T–helperiai CD4+limfocitai; CTL, citotoksiniai T limfocitai; NO, azoto oksidai; O₂, laisvieji deguonies radikalai; IDDM, nuo insulino priklausomas cukrinis diabetas; LT, leukotrienai.

[Bradley J. And Cluskey Jim, MC.Clinical imunology, 148–149].

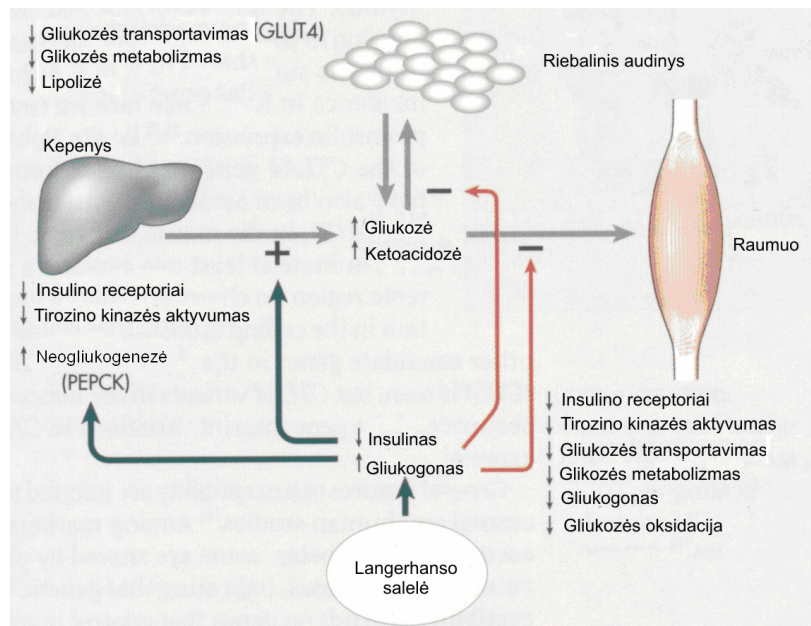
Kelios diabetinės būklės formos gali būti siejamos su monogeniniais beta (β) ląstelių funkcijos defektais, dažnai išskiriamais pagal prasidėjusią nežymią hiperglikemiją jauname amžiuje (paprastai prieš 25 m. amžių) [3]. Jos dažniausiai yra paveldimos autosominiu dominantiniu būdu. Sergant diabeto formomis, anksčiau vadintomis suaugusių amžiaus diabetu jauniems (MODY), būna sutrikęs insulino išsiskyrimas su minimaliu insulino veikimo defektu arba be jo [43].

Yra išskirtos trijų genų sričių skirtingose chromosomose anomalijos. Dažniausia forma susijusi su 12–os chromosomos mutacija hepatocitų branduolių transkripcijos faktoriumi (angl. *hepatocyte nuclear transcription factor*), žymimu HNF1 [25]. Kita forma susijusi su gliukokinazės geno mutacija 7p chromosomoje [26]. Gliukokinazė verčia gliukozę gliukozės–6 fosfatu, o šio metabolizmas savo ruožtu stimuliuoja insulino sekreciją beta ląstelėse. Taigi gliukokinazė tarnauja ląstelei „gliukozės sensoriumi“. Dėl gliukokinazės geno defekto reikalingas didesnis gliukozės lygis, kad būtų išgaunamas normalus insulino lygis [26]. Pastaruoju metu vis dažniau nustatomi DNR mitochondrijų defektai, kai diabetas paveldimas pagal motinos liniją [56]. Pasitaiko ir vadinamas „antrinis diabetas“, kuris išsivysto dėl kasos pažeidimo arba endokrininių sutrikimų, taip pat – ir vaistų sukeltas diabetas [56].

II tipo cukriniam diabetui būdinga, kad insulino gamyba nėra visiškai sutrikusi ir nepažeistos kasos beta (β) ląstelės, tačiau insulino sekrecija yra nepakankama ir priklauso nuo periferinių audinių (riebalinio audinio, kepenų, raumenų) insulino receptorių [13]. Pagrindinės ligos atsiradimo priežastys yra dvi: didėjanti rezistencija insulinui ir mažėjanti insulino sekrecija.

Rezistentiškumas insulinui – tai patofiziologinė organizmo būklė, kai padidėjęs insulino kiekis kraujo plazmoje nesumažina tuo metu plazmoje esančio gliukozės kiekio taip efektyviai, kaip esant normaliai būklei [56]. Rezistentiškumas insulinui pirmiausia pasireiškia skeleto raumenyse, kur gliukozės įėjimui į ląsteles reikia didesnės insulino koncentracijos [29]. Tai įtakoja tiek genetiniai, tiek įgyti faktoriai. II tipo diabetas susijęs su daugelio medžiagų apykaitos sutrikimų, įskaitant: hiperinsulinemiją, centrinio tipo nutukimą, dislipidemiją, arterinio kraujo spaudimo padidėjimą [56][29], endotelinę disfunkciją, susilpnėjusią fibrinolizę, ankstyvą aterosklerozę [29]. Nustatyta, kad jautrumas insulinui sumažėja 40%, kai idealus svoris yra viršijamas 35 – 40% [34].

Daugeliui II tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų stebima hiperglikemija, nors insulino koncentracija kraujo plazmoje padidėjusi. Hiperinsulinemija – kompensacinis atsakas į rezistenciją insulinui, nes mažėjant audinių taikinių jautrumui insulinui, kasos beta (β) ląstelės intensyviau išskiria insuliną. Laikui bėgant insulino sekrecija mažėja, nes vystosi kasos beta (β) ląstelių dekompensacija, padidėja kepenyse produkuojamos gliukozės kiekis [34].



2 pav. II tipo cukrinis diabetas.

Parodyti svarbiausi audiniai, dalyvaujantys išsivystant hiperglikemijai. Kiekviename audinyje yra genų variantų rinkiniai, kurių sąveika ir reikšmė įvairiems antro tipo diabeto fenotipiniams

požymiams nėra iki šiol išaiškinta. GLUT – gliukozės transporto sistema, PEPCK – fosfoenolpiruvatkarboksikinazė.

[C.Boitard, The human genome project: impact on diabetes management and research. France//Medicographia. Vol 26, No.1, 2004].

Kai II tipo cukrinio diabeto priežastis yra mažėjanti insulino sekrecija, tai nulemia pirmos fazės insulino sekrecijos kasoje sutrikimai [3]. Tai įtakojama tiek genetinių, tiek įgytų faktorių.

I tipo cukrinio diabeto ir II tipo cukrinio diabeto patogenezė skiriasi (1 lentelė), bet sukeltos komplikacijos yra vienodos.

1 lentelė.

I tipo cukrinio diabeto ir II tipo cukrinio diabeto bendra charakteristika

Charakteristika	I tipo diabetas	II tipo diabetas
Amžius susergant	<35	>35
Genetinis polinkis	mažas	didelis
Antikūnai prieš β ląsteles	yra 90–95%	nėra
Kūno masė	normali/sumažėjusi	nutukęs
Plazmoje insulinas/c-peptidas	mažas/nėra	didelis
Pagrindinis metabolizmo broožas	insulino deficitas	metabolinis sindromas kartu su nejautrumu insulinui
Gydymas insulinu	reikalingas	paprastai nereikalingas
Komplikacijos	dažnos	dažnos
Ryšys su ŽLA	yra	nėra
Ketozė	dažna	reta

[Reinauer H.,Home D.P., Ariyur S.Kanagasabapathy, Heusk Claus–Chr. Laboratory diagnosis and monitoring of diabetes mellitus 2002].

Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimu (DCCT) ir Jungtinės Karalystės prospektyvinės diabeto studijos (UKPDS) buvo įrodyta hiperglikemijos poveikis besivystant ir progresuojant mikrokraujagyslinėms, makrokraujagyslinėms komplikacijoms [60][51]. Diabetinė nefropatija – viena grėsmingiausių diabeto komplikacijų, distrofinio pobūdžio inkstų pažeidimas [31]. Diabetinė retinopatija – akies tinklainės pažeidimas, kurio metu sutrinka smulkiųjų tinklainės kraujagyslių sienelės pralaidumas [14]. Komplikacijos priklauso nuo cukrinio diabeto trukmės, klinikinės eigos [2].

1.2.Hiperglikemija

Angliavandenių apykaitoje pagrindinis vaidmuo tenka gliukozei. Gliukozė – monosacharidas – aprūpinantis energija ir taip palaikantis ląstelių funkciją. Dalyvaujant fermentams vyksta skilimo reakcijos – glikolizė. Šis procesas reguliuoja koncentraciją kraujyje. Ląstelėse ir tarpląstelinuose skysčiuose gliukozė gali būti laisva, fosforilinta ar glikogeno molekulėje. Riebalinio audinio, skeleto ir širdies raumenų ląstelės turi specifinius receptorius insulinui. Gliukozės pernašai į šiuos audinius reikalingas insulinas. Į kepenų ląsteles, eritrocitus gliukozės pernaša yra pasyvi. Ji tiesiogiai priklauso nuo gliukozės koncentracijos kraujyje ir nepriklauso nuo insulino.

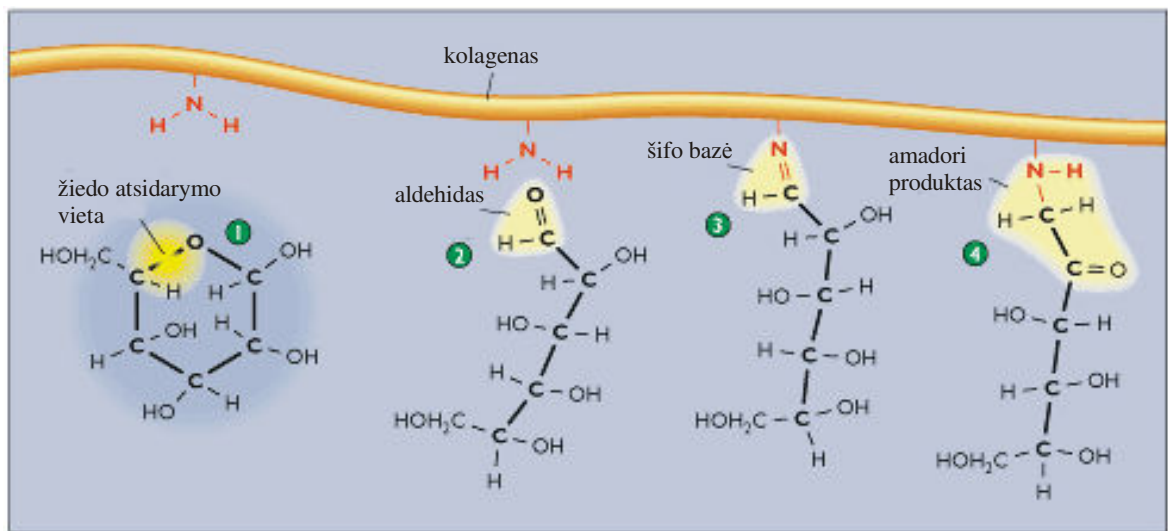
Hiperglikemijos rezultatai yra dažnai negrįžtami ir veda prie ląstelės funkcijos sutrikimo [40]. Šešiaanglis gliukozės žiedas pasikeičia į linijinę molekulę su aldehidine liekana [27]. Nedalyvaujant fermentams gliukozės molekulės aldehidinė grupė gali jungtis prie amino grupės [24][47]. Tokio gliukozės prisijungimo prie baltymo molekulės, pradžioje susidaro chemiškai grįžtamas ankstyvas glikozilinimo produktas (šifo bazė). Vėliau jis savaime persitvarko ir tampa stabiliais Amadori tipo glikozilinimo produktais [27]. Reakcija vyksta lėtai, laipsniškai [55]. Vėliau susidaro stabilus produktas pvz. ketoamino 1–glukofruktovalinas gliukozė prisijungia prie hemoglobino grandinių N-galuose esančių valino amino grupių [47]. Glikozilintas hemoglobinas yra efektyvus, 3 mėn. laikotarpio, glikemijos kontrolės rodiklis [51]. Per visą eritrocito egzistavimo laiką gliukozė laisvai pereina per jo membraną ir nedalyvaujant fermentams negrįžtamai jungiasi su hemoglobinu. Trumpalaikis glikemijos padidėjimas ar sumažėjimas esminės įtakos neturi glikozilinto hemoglobino koncentracijai. Glikozilintas hemoglobinas turi aiškią diagnostinę reikšmę. Kuo didesnė šio rodiklio koncentracija, tuo didesnis diabetinių komplikacijų pavojus [61].

Gliukozė gali jungtis prie ilgai gyvuojančių baltymų, kurie laiko eigoje kaupiasi ląstelės sienelėje [27]. Prie kolageno gliukozė gali jungtis O-glikozidiniais ryšiais. Per eilę cheminių persitvarkymų virsta sudėtingais stabiliais glikozilinimo produktais (3 pav.). Laipsninis nefermentinis glikozilinimas priklauso nuo gliukozės koncentracijos ir laiko [55]. Ląstelės membranos baltymų glikozilinimas nulemia bazinės membranos sustorėjimą [27].

Pagrindiniai išaiškinti metaboliniai sutrikimai sukelti pastovios hiperglikemijos: sorbitolio kaupimasis ląstelėje, sumažėjusi intraaksoninių baltymų sintezė ir transportas, natrio-kalio ATP-azės sumažėjimas nerve, proteinkinazės C aktyvacija, sumažėjęs L-karnitino kiekis nerve, pakitęs inozitolio metabolizmas [31], perteklinis glikogeno kaupimasis, sumažėjęs glikolipidų ir amino rūgščių įjungimas į mieliną. Šie mechanizmai diabetinės neuropatijos

priežastis. Gliukozės perteklius virsta sorbitoliu bei fruktoze dalyvaujant aldozės reduktazei ir sorbitolio dehidrogenazei. Fruktozė ir sorbitolis kaupiasi periferiniuose nervuose ir kituose audiniuose. Jų susikaupimas sumažina mioinozitolio kiekį nerve, membranos Na-K ATP-azės aktyvumą, natriis kaupiasi aksone, sumažėja nervinio laidumo greitis, nervas irsta [31].

Didelė gliukozės koncentracija aktyvina proteinkinazę C, nes vis daugiau susidaro diacilglicerolio, pagrindinio endogeninio ląstelės kofaktoriaus proteinkinazei C. Proteinkinazė turi mažiausiai 12 izoformų (pvz. serinokinazė). Ši sistema yra pasiskirsčiusi po visą ląstelę, reguliuoja augimo faktoriaus signalo paleidimą [59]. Augimo faktorius β (TGF- β) - vienas reikšmingiausių faktorių, aktyvinantis proteoglikanų ir kologeno genų ekspresiją taip pat mažina proteolizinių fermentų sintezę [38]. Galvojama, kad padidėjusi TGF - β ekspresija skatina kapiliarų membranos sustorėjimą [38].



3 pav. Glikozilinito produkto formavimosi procesas.

Pirminės molekulės grandinės pažymėtos geltona spalva. Žiedo formos gliukozės molekulė (D-gliukopiranozė) yra neaktyvi (1). Savaiminis žiedo atsідarymas suformuoja linijinę D-gliukozės molekulę (2) su aldehidine grupe, kuri gali jungtis su laisva amino grupe. Pradinėje sąveikoje susidaro šifobazė (3), kuri savaime virsta Amadori produktu (4). Tolesnis laipsniškas procesas, suformuojantis makromolekules, yra negrįžtamas.

[<http://www.hosprract.com/issues/2000/11/eldvlas.htm>]

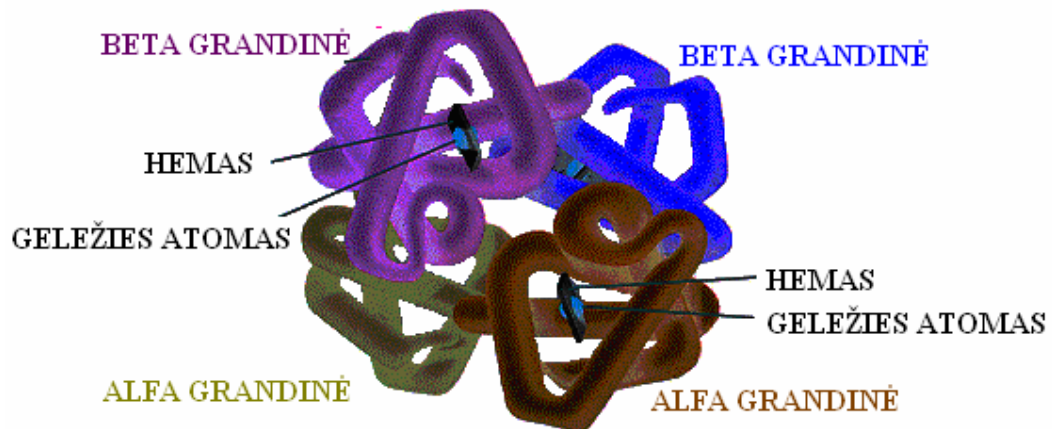
Pirminio glikozilinito produktai gali būti užsitęsusio reumatoidinio artrito priežastis. Pacientų kraujyje nustatomi antikūnai prieš pirminius glikozilinito produktus – imunoglobulinai G klasės [39].

Glikozilinti baltymai formuojasi po transliacijos laipsniškai, nefermentine reakcija tarp gliukozės ir baltymų amino grupės [54]. Glikozilinti baltymai (glikozilinti serumo/plazmos baltymai) gali būti taikomi ilgalaikės glikemijos kontrolei [18][8]. Tačiau kai kurių glikozilintų

baltymų egzistavimo laikas yra trumpas nuo 15 iki 30 dienų [18]. Tuo tarpu glikozilintas hemoglobinas atspindi glikemijos vidurkį nuo 60 iki 120 dienų [18][30][46][20][22][32].

1.3. Glikozilintas hemoglobinas

Hemoglobinas – baltymas, turintis prostetinę grupę hemą. Baltyminė dalis - globinas sudarytas iš keturių nekovalentiškai susijungusių polipeptidinių grandinių. Yra nustatytos kelios hemoglobino formos, kurios skiriasi ne prostetine grupe, o polipeptidinėmis grandinėmis.



4 pav. Baltymo struktūra: tetrameras, keturios polipeptidinės grandinės.

[Classroom C.:Biology 442 – Human genetics. Lecture Syllabus – Spring 2006]

Hemoglobino forma ir sintezės vieta priklauso nuo žmogaus amžiaus. Embriono eritrocitų hemoglobinas turi zeta (ϵ) 2 epsilon (ζ) 2, alpha (α) 2 epsilon (ζ) ar zeta (ϵ) 2 gama (γ) 2 grandines. Sintezės vieta kiaušinėlio trynio maišelyje, o vėlesnis fetalinis hemoglobinas (HbF) sintetinamas kepenyse ir blužnyje [17]. HbF grandinės – alpha (α) 2 gama (γ) 2. Suaugusio žmogaus hemoglobinas, kurio sintezė vyksta kaulų čiulpuose, sudaro HbA1 – (97-98 %) alpha (α) 2 beta (β) 2, o HbA2 – (2-3 %) alpha (α) delta (δ) polipeptidinės grandinės [17]. Jos skiriasi

amino rūgščių skaičiumi. Pvz. alpha (α) grandinę sudaro 141 amino rūgštys, o beta (β) ir gama (γ) – 146 amino rūgštys.

Dar 1955 metais buvo pastebėta kad, žmogaus hemoglobinas yra heterogeniškas [19][44]. 1958 metais Allen su kolegomis, atlikus jonų mainų chromatografija, nustatė HbA1 komponentus, tai HbA1a, HbA1b, Hb1c [19][45]. To atradimo reikšmė diabetui nebuvo įvertinta, kol Rahbar naudodamas elektroforezę išskyrė hemoglobino frakcijas pacientams sergantiems cukriniu diabetu [19].

XX amžiaus aštuntojo dešimtmečio viduryje buvo aišku, kad HbA1c tai potranskripcinė HbA1 modifikacija [45]. Vėliau tapo plačiai naudojamas tyrimas ilgalaikės glikemijos kontrolei [19].

Glikozilinto hemoglobino analizei naudojama daugiau 30 skirtingų metodų, bet iš jų svarbiausi yra keturi, tai jonų mainų chromatografija, elektroforezė, Afininė (giminingumo) chromatografija, imunocheminės analizės metodas [12][18][19].

Jonų mainų chromatografijos pagrindas – hemoglobino A1c izoelektrinio taško ir kitų hemoglobino variantų skirtumas [35][6].

Afininė (giminingumo) chromatografija remiasi kovalentinių jungčių glikozilintame hemoglobine tarp gliukozės ir boronato matricos susidarymu, matuojant bendrą glikozilinimą (α ir β grandinių valino ir ϵ - lizino) [35].

Imunocheminės analizės metodo pagrindas – antikūnai prieš hemoglobiną A1c [35][44].

Metodus galime suskirstyti į dvi grupes. Pirma grupė metodu, tai jonų mainų chromatografija ir elektroforeze, atskiria glikozilinto ir neglikozilinto hemoglobino komponentus [51]. Antrai grupei priskirtume metodus, kurių pagrindas struktūros giminingumas, tai imunocheminė analizė ir Afininė (giminingumo) chromatografija [51].

Skirtingų metodų matavimo principai daugiau mažiau skirtingi, taip pat skiriasi jų specifiškumas [18]. Bet rezultatų reikšmė yra tokia pati: eritrocitai laidūs gliukozei, glikozilintas hemoglobinas tiesiogiai proporcingas gliukozės koncentracijai [45]. Yra galimos beveik 44 glikozilinimo vietos, bet visada toks pat santykis glikozilinimo skirtingose vietose [7]. Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC) darbinė grupė apibrėžia analizę hemoglobiną (Hb) A1c tai: hemoglobino β grandinės N – gale glikozilintas valinas [32].

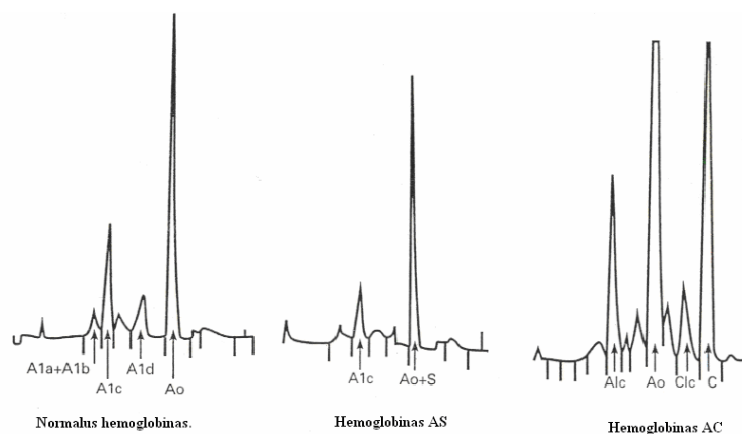
IFCC darbinė grupė, standartizuojant HbA1c, taiko referentiniu metodu didelio efektyvumo skysčių chromatografiją ir kapiliarinę elektroforezę [32]. Referentinio metodo principas: hemoglobinas suskaldomas fermento endoproteinazės Glu-C, atskiriamas ir išmatuojamas glikozilintas ir neglikozilintas N-gale β -grandinės heksopeptidas [30][23][32].

Etalonų sudėtis – gerai išgrynintų HbA1c ir HbAo mišinys [50][23]. Abiejų metodu rezultatai tokie pat. Tarptautinių referentinių laboratorijų tinklas, kurį sudaro Europos, Japonijos ir JAV laboratorijos, įvertino referentinio metodo (didelio efektyvumo skysčių chromatografijos) rezultatus [23]. Variacijos koeficientas, atliekant tyrimus vienoje laboratorijoje nuo 0,5% iki 2%, tarp laboratorijų nuo 1,4% iki 2,3% [23]. Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC) tikslas, kad visuose pasaulio laboratorijose rutininei kiekybinei analizei HbA1c būtų taikoma vienodos standartizacijos metodai [30]. Šiuo metu yra daug komercinių rinkinių, kurių etalonai remiasi palyginamuoju metodu ir turi skirtingą neapibrėžtį.

Glikozilinto hemoglobino tyrimų rezultatams amžius, lytis, rasė įtakos neturi [18]. Sutrumpėjęs eritrocitų gyvavimo laikas gali klaidingai sumažinti rezultatus (hemolizinė anemija, netekus kraujo) [18][5][51]. Hemoglobinopatijos, nepriklausomai nuo jų įtakos eritrocitų išlikimui gali įtakoti glikozilinto hemoglobino rezultatus [16]. Rezultatai, priklausomai nuo metodo ir hemoglobinopatijos, gali būti tiek padidinti, tiek sumažinti [51][44]. Hipertrigliceridemija, hiperbilirubinemija, uremija, lėtinis alkoholizmas, vitaminas C, vitaminas E, geležies deficitinė anemija, yra būklės, kurių metu nustatomas klaidingai didesnis HbA1c kiekis, priklausomai nuo tyrimo metodikos [57][5][9]

Imunocheminis metodas – tai lateks agliutinacija ar imunotubidimetrinė analizė [5], kuomet antikūnai atpažįsta hemoglobino N – gale β – grandinės glikozilintą valiną ir papildomai nuo 4 iki 10 pirmas amino rūgštis [9][5]. Antikūnai neatpažįsta grįžtamos Šifo bazės ar kitos glikozilinto hemoglobino atmainos, įskaitant chemiškai modifikuotus derivatus [5]. Tai gali būti HbA1c sumažėjimo priežastis nustatant imunocheminiu metodu [5]. Hb Raleigh (Val→Ala) atveju, acetilinimas galinės NH_2 grupės trukdo susidaryti glikozilintam hemoglobinui, todėl rezultatas gaunamas mažesnis [10].

Jonų mainų chromatografija – pritaikomas elektrocheminis gradientas, išplautos hemoglobino frakcijos lengvai išmatuojamos [33]. Šiuo atveju hemoglobino variantai HbA1c rezultatui įtakos neturi, nes jie yra išskiriami, kaip atskira frakcija [33].

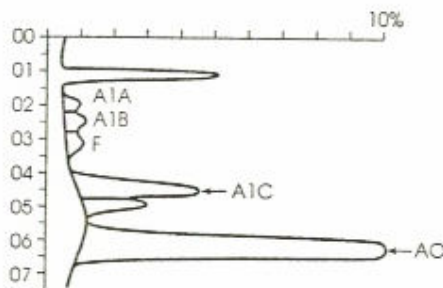


5 pav. Didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodas.

[Logue FC, Goldstein DE, Wilson DH, Weykamp CW, Braconnier F, Blouquit Y, Gillery P, Grand C, Buño A, Bürgi W, Caenaro G, Stolba P. Glycated hemoglobin for the management of the diabetes patient. ABBOTT diagnostics educational serces.]

Afininė (giminingumo) chromatografija – išmatuojama glikozilintų frakcijų visuma. Visi hemoglobino tipai, bet kokia mutacija gali būti glikozilinama, todėl analitės HbA1c rezultatai gali būti klaidingai didesni [33].

	%	Laikas	Plotas
A1A	0.3	1.9	16.39
A1B	0.8	2.4	41.97
F	0.6	3.1	30.25
A1C	4.4	4.3	203.12
P5	2.0	4.8	100.47
A0	91.8	6.0	4587.97
Bendras			4996.62
HbA1C - 4.4%			HBA1 5.6%



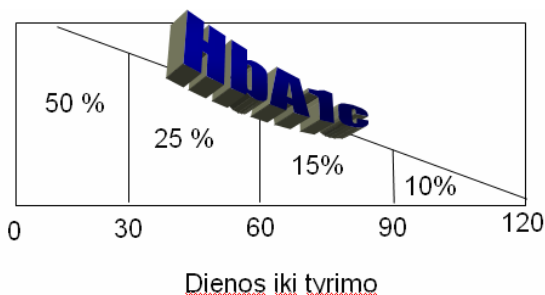
6 pav. Afininė (giminingumo) chromatografijos metodas. Pavyzdys diabetu sergančio paciento (heterozigota HbE).

[Logue FC, Goldstein DE, Wilson DH, Weykamp CW, Braconnier F, Blouquit Y, Gillery P, Grand C, Buño A, Bürgi W, Caenaro G, Stolba P. Glycated hemoglobin for the management of the diabetes patient. ABBOTT diagnostics educational serces.]

Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimas (DCCT) ir Jungtinės Karalystės prospektyvinė diabeto studija (UKPDS) įrodė, jog kuo didesnė HbA1c koncentracija, tuo didesnis diabetinių komplikacijų pavojus [51]. Amerikos diabeto asociacijos tikslas pacientams sergantiems cukriniu diabetu gliukozės koncentraciją palaikyti artimą normaliai, tai yra HbA1c < 7%, kai metodas standartizuotas Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimų (DCCT) [51].

Aukštą metodo specifiškumą rodo linijinė koreliacija, tai įrodo palyginus rutininius metodus su Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC) nauja standartizacija [20]. Pvz. Hitachi/Tina quant $r = 0,995$, COBAS INTEGRA $r = 0,997$, palyginus abu šiuos metodus, standartizuotus Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos $r = 0,997$ [20]. Dviguba standartizacija: tai bendro hemoglobino – cianmethemoglobino referentinis (kolorimetrinis) metodas ir hemoglobino N- gale β – grandinė prisijungusi gliukozė imunoturbidimetrinis metodas [20]. Atliekant tyrimus metodais standartizuotais DCCT, rezultatus gauname aukštesnius, nei IFCC standartizuotais metodais [46]. Skirtingų standartizacijos metodų naudojimas sudaro sunkumų klinacistams įvertinti rezultatus [54]. Bendra tarptautinė standartizacija leistų palyginti skirtingų laboratorijų rezultatų skirtumus [12].

Žmonių sergančių II tipo cukriniu diabetu, 24 valandų laikotarpiu gliukozės koncentracijos vidurkis, gerai koreliuoja su glikozilintu hemoglobinu [22]. Nenumatytas giminingumas tarp amžiaus (amžiaus vidurkis: $71,5 \pm 5,01$) ir miego arterijos vidinio – vidurinio dangalo, ir HbA1c lygio [15].



6 pav. HbA1c: asimetrinis glikemijos vidurkis.

HbA1c atspindi trijų mėnesių glikemijos kontrolę, tačiau paskutinių keturių savaičių gliukozės kiekis turi didžiausią įtaką HbA1c koncentracijai (6 pav.) [57].

Yra žinoma, jog galima $\approx 1\%$ HbA1c rezultatų variacija tarp individų, esant identiška glikemijos koncentracijai plazmoje, taigi 1% skirtumas tarp individų ne visuomet yra reikšmingas [57].

HbA1c svarba gydant cukrini diabetą:

- HbA1c – esminis cukrinio diabeto gydymo efektyvumo kriterijus,

- HbA1c lygis koreliuoja su mikro- ir makrovaskulinių komplikacijų rizikos didėjimu diabetikams [57],
- Pasaulinės organizacijos patvirtina ir remia tikslinio gydymo strategiją > 6%.

IFCC darbinės grupės nustatytas referentinės sistemos etalonas gali būti pagrindu globalinei HbA1c standartizacijai [35]. Veikia 12 tarptautinių referentinių laboratorijų tinklas, kurių palyginti rezultatai CV yra žemiau 2%. IFCC terapinė vertė > 6%.

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

2.1. Tiriamoji medžiaga

Tyrimams pasirinkta: 62 moterų ir 41 vyro, sergančių cukriniu diabetu, kraujo mėginiai. Vyriausias pacientas 81 metų moteris serganti 12 metų II tipo cukriniu diabetu. Jauniausias pacientas – 13 metų mergaitė 7 metus serganti I tipo cukriniu diabetu. Ilgiausiai sergantis pacientas 58 metų vyras, liga diagnozuota 1974 metais (serga 31 metus) I tipo cukriniu diabetu. Visi tirti 103 pacientai gydomi insulinu iš kurių:

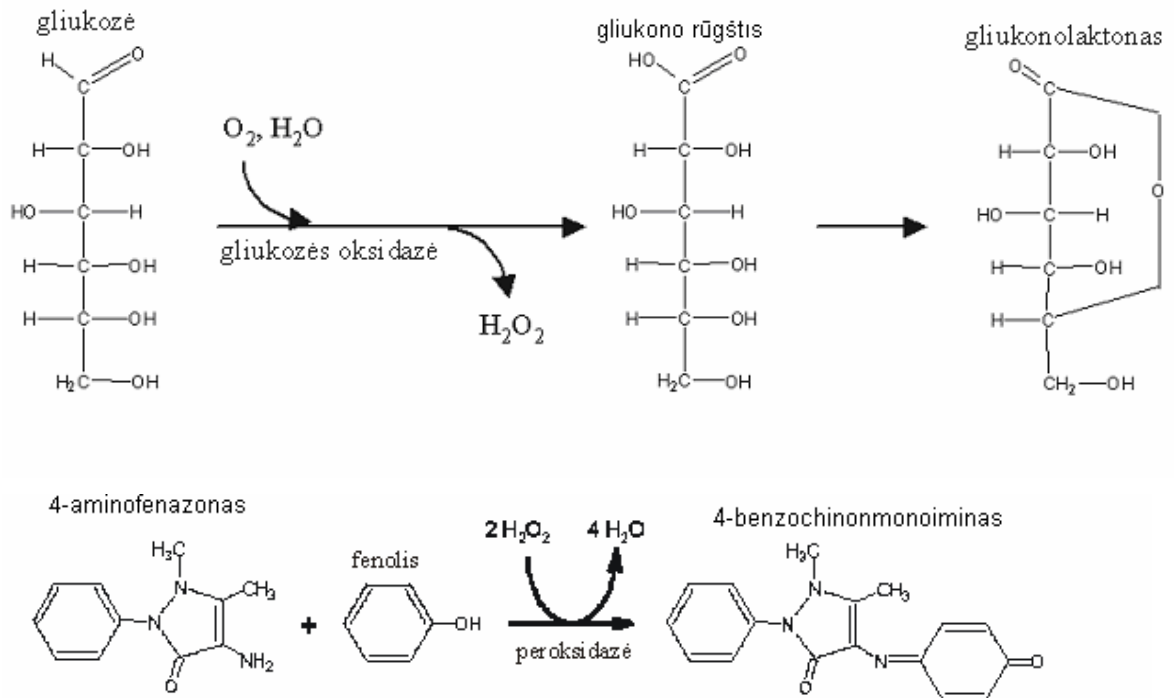
- o sergančių I tipo cukriniu diabetu – 12;
- o sergančių II tipo cukriniu diabetu – 91.

Tiriamoji medžiaga - veninis kraujas su antikoagulantu etilendiamintetraacetatu (0,072 ml 7,5 % K3EDTA). Kraujas imamas punktuojant veną ryte, nevalgius į vakuuminį mėgintuvėlį.

2.2. Gliukozės koncentracijai nustatyti naudotos analizinės sistemos

2.2.1. ROCHE–HITACHI 917 analizinė sistema

Metodo principas:



3 schema. Gliukozės nustatymo metodo principas.

[<http://www2.uah.es/bioquimica/f-bcpmh/practics/diabetes.htm>]

Gliukozė, dalyvaujant fermentui gliukozės oksidazei (GOD), virsta gliukono laktonu susidarant vandenilio peroksidui. Vandenilio peroksidas yra suskaidomas fermento peroksidazės (POD) ir oksiduojamas fenolis, kuris su 4-aminofenazonu sudaro 4-benzochinonmonoimino kompleksą. Susidariusio komplekso raudonos spalvos intensyvumas tiesiogiai proporcingas gliukozės koncentracijai. (3 schema).

Reagentai:

R₁ Buferis/fermentai/4-aminofenozonas/fenolis/fosfatinis buferis: 200mmol/l, pH7,5; GOD≥11U/ml; POD≥0,02U/ml; 4-aminofenozonas: 0,77mmol/l; fenolis: 11mmol/l.

Etalonai:

S₁ 0,9% natrio chlorido tirpalas

S₂ Kalibrantai automatinei sistemai (C. f. a. s.). Dviejų taškų kalibracija. (ROCHE Diagnostics, Vokietija)

Kokybės kontrolė:

Precinorm U, Precipath U. Gamintojas – ROCHE Diagnostiks.

Gamintojo rekomenduotos normos:

Serume/plazmoje

Suaugusiems: 3,89–5,83 mmol/l;

>60 metų 4,4–6,38 mmol/l;

>70 metų 4,61–6,11 mmol/l;

Vaikams: 3,33–6,11 mmol/l.

Naujagimiams:

1 diena: 2,22–3,33 mmol/l;

>1 diena: 2,78–4,44 mmol/l.

2.2.2. Analizatorius EBIO compact

Matavimo principas:

Gliukozė nustatoma fermentu įmobilizuotu membranoje ir platinos elektrodo pagalba. Gliukozė, kuri prasiskverbia į matavimo kamerą įsiurbimo metu, susiduria su stabilia gliukozės GOD membrana ir praėjusi pirmąją membranos užtvarą gliukozė virsta į gliukono rūgštį ir vandenilio peroksidą. Vandenilio peroksidas jutiklio bloke praeidamas per antrąją

membranos užtvarą yra elektrochemiškai oksiduojamas. Dėl to atsiranda elektros srovės pokytis, kuris proporcingas gliukozės koncentracijai tiriamame mėginyje (1 schema).

Etalonai:

Gamintojas - EBIO diagnostics. Koncentracija – 12 mmol/l.

Kokybės kontrolė:

PrecinormU – normali kontrolė;

Precipath U – patologinė kontrolė.

Rekomenduojamos normos:

3,33 – 5,55mmol/l.

2.2.3. Gliukozės analizatorius BIOSEN C line Cline

Matavimo principas:

Gliukozė nustatoma fermentu įmobilizuotu membranoje ir platinos elektrodo pagalba. Gliukozė, kuri prasiskverbia į matavimo kamerą, įsiurbimo metu susiduria su stabilia gliukozės GOD membrana ir praėjusi pirmąją membranų užtvarą gliukozė virsta į gliukono rūgštį ir vandenilio peroksidą. Vandenilio peroksidas jutiklio bloke praeidamas per antrąją membranų užtvarą yra elektrochemiškai oksiduojamas. Dėl to atsiranda elektros srovės pokytis, kuris proporcingas gliukozės koncentracijai tiriamame mėginyje (1 schema).

Etalonai:

Gamintojas - EKF diagnostics. Koncentracija – 12 mmol/l

Kokybės kontrolė:

Precinorm U – normali kontrolė;

Precipath U – patologinė kontrolė.

Rekomenduojamos normos:

3,33 – 5,55mmol/l.

2.2.4. Automatinis analizatorius SUPER

Matavimo principas:

Gliukozė nustatoma fermentu įmobilizuotu membranoje ir platinos elektrodo pagalba. Gliukozė, kuri prasiskverbia į matavimo kamerą, įsiurbimo metu susiduria su stabilia gliukozės GOD membrana ir praėjusi pirmąją membranų užtvarą gliukozė virsta į gliukono rūgštį ir vandenilio peroksidą. Vandenilio peroksidas jutiklio bloke praeidamas per antrąją

membranos užtvary yra elektrochemiškai oksiduojamas. Dėl to atsiranda elektros srovės pokytis, kuris proporcingas gliukozės koncentracijai tiriamame mėginyje (1 schema).

Etalonai:

Gamintojas - HITADO diagnostics. Koncentracija – 12mmol/l.

Kokybės kontrolė:

Precinorm U – normali kontrolė;

Precipath U – pataloginė kontrolė.

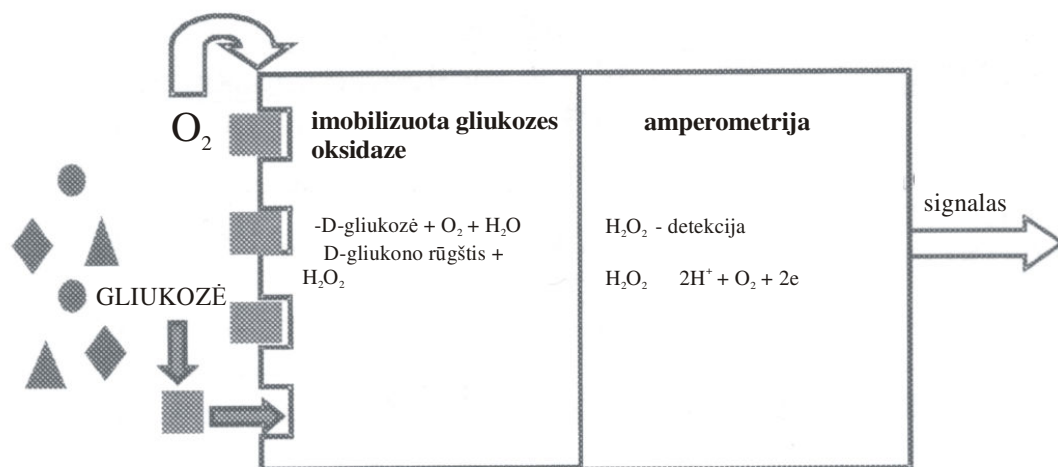
Normos:

Kapiliarinis kraujas – 3,33–5,55 mmol/l;

Veninis kraujas – 3,33–5,55 mmol/l;

Kraujo serumas – 3,9–5,55 mmol/l;

Kraujo plazma – 3,05–6,4 mmol/l.



1 schema. Gliukozės matavimo principas.

2.3. Glikozilinto hemoglobino nustatymui naudotos analizinės sistemos

2.3.1. ROCHE–HITACHI 917 analizinė sistema

Metodo principas (2 schema):

Lizuojančio reagento tetradeciltrimetilamonio bromido pagalba suardoma eritrocitų membrana ir kartu išlaisvinamas hemoglobinas.

HbA1c hemolizuotame kraujyje nustatomas imunoturbidimetriniu metodu.

Mėginyje esantis glikozilintas hemoglobinas (HbA1c) reaguoja su antikūnais prieš HbA1c ir susidaro tirpus antigeno – antikūnų kompleksas.

Antikūnų prieš HbA1c perteklius reaguoja su polihaptenu ir sudaro netirpų antigeno – antikūnų kompleksą. Reakcijos drumstumas atvirkščiai proporcingas glikozilinto hemoglobino koncentracijai mėginyje.

Hemoglobinas hemolizuotame mėginyje nustatomas kolorimetriniu metodu. Laisvas hemoglobinas turi savybę sugerti jam charakteringą bangos spektrą.

Reagentai :

Reagentai esantys rinkinyje paruošti naudojimui.

R1 2–morfolinoetano sulfono rūgšties buferis: 0,025 mol/l;

Tris (hidroksimetyl)–aminometano buferis: 0,015mol/l, ph 6,2;

Anti–HbA1c antikūnai: $\geq 0,5\text{mg/ml}$.

R2 2–morfolinoetano sulfato rūgšties buferis: 0,025 mol/l;

Tris (hidroksimetyl)–aminometano buferis: 0,015 mol/l, ph 6,2;

HbA1c polihaptenas: $\geq 8\mu\text{g/l}$.

3a–b Hemolizuotas žmogaus kraujas.

Tetradeciltrimetilamonio bromidas: 9 g/l.

R1 Fosfatinis buferis: 0,02mol/l, ph 7,4.

Etalonai:

Metodas standartizuotas ir patvirtintas Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC), taikomas HbA1c nustatyti žmogaus kraujyje. Rezultatai gali būti perskaičiuojami remiantis Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimais (DCCT).

HbA1c

S1 0,9% NaCl

S2–5 etalonai 3a–d

Hemoglobinas

S1 0,9% NaCl

S2 etalonai 3a.

Kokybės kontrolė:

Precinorm HbA1c –normali kontrolė;

Precipath HbA1c –patologinė kontrolė.

Gamintojas - ROCHE Diagnostics, Vokietija.

Apskaičiavimai:

Pagal Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federaciją (IFCC).

Apskaičiuojamas HbA1c procentais:

$$HbA1c(\%) = \frac{HbA1c(g/dL)}{Hb(g/dL)} \times 100.$$

Pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimus (DCCT).

$$HbA1c(\%) = \left(87,6 \times \frac{HbA1c(g/dL)}{Hb(g/dL)}\right) + 2,27.$$

Rekomenduojamos normos:

Pagal Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC) rekomendacijas:

HbA1c – 2,9 – 4,2 %.

Pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimų rekomendacijas:

HbA1c – 4,8 – 5,9%.

2.3.2. BAYER – ADVIA 1650 analizinė sistema**Metodo principas:**

Išmatavus hemoglobino A1c ir bendro hemoglobino koncentracijas, jų santykis išreiškiamas procentais. Tiriamasis kraujas sumaišomas su hemoglobina denatūruojančiu reagentu (1:41) ir inkubuojamas mažiausiai 5 minutes (kambario temperatūroje). Eritrocitai yra lizuojami, hemoglobino grandinės hidrolizuojamos dalyvaujant fermentui proteazei. Bendro hemoglobino koncentracijos nustatymo metodas pagrįstas visų hemoglobino derivatų konversija į šarminį hematiną (šarminiame nonioninio detergento tirpale, kuris aprašytas Wolfo ir kt.). Matavimas kolorimetrinis 596 nm banga. Nustatant hemoglobina A1c naudojamas specifinis lateksas (agliutinacijos inhibitorius). Mėginyje esantis HbA1c, jungdamasis su antikūnais prieš HbA1c, sudaro kompleksą. Agliutinaciją sustiprina latekso dalelės sujungtos su antikūnais.

Reakcija vertinama pagal šviesos pokytį. Įvykus agliutinacijai, homogeninė suspensija drumstėja ir šviesos absorbcija didėja. Šviesos pokytis yra atvirkščiai proporcingas HbA1c kiekiui mėginyje.

Reagentai:

Reagentas 1:

Anti HbA1c antikūnai sujungti lateksu – 8µg/mg;

Galvijų serumas – albuminas – 0,2%;

Buferis.

Reagentas 2:

HbA1c haptenas kovalentiškai prijungtas polimeras – 2µg/ml;

Galvijų serumas – albuminas – 0,1%;

Buferis.

Bendro hemoglobino reagentas:

Natrio hidroksidas – 0,4%.

Denatūruojantis reagentas:

Kiaulės pepsinas – 0,01%.

Etalonai:

Standartizuota Nacionalinės glikohemoglobino standartizacijos programos (NGSP). Kalibracijai naudojami šeši lygiai. 1-0,9% NaCl; 2-1,9g/dl; 3-3,310g/dl; 4-4,28g/dl; 5- 6,67g/dl; 6-9,10g/dl.

Kokybės kontrolė:

Bayer DCA 2000 Hemoglobino A1c normali ir patologinė kontrolė.

Rekomenduojamos normos:

4 – 6%

2.3.3. DADE BEHRING-DIMENSION R x L analizinė sistema

Metodo principas:

Bendro hemoglobino nustatymas:

Lizuojančio reagento pagalba suardoma eritrocitų membrana ir kartu išlaisvinamas hemoglobinas. Išlaisvintas hemoglobinas gali sugerti charakteringą bangos spektrą. Bendro hemoglobino koncentracija nustatoma 405nm ir 700nm banga.

Hemoglobino A1c nustatymas:

Mėginyje esantis HbA1c ir antikūnai prieš HbA1 susidaro tirpu antigeno – antikūnų kompleksą. HbA1c molekulė turi epitopus (determinantes) polihaptenui. Mėginyje esantis anti-HbA1c antikūnų perteklius ir polihapteno reagentas sudaro netirpų antigeno – antikūnų kompleksą. Reakcijos drumstumas atvirkščiai proporcingas HbA1c koncentracijai mėginyje. Matavimas 340nm ir 700nm banga (2 schema).

Reagentai:

Buferinis reagentas su anti-HbA1c antikūnais:

Antikūnai ≥ 0,5mg/ml;

2–morfolinoetano sulfato rūgštis 0,025M;
Tris (hidroksimetil) aminoetanas 0,015M;
Ph 6,2.

Polihapteno buferinis reagentas:

Polihapteno reagentas $\geq 8\mu\text{g/l}$;

2–morfolinoetano sulfato rūgštis 0,025M;

Tris (hidroksimetil) aminoetanas 0,015M;

Ph 6,2.

Lizuojantis reagentas:

Tetradecil trimetil amonio bromidas $< 1\%$.

Reagentai paruošti naudojimui.

Etalonai:

Standartizuota Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimų (DCCT). Kalibracijai naudojami 5 lygių etalonai. 1-0,9% NaCl; 2-0,48 g/dl; 3-0,89g/dl; Hb -14,7g/dl; 4-1,83g/dl; Hb-14,5 g/dl; 5-3,75g/dl.

Kokybės kontrolė:

DADE diabeto normali ir patologinė kontrolė.

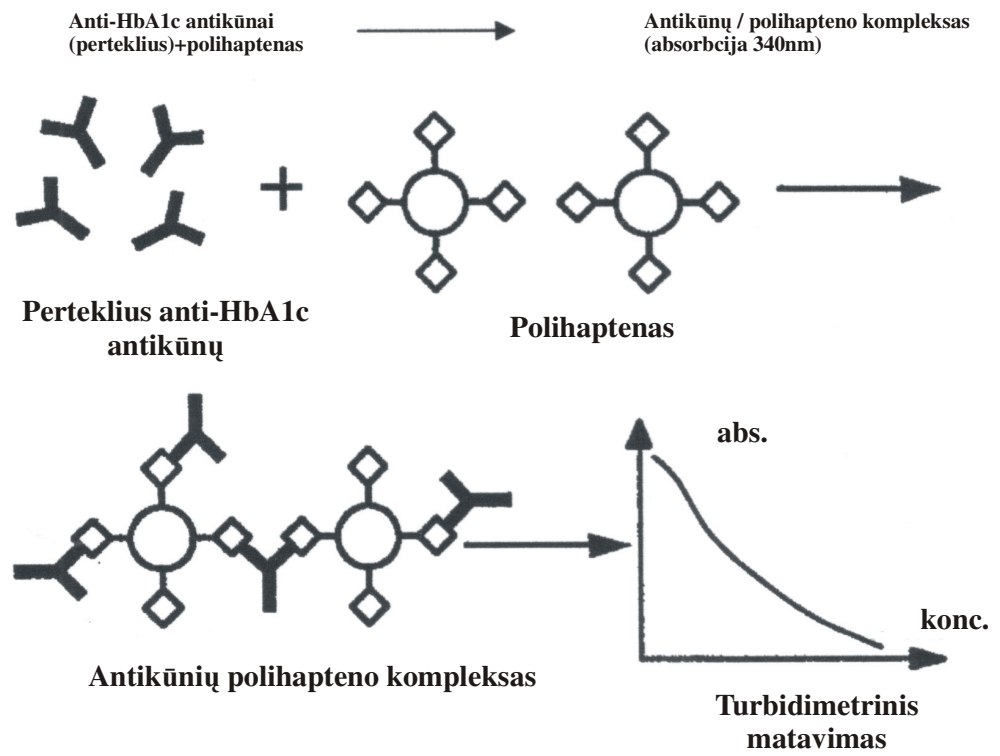
Rekomenduojamos normos:

4,8 – 6,0 %

Mėginys + lizuojantis reagentas \longrightarrow Kolorimetrinis matavimas
(405nm banga)

Hemoglobinas A1c+anti-HbA1c antikūnai \longrightarrow Hemoglobino A1c-anti-HbA1c antikūnų kompleksas





2 schema. Glikozilinto hemoglobino nustatymo metodo principas.

Schemos sudarytos remiantis gamintojo pateiktais aprašymais.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2 lentelė.

Tiriamų pacientų duomenys

Eil. Nr.	Kodas	Gliuk. konc. mmol/l	Gliuk. konc. vid. mmol/l	Roche HbA1c %	Dimen-sion RxL HbA1c %	Advia 1650 HbA1c %	Dimen-sion RxL skirtumas %	Advia 1650 skirtumas %
1.	050402014	—	7,6	7,5	7,7	9,45	0,2	1,95
2.	050402090	5,81	—	5,7	6,3	6,97	0,6	1,27
3.	050402091	6,22	—	7,11	8,8	9,28	1,69	2,17
4.	050402092	6,71	—	5,5	6	6,67	0,5	1,17
5.	050402093	9,2	—	12,2	11,5	13,51	-0,7	1,31
6.	050402094	6,47	—	8	7,8	9,51	-0,2	1,51
7.	050301083	—	6,5	6,5	6,9	7,88	0,4	1,38
8.	050402095	5,13	—	7,8	7,9	9,39	0,1	1,59
9.	050402096	4,78	—	5,5	5,9	5,87	0,4	0,37
10.	050402097	7,23	—	9,4	9,1	10,92	-0,3	1,52
11.	050402098	5,11	—	5,2	5,8	6,23	0,6	1,03
12.	050302099	4,78	—	6	6,7	7,33	0,7	1,33
13.	050302101	5,79	—	5,3	5,8	6,42	0,5	1,12
14.	050402102	9,45	—	9,9	9,3	11,31	-0,6	1,41
15.	050402012	—	7,5	7,5	8,8	9,15	1,3	1,65
16.	050302080	—	8,4	8,4	8,6	10,15	0,2	1,75
17.	050302071	—	10	10	9,3	11,01	-0,7	1,01
18.	050302072	—	9,5	9,3	9,3	10,85	0	1,55
19.	050302022	—	10	10	9,4	10,85	-0,6	0,85
20.	050301053	—	8,5	9,3	9,3	10,85	0	1,55
21.	050402103	7,12	—	7,6	7,7	8,99	0,1	1,39
22.	050402104	6,92	—	12,7	11,9	14	-0,8	1,3
23.	050302105	5,64	—	6	6,6	7,42	0,6	1,42
24.	050302106	8,61	—	13,1	8,9	10,56	-4,2	-2,54
25.	050401045	—	12	12,1	11,2	13,06	-0,9	0,96
26.	050402107	9,23	—	6,91	7,4	8,98	0,49	2,07
27.	050401044	—	11	11,1	10,7	12,72	-0,4	1,62
28.	050402108	7,12	—	5,2	5,8	6,34	0,6	1,14
29.	050302109	6,93	—	8	8	9,37	0	1,37
30.	050402015	—	6,3	6,3	7	7,96	0,7	1,66
31.	050302078	—	11	7,1	7,7	8,54	0,6	1,44
32.	050402036	—	6,1	6,1	7,3	7,93	1,2	1,83
33.	050402035	—	10,2	10,2	9,6	11,3	-0,6	1,1
34.	050402037	—	8,3	6,7	7,1	7,8	0,4	1,1
35.	050302078	4,46	—	10,1	10,2	11,27	0,1	1,17
36.	050402024	—	11	11	10,5	11,66	-0,5	0,66
37.	050302085	—	7,7	7,7	7,4	8,64	0	0,94
38.	050302086	—	10,2	10,2	10,3	11,83	0,1	1,63
39.	050402017	—	8,9	8,9	8,9	9,9	0	1
40.	050402021	—	10,3	10,3	10,7	13,24	0,4	2,94
41.	050402038	—	7,1	7,1	7,7	8,5	0,6	1,4

42.	050302087	—	11,8	11,8	11,1	12,34	-0,7	0,54
43.	050402019	—	6,1	6,1	6,8	7,59	0,7	1,49
44.	050402018	—	9,6	9,6	10,2	11,07	0,6	1,47
45.	050402039	—	7,45	6,1	6,3	6,67	0,2	0,57
46.	050402025	—	10,4	14,2	13,3	14,98	-0,9	0,78
47.	050401046	—	11,3	11,3	10,3	11,09	-1	-0,21
48.	050402034	—	11,1	11,1	9,8	11,55	-1,3	0,45
49.	050302068	—	11,2	6,2	6,4	6,93	0,2	0,73
50.	050302066	—	11,7	11,7	9,5	11,4	-2,2	-0,3
51.	060402001	—	4,17	6,4	6,2	7,59	-0,2	1,19
52.	060402002	—	5,3	5,8	5,9	6,8	0,1	1
53.	060402003	—	9,15	12,8	11,6	14,13	-1,2	1,33
54.	060402004	—	5,7	7	6,2	7,43	-0,8	0,43
55.	060402005	—	7,34	10,8	11,5	13,2	0,7	2,4
56.	060402006	—	6,27	7	6,5	7,63	-0,5	0,63
57.	060302007	—	7,68	6,8	6,6	7,74	-0,2	0,94
58.	060302008	—	11,04	8,5	8,8	11,2	0,3	2,7
59.	060402009	—	10,69	13,8	12,4	14,9	-1,4	1,1
60.	060402010	—	5,25	5,1	5,8	6,6	0,7	1,5
61.	060402011	—	17,65	8,3	7,8	9,36	-0,5	1,06
62.	060302014	—	9,04	11,7	11,3	13,39	-0,4	1,69
63.	060302015	—	11,9	11,9	11,7	13,59	-0,2	1,69
64.	060302016	—	9	9,6	9	11,53	-0,6	1,93
65.	060402017	—	7,26	6,6	6,4	7,88	-0,2	1,28
66.	060402018	—	8,56	7,2	7,1	8,43	-0,1	1,23
67.	060302019	—	4,54	6,2	6,7	8,06	0,5	1,86
68.	060302020	—	9,31	6,5	6,6	7,96	0,1	1,46
69.	060402021	—	8,85	10,3	11,2	12,3	0,9	2
70.	060402022	—	8,6	6,1	6,4	7,56	0,3	1,46
71.	060402024	—	4,62	5,7	5,4	6,1	-0,3	0,4
72.	060402025	—	9,61	7,1	8	8,65	0,9	1,55
73.	060302026	—	9,04	11,7	10,8	13,1	-0,9	1,4
74.	060302027	—	6,03	5,7	5,7	6,72	0	1,02
75.	060402028	—	12,67	7,9	7,8	9,78	-0,1	1,88
76.	060302029	—	10,3	6,7	6,7	8,21	0	1,51
77.	060302030	—	9,1	8,6	8,8	10,42	0,2	1,82
78.	060402031	—	8,72	8,4	8,3	10,09	-0,1	1,69
79.	060402032	—	9,38	8,7	8,7	10,52	0	1,82
80.	060402033	—	11,8	12,4	12,3	13,65	-0,1	1,25
81.	060302034	—	8,96	8,7	9,1	10,76	0,4	2,06
82.	060302035	—	8,93	8,7	8,5	7,94	-0,2	-0,76
83.	060402036	—	8,52	7	6,6	7,81	-0,4	0,81
84.	060402037	—	11,28	12,2	12,7	14,11	0,5	1,91
85.	060402038	—	7,61	9,8	9	10,74	-0,8	0,94
86.	060402039	—	10,05	12,6	11,9	12,72	-0,7	0,12
87.	060402040	—	11,34	12,2	11,2	12,85	-1	0,65
88.	060402041	—	8,29	8,9	8,3	9,82	-0,6	0,92
89.	060402042	—	12,6	8,6	8,3	9,83	-0,3	1,23
90.	060402043	—	6,5	11,3	10,5	12,2	-0,8	0,9
91.	060302044	—	16,7	12,7	12,3	13,66	-0,4	0,96
92.	060402045	—	8,31	8,7	8,5	10,1	-0,2	1,4
93.	060402046	—	10,99	11,7	14,5	15,66	2,8	3,96
94.	060402047	—	11,98	13,3	11,4	13,24	-1,9	-0,06
95.	060402048	—	7,06	7,3	9,3	11,64	2	4,34

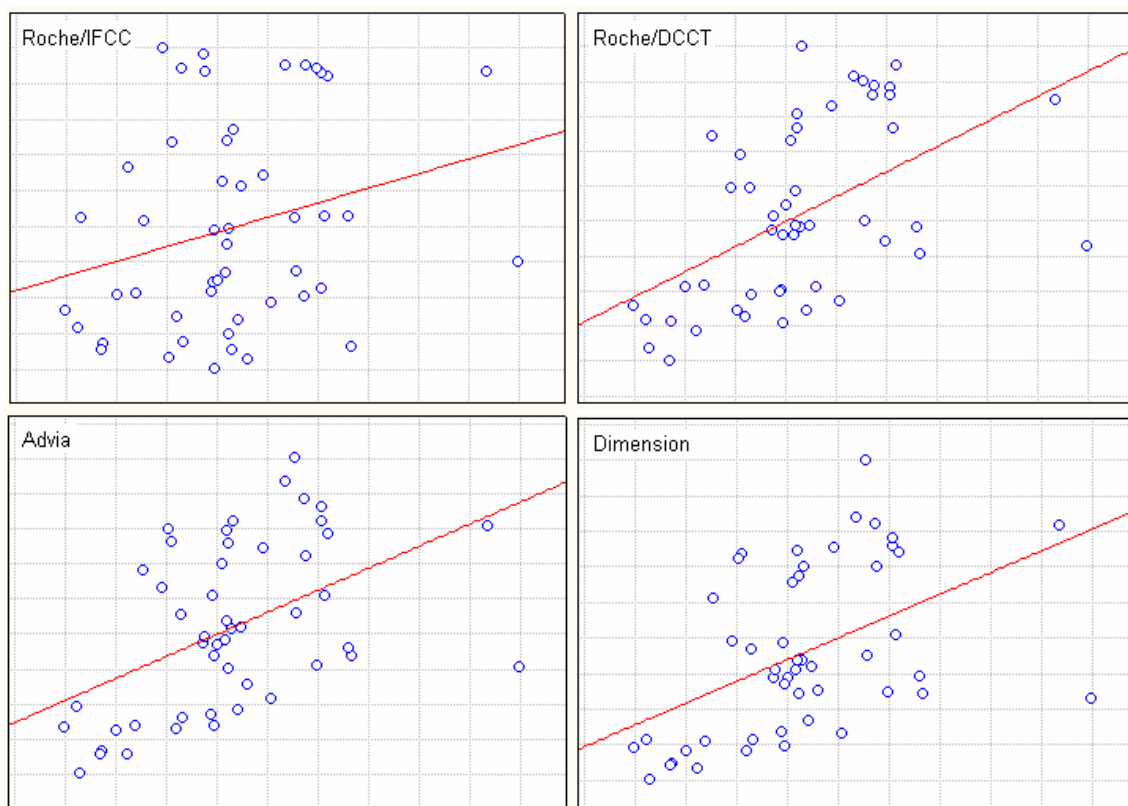
96.	060402049	—	7,47	6,3	6,3	7,41	0	1,11
97.	060402050	—	8,62	8,7	8,1	9,68	-0,6	0,98
98.	060402051	—	11,8	12,1	12,7	14,14	0,6	2,04
99.	060402052	—	11,65	12,5	12,2	15,14	-0,3	2,64
100.	060302053	—	7,79	8,9	7,7	9,11	-1,2	0,21
						Minimum	-4,2	-2,54
						Maksimum	2,8	4,34

Tiriamų pacientų duomenys, surinkti Vš.Į. Panevėžio ligoninėje, pateikti lentelėje. Kiekvienas pacientas turi kodą kuriame atsispindi kuriuo metu buvo rinkti duomenys ir atlikti tyrimai, lytis, cukrinio diabeto tipas, paciento numeris. Pirmi du skaičiai rodo: 05 – 2005 metai; 06 – 2006 metai. Lytį parodo antri du skaičiai: 04 – moteris; 03 – vyras. Treti du skaičiai: 01 – I tipo cukrinis diabetas; 02 – II tipo cukrinis diabetas. Likę trys skaičiai – paciento numeris. Pagrindinis kriterijus pasirenkant pacientus, padidinta glikozilinto hemoglobino koncentracija.

100 pacientų vidutinė gliukozės koncentracija apskaičiuota susumavus trijų mėnesių laikotarpyje atliktų tyrimų rezultatus. Pacientai 050302078 ir 05030268, duomenų rinkimo metu, dėl pablogėjusios būklės ir gliukozės koncentracijos padidėjimo kraujyje, buvo gydomi VšĮ Panevėžio ligoninėje Endokrinologijos skyriuje. 050402025 pacientui gliukozės koncentracijos vidurkis išvestas iš trijų rezultatų. Todėl šių pacientų rezultatai neatitinka glikozilinto hemoglobino kiekiui kraujyje. Pacientams 060302017, 060402047 ir 060402028 tyrimo eigoje buvo paskirtas papildomas ilgo veikimo insulino preparatas (veikimo pradžia 10-20 minučių po injekcijos, maksimalų efektą pasiekia 1-4 valandą, ir poveikis tęsiasi iki 24 valandų [42]). Prieš tai jie vartojo greitai ir trumpai veikiančią preparatą gliukozės koncentracijai reguliuoti. 060402026 pacientui tyrimo eigoje buvo padidinta insulino dozė. Pacientas 060402011 nesilaikė gydytojo paskyrimų. Jo motyvas - hipoglikemijos baimė. Tarp kitų tyrimų HbA1c ir gliukozės vidurkio yra koreliacija (1 diagrama).

Koreliacijai paskaičiuoti naudojome kompiuterinę programą Statistika for Windows 7. Palyginus gautą gliukozės koncentracijos vidurkį su HbA1c trijų analizinių sistemų rezultatais artimiausia koreliacija su Roche-Hitachi 917, kai metodas standartizuotas pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimą (DCCT), tai:

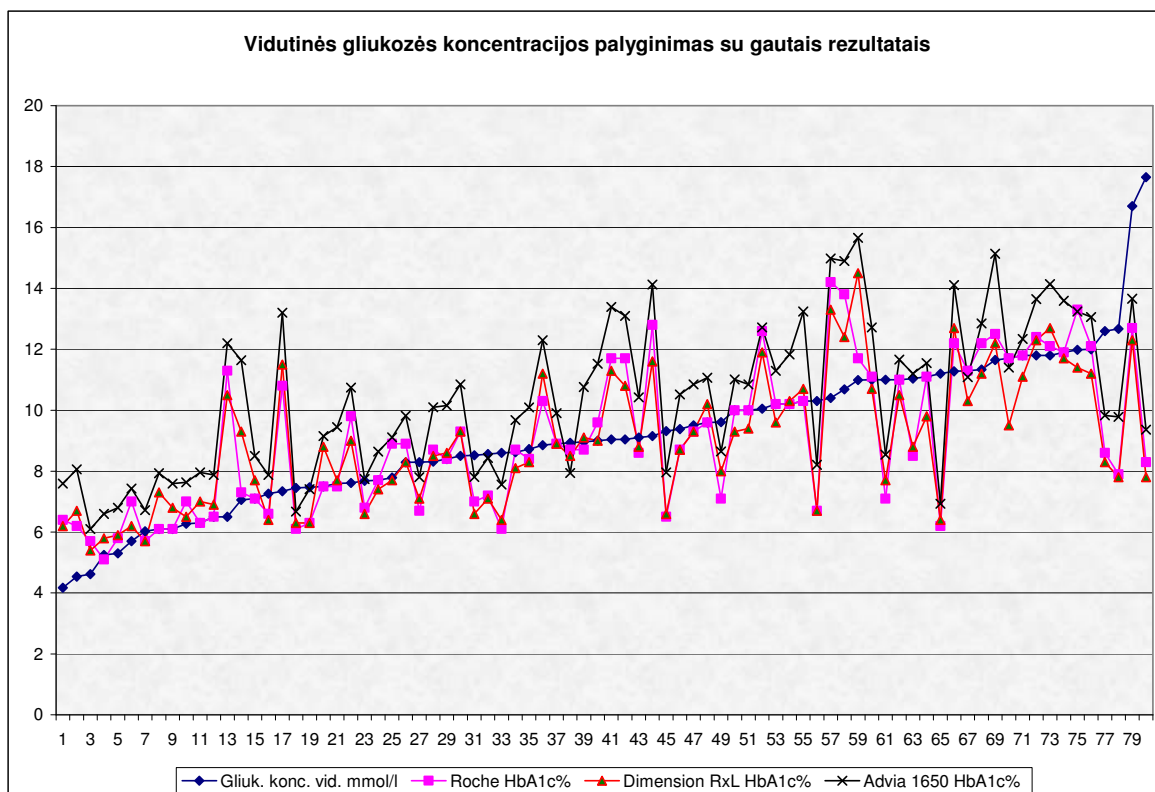
- Roche-Hitachi 917 (IFCC) – $r = 0.26$, $N = 50$,
- Roche-Hitachi 917 (DCCT) – $r = 0.52$, $N = 50$,
- Bayer-Advia1650 (NGSP) – $r = 0.48$, $N = 50$,
- Dade Behring-Dimension RxL (DCCT) – $r = 0.48$, $N = 50$



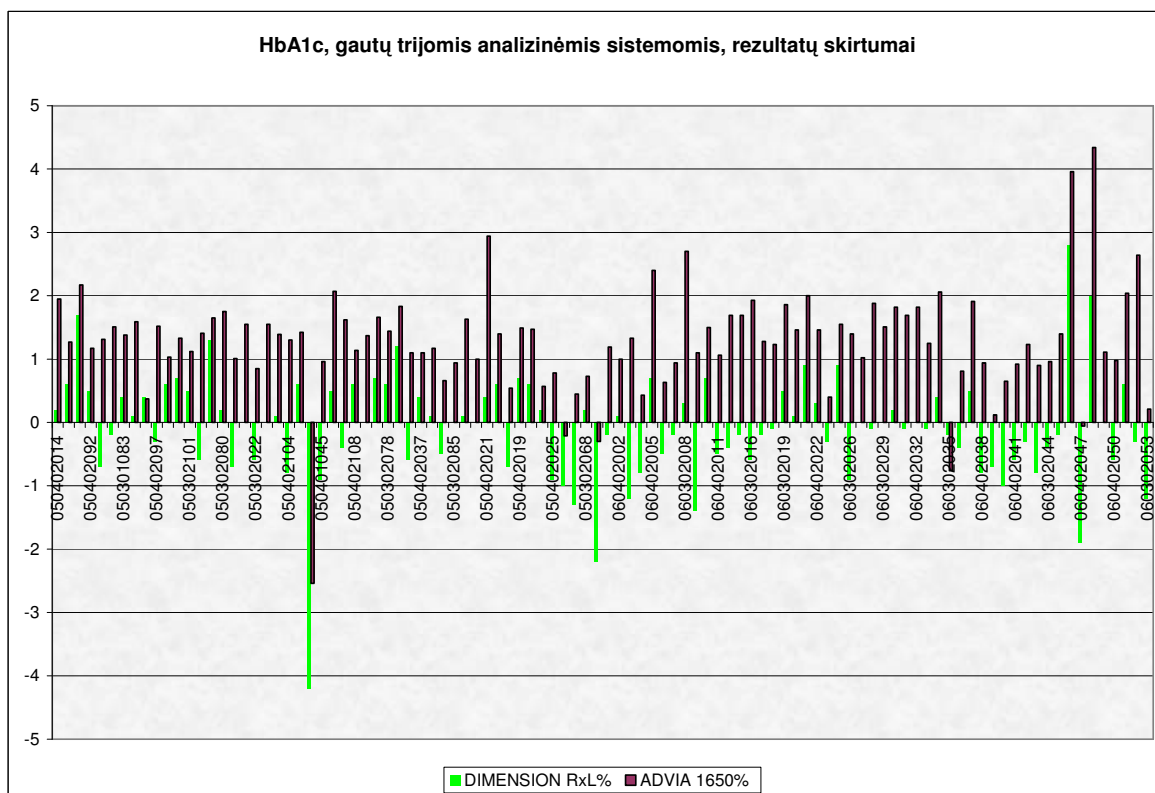
7 pav. HbA1c ir gliukozės vidurkių koreliacija.

Roche - 69 rezultatai iš 100, HbA1c koncentracija, yra didesnė negu 7 procentai. Remiantis DCCT rekomendacijomis tai rodo blogą glikemijos kontrolę. Dimension RxL – 73,0 Advia 1650 – 88 rezultatai yra daugiau negu 7 procentai. Tą skirtumą gali sąlygoti antikūnų specifiškumas, analizatorių kalibracijai naudojamų etalonų koncentracijos skirtumas, taip pat jų lygių skaičius. Tai rodo, kad rezultatų skirtumas yra kliniškai reikšmingas.

HITACHI 917 analizatoriumi glikozilinto hemoglobino koncentracija nustatyta VšĮ Panevėžio ligoninės Laboratorinės diagnostikos skyriuje. Mėginiai laikyti -20°C temperatūroje. Analizatoriais ADVIA 1650 ir DIMENSION RxL tyrimai atlikti V.Į. Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centre.



1 diagrama. Glikozilinto hemoglobino rezultatų palyginimas su vidutine gliukozės koncentracija.



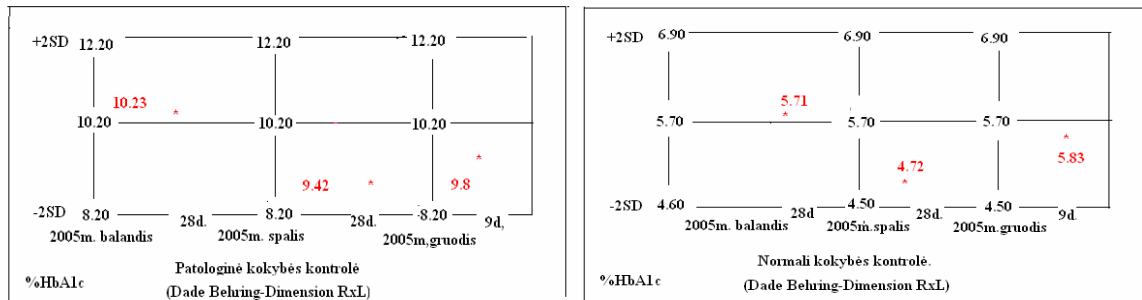
2 diagrama. Glikozilinto hemoglobino rezultatų palyginimas.

Analičių atliktų skirtingais analizatoriais rezultatai skiriasi (2 diagrama). Advia 1650 (Bayer) ir Dimension RxL (Dade Behring) analizatoriais tyrimai buvo atlikti per vieną dieną, todėl galimas sisteminis nuokrypis. Būtina atlikti matavimus ne vienoje matavimo serijoje, kad eliminuot sisteminius nuokrypius būdingus vienai dienai. Kad to išvengtume, kita dalis tyrimų buvo atlikta ne vieną dieną ir su kiekviena matavimo serija buvo atliekama vidaus kokybės kontrolė.

Rezultatų tikslumui įvertinti šalia mėginių naudojome kontrolinius serumus dviejų lygių (3 lentelė, 4 lentelė, 5 lentelė). Tai įrodo, kad neįvesta sisteminė paklaida, nes kontrolinio mėginio rezultatai gauti referentinėse ribose nėra aštuonių viena paskui kitą einančių reikšmių vienoje pusėje nuo aritmetinio vidurkio. Nėra keturių viena paskui kitą einančių reikšmių už $\pm 1S$ ribos, taip pat visos reikšmės yra žemesnės $\pm 2S$ ribos. Tai rodo, kad tyrimų rezultatai yra priimtini.

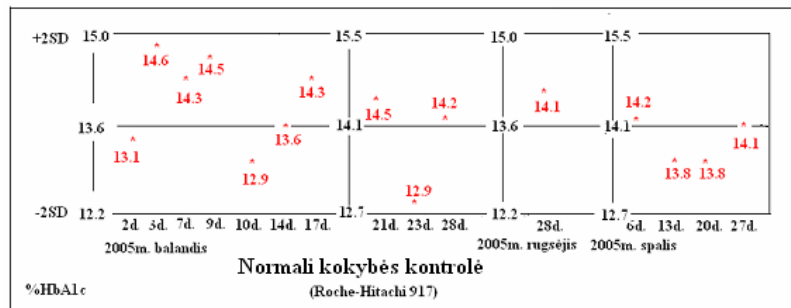
3 lentelė.

DADE diabeto normali ir patloginė kontrolė.

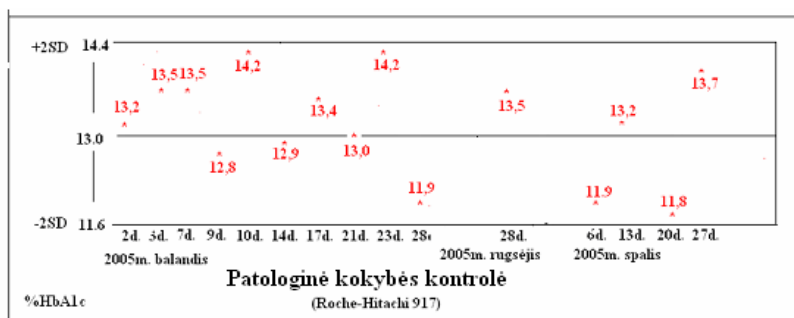


4 lentelė.

Precinorm HbA1c –normali kontrolė;

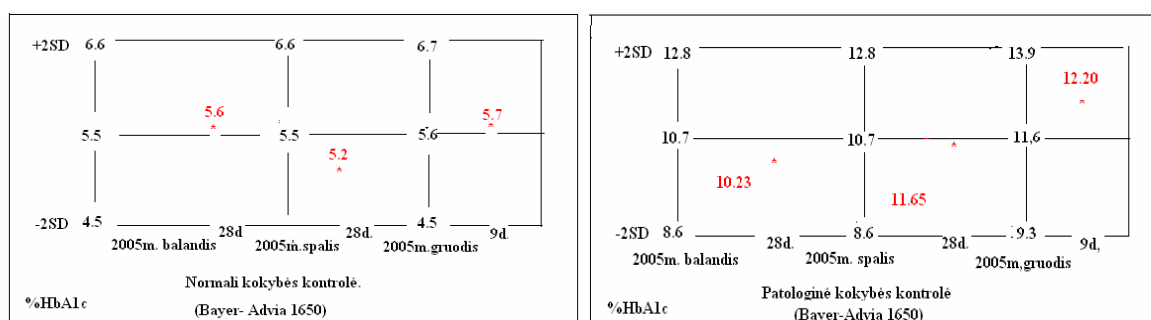


Precipath HbA1c – pataloginė kontrolė.
Gamintojas - ROCHE Diagnostics, Vokietija.



5 lentelė.

Bayer DCA 2000 Hemoglobino A1c normali ir pataloginė kontrolė



Atkuriamumas – kokybės kriterijus yra vertinamas pagal variacijos koeficientą, tai aritmetinio vidurkio ir vidutinio kvadratinio nuokrypio santykis. Pagal tai išaiškinamos atsitiktinės klaidos. Didžiausia leidžiama laboratorinių tyrimų paklaidų riba yra 10% [61]. Žemiau (6 lentelė) lentelėje pateikti visų mėginių variacijos koeficientai ir standartiniai nuokrypiai. Skaičiavimai atlikti naudojant kompiuterinę programą „Microsoft Office Excel 2003“.

Variacijos koeficientas apskaičiuojamas:

$$V = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% .$$

S – vidutinis kvadratinis nuokrypis;

\bar{X} - aritmetinis vidurkis [59].

Vidutinis kvadratinis nuokrypis parodo matavimo rezultato neapibrėžtį.

Apskaičiuojamas:

$$SD = \pm \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}} .$$

Σ - sumos ženklas; X – kasdieninio tyrimo rezultatas; n – atvejų skaičius; \bar{X} - aritmetinis vidurkis; ($\bar{X} - X$) – kiekvieno iš tyrimų nukrypimas nuo aritmetinio vidurkio [1].

Didžiausias nuokrypis nuo vidurkio gautas, Hitachi 917 analizatorium SD = ± 1,77, o variacijos koeficientas CV = 18.06 %. Lyginant rezultatus gautus analizatoriumi Hitachi 917 su Dimension RxL, kai n = 53, 12 rezultatų variacijos koeficientai yra mažesni Hitachi 917, o 31 didesni. Tuo tarpu Advia 1650 gauti variacijos koeficientai 7 mažesni už Hitachi 917, o už Dimension RxL analizatorium atliktus – 29.

6 lentelė.

Vidutinis kvadratinis nuokrypis ir variacijos koeficientas tarp skirtingų analizinių sistemų.

Kodas	X	SD	CV %	Rezultatai	X	SD	CV %	Rezultatai	X	SD	CV %	Rezultatai
060402001	6,6	0,14	2,1	3	6,29	0,08	1,3	2	7,5	0,11	0,52	3
060402002	6,2	0,12	1,94	3	5,86	0,04	0,68	2	6,76	0,07	0,98	3
060402003	13,6	0,57	4,19	3	11,36	0,25	2,2	2	13,76	0,37	2,67	3
060402004	7,1	0,19	2,68	3	6,21	0,01	0,13	2	7,4	0,04	0,55	3
060402005	10,67	0,09	0,88	3	11,69	0,2	1,7	2	13,15	0,08	0,59	3
060402006	7,17	0,17	2,37	3	6,47	0,05	0,8	2	7,56	0,07	0,9	3
060302007	6,9	0,08	1,18	3	6,54	0,05	0,78	2	7,79	0,05	0,58	3
060402008	8,9	0	0	3	8,89	0,1	1,13	2	10,97	0,2	1,79	3
060402009	12,77	0,78	6,14	3	12,72	0,3	2,36	2	14,97	0,09	0,6	3
060402010	5,13	0,37	7,18	3	5,79	0,06	1,11	2	6,66	0,08	1,14	3
060402011	8,2	0,1	1,22	3	7,67	0,15	1,97	2	9,34	0,04	0,38	3
060402012	8,1	0,16	2,02	3	7,79	0,06	0,82	2	9,28	0,09	1	3
060402013	9,87	0,54	5,51	3	9,45	0,25	2,65	2	11,51	0,08	0,68	3
060302014	11,37	0,54	4,78	3	11,79	0,45	3,83	2	13,5	0,11	0,84	3
060301015	11,7	0,22	1,85	3	11,58	0,15	1,32	2	13,55	0,35	2,57	3
060302016	9,7	0,14	1,46	3	9,23	0,25	2,72	2	11,5	0,11	0,97	3
060302017	6,5	0,08	1,26	3	6,52	0,1	1,56	2	7,88	0,04	0,51	3
060301018	7,03	0,17	2,42	3	7,05	0,05	0,71	2	8,47	0,06	0,67	3
060402019	6,23	0,05	0,76	3	6,72	0,02	0,3	2	8,13	0,06	0,74	3
060402020	6,5	0	0	3	6,63	0,05	0,81	2	8,02	0,04	0,5	3
060302021	11,07	1,23	11,09	3	10,91	0,3	2,75	2	12,46	0,21	1,72	3
060302022	6,13	0,05	0,77	3	6,34	0,05	0,8	2	7,53	0,08	1,11	3
060402023	10,33	0,21	1,99	3	11,34	0,07	0,57	2	12,31	0,13	1,02	3
060402024	5,47	0,21	3,76	3	5,4	0	0	2	6,07	0,04	0,59	3
060402025	7,1	0	0	3	7,89	0,1	1,27	2	8,82	0,1	1,13	3
060302026	11,37	0,54	4,78	3	11,11	0,3	2,7	2	13,13	0,08	0,59	3
060302027	5,93	0,26	4,43	3	5,7	0	0	2	6,67	0,04	0,56	3
060401028	8	0,14	1,77	3	7,81	0,01	0,13	2	9,67	0,11	1,18	3
060302029	6,73	0,12	1,85	3	6,69	0,01	0,15	2	8,37	0,14	1,72	3
060302030	8,73	0,09	1,08	3	8,76	0,05	0,58	2	10,47	0,04	0,35	3
060402031	9,3	1,07	11,48	3	8,25	0,05	0,61	2	10,03	0,05	0,49	3
060401032	8,77	0,17	1,94	3	8,56	0,15	1,76	2	10,56	0,08	0,72	3
060402033	12,47	0,57	4,6	3	11,92	0,35	2,95	2	13,76	0,11	0,81	3
060302034	8,77	0,33	3,76	3	8,73	0,35	4,02	2	10,76	0,07	0,65	3
060401035	8,5	0,22	2,54	3	8,46	0,05	0,6	2	10,17	0,16	1,61	3
060402036	6,97	0,05	0,68	3	6,75	0,15	2,22	2	7,89	0,09	1,18	3

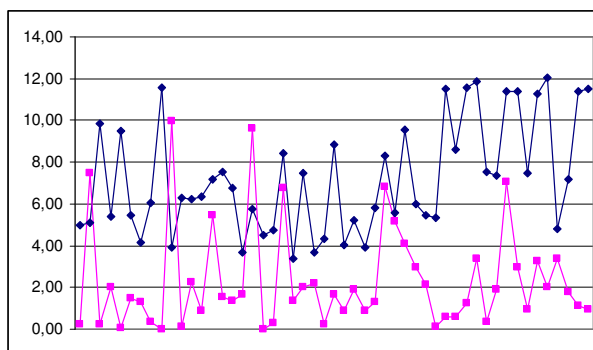
060402037	12,27	0,17	1,39	3	12,54	0,2	1,63	2	14,47	0,26	1,77	3
060401038	9,77	0,12	1,28	3	9,06	0,05	0,56	2	10,93	0,16	1,5	3
060402039	12	0,59	4,91	3	11,88	0,1	0,84	2	12,67	0,29	2,3	3
060302040	12,53	0,47	3,76	3	11,34	0,15	1,33	2	12,71	0,11	0,84	3
060402041	8,63	0,31	3,58	3	8,26	0,05	0,62	2	10,05	0,17	1,64	3
060402042	8,73	0,12	1,43	3	8,3	0	0	2	9,92	0,07	0,74	3
060402043	11,17	1,8	16,1	3	10,48	0,02	0,19	2	12,29	0,07	0,54	3
060302044	12,17	0,39	3,17	3	12,5	0,05	0,4	2	13,62	0,06	0,45	3
060402045	9	0,29	3,27	3	8,49	0,01	0,12	2	10,25	0,19	1,89	3
060402046	12,67	0,82	6,46	3	14,34	0,2	1,42	2	15,71	0,04	0,26	3
060401047	13,1	0,51	3,89	3	11,77	0,37	3,17	2	13,42	0,13	0,98	3
060402048	9,8	1,77	18,06	3	9,29	0,06	0,69	2	11,75	0,08	0,66	3
060402049	6,33	0,29	4,53	3	6,2	0,1	1,61	2	7,45	0,04	0,5	3
060402050	8,5	0,14	1,66	3	8,06	0,05	0,63	2	9,69	0,04	0,36	2
060402051	12,3	0,14	1,15	3	12,17	0,5	4,12	2	14,23	0,15	1,05	2
060402052	12,6	0,47	3,72	3	13,04	0,85	6,52	2	15,58	0,17	1,09	2
060302053	8,33	0,42	5,03	3	7,83	0,15	1,93	2	9,39	0,05	0,53	2

Roche-Hitachi 917 analizinės sistemos HbA1c metodus standartizuotas Tarptautinės klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacijos (IFCC) ir Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimų (DCCT), todėl šis metodas šiame darbe naudojamas kaip referentinis metodas. Dviguba standartizacija leidžia palyginti rezultatus atliktus ta pačia analizine sistema, bet skirtinga standartizacija. Naudojant IFCC standartizaciją rezultatai, kurie pateikti lentelėje, yra mažesni nei DCCT standartizacijos.

Bayer-Advia 1650 analizinės sistemos HbA1c metodus standartizuotas Nacionalinės glikohemoglobino standartizacijos programos (NGSP). Šio metodo rezultatus palyginus su mūsų referentinio metodo rezultatais gauname, kai HbA1c metodus standartizuotas pagal IFCC $r = 1.017$ [0.883 iki 1.188]; $y = 3.068$ [1.894 iki 4.142]; $N = 52$; $p = 0.0000001$. O kai standartizacija pagal DCCT $r = 1.132$ [1.060 iki 1.209]; $y = 0.282$ [-0.476 iki 0.990]; $N=53$; $p = 0.001$.

Dade Behring-Dimension RxL analizinės sistemos metodus standartizuotas pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimus (DCCT). Palyginus rezultatus su mūsų referentinio metodo rezultatais, tai Roche-Hitachi 917 HbA1c pagal IFCC – $r = 0.886$ [0.767 iki 1.021]; $y = 2.422$ [1.630 iki 3.413]; $N = 52$; $p = 0.0000001$. Diagramoje matyti, kad kuo mažesnė HbA1c koncentracija, tuo nuokrypis nuo IFCC standartizuoto metodo yra didesnis (14 pav.). Tai gali nulemti etalonų skirtumas. Roche-Hitachi 917 kalibruojamas su penkių lygių etalonais tai: I – 0,9% NaCl; II – 0,48 g/dl; III – 0,87 g/dl; IV – 1,58 g/dl; V – 2,33 g/dl; Hb – 14,5g/dl. Dade Behring-Dimension RxL kalibruojamas: - I - 0,9% NaCl; II - 0,48 g/dl; III - 0,89g/dl; Hb - 14,7g/dl; IV - 1,83g/dl; Hb - 14,5g/dl; V - 3,75g/dl. Šiuo atveju matome, kad etalonų koncentracija mažai skiriasi. Mažesnės koncentracijos rezultatams gali turėti įtakos analizatoriaus jutiklio jautrumas šviesos pasikeitimui. Reakcijos metu susidariusiu kompleksų dydis priklauso nuo molekulių skaičiaus, atstumas tarp molekulių taip pat keičiasi. Kuo

drumstesnis mėginys, tuo didesnė šviesos sugertis, bei sklaida. Kadangi mėginio drumstumas atvirkščiai proporcingas koncentracijai, tai kuo mažiau šviesos praeina, tuo koncentracija mažesnė. Todėl galima būtų manyti, kad analizatoriau foto jutiklis mažiau jautrus silpnesnei šviesai. Tam patvirtinti reikia išanalizuoti variacijos koeficientą priklausomai nuo koncentracijos. 7 lentelėje pateikti Hitachi 917 analizatoriaus rezultatai ir variacijos koeficientai, kai metodas standartizuotas pagal Tarptautinė klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federaciją, parodo, kad variacijos koeficiento dydis nepriklauso nuo koncentracijos (3 diagrama). Pvz. Kai hemoglobino A1c koncentracija 4,8% tai variacijos koeficientas 3,39%, o kai 11,88%, tai 3.36%.



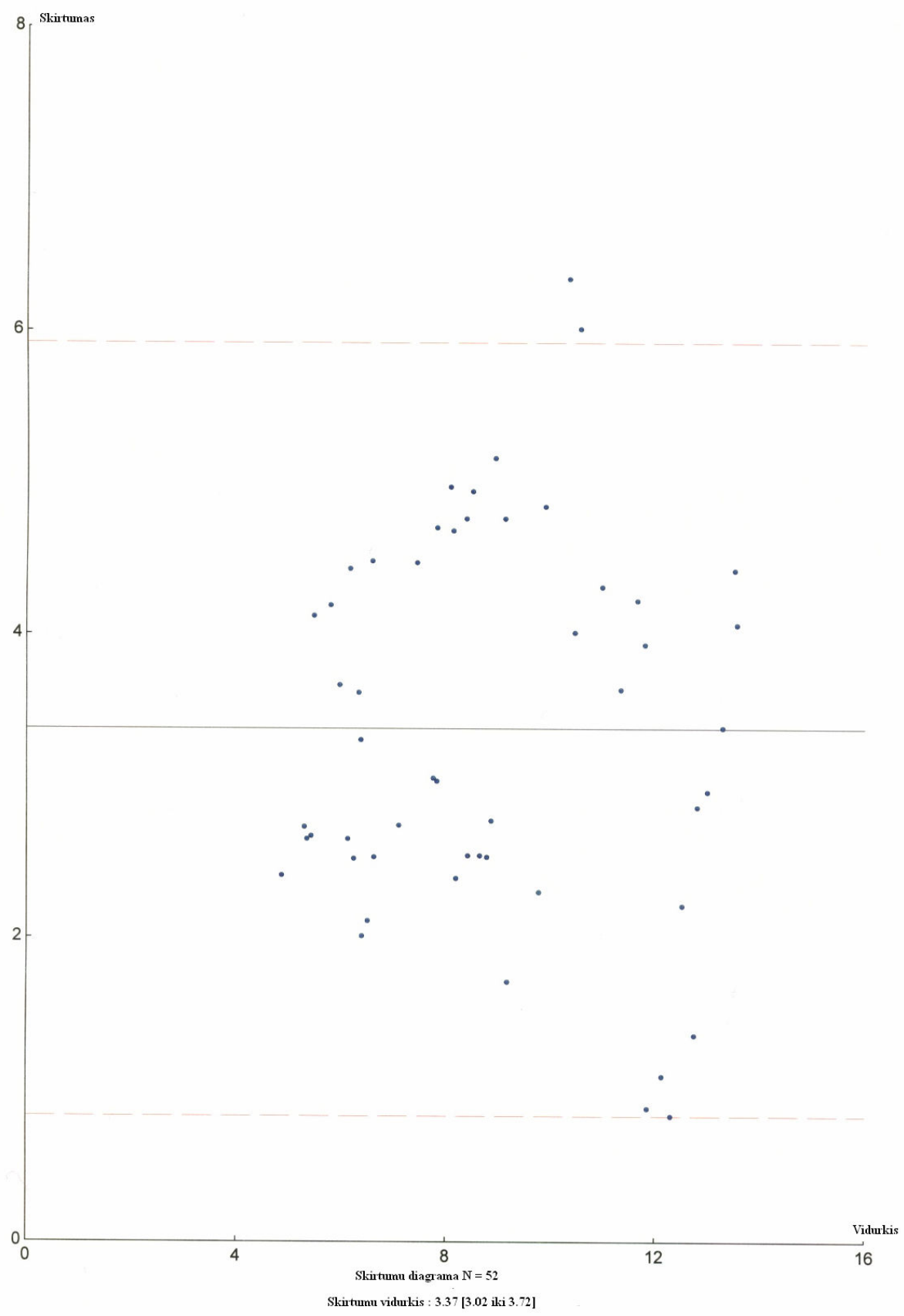
3 diagrama. HbA1c variacijos koeficiento priklausomybė nuo koncentracijos.

Palyginus Dade Behring-Dimension RxL analizinės sistemos rezultatus su Roche-Hitachi 917, standartizuotu pagal DCCT tai: $r = 0.987$ [0.920 iki 1.059]; $y = -0.086$ [-0.730 iki 0.446]; $N = 53$; $p = 0.001$. (13 pav.) matyti kad šių rezultatų atsikartojimas yra labai geras. Tai įrodo vienodos standartizacijos įtaką rezultatų tapatumui.

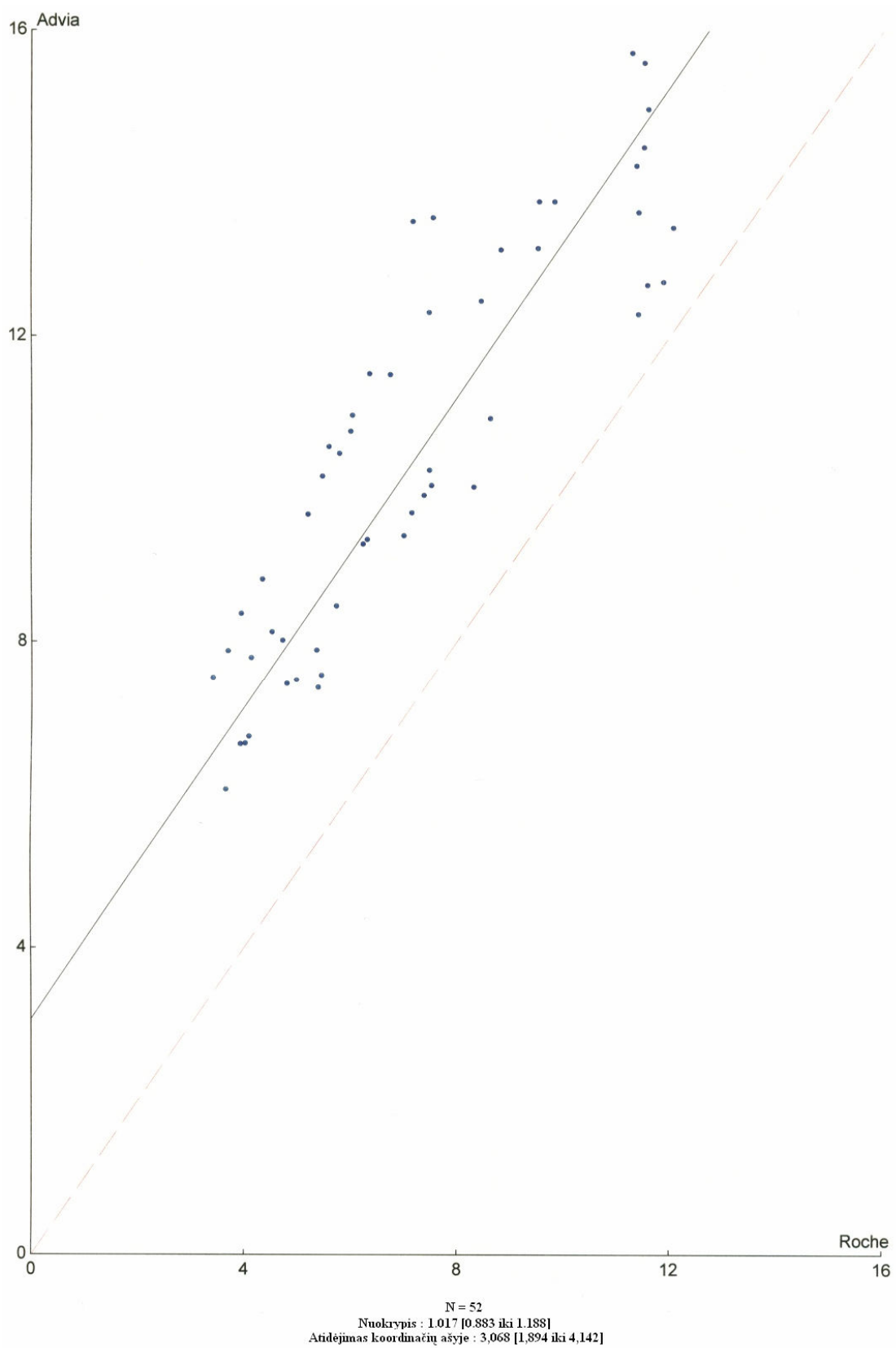
Didžiausias rezultatų skirtumų vidurkis gautas palyginus Hitachi 917 (metodas pagal IFCC) su Advia 1650 rezultatais 3,37 (8 pav.). Mažiausias vienodos standartizacijos metodu -0,178.

Tiek Hitachi 917 nepriklausomai nuo metodo standartizacijos, tiek Dimensoin RxL rezultatai yra akivaizdžiai mažesni, palyginus su Advia 1650 analizatoriaus rezultatais.

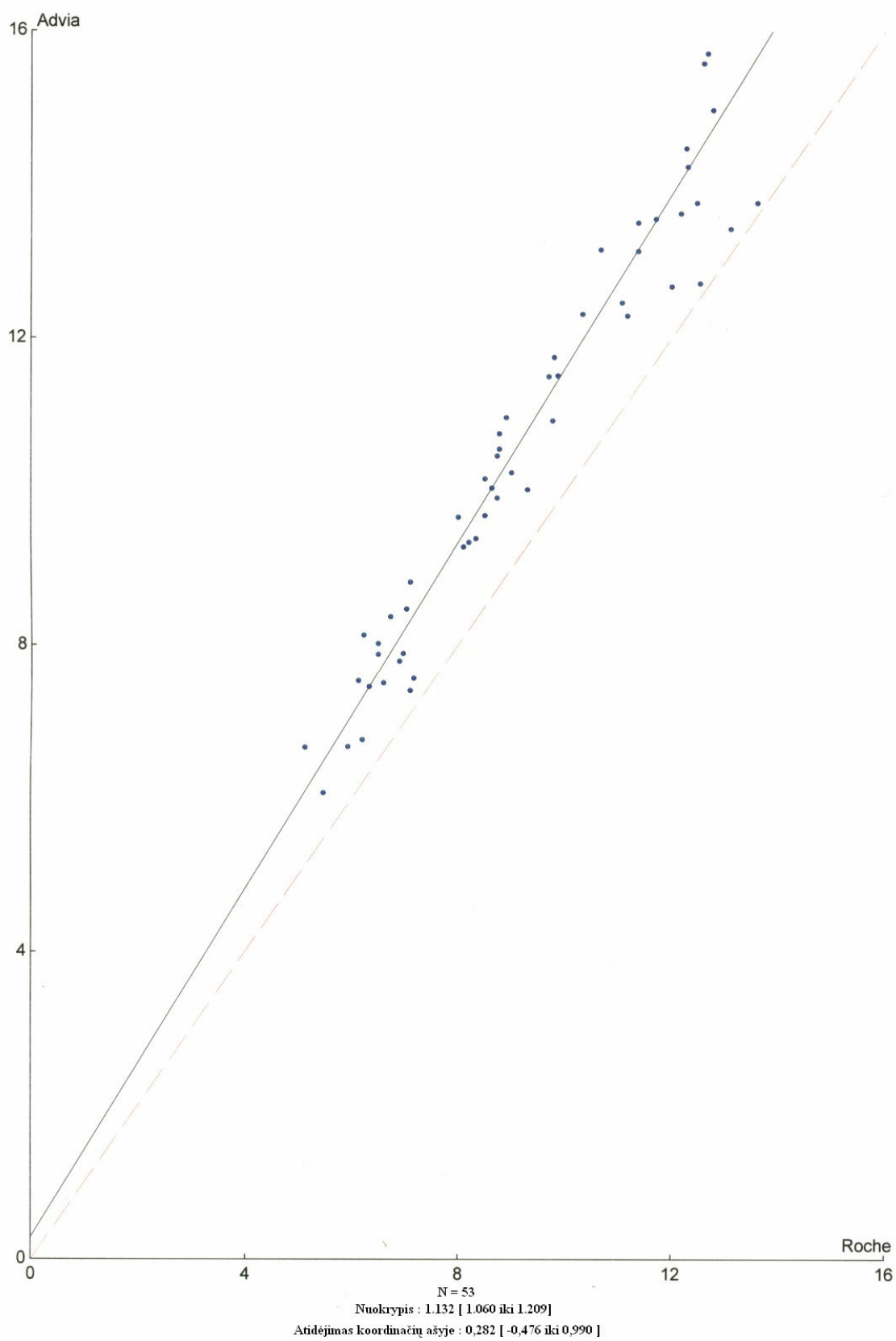
Statistiniai skaičiavimai buvo atliekami Stjudento t-testo, dispersinės analizės metodu (ANOVA), koreliacinės ir tiesinės regresijos analizės metodais. Apskaičiuoti skirtumų patikimumai. Dažniausiai naudojama „Michelin Guide“ skalė. Kai $p < 0,05$ (patikimas); $p < 0,01$ (labai patikimas); $p < 0,001$ (ekstremaliai patikimas). Rezultatų patikimumui būtina įvertinti p reikšmę [36]. Darbe gauti rezultatai laikomi labai patikimi, nes patikimumas ne didesnis kaip $p < 0,01$.



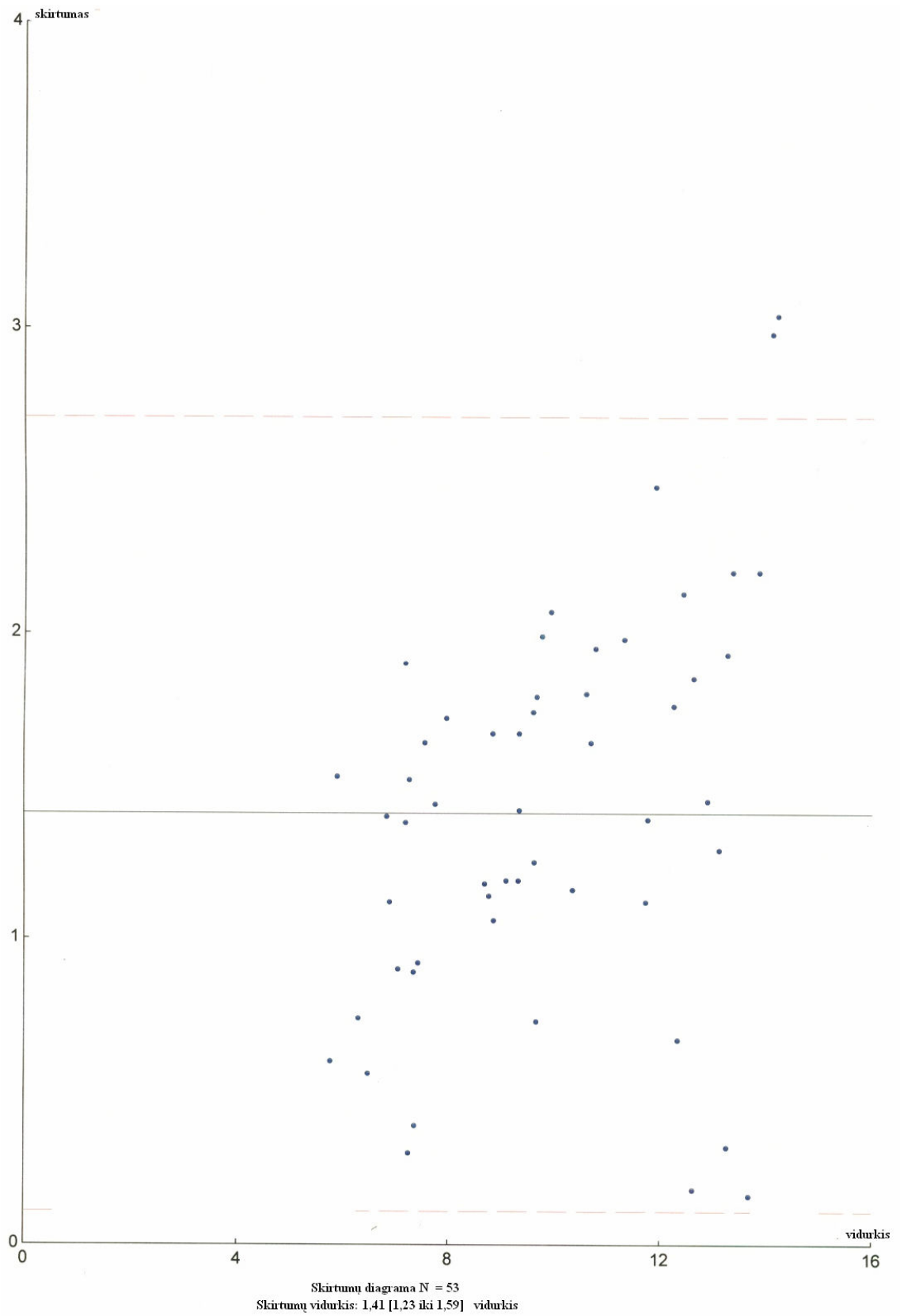
8 pav. Roche 917 analizatoriumi (IFCC) ir Advia 1650 analizatoriumi gautu rezultatų skirtumai.



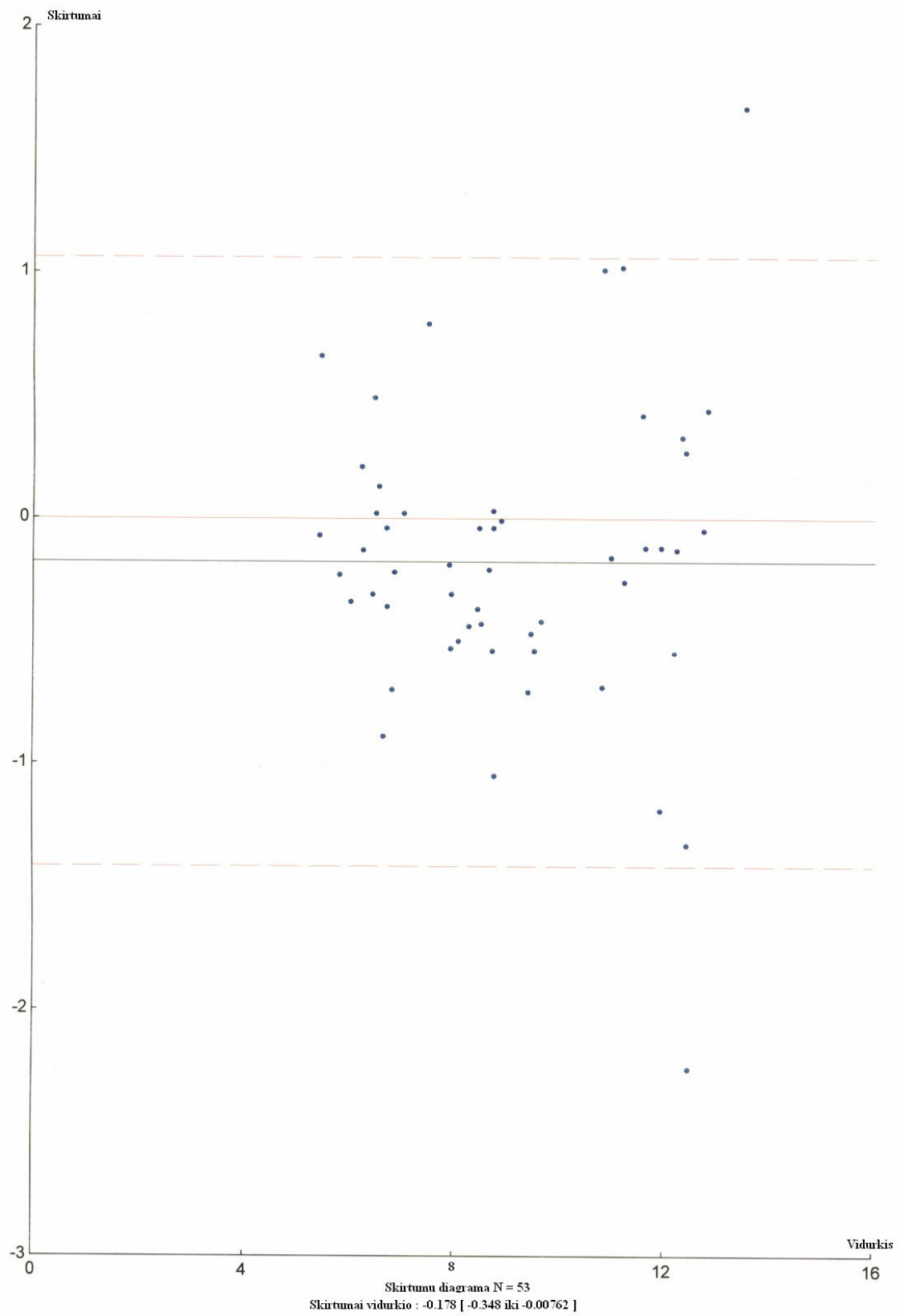
9 pav. IFCC standartizuoto metodo ir NGSP standartizuoto metodo rezultatų palyginimas.



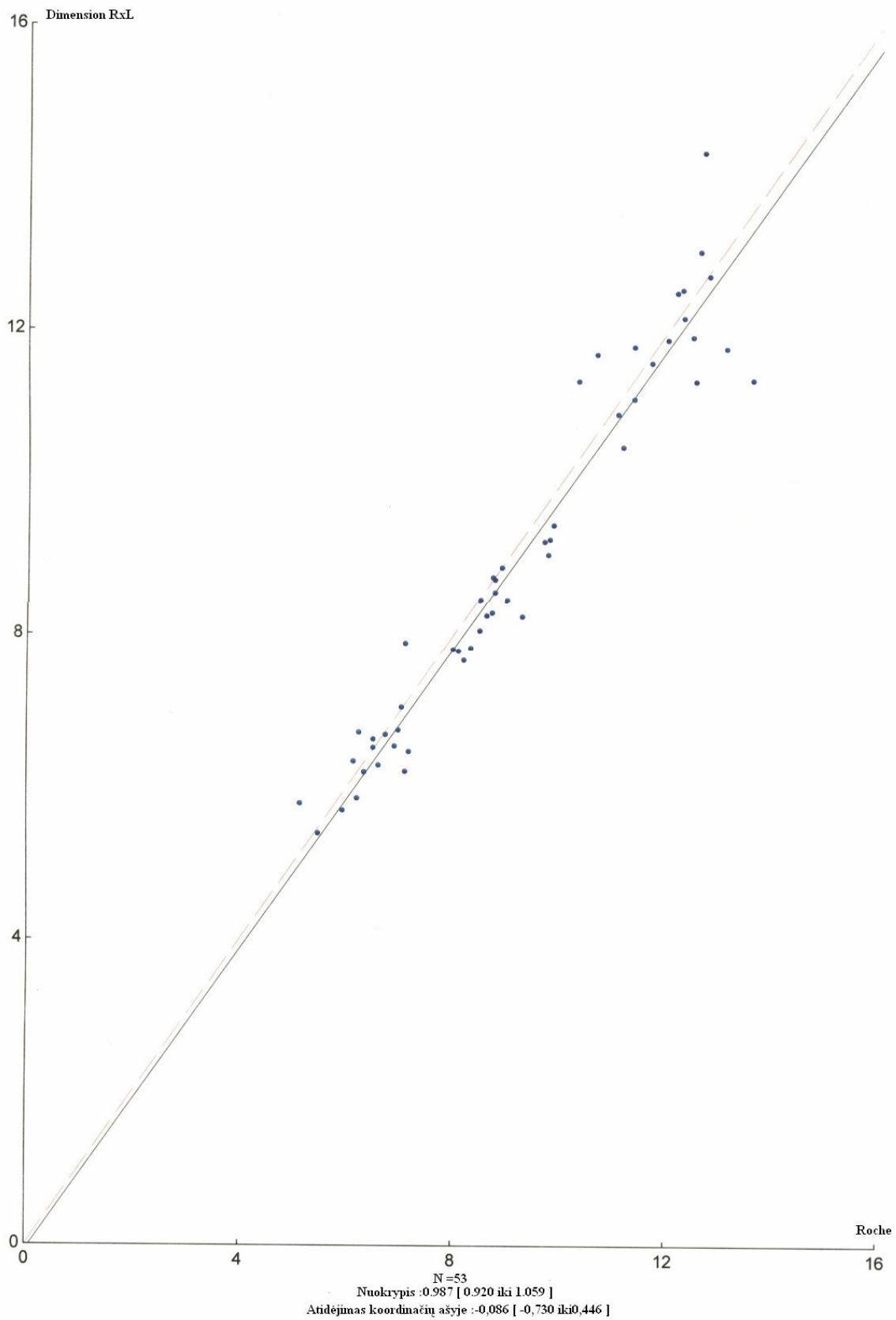
10 pav. DCCT standartizuoto metodo ir NGSP standartizuoto metodo rezultatų palyginimas.



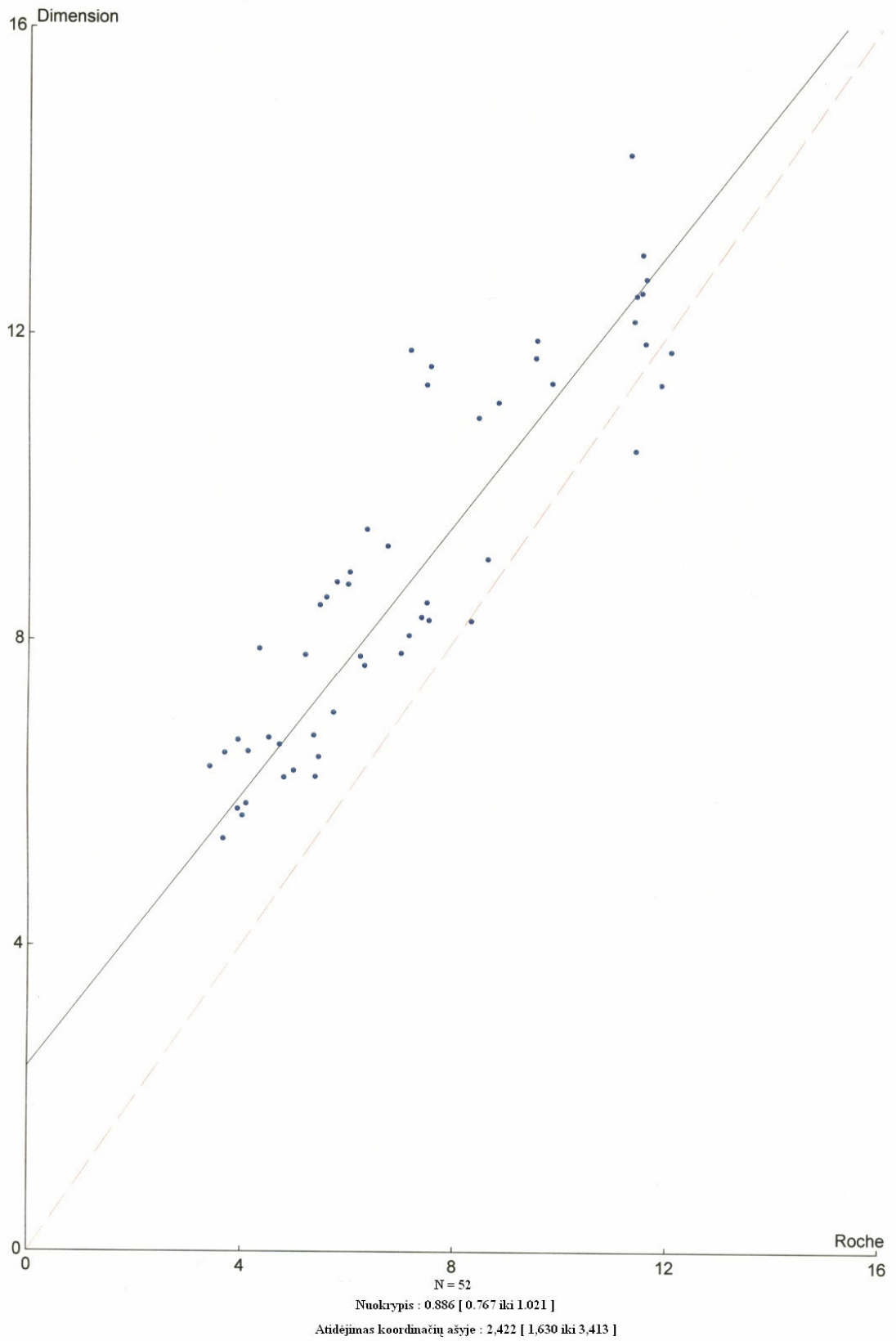
11 pav. Roche 917 analizatoriumi (DCCT) ir Advia 1650 analizatoriumi gautu rezultatų skirtumai.



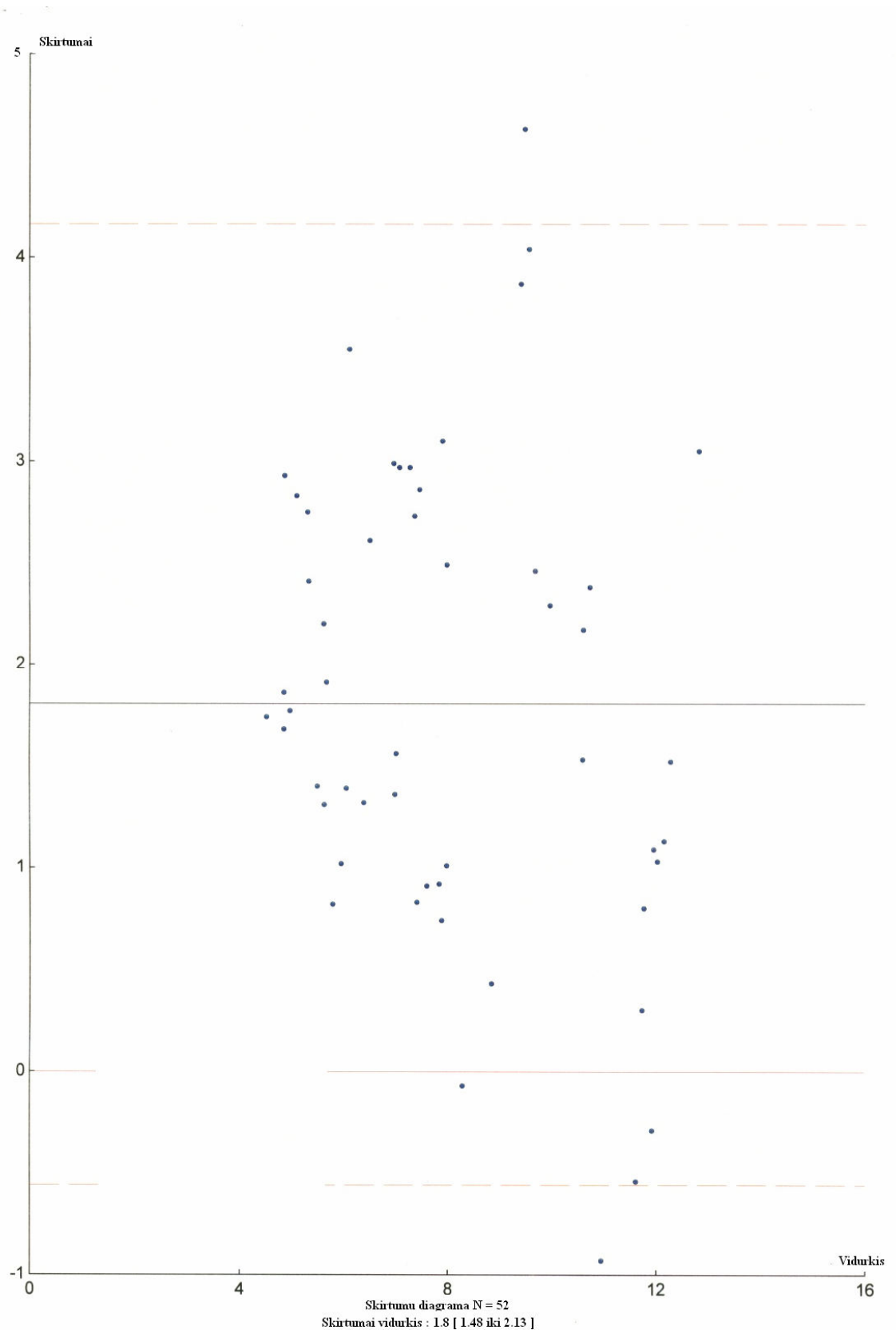
12 pav. Roche 917 analizatoriumi (DCCT) ir Dimension RxL analizatoriumi gautų rezultatų skirtumai.



13 pav. Vienos standartizacijos skirtingų analizinių sistemų rezultatų palyginimas (Roche-hitachi 917 ir Dade Behring-Dimension RxDL).



14 pav. DCCT standartizuoto metodo ir IFCC standartizuoto metodo rezultatų palyginimas



15 pav. Roche 917 analizatoriumi (kai metodas pagal IFCC) gautų rezultatų palyginimas su Dimension RxL (DCCT).

7 lentelė.

Tyrimų rezultatai, atliktų Hitachi 917 analizatoriumi, kai metodas standartizupotas pagal IFCC

Kodas	I	II	\bar{x}	SD	CV %
060402001	4.97	5	4.98	0.011	0.225
060402002	4.55	5.63	5.09	0.382	7.502
060402003	9.86	9.8	9.83	0.021	0.216
060402004	5.54	5.23	5.39	0.110	2.034
060402005	9.52	9.53	9.52	0.005	0.053
060402006	5.33	5.56	5.45	0.081	1.493
060302007	4.21	4.06	4.13	0.053	1.287
060402008	6.06	6	6.03	0.021	0.352
060402009	11.59	11.59	11.59	0.000	0.000
060402010	3.37	4.48	3.93	0.392	9.986
060402011	6.32	6.3	6.31	0.007	0.112
060402012	6.07	6	6.23	0.140	2.249
060402013	6.43	6.27	6.35	0.057	0.891
060302014	6.6	7.71	7.16	0.392	5.481
060301015	7.71	7.38	7.54	0.117	1.548
060302016	6.87	6.61	6.74	0.092	1.364
060302017	3.77	3.6	3.69	0.060	1.632
060301018	4.95	6.51	5.73	0.552	9.626
060402019	4.52	4.52	4.52	0.000	0.000
060402020	4.7	4.74	4.72	0.014	0.300
060302021	7.64	9.25	8.45	0.569	6.736
060302022	3.47	3.34	3.41	0.046	1.352
060402023	7.69	7.26	7.47	0.152	2.036
060402024	3.78	3.55	3.66	0.081	2.224
060402025	4.33	4.36	4.34	0.011	0.258
060302026	8.62	9.03	8.82	0.145	1.644
060302027	4.07	3.97	4.02	0.035	0.879
060401028	5.06	5.34	5.2	0.099	1.904
060302029	3.89	3.99	3.94	0.035	0.897
060302030	5.89	5.68	5.79	0.074	1.284
060402031	9.13	7.52	8.32	0.569	6.842
060401032	5.18	6	5.59	0.290	5.186
060402033	8.99	10.09	9.54	0.389	4.077
060302034	5.75	6.25	6	0.177	2.946
060401035	5.31	5.64	5.47	0.117	2.134
060402036	5.37	5.35	5.36	0.007	0.132
060402037	11.64	11.51	11.51	0.065	0.565
060401038	8.7	8.55	8.63	0.053	0.616
060402039	11.38	11.79	11.58	0.145	1.252
060302040	12.44	11.31	11.88	0.400	3.363
060402041	7.48	7.55	7.52	0.025	0.332
060402042	7.57	7.18	7.38	0.138	1.869
060402043	12.55	10.27	11.41	0.806	7.065
060302044	10.93	11.89	11.41	0.339	2.975
060402045	7.38	7.58	7.48	0.071	0.945
060402046	11.81	10.77	11.29	0.368	3.257
060401047	11.57	12.06	12.06	0.245	2.032
060402049	5.03	4.57	4.8	0.163	3.388
060402050	6.97	7.33	7.15	0.127	1.780
060402051	11.55	11.18	11.37	0.131	1.151
060402052	11.36	11.67	11.52	0.110	0.952

IŠVADOS

1. Ištyrus HbA1c trimis analizinėmis sistemomis gauti statistiškai patikimi rezultatų skirtumai ($p < 0,01$):
 - 1.1. Roche-Hitachi 917 HbA1c (IFCC) ir Dade Behring-Dimension RxL (DCCT) – $r = 0.886$ [0.767 iki 1.021]; $y = 2.422$ [1.630 iki 3.413]; $N = 52$;
 - 1.2. Roche-Hitachi 917 HbA1c (IFCC) ir Bayer-Advia 1650 (NGSP) $r = 1.017$ [0.883 iki 1.188]; $y = 3.068$ [1.894 iki 4.142]; $N = 52$;
 - 1.3. Roche-Hitachi 917 HbA1c (DCCT) ir Bayer-Advia 1650 (NGSP) $r = 1.132$ [1.060 iki 1.209]; $y = 0.282$ [-0.476 iki 0.990]; $N = 53$;
 - 1.4. Roche-Hitachi 917 HbA1c (DCCT) ir Dade Behring-Dimension RxL (DCCT) tai: $r = 0.987$ [0.920 iki 1.059]; $y = -0.086$ [-0.730 iki 0.446]; $N = 53$.
2. Gautus skirtumus nulemia skirtinga standartizacija:
 - 2.1. Roche-Hitachi 917 standartizuota pagal Tarptautinę klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federaciją ir Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimą;
 - 2.2. Bayer-Advia 1650 standartizuota pagal Nacionalinės glikohemoglobino standartizacijos programą;
 - 2.3. Dade Behring-Dimension RxL standartizuota pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimą.

Perskaičiusius Roche-Hitachi 917 IFCC standartizuotus rezultatus į DCCT standartizuotus rezultatus, jie sutampa su Dade Behring-Dimension RxL DCCT standartizuotais rezultatais nes $y = -0,086$.
3. Palyginus gautus rezultatus su vidutine gliukozės koncentracija:
 - 3.1. Roche-Hitachi 917 (IFCC) – $r = 0.26$, $N = 50$;
 - 3.2. Roche-Hitachi 917 (DCCT) – $r = 0.52$, $N = 50$;
 - 3.3. Bayer-Advia1650 (NGSP) – $r = 0.48$, $N = 50$;
 - 3.4. Dade Behring-Dimension RxL (DCCT) – $r = 0.48$, $N = 50$.
 - 3.5. Geriausia koreliacija su Roche-Hitachi 917, kai metodas standartizuotas pagal Diabeto kontrolės ir komplikacijų tyrimą (DCCT).

Diana Žilytė

METHODOLOGICAL ANALYSIS OF DIABETUS MELLITUS OF MONITORING LABORATORY INDICATORS

SUMMARY

There are many organisations trying to improve Diabetes Mellitus diagnostics, enhance glycaemia management of diabetes patients, because insufficient and late diagnosis increases formation, and complications progress. The purpose of this work was evolution of influence, of different methodological approaches to of glycosylated hemoglobin results. Samples of 100 patients with Diabetes Mellitus was analyzed for glucose and HbA1c. There was shown correlation between average concentration glucose's during three months coefficient. HbA1c was analyzed using three analytical systems of Roche-Hitachi 917, Bayer-Advia1650 and Dade Behring-Dimension RxL standardized according different standardization recommendations: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Roche-Hitachi 917 results standardized according IFCC recommendations were chosen as reference. Correlation and differences between analytical systems were as follows.

Roche-Hitachi 917 (IFCC) – Bayer-Advia1650 (NGSP):

$r = 1.017$ [0.883 to 1.188]; $y = 3.068$ [1.894 to 4.142]; $n = 52$; $p = 0.0000001$.

Roche-Hitachi 917 (DCCT) – Bayer-Advia1650 (NGSP):

$r = 1.132$ [1.060 to 1.209]; $y = 0.282$ [-0.476 to 0.990]; $n = 53$; $p = 0.001$.

Roche-Hitachi 917 (IFCC) – Dade Behring-Dimension RxL (DCCT):

0.886 [0.767 to 1.021]; $y = 2.422$ [1.630 to 3.413]; $n = 52$; $p = 0.0000001$.

Roche-Hitachi 917 (DCCT) – Dade Behring-Dimension RxL (DCCT):

$r = 0.987$ [0.920 to 1.059]; $y = -0.086$ [-0.730 to 0.446]; $n = 53$; $p = 0.001$.

Meanwhile results of two analytical systems (Roche-Hitachi 917, Dade Behring-Dimension RxL) standardized according same recommendation Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) were on good agreement.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraitienė G., Gediminaitė P. Klinikinių biocheminių tyrimų laboratorinė technika ir kokybės kontrolė. 1993; 107-120.
2. Basaria S., Link between diabetes and osteoporosis. //Diabetes Care.2000-23.P.564
3. Bortaid C., The human genome project: impact on diabetes management and research. //Medicographia. Vol 26, 1,2004. P.91-96.
4. Bradley J, and Cluskey Jim MC. Clinical imunology. 2000; 148-149.
5. Bry L, Chen PC, and Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clinical Chemistry 2001; 47:153-163.
6. Brunnekreeft JW, Eindhoven HH. Improved rapid procedure for simultaneous determinations of hemoglobins A1a, A1b, A1c, F, C, and S, with indication for acetylation or carbamylation by cation – exchange liquid chromatography. Clin Chem 1999 Dec; 39(12):2514-8.
7. Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, and Gallop PM: The biosynthesis of human A1c. Slow glycosyla hemoglobin in vivo. J Cin Invest. 1976, 57(6):1652-1659.
8. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of proteins: relevance to diabetes. Am J Med 1981; 70:331-38,12,
9. Chang J, Hoke C, Ettinger B, Penerian G. Evaluation and interference study of hemoglobin A1c measured by turbidimetric inhibition immunoassay. Am J Clin Pathol. 1998; 109(3):274-8.
10. Chen D, Crimmins DL, Fu Hsu F, Lindberg FP, and Scott MG. Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1c in an automated ion – exchange HPLC method.Clinical Chemistry 1998; 44:1296-1301.
11. Classroom C: Biology 442 – Human genetics. Lecture Syllabus – Spring 2006.
12. Colman PG, Goodall GI, Garcia-Webb P, Williams PF, and Dunlop ME. Glycohaemoglobin: a crucial measurement in modern diabetes management Progress towards standardisation and improved precision of measurement. MJA1997,167: 96-98.
13. Dezii Ch.M., Effects of once-daily and twice-daily dosing on adherence with prescribed glipizide oral therapy for type 2 diabetes. //South Med J.2002; 95, P.68-71
14. Donaghue K.C., King J., Fung A.Y.W.,The effects of prepubertal diabetes duration on diabetes.//Diabetes Care.1997-20, P. 77-80
15. Doruk H, Mas MR, Ateşkan Ü, Turan Isik A, Sağlam M, Kutlu M. The relationship between age and carotid artery intima – thickness, hemoglobin A1c in nondiabetic, healthy

- geriatric population. Archives of gerontology and geriatrics. 2005 september; volume 41, issue 2, pages 113-119.
16. Frank EL, Moulton L, Little RR, Wiedmeyer HM, Rohlfing C, and Roberts WL. Effects of hemoglobin C and S traits on seven glycohemoglobin methods. Clinical Chemistry. 2000; 46:864-867.
 17. Friess U, Beck A, Kohne E, Lehmann R, Koch S, Haring HU, Schmuelling RM, and Schleicher E. Novel hemoglobin variant [β 66(E10) Lys→Asn], with decreased oxygen affinity, causes falsely low hemoglobin A1c values by HPLC. Clinical Chemistry 2003; 49:1412-1415.
 18. Goldstein D. Glycated proteins. University of Missouri Columbia, MO.
 19. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM and Sacks DB: Tests of glycemia in diabetes. Diabetes care 2004, 27: 1761-1773.
 20. Groche D, Hoeno W, Hoss G, Vogt B, Herrmann Z, Witzigmann A. Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. Clin Lab. 2003; 49(11-12):657-61.
 21. Harrison L.C., Schmidli R.S., Petrovsky N., Honeyman M.C., Insulin – dependent diabetes. //Clinical immunology. 2003, P.147-153.
 22. Hassan Y, Johnson B, Nader N, Gannon MC, Nuttall FQ. The relationship between 24-hour integrated glucose concentrations and % glycohemoglobin. J Lab Clin Med. 2006 Jan; 147(1):5-6.
 23. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method – comparison study. Clin Chem 2004; 50:166-174.
 24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose>
 25. <http://www.ex.ac.uk/diabetesgenes/index.htm>
 26. <http://www.ex.ac.uk/diabetesgenes/mody/gliukokinase.htm>
 27. <http://www.hosprract.com/issues/2000/11/eldvlas.htm>
 28. <http://www2.uah.es/bioquimica/f-bcpmh/practics/diabetes.htm>
 29. Inzucchi S.E., II tipo cukrinio diabeto gydymas peroraliniais glikemija mažinančiais vaistais. //Diabeto panorama. 2005-16; P.8,9
 30. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M and Weykamp C: Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. 2002/1.
 31. Klimašauskiene A., Diabetinė neuropatija. 2005.

32. Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W and Miedema K: Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping.
33. Logue FC, Goldstein DE, Wilson DH, Weykamp CW, Braconnier F, Blouquit Y, Gillery P, Grand C, Buño A, Bürgi W, Caenaro G, Stolba P. Glycated hemoglobin for the management of the diabetes patient. ABBOTT diagnostics educational serces.
34. Matulevičius V., Žilaitienė B., Petrauskienė V., Petrauskas A., Rezistentiškumo insulinui tyrimai nutukusioms moterims. //Lietuvos endokrinologija. 2001-9t.-1,2. P.35-37
35. Miedema Kor: Standardization of HbA1c and optimal range of monitoring. Scand J Clin Invest (suppl 240): 61-72.
36. Motulsky H, M.D. Intuitive biostatistics. 1995; 165 – 179.
37. Musneckiene J., Kazanavičius G., CD kompensacijos kriterijų: gliukuoto hemoglobino, gliukozės kraujo plazmoje nevalgius ir po valgio, cholesterolio, didelio tankio lipoproteidų, mažo tankio lipoproteidų, trigliceridų pokyčiai ir c peptido nevalgius, c peptido po valgio kiekio pokyčiai gydant lėtos rezorpcijos glipizidu. //Lietuvos endokrinologija. 2002-10t.-3,4. P.212-217.
38. Nabel E, Shum L, Pompili V, Yang Z-Y, San H, Shu H, Liptay S, Gold L, Gordon D, Dernynck R., Direct transfero of transforming growth factor b1 gene info arteries stimulaties fibrocellufar hyperplasia. Proc Natl Acad USA 1993.
39. Newkirk M.M., Goldbach-Mansky R.Lee J.,Hoxworth J.,McCoy A.,Yarboro C.,Klippel J.,El-Gabalawy H.S.,Advanced glycation end product (AGE)-damaged IgG and IgM antibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. 2004.
40. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000; 404:787-790.
41. Norkus A., Cukrinio diabeto klasifikacija ir diagnostika. Kaunas, 2000; P.10-11.
42. NovoMix 30 FlexPen informacinis lapelis.
43. Pasaulio sveikatos organizacija. Cukrinio diabeto ir jo komplikacijų apibrėžimas, diagnozavimas ir klasifikacija. //Diabeto panorama.2003-13. P.18-23.
44. Penttilä M, Halonen T, Punnonen K, Tiikkainen U. Best use of the recommended IFCC reference method, material and values in HbA1c analyses. Scand / Clin Lab Invest 2005; 65: 453-462.
45. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, and Peterson CM. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clinical Chemistry, 1998; 44: 1951-1958.

46. Ragnar Hanas. Psychological impact of changing the scale of reported HbA1c results affects metabolic control. *Diabetes Care*, 2002; 25:2110-2111.
47. Rahbar S., The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute. USA. 2004.
48. Raškauskienė D., Centrinis nutukimas – II tipo diabeto rizikos faktorius. //Lietuvos endokrinologija. 1998-5t.-1, 2. P.102-104.
49. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin chem* 2002; 48 ;436-472.
50. Sacks DB, for the ADA/EASD/IDF working group of the HbA1c assay: Global harmonization of hemoglobin A1c. *Clinical chemistry*. 2005;51: 681-683.
51. Sacks DB. Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: problem solved? *Clinical Chemistry* 2003; 49: 1245-1247.
52. Sapin R. Insuline assays - when and how should they be performed. //CLI June2001; P.6-8.
53. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D: Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91:2155-2168.
54. Standardisation of glycated hemoglobin. *BMJ* 2004; 329: 119-1197 (20 November), doi: 10.1136/bmj.329.7476.1196.
55. Steven Vik. A mini-review – glycation protein cross-linking. *Biochemistry Mike Cooper*; 2001 November.
56. Šulcaitė R., II tipo cukrinis diabetas, 2002; P.17-18;74,79
57. Visockienė Ž. Cukrinis diabetas – multifaktorinis sindromas. Patogenezės ir kontrolės aspektai. 2006.
58. William H, Wong, PhD. Hemoglobin A1c and glycated hemoglobins. 1999 Dec.
59. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL: Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994; 43:1122-1129.
60. Zabulienė L. Cukrinis diabetas ir insulino analogai „Diabeto programa“ Nr.3 2003m. 38psl.
61. Zaleckis G., Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas, 2002; 83psl.