

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



BREDA KLADNIK

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE**

**PRIMERJAVA KROMATOGRFSKE IN IMUNOKEMIJSKE
METODE ZA DOLOČANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA V
KRVI PRI BOLNIKI S SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 2**

**COMPARISON OF CHROMATOGRAPHIC AND IMMUNOCHEMICAL METHOD FOR
DETERMINING GLYCATED HEMOGLOBIN IN BLOOD IN PATIENTS WITH TYPE 2
DIABETES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala, v Diagnostičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Slovenj Gradec.

ZAHVALA

Za pripravljenost, strokovno pomoč in dobro voljo pri izdelavi diplomske naloge, se zahvaljujem mentorju prof.dr. Jošku Osredkarju, mag.farm.,spec. med. biokem in somentorici Tanji Lađić, spec.med.biokem. Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem, vsem sodelavcem Diagnostičnega laboratorija Splošne bolnišnice Slovenj Gradec.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, ki mi je omogočila študij in za vso njihovo moralno podporo pri študiju in diplomi. Zahvalila bi se tudi, svojima dvema prijateljicama Klavdiji Krivec in Mirjani Hrnjak za vso podporo pri študiju in diplomi.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joško Osredkarja, mag. farm., spec.med.biokem in somentorstvom Tanje Lađić, spec. med. biokem.

Breda Kladnik

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije : izr.prof.dr. Vojko Kmetec

Član: doc. dr. Nataša Karas Kuželički

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK

KAZALO PREGLEDNIC

POVZETEK

ABSTRACT

SEZNAM OKRAJŠAV

1. UVOD.....	1
1.1. HEMOGLOBIN.....	1
1.2. GLIKIRANI HEMOGLOBIN.....	2
1.2.1. Reakcija glikiranega hemoglobina.....	2
1.2.2. Vrste glikiranega hemoglobina.....	3
1.3. SLADKORNA BOLEZEN.....	4
1.3.1. Insulin.....	5
1.3.1.1. Vzroki za pomanjkljivo delovanje insulina.....	6
1.3.2. Tipični znaki sladkorne bolezni.....	6
1.3.3 .Klasifikacija sladkorne bolezni.....	6
1.3.4. Sladkorna bolezen tipa1.....	7
1.3.5. Sladkorna bolezen tipa 2.....	7
1.3.6. Nosečnostna sladkorna bolezen.....	7
1.3.7. Ostali specifični tipi sladkorne bolezni.....	7
1.3.8. Zapleti sladkorne bolezni.....	8

1.3.8.1. Akutni zapleti sladkorne bolezni.....	8
1.3.8.2. Kronični zapleti sladkorne bolezni.....	9
1.3.9. Vrednosti koncentracije sladkorja v krvi.....	9
1.3.10. Določanje sladkorne bolezni.....	9
1.4. METODE ZA DOLOČANJE GLUKOZE.....	10
1.4.1. Metoda s heksokinazo.....	10
1.4.2. Metoda z glukoza-oksido.....	11
1.4.3. Različica s polarografijo.....	11
1.4.4. Oralno glukozni tolerančni test-(OGTT).....	12
1.4.4.1. Enostopenjski (OGTT-oralno glukozni tolerančni test).....	13
1.4.4.2. Dvostopenjski (OGTT-oralno glukozni tolerančni test).....	13
1.5. GLIKIRANI HEMOGLOBIN V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI.....	14
1.6. METODE ZA DOLOČANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA.....	15
1.6.1. Ionsko-izmenjevalna kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	15
1.6.2. Afinitetna kromatografija.....	16
1.6.3. Imuno-turbidimetrična metoda.....	16
1.7. REFERENČNE METODE ZA DOLOČANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA.....	17
1.8. INTERFERENCE PRI DOLOČANJU GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA....	18
2. NAMEN DELA.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DEL.....	20
3.1. VZORCI.....	20

3.2. REAGENTI.....	21
3.2.1. Analizator Primus PDQ.....	21
3.2.2. Analizator Cobas C311.....	21
3.3. OPREMA.....	22
3.4. POSTOPKI.....	22
3.4.1. Analizator Primus PDQ.....	22
3.4.2. Analizator Cobas C 311.....	23
3.4.3. Statistična obdelava podatkov.....	24
4. REZULTATI.....	24
4.1. OBMOČJE NORMALNIH VREDNOSTI.....	25
4.2. REZULTATI GLEDE NA SLADKORNO BOLEZEN.....	26
4.3. STATISTIČNE VREDNOSTI.....	27
4.4. REGRESIJSKI PREMICI.....	28
5. RAZPRAVA.....	29
6. SKLEP.....	32
7. LITERATURA.....	34
PRILOGA.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekula hemoglobina.....	1
Slika 2: Reakcija nastanka glikiranega hemoglobina.....	2
Slika 3: Glikirani hemoglobin.....	3
Slika 4: Graf; Razporeditev po spolu udeleženi v študiji.....	20
Slika 5: Graf; Število vzorcev v posamezni starostni skupini.....	20
Slika 6: Analizator Primus PDQ.....	22
Slika 7: Analizator Cobas C 311.....	22
Slika 8: Graf; Primerjava rezultatov dobljenih na analizatorju Cobas in Primus....	24
Slika 9: Graf; Podatki normalnih vrednosti.....	25
Slika 10: Graf; Regresijski premici obeh analizatorjev.....	28

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Kriteriji za interpretacijo oralno glukoznega tolerančnega testa....	12
Preglednica II: Kriteriji za potrditev nosečnostne sladkorne bolezni.....	13
Preglednica III: Statistične vrednosti posameznega analizatorja.....	27

POVZETEK

V diplomskem delu smo najprej opisali, pomen hemoglobina, glikiranega hemoglobina in sladkorne bolezni. Nato smo predstavili metode za določanje glukoze in glikiranega hemoglobina. V razpravi diplomske naloge smo opisali standardizacijo glikiranega hemoglobina.

Namen diplomske naloge je bil, da ugotovimo, ali imunološka metoda na analizatorju COBAS C311 daje primerljive rezultate glede na kromatografsko metodo na PRIMUS PDQ. V primerjavo smo vključili 100 bolnikov, ki se zdravijo v Diabetološki ambulanti Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Bolnikom smo vzeli kri in določili glikirani hemoglobin.

V okviru naloge smo izračunali korelacijski koeficient, ki je ($r=0,979869$). To pomeni dobro povezanost podatkov meritev med analizatorjem Primus PDQ in Cobas C311. Izvedli smo tudi t-test, kjer znaša statistična pomembnost 0,02, kar pomeni, da se srednja vrednost rezultatov statistično pomembno razlikuje. Glede na območje priporočenih vrednosti posamezne metode smo ugotovili naslednje: kromatografska afinitetna metoda ima območje referenčnih vrednosti od 4,2-6,4%. Tisti vzorci, ki so bili izmerjeni na analizatorju Primus PDQ in so imeli višje vrednosti od 6,4%, so bili izven območja referenčnih vrednosti. Teh je bilo 74, kar pomeni, da ti sladkorni bolniki nimajo urejene sladkorne bolezni.

Imunska metoda ima območje referenčnih vrednostih od 4,8-5,9%. Tisti vzorci, ki so bili izmerjeni na analizatorju Cobas C311 in so imeli višje vrednosti od 5,9%, so bili izven območja referenčnih vrednosti. Teh je bilo 79, kar pomeni da ti bolniki nimajo urejene sladkorne bolezni. V območju priporočenih vrednostih je bilo 25 vzorcev po metodi afinitetne kromatografije in 21 vzorcev po imuno metodi. To pomeni, da imajo ti bolniki urejeno sladkorno bolezen.

Pri določanju odstotka glikiranega hemoglobina afinitetna kromatografija ne interferira z ostalimi vrstami hemoglobina, medtem ko imunska metoda interferira z ostalimi vrstami hemoglobina, kar pomeni, da lahko določimo lažno zvišane vrednosti odstotka glikiranega hemoglobina.

ABSTRACT

In the graduation thesis we first described the meanings of hemoglobin, glycated hemoglobin and diabetes. Then we presented the methods for determining glucose and glycated hemoglobin. In the debate of the thesis we described the standardization of glycated hemoglobin.

The aim of the graduation thesis was to determine whether immunological method on analyzer COBAS C311 provides comparable results to those determined by the chromatographic method on PRIMUS PDQ. Into the comparison we included 100 patients, which are being treated at the Diabetological clinic of General hospital Slovenj Gradec. We took patient's blood and determined the glycated hemoglobin.

In the thesis, we calculated the correlation coefficient, which is $r = 0,979869$. This means there is a good connectedness between the measurement data from the analysers. We also conducted a t- test, where the statistical significance was 0.02, which means that the mean value of the results statistically significantly varies. Given the range of recommended values for each method, we found the following: chromatographic affinity method has a range of recommended values from 4,2 % to 6,4 %. Samples that were measured on the Primus PDQ analyzer and had values higher than 6,4 % were outside the range of recommended values. There were 74 of those, which means that these diabetics don't have their diabetes regulated.

Immunological method has a range of recommended values from 4,8 % to 5,9 %. Samples that were measured on Cobas C311 analyzer and had values higher than 5,9 %, were outside the range of recommended values. There were 79 of those, which means that these patients don't have their diabetes regulated. 25 samples analyzed by the chromatographic affinity method and 21 samples analyzed by the immunological method were inside the range of recommended values, which means that these patients have their diabetes regulated. In determining the percentage of the glycated hemoglobin the chromatographic affinity method does not interfere with other types of hemoglobin, while immunization methods interfere with other types of hemoglobin, which means that the percentage of elevated glycated hemoglobin can be falsely determined.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADA - American Diabetes Association (Ameriško združenje za diabetike)

AACC - American Diabetes Association for Clinical Chemistry

CV - koeficient varijacije

CAP - College of American Pathologists

DCCT - Designated Comparison Method

EDTA – etilendiamintertraocetna kislina

ESAD - European Diabetes Study Group

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HbA_{1c} - glikirani hemoglobin

IDF - International Diabetes Federation

ISPAD - International Society for Pediatric and Adolescent Diabetology

IFCC - International Federation of Clinical Chemistry (Mednarodno Združenje za klinično kemijo)

MES-2 - morfolinoetansulfonska kislina monohidrat

NGSP - National Glycohemoglobin Standardization Program

OGTT - oralno glukozni tolerančni test

POC - point of care (prenosni instrumenti, ki se uporabljajo za hitro določanje odstotka HbA_{1c})

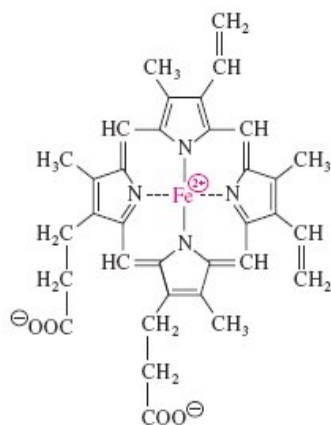
TRIS – trihidroksi metil aminometan

UKSPD-UK - United Kingdom Prospective Diabetes Study

1. UVOD

1.1. HEMOGLOBIN

Hemoglobin (slika 1) se nahaja v eritrocitih in je sferični protein, ki je sestavljen iz štirih polipeptidnih verig(α , β , γ , δ). Dve po dve polipeptidni verigi v hemoglobinu sta enaki. Vsaka podenota tvori v svoji tridimenzionalni strukturi žep, v katerem je prostetična skupina hem. Glavna naloga hemoglobina je prenos O_2 in CO_2 po krvi. Večino človeškega hemoglobina (97%) predstavlja HbA z dvema α in dvema β podenotama. Preostali delež si delita HbA₂ (dve α in dve δ podenoti), ki prispevata do 3% in HbF (dve α in dve γ podenoti) z deležem do 1% (10)

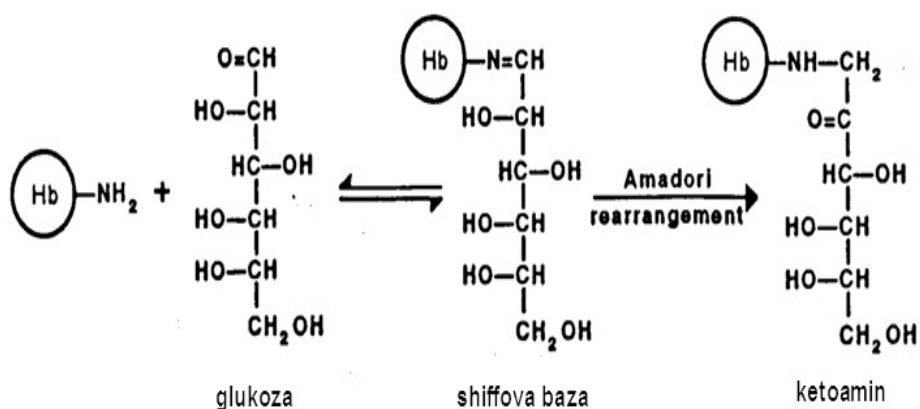


Slika 1: Molekula hemoglobina (12)

1.2. GLIKIRANI HEMOGLOBIN (Hb A_{1c})

1.2.1. Reakcija glikiranega hemoglobina

Hemoglobin se lahko tudi glikira oziroma glikozilira in pri tem nastane glikirani hemoglobin. Glikiranje pa je neencimska reakcija. Pri tej reakciji se hemoglobin HbA₁ najprej glikira na N-terminalnem valinu v β verigi. Nastane Schiffova baza, ki s časoma prehaja v stabilnejši ketoamin. Glukoza se veže na hemoglobin s kovalentno vezjo. Hitrost neencimske reakcije, v kateri nastaja HbA_{1c} je odvisna od koncentracije glukoze. Prvi del reakcije je reverzibilen, drugi del pa ireverzibilen. (slika2)



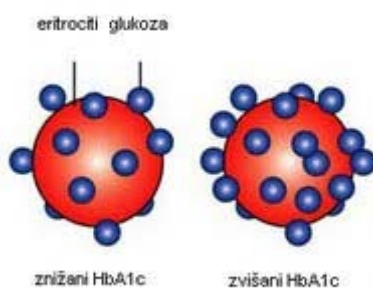
Slika 2: Reakcija nastanka glikiranega hemoglobina(8)

1.2.2. Vrste glikiranega hemoglobina

Med glikiranimi hemoglobini je najpomembnejši HbA_{1c}. Med frakcijami glikiranega hemoglobina HbA_{1c} predstavlja največji del (75-80%) HbA_{1c}, ki nastane z vezavo glukoze. Druge oblike glikiranega hemoglobina : HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, pa nastanejo tako, da poleg glukoze v reakcijo vstopajo še druge oblike monosaharidov, kot so: glukoza 6-fosfat, fruktoza-1,6-difosfat. Molekula glikiranega hemoglobina je predstavljena na sliki 3.

Sprememba glikiranega hemoglobina za 1% je povezana s spremembo koncentracije glukoze za približno 2 mmol/l. Torej v odvisnosti od koncentracije glukoze v krvi se spreminja delež glikiranega hemoglobina v eritrocitih. Višja kot je raven glukoze v zadnjih 2-3 mesecih, višji je glikirani hemoglobin.

Življenjska doba eritrocitov je približno 120 dni in zato je določanje deleža glikiranega hemoglobina, dober pokazatelj koncentracije glukoze v obdobju 60 do 90 dni pred njegovo določitvijo. S periodično kontrolo glikiranega hemoglobina pri bolnikih s sladkorno boleznijo, lahko spremljamo metabolno urejenost sladkorne bolezni za daljše preteklo časovno obdobje, za načrtovanje prihodnjega terapijskega režima in za oceno tveganja za razvoj kroničnih zapletov pri sladkorni bolezni (1,9,10).



Slika 3: Glikirani hemoglobin(13)

1.3. SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen je bila po sedaj znanih podatkih opisana na papirusu iz Egipta že v obdobju med 3000 in 1500 let pred našim štetjem. Ameriško združenje za sladkorno bolezen (ADA) in svetovna zdravstvena organizacija (WHO) opredeljujeta diabetes melitus, kot skupino presnovnih bolezni s kronično hiperglikemijo. Po oceni svetovne zdravstvene organizacije je sladkorna bolezen ena izmed najbolj razširjenih kroničnih bolezni razvitega sveta, saj obsega skupaj 120 do 140 milijonov bolnikov, smrtnost zaradi sladkorne bolezni pa je na sedmem mestu. V Sloveniji ima sladkorno bolezen približno 8% prebivalstva(1).

V razvitem svetu, se bo število bolnikov s sladkorno boleznijo podvojilo do leta 2025. Zaradi nezdravega načina prehranjevanja, premalo telesne aktivnosti, debelosti in staranja prebivalstva. V razvitem svetu naj bi bilo največje povečanje v starostni skupini nad 65 let, v deželah v razvoju pa v starostni skupini 45-64 let.

S patofiziološkega vidika je sladkorna bolezen stanje, ki nastane zaradi pomanjkanja učinkov inzulina. Vzrok je lahko v pomanjkanju ali neučinkovitosti samega inzulina ali v neodzivnosti tarčnih tkiv na njegovo delovanje, kar v organizmu povzroči moteno presnovo ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin. Če je vzrok v izločanju inzulina, potem se glukoza v obliki glikogena po obroku uskladišči v jetrih in mišicah. Lahko pa se glukoza spremeni v maščobo in se uskladišči v maščobnem tkivu. Zaloge glikogena in maščob se potem glede na potrebe izrabljajo med obroki.

Če pa je vzrok v delovanju inzulina, potem pa preprečuje skladiščenje glukoze in maščob. Končni učinki bolezni so lahko trajne okvare, nepravilnosti v delovanju ali pa celo odpoved številnih telesnih organov. Bolezen nastane na osnovi dednosti in okolja, ki pogosto delujeta skupaj(1).

1.3.1. Inzulin

Inzulin je hormon, ki nastaja v beta Langerhansovih otočkih v trebušni slinavki (pankreasu), kjer se iz preproinzulina sintetizira v proinzulin. Proinzulin je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, A in B (veriga A iz 21 aminokislin, veriga B iz 30 aminokislin), ki sta med seboj povezani z dvema disulfidnima mostovoma in še z veznim C-peptidom. V Golgijevem aparatu se tvorijo zrnca (vezikli) v katerih se pod vplivom endopeptidaz odcepi C-peptid in nastane inzulin. Inzulin je lahko neučinkovit, če se sintetizira nepravilna molekula inzulina ali, če je pretvorba proinzulina v inzulin nepopolna.

Izločanje inzulina iz celic beta je uravnavano s koncentracijo glukoze v krvi. Zvišana koncentracija glukoze spodbudi zvečano izločanje inzulina iz zrnca. Poleg glukoze pospešujejo izločanje inzulina še aminokislina, proste maščobe, kisline, ketoni, hormoni prebavnega trakta. Hitrost izločanja inzulina je sorazmerna hitrosti presnove glukoze v celicah beta. Inzulin se iz trebušne slinavke izloča v portalni krvni obtok, okrog 50% inzulina, ki pride po portalni krvi do jeter se tam razgradi in ne doseže sistemskega obtoka. Koncentracija inzulina v sistemskega krvnem obtoku je na tešče 0,5 µg/l, po hranjenju pa naraste do 6-krat. Razpolovni čas inzulina je 5-6 minut. Izločanje inzulina je zavrtlo, če je zvišan nivo inzulina nasprotno učinkujočih hormonov.

Inzulin deluje na periferne celice, tako da se veže na specifične membranske receptorje. Membranski receptorji so na tarčnih celicah jeter, mišic in maščevja. Receptor ima dve podenoti α in dve podenoti β , ki sta med seboj povezani z disulfidnimi vezmi. Podenoti α sta nad površino, podenoti β pa na notranji strani celične membrane. Inzulin se veže na podenoti α , s tem sproži transmembranski signal, ki spodbudi tirozin-kinaze v podenoti β k avtofosforilaciji in fosforilaciji drugih kinaz, kar aktivira transmembranski prenašalni sistem za prenos glukoze v celico. Delovanje inzulina preneha takoj, ko koncentracija glukoze pade na normalno vrednost. Organizem je zavarovan pred hipoglikemijo z obratom anabolne faze v katabolno, kar stimulira že sama odsotnost inzulina in učinek katabolnih hormonov. Delovanje inzulina je lahko zmanjšano, če je zmanjšano število receptorjev, če je receptor okvarjen in je vezava inzulina nanj ovirana, ali če so prisotna protitelesa proti receptorju(1).

1.3.1.1. Vzroki za pomanjkljivo delovanje inzulina:

- ❖ motnje v biosintezi inzulina v celicah beta,
- ❖ motnja v izločanju inzulina iz celic beta,
- ❖ motnja v potovanju inzulina po krvnem obtoku,
- ❖ motnja v delovanju inzulina na tarčno celico.

1.3.2. Tipični znaki sladkorne bolezni:

- ❖ povečano izločanje vode iz telesa (poliurija),
- ❖ dehidracija in huda žeja (polidipsija),
- ❖ slabo počutje,
- ❖ izguba teže,
- ❖ zmanjšana odpornost.

1.3.3. Klasifikacija sladkorne bolezni:

Ločimo dva glavna tipa sladkorne bolezni; sladkorna bolezen tipa 1 (od inzulina odvisna sladkorna bolezen), sladkorna bolezen tipa 2. Poleg teh dveh oblik sladkorne bolezni poznamo še nosečnostno sladkorno bolezen in druge redke specifične tipe sladkorne bolezni⁽¹¹⁾.

1.3.4. Sladkorna bolezen tipa 1

Sladkorna bolezen tipa 1 se običajno pojavi do 30 leta starosti. Do bolezni pride zaradi nepravilnosti v imunskem sistemu, ki povzroči uničenje beta celic trebušne slinavke, katere proizvajajo inzulin, kar vodi do popolne nesposobnosti sinteze in izločanje inzulina. Vzrok za nepravilnosti v imunskem sistemu so genske anomalije, ki pa so, kot se zdi povezane z zunanjimi dejavniki, na primer z okužbami. Pri tej vrsti sladkorne bolezni je pomanjkanje inzulina zelo veliko. Ker ne more organizem izrabljati glukoze mora organizem črpati lastne zaloge maščob, kar vodi v hujšanje. Celice pa proizvajajo strupene snovi (aceton), zaradi česar lahko pride do kome ali smrti. Omenjeni proces lahko zdravimo z vsakodnevnim vbrzgovanjem inzulina. Torej sladkorna bolezen tipa 1 je avtoimunska bolezen, ki se pojavi pri otrocih. Za boleznijo tipa 1 je obolelih okrog 10% vseh diabetikov.

1.3.5. Sladkorna bolezen tipa 2

Ta oblika sladkorne bolezni je poligenska presnovna motnja, ki vključuje veliko genov in je tesno povezana z drugimi motnjami, kot so: debelost, hiperlipidemija, napredovalna ateroskleroza, hipertenzija. Te motnje vplivajo na spremenjeno izločanje inzulina. Sladkorna bolezen tipa 2 je najpogostejši tip sladkorne bolezni in obsega 90-95% vseh oblik diabetesa. Navadno se pojavlja po 45. letu starosti. Če bolezni ne zdravimo, odvečna glukoza reagira skupaj s proteini v organizmu in povzroča pogubne učinke na krvnih žilah in živcih. Zaradi kopičenja sorbitola (alkohola, ki nastane pri presnovi glukoze) so prizadete tudi ledvice in očesna mrežnica.

1.3.6. Nosečnostna sladkorna bolezen

Nosečnostna sladkorna bolezen se pojavi pri približno 4% vseh nosečnostih. Nastopi zaradi povečane inzulinske rezistence pretežno v drugem in tretjem trimestrju. To stanje je običajno brez znakov bolezni, je pa povezano z večjo smrtnostjo novorojenčkov, hipoglikemijo, makrosomijo in zlatenico. Razvije se pogosteje pri debelih nosečnicah, starejših nosečnicah in osebah, ki imajo v družini diabetes. Ženske z nosečniškim diabetesom imajo značilno večje tveganje za razvoj sladkorne bolezni, 30-40% jih v naslednjih 10-20 letih razvije sladkorno bolezen tipa 2 (11).

1.3.7. Ostali specifični tipi sladkorne bolezni

Ostali specifični tipi sladkorne bolezni so zelo redki, z zelo različno etiologijo in patofiziologijo, največkrat povezni z motnjo izločanja inzulina in njegovo učinkovitostjo. (11)

1.3.8. Zapleti sladkorne bolezni

Zaplete sladkorne bolezni delimo na akutne in kronične.

1.3.8.1. Akutni zapleti sladkorne bolezni

Hipoglikemija nastane zaradi nesorazmerja med količino inzulina in glukoze v krvi. Do tega pride zaradi treh vzrokov: premalo hrane oziroma ogljikovih hidratov, prevelikega odmerka inzulina in prevelike telesne aktivnosti.

1. Premalo hrane:

- spremenjen ritem hranjenja
- premajhen obrok
- prebavne motnje (bruhanje, driska)

2. Preveč inzulina

- prevelik odmerek inzulina
- hitrejša resorpcija inzulina z mesta vbrizga
- injekcija inzulina v žilo

3. Večja telesna aktivnost

Znaki hipoglikemije so: znojenje, bledica, lakota, glavobol, razdražljivost, zaspanost, omotica in motnje zavesti.

Hiperglikemija nastane zaradi pomanjkanja inzulina. Krvni sladkor je povišan nad 30mmol/l.

Znaki hiperglikemije:huda žeja, poliurija (povečano izločanje urina,glede na normalno količino izločenega urina), bolečine v žlički, bruhanje, pospešeno dihanje, zadah po acetonu in s tem lahko pride do ketoacidozne kome, tahikardija, suha, topla, izsušena koža, povišan je tudi aceton v urinu(9,11)

1.3.8.2. Kronični zapleti sladkorne bolezni

Kronični zapleti nastanejo po 5-10 letih obolenja.

Kronični zapleti pri sladkorni bolezni so:

- diabetična nefropatija (kronični zaplet na malih žilah v ledvicah)
- diabetična retinopatija (kronične okvare žilic na očesnem ozadju)
- diabetična nevropatija (kronične okvare živcev)
- diabetična noga (z izrazom diabetična noga označujemo prizadetost nog, ki pri sladkornem bolniku nastaja zaradi kombinacije okvar velikih (makroangiopatija) in malih (mikroangiopatija) žil, ter živčevja (nevropatija)
- kardiovaskularna obolenja (srčni infarkt, možganski infarkt) ateroskleroza (pomeni poapnenje žil. Pri aterosklerozi gre za proces odlaganja maščob v steno arterij in mašenje žil, ki iz srca dovajajo kri vsem organom), angina pectoris)

1.3.9. Vrednosti koncentracije glukoze v krvi

- ❖ od 3,5 mmol/l do 5,6 mmol/l (normalna vrednost)
- ❖ nad 5,6 mmol/l (hiperglikemija-povišana vrednost sladkorja v krvi)
- ❖ pod 3,5 mmol/l (hipoglikemija-znižana vrednost sladkorja v krvi)

1.3.10. Določanje sladkorne bolezni

Na sladkorno bolezen kaže koncentracija sladkorja v krvi, višja od 7 mmol/l na tešče oziroma 11 mmol/l ne glede na čas predhodnega obroka hrane. Pozornost zahtevajo še vrednosti nad 5,6 mmol/l, izmerjene na tešče, tedaj gre za blago hiperglikemijo oziroma moteno toleranco na glukozo (11,9).

1.4. METODE ZA DOLOČANJE GLUKOZE

Glukozo določamo v polni krvi ali pa v plazmi, serumu, urinu.

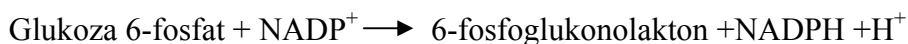
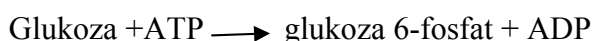
Če določamo glukozo v krvi, vzamemo kri z antikoagulantom (EDTA ali Li-heparin ali K-oksalat ali citrat). Ker koncentracija glukoze v krvi hitro pada, mora biti plazma odločena od celic v 60 minutah, sicer dodamo inhibitor glikolize Na-flurid, ki kompleksira magnezijeve ione in s tem lahko upočasnimo glikolizo. V serumu, ki ni hemoliziran, kontaminiran ali mikrobiološko obdelan, je koncentracija glukoze stabilna na sobni temperaturi do 8 ur pri 4°C do tri dni. Koncentracijo glukoze v polni krvi, plazmi in serumu merimo z encimskimi metodami. Najpogosteje se v laboratorijih uporablja za določanje glukoze heksokinazna ali glukoza-oksidadna metoda.

Reagenti pri teh dveh metodah so pripravljene, v obliki raztopin ali v suhi obliki v polimerih, nanesenih na trakove ali ploščice (suha kemija). Suha kemija se uporablja večinoma v senzorjih za osebne glukometre, ter za semikvantitativno določanje glukoze v urinu s testnimi trakovi.

1.4.1. Metoda s heksokinazo

Pri heksokinazni metodi se glukoza fosforilira v glukoza-6-fosfat, reakcijo katalizira heksokinaza. Nastali glukoza 6-fosfat se dalje oksidira z glukoza-6-fosfat dehidrogenazo, ob tem se NADP^+ pretvarja v NADPH_2 , ki ga merimo pri 340 nm.

Reakcija:



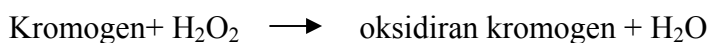
V prvi reakciji lahko poleg glukoze reagirajo tudi druge heksoze. Druga reakcija je specifična za glukoza-6-fosfat.

Vzorec za določanje glukoze ne sme biti hemoliziran, saj motijo encimi in fosfatni estri iz eritrocitov pri določanju. Interference pri tej metodi so lahko: bilirubin, lipemični vzorec in zdravila. Metoda je referenčna, kar pomeni da je specifična, točna in zajema široko koncentracijsko območje in ima manj interferenc, kot metoda z glukoza-oksidadzo.

1.4.2. Metoda z glukoza-oksidadzo

Pri glukoza-oksidadzni metodi se glukoza oksidira v glukonsko kislino ob prisotnosti glukoza oksidaze. Pri tem nastaja H_2O_2 (peroksid), ki v prisotnosti peroksidaze oksidira kromogen v obarvano spojino.

Reakcija:



Reakcija oksidacije glukoze je specifična za β -D-glukozo, zato je v reagentu še encim mutarotaza, ki pospeši prehajanje med α in β obliko. Oksidacija kromogena s peroksidom je nespecifična, motijo urati, kreatinin, askorbinska kislina, bilirubin, ki lažno znižajo rezultat, oksidanti, pa povzročijo lažno zvišanje rezultata.

1.4.3. Različica s polarografijo

S kisikovo polarografsko elektrodo se meri poraba kisika pri oksidaciji glukoze z glukoza oksidazo. S tem se izognemo interferencam, ki so prisotne pri reakciji s kromogenom. Metoda temelji na principu oksidacije glukoze s pomočjo glukoza oksidaze. Ta princip metode je tudi pri večini glukometrov, ki jih sladkorni bolniki uporabljajo za spremljanje koncentracije glukoze doma.(9,5).

1.4.4. Oralno glukozni tolerančni test-(OGTT)

Oralno glukozni tolerančni test se uporablja pri odkrivanju sladkorne bolezni in nosečnostne sladkorne bolezni. Za odkrivanje sladkorne bolezni se izvede oralno glukozno tolerančni test, po naslednjem postopku. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) priporoča, izvedbo oralno glukoznega tolerančnega testa, kadar je koncentracija glukoze v plazmi na tešče v območju 6,1 do 7,0 mmol /L. Kriteriji za interpretacijo oralno glukoznega tolerančnega testa (preglednica1).

Preiskovanec je tri dni na normalni prehrani, pred obremenitvijo z glukozo je 8-14 ur tešč. V laboratoriju se vzame kri, pred obremenitvijo z glukozo. Nato v 5 minutah spiže 75g glukoze raztopljene v 250-300ml vode. Po dveh urah se spet vzame kri in se izmeri koncentracija glukoze v obeh vzorcih pred obremenitvijo z glukozo(0^h) in po obremenitvi z glukozo(2^h).

Preglednica 1: Kriteriji za interpretacijo oralno glukoznega tolerančnega testa

Interpretacija	Koncentracija glukoze v mmol/L	Koncentracija glukoze v mmol/L
	0 ^h	2 ^h
Neustrezna glukoza na tešče	≥6,1<7,0	<7,8
Neustrezna toleranca	<7,0	≥7,8<11,1
Sladkorna bolezen	≥7,0	≥11,1

Pri odkrivanju nosečnostne sladkorne bolezni izvedemo oralno glukozni tolerančni test (OGTT), če je glukoza na tešče ≥7,0 mmol/L ali kadarkoli čez dan ≥11,1 mmol /L in potrditev teh vrednostih je dokaz za sladkorno bolezen, vendar ne isti dan. Razlikujemo dva oralno glukozno tolerančna testa, enostopenjski (OGTT) in dvostopenjski (OGTT).

1.4.4.1. Enostopenjski oralno glukozni tolerančni test

Nosečnica je 8-14 ur tešča, brez diete ali omejitve fizične aktivnosti, kajenje med testom ni dovoljeno. Merimo koncentracijo glukoze pred obremenitvijo na tešče. Nato zmešamo 100g (75g) glukoze pri nosečnicah z vodo in nosečnica to popije, nato merimo koncentracijo glukoze po 1 uri, 2 urah, 3 urah po obremenitvi z glukozo. Za diagnozo nosečnosti sladkorne bolezni so sprejete 5-10% nižje vrednosti glukoze.

Kriteriji za oralno glukozno tolerančni test so enaki s obremenitvijo 75g glukoze so enaki, le da ni merjenja koncentracije po 3 urah.

Če so kriteriji v spodaj prikazani preglednici 2 doseženi ali preseženi v vsaj dveh primerih je to potrditev nosečnosti sladkorne bolezni.

Preglednica 2: Kriterij za potrditev nosečnosti sladkorne bolezni:

Čas	Koncentracija glukoze v plazmi mmol/l
0 ^h	≥5,3
1 ^h	≥10,0
2 ^h	≥8,6
3 ^h	≥7,8

1.4.4.2. Dvostopenjski oralno glukozni tolerančni test (OGTT)

Pri tem testu ni potrebno biti tešč. Nosečnico obremenimo s 50g glukoze. Koncentracija glukoze se izmeri po 1^h in v primeru koncentracije ≥7,8 mmol/L se izvede zgoraj opisani 75g OGTT (1).

1.5. GLIKIRANI HEMOGLOBIN V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI

Natančnost in pravočasno merjenje glikiranega hemoglobina je vse bolj pomemben izziv v kliničnih laboratorijih. V zadnjem času se glikirani hemoglobin določa, za spremljanje urejenosti sladkorne bolezni. Študije so pokazale, da takojšne povratne informacije glikiranega hemoglobina izboljšuje glikemijo pri sladkorni bolezni tipa ena in dva. Zato je pomembna analitska uspešnost vsake metode, ki se uporablja za merjenje glikiranega hemoglobina(2).

Namen NGSP je standardizirati rezultate preizkusa glikiranega hemoglobina, tako da so v kliničnih laboratorijih primerljivi s tistimi, o katerih so poročali pri (DCCT), kjer razmerja pomenijo nivo glukoze v krvi in tveganje za žilne zaplete. Ključni pomen je referenčni laboratorij Network. Omrežja komunicirajo s proizvajalci metod glikiranega hemoglobina in pomagajo pri prvi standardizaciji svoje metode in pri zagotavljanju primerljivih podatkov za certificiranje sledljivosti DCCT(4).

Po priporočilih NGSP mora znašati koeficient variacije <5% med laboratoriji, znotraj laboratorija pa mora znašati CV <3%(2).

Mednarodno združenje za klinično kemijo (IFCC) je razvilo referenčne metode za določanje glikiranega hemoglobina. Za kalibracijo referenčne metode, se uporablja mešanica čistega glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}) in čisti hemoglobin(HbA_0). Glikirani hemoglobin se izmeri z eno izmed referenčnih metod: HPLC, masno spektroskopijo ali kapilarno elektroforezo. Merjenje glikiranega hemoglobina v obliki HbA_{1c} je priporočilo Ameriškega diabetološkega združenja (ADA) za spremljanje diabetične urejenosti.

Priporočeno je iz strani (ADA), da naj se opravi test glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}) vsaj dvakrat letno, pri bolnikih, ki imajo urejeno sladkorno bolezen. Pri tistih bolnikih, ki nimajo urejene sladkorne bolezni in se zdravljenje spreminja pa priporoča test na četrto leta(4).

1.6. METODE ZA DOLOČANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA

Za določanje glikiranega hemoglobina je v uporabi 30 različnih metod, ki pa se delijo v dve skupini. Prva skupina metod temelji na osnovi različnega naboja glikiranih in neglikiranih komponent. Te metode so: kationsko- izmenjevalna kromatografija, agar-gelska kromatografija. Druga skupina metod pa temelji na strukturnem razlikovanju glikiranih in neglikiranih komponent. Te metode so: boronatna afinitetna kromatografija, imuno-kemijske metode. Referenčna metoda je ionsko izmenjevalna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Novejši referenčni metodi pa sta afinitetna kromatografija in imunoturbidimetrična metoda⁽¹⁾.

1.6.1. Ionsko-izmenjevalna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Ionsko-izmenjevalna HPLC je referenčna metoda.

Glikirani hemoglobin se določi iz venske ali kapilarne krvi po predanalitični obdelavi vzorca. Z boronatnim pufrom odstranimo nestabilno obliko pre-HbA_{1c}.

Princip metode:

Ionsko izmenjevalna HPLC uporablja tri fosfatne pufre z naraščajočo ionsko jakostjo, ki potujejo skozi kromatografsko kolono v točno določenih časovnih zaporedjih. Kolona vsebuje sferični kationski- izmenjevalni gel. Hemoliziran vzorec hranimo pri konstantni temperaturi $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, preden se avtomatsko vbrizga v sistem. Detekcija se vrši pri valovni dolžini 415 in 690 nm. Vse operacije kontrolira mikroprocesor, ki izračuna odstotek glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}) in celokupnega hemoglobina (HbA₁).

1.6.2. Afinitetna kromatografija

Glikirani hemoglobin se pri tej metodi določi iz polne krvi z dodatkom antikoagulanta EDTA ali heparina.

Princip metode:

Sladkorji v glikirani hemoglobinski molekuli se specifično vežejo s polanionskim afinitetnim reagentom (dihidroksikarbonat in negativno nabite molekule poliakrilata), pri čemer nastane negativno nabit kompleks označen s fluoroforom. Na principu elektrostatske interakcije s kationskim steklenim nosilcem prihaja do ločbe glikiranega hemoglobina od reakcijske zmesi in potencialnih interferenc. Z optičnim sistemom merimo intenziteto fluorescence, ki je sorazmerna koncentraciji glikiranega hemoglobina in celokupnega hemoglobina. Sorbitol označen s fluoroforom tekmuje z glikiranim hemoglobinom za boronata vezavna mesta na steklenem nosilcu, pri čemer se odstrani glikirani hemoglobin. Po dodatku sorbitola merimo intenziteto fluorescence. Preko kalibracijske krivulje, ki jo dobimo s šestimi kalibracijskimi točkami pa odčitamo koncentracijo celokupnega glikiranega hemoglobina.

Rezultate podajamo kot razmerje glikirani hemoglobin glede na celokupni.

1.6.3. Imuno-turbidimetrična metoda

Analiza se izvaja iz hemolizata venske ali kapilarne krvi, vzete z EDTA-jem ali heparinom.

Princip metode:

Molekule glikiranega hemoglobina reagirajo s specifičnimi monoklonskimi HbA_{1c} protitelesi v prvem reagentu. Na specifične HbA_{1c} epitope molekul HbA_{1c} se vežejo protitelesa in tvori se topen imunski kompleks. Polihapteni, dekstranski nosilci, v drugem reagentu, imajo številna vezavna mesta za protitelesa (HbA_{1c}-specifične epitope). Vezava prostih protiteles na polihaptenske produkte, povzroči agregacijo, ki jo merimo kot naraščajočo motnost pri 340nm. Vsebnost HbA_{1c} določimo preko nelinearne kalibracijske krivulje ob uporabi petih kalibracijskih točk. Vrednosti HbA_{1c} podajamo kot odstotek celokupnega hemoglobina, ki ga določimo istočasno z aparatom(5).

1.7. REFERENČNE METODE ZA DOLOČANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA

Izvedli so farmakokinetično študijo v kateri so ocenili vse razpoložljive prenosne instrumente, ki se uporabljajo za hitro določanje odstotka HbA_{1c} (POC). (In2it (Bio-Rad), DCA Vantage (Siemens), Afinion in Nycocard (Axis-Shield), Clover (Infopia), Innovastar (DiaSys) A1CNow (Bayer) in Qup-test iz kvocienta Diagnostic) v skladu z CLSI protokoli (EP-10, EP-5 in EP-9). Zanimalo pa jih je tudi, kakšne meritve dajejo instrumenti iz strani NGSP, če so izvedli meritve z dvema različnima reagentoma.

CLSI protokol EP-9 je bil izveden dvakrat in je bil uporabljen za preiskavo med instrumenti s strani POC in tremi različnimi sekundarnimi referenčnimi merilnimi postopki (40 vzorcev, 5 dni, podvojene meritve).

Vrednost določitev vzorcev glikiranega hemoglobina so opravili s tremi različnimi potrjenimi sekundarnimi referenčnimi merilnimi postopki.

Ti postopki so bili naslednji:

- ❖ analizator Roche, (Tina-quant Gen.2.), za določanje glikiranega hemoglobina, imunski, (IFCC in NGSP certificirano) (RocheDiagnostics).
- ❖ analizator Primus Ultra2, afinitetna HPLC kromatografija (IFCC in NGSP certificirano) (Primus Diagnostics,)
- ❖ analizator Tosoh G7, (Trinity Biotech Company), kationsko-izmenjevalna HPLC, (IFCC certificirano) (Tosoh Bioscience N.V. / S.A.).

Sekundarni referenčni merilni postopki so imeli dobre rezultate s strani NGSP in IFCC. Rezultati POC instrumentov pa so bili srednje dobri v primerjavi z sekundarnimi referenčnimi merilnimi postopki.

Večina od instrumentov POC ne izpolnjuje zadostne analitske kakovosti za merjenje glikiranega hemoglobina v laboratoriju. Samo instrumenta Afinion in DCA Vantage izpolnjujeta, da je koeficient variacije 3% (3).

1.8. INTERFERENCE PRI DOLOČANJU GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA

Ugotovljeno je bilo, da starost, spol, etnična pripadnost, sezonske spremembe in akutna stanja ne vplivajo bistveno na vrednosti glikiranega hemoglobina. Vsa klinična stanja z znižano življenjsko dobo eritrocitov ali znižano povprečno starostjo eritrocitov vpliva na lažno znižanje glikiranega hemoglobina. Stanja z znižano povprečno starostjo eritrocitov so: hemolitična anemija, akutna izguba krvi. Vitamin C in E tudi znižujeta raven glikiranega hemoglobina, saj inhibirata glikacijo. V nekaterih metodah vplivajo na rezultat glikiranega hemoglobina naslednje interference: C vitamin, salicilati, opiaty in stanja kot so hiperbilirubinemija, kronični alkoholizem, hipertrigliceridemija in uremija, in s tem povzročajo izmerjene lažno zvišane vrednosti glikiranega hemoglobina. Razne hemoglobinopatije (Hb S, C, E, D, Graz, Sherwood Forest, in Padova) interferirajo odvisno od metode z lažno nižjo ali višjo vrednostjo glikiranega hemoglobina. V teh primerih je priporočena afinitetna kromatografija, kjer so ti vplivi manj izraziti. Za afinitetno kromatografijo velja, da nima interferenc, glede določanja drugih oblik glikiranega hemoglobina(1).

Analizator Tosoh G7 temelji na principu ionsko-izmenjevalne kromatografije. Pri tej metodi so ugotovili, da motijo merjenje glikiranega hemoglobina hemoglobinopatije vrste HbE, HbD, HbS, HbC, HbF in predstavljajo interference. Pri meritvah glikiranega hemoglobina pa zaradi interferenc izmeri lažno nižje vrednosti glikiranega hemoglobina, v primeru prisotnosti hemoglobina oblike HbF. Ta metoda ima nizek koeficient variacije(8).

Analizator Primus PDQ združuje princip afinitetne, boronatne in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in pri tej metodi ni interferenc pri določanju glikiranega hemoglobina(8).

Analizator Cobas C 311 temelji na imunsko-turbidimetrični metodi in ima interference. Pri merjenju glikiranega hemoglobina motijo razne hemoglobinopatije HbS, HbC, HbE in HbD. (7).

2. NAMEN DELA:

Namen diplomske naloge je, da ugotovimo primerljivost imunološke metode na analizatorju COBAS C311 in kromatografske metode na PRIMUS PDQ. Želimo ugotoviti ali imunološka metoda daje primerljive rezultate, glede na kromatografsko metodo, ki je referenčna. V primerjavo bomo vključili 100 bolnikov, ki se zdravijo v Diabetološki ambulanti Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Bolnikom bomo vzeli kri in določili glikirani hemoglobin. V okviru naloge bomo izračunali korelacijo rezultatov, ki jih bomo dobili z omenjenima metodama, potem bomo izračunali delež povišanih vrednosti s posamezno metodo in pogledali, če je to povišanje pri istih pacientih. Izračunali bomo za koliko se obe metodi medsebojno razlikujeta in če je srednja vrednost rezultatov statistično pomembno različna.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

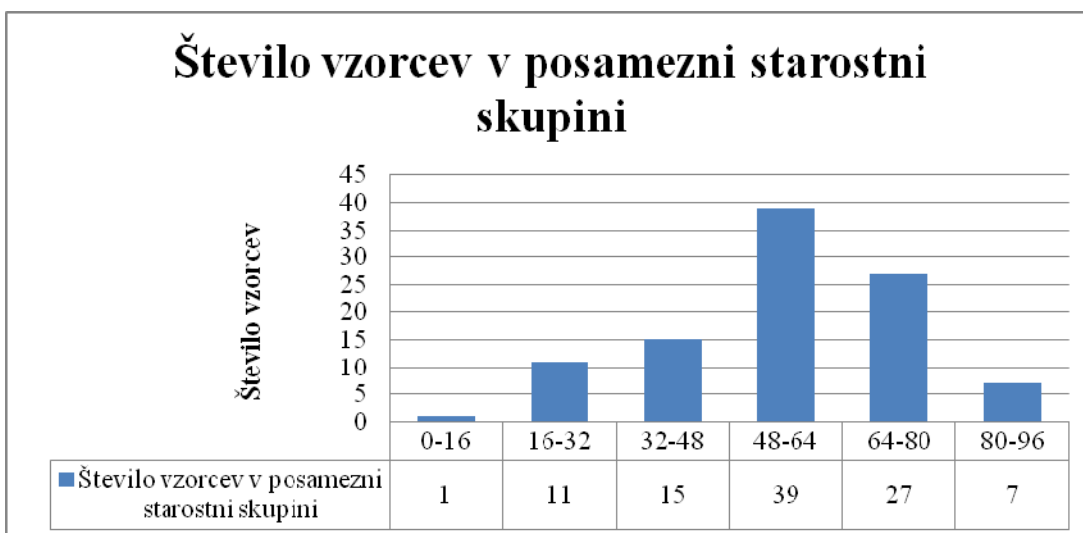
3.1. VZORCI

V študiji smo določili, koncentracijo glikiranega hemoglobina v polni krvi pri 100 diabetičnih bolnikih, od katerih je bilo 53 žensk in 47 moških, kar prikazuje (slika 4). Vzorce smo dobili iz Diabetične ambulante splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Vsakemu vzorcu smo določili odstotek glikiranega hemoglobina, vzporedno na dveh analizatorjih in primerjali rezultate meritev.



Slika 4: Graf; Razporeditev po spolu udeležnih v študiji

Vzorce smo razporedili v starostne skupine (slika 5). Ugotovili smo, da je bilo v študiji udeležnih največ preiskovancev med 48-64 let, najmanj pa v starostni skupini od 0-16 let.



Slika 5: Graf; Število vzorcev v posamezni starostni skupini

3.2. REAGENTI

3.2.1. Analizator Primus PDQ

Za določanje koncentracije glikiranega hemoglobina smo uporabili pripravljene reagente proizvajalca Primus Corporation.

Reagenti:

- PDQ Reagent 1(pufer)
- PDQ Reagent 2(pufer)
- PDQ Diluent
- Destilirana voda(H₂O)
- Kolona

Reagente shranjujemo na sobni temperaturi. Po odprtju so reagenti stabilni minimalno osem tednov.

Kolono shranjujemo na temperaturi 2-8°C(8).

3.2.2. Analizator Cobas C311

Za določanje koncentracije glikiranega hemoglobina smo uporabili naslednje reagente Tina-quant Hemoglobin A_{1c} proizvajalca Roche.

Reagent s protitelesi je sestavljen iz:

- ❖ MES pufer: 0,025mol/l; TRIS pufer: 0,015mol/l, pH6,2; HbA_{1c} protitelesa (ovčji serum) ≥ 0,5 mg/ml; stabilizatorji; konzervansi

Reagent s polihaptenom je sestavljen iz :

- ❖ MES pufer: 0,025mol/l; TRIS pufer: pH 6,2; HbA_{1c} ; polihapten ≥8μg/ml; stabilizatorji; konzervansi

Reagente shranjujemo, na temperaturi 2-8°C. Po uporabi jih lahko shranjujemo v ohlajenem delu analizatorja 4 tedne. Reagente pred uporabo damo na sobno temperaturo (15°-25°C)(7).

3.3. OPREMA

Za določanje odstotka glikiranega hemoglobina v poni krvi smo uporabili analizator Primus PDQ Plus TM(slika 6) proizvajalca Dipros in analizator Cobas C 311 (slika 7), proizvajalca Roche. Uporabljali smo tudi epruvete, merilne pipete, rokavice.



Slika 6: Analizator Primus PDQ(8)

Slika 7: Analizator Cobas C 311(14)

3.4. POSTOPKI

3.4.1. Analizator Primus PDQ

Koncentracijo glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}) smo določili na analizatorju Primus PDQ Plus TM. Metoda temelji na strukturnem razlikovanju glikiranih in neglikiranih komponent hemoglobina.

Na aparatu Primus PDQ Plus TM se kvantitativno določa glikirani hemoglobin (HbA_{1c}) z metodo, ki združuje princip boronatne, afinitetne in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Vzorec, ki je polna kri odvzeta z antikoagulantom EDTA, smo dali na analizator. Vzorec se na analizatorju hemolizira in avtomatsko vbrizga v kolono, skozi katero potuje. Kolona je ogreta na 54-56°C in pod pritiskom 14-30 barov in pretok 2000 μ l/min. Kolona vsebuje aminofenolboronatno kislino, ki je vezana na porozen polimerni gel. Glikirani hemoglobin iz vzorca se veže na boronat, neglikirani hemoglobin pa skupaj s PDQ reagentom 1 (pufer) potuje skozi spektrofotometrični detektor, ki detektira od 413 do 2 nm, Spektrofotometrični detektor detektira neglikirani hemoglobin. S PDQ reagentom 2 (pufer) se s kolone odcepi glikirani hemoglobin, ki pa prav tako potuje do spektrofotometričnega detektorja, kjer se določi njegova količina.

Signali iz spektrofotometra se detektirajo in analizator izračuna koncentracijo glikiranega hemoglobina kot odstotek glede na celotni hemoglobin.

Izračun odstotka glikiranega hemoglobina v vzorcu izračunamo po naslednji formuli:

$$\%HbA_{1c} = \frac{\text{Površina vrha 2}}{(\text{Površina vrha 1} + \text{Površina vrha 2})} \cdot 100$$

V formuli je (vrh 2) za glikirani hemoglobin in (vrh 1) ena za neglikirani hemoglobin.

Pred začetkom dela smo izvedli kontrolo kakovosti s kontrolami proizvajalca (Primus Corporation, kataloška številka kontrole: 01-04-0013). Kontrole morajo biti v dovoljenem območju odstopanja. Ob menjavi kolone je potrebno izvesti kalibracijo analizatorja s kalibratorji proizvajalca (Primus Corporation, kataloška številka: 01-04-0016)

Normalne orientacijske vrednosti glikiranega hemoglobina so 4,2-6,4 %(8).

3.4.2. Analizator Cobas C 311

Na biokemičnem analizatorju COBAS C 311 smo določili HbA_{1c}. Vzorec je polna kri odvzeta z antikoagulantom EDTA, ki se hemolizira avtomatsko. Določanje glikiranega hemoglobina (HbA_{1c}) temelji na imunološki metodi, ki ga določamo turbidimetrično. Pred določanjem glikiranega hemoglobina vzorcu dodamo reagent s protitelesi in pufer. Glikirani hemoglobin v vzorcu reagira s protitelesi anti-HbA_{1c}, pri tem pride do nastanka kompleksa.

Nato dodamo pufer in polihapten. Polihapten z vezavnimi mesti za protitelesa anti-HbA_{1c}, veže nastali kompleks, ki ga merimo turbidimetrično. Po končanem merjenju računalnik detektira turbidimetrični signal in izračuna koncentracijo glikiranega hemoglobina, ki ga poda kot odstotek glikiranega hemoglobina glede na celotni hemoglobin.

Pred meritvijo vzorcev smo izvedli kontrolo kakovosti s kontrolami proizvajalca (kataloška številka: 20764841), ki morajo biti v dovoljenem območju odstopanja. Vsak reagent je potrebno kalibrirati s kalibratorji proizvajalca (kataloška številka :04528182).

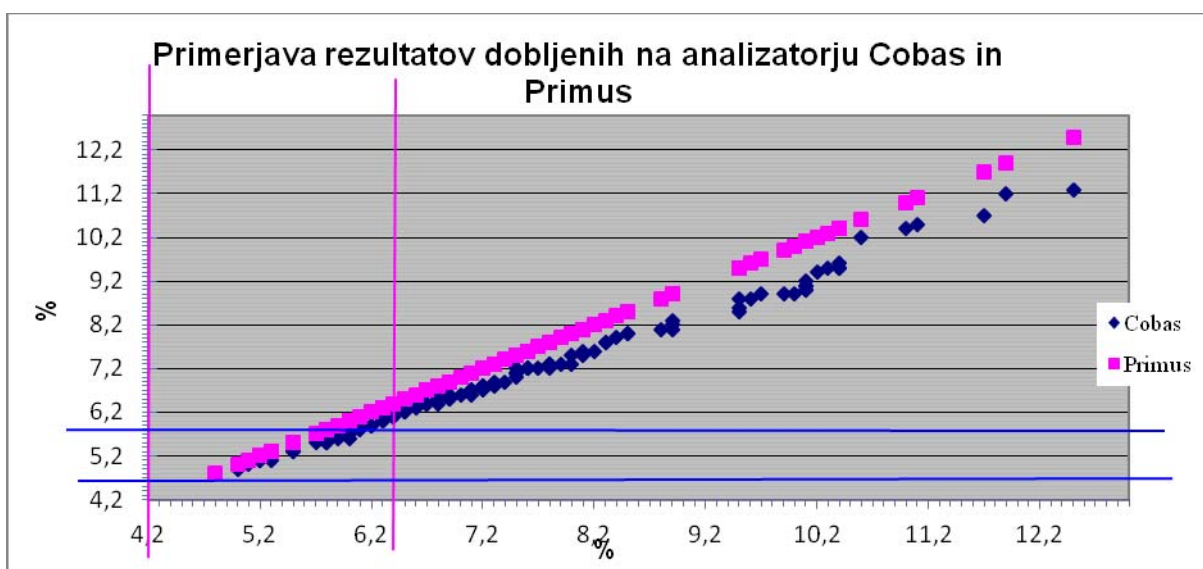
Normalne orientacijske vrednosti glikiranega hemoglobina so: 4,8-5,9%(7).

3.4.3. Statistična obdelava podatkov:

V diplomskem delu sem uporabila, za statistično obdelavo podatkov naslednji statistični test: t-test. Izračunala sem korelacijski koeficient, regresijsko premico, povprečno vrednost in standardni odklon podatkov. Vse izračune in t-test sem izvedla v programu Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI

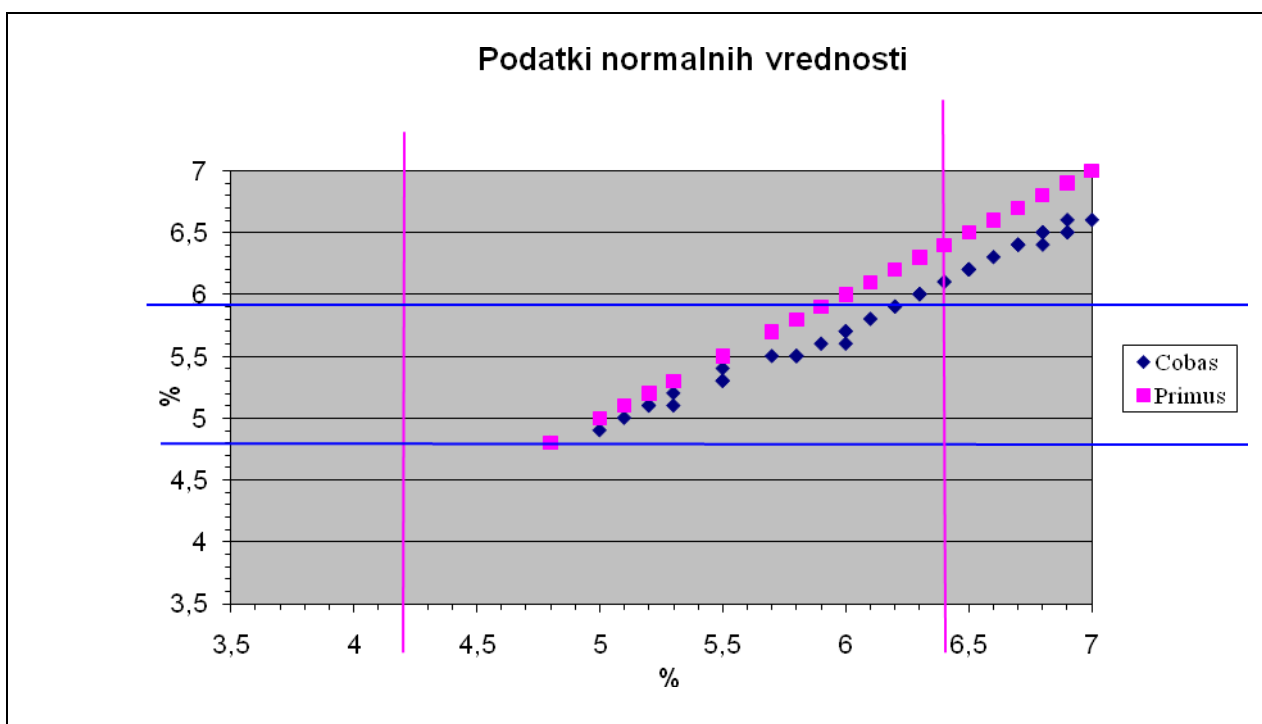
Vzporedno smo določili odstotek glikiranega hemoglobina v 100 vzorcih na analizatorju Primus PDQ in Cobas C311 (Priloga, preglednica 1). Nato smo dobljene rezultate primerjali med seboj s pomočjo grafa. V graf smo vnesli referenčne vrednosti posameznega analizatorja in nato dobili območje normalnih vrednosti. Referenčne vrednosti za analizator Primus PDQ so: 4,2-6,4%. Referenčne vrednosti za analizator Cobas C 311 so: 4,8-5,9%.



Slika 8: Graf; Primerjava rezultatov dobljenih na analizatorju Cobas in Primus

4.1. OBMOČJE NORMALNIH VREDNOSTI

Iz območja normalnih vrednostih smo ugotovili zvišane, znižane in normalne vrednosti posameznega bolnika. Ugotovili smo, kar je tudi razvidno iz grafa, da je ena vrednost z imuno kemijsko metodo na analizatorju Cobas C 311 znižana. Z afinitetno metodo na analizatorju Primus, ki ima območje referenčnih vrednostih od 4,2-6,4%, je glede na imuno kemijsko metodo na analizatorju Cobas C 311, ki ima območje referenčnih vrednostih od 4,8-5,9% pet vrednosti višje od 5,9%. Dve vrednosti, ki sta izmerjeni na imunokemijskem analizatorju Cobas C 311 sta povišani, pri analizatorju Primus pa sta še v območju normalnih vrednosti. Vse ostale vrednosti so pri obeh metodah zvišane in so izven referenčnih vrednostih.



Slika 9: Graf; Podatki normalnih vrednosti

4.2. REZULTATI GLEDE NA SLADKORNO BOLEZEN

Analizator Primus PDQ, ki deluje na principu, afinitetne metode ima območje referenčnih vrednosti od 4,2-6,4%. Vzorci bolnikov iz Diabetološke ambulante splošne bolnišnice Slovenj Gradec, ki so bili izmerjeni nad 6,4%, so izven referenčnih vrednosti. Teh preiskovancev je bilo 74. To pomeni, da ti preiskovanci nimajo urejene sladkorne bolezni. 26 preiskovancev je imelo vrednosti glikiranega hemoglobina, v območju referenčnih vrednostih, kar pomeni da imajo urejeno sladkorno bolezen.

Analizator Cobas C 311, ki deluje na principu, imunokemijske metode ima območje referenčnih vrednostih od 4,8-5,9%. Vzorci preiskovancev iz Diabetološke ambulante splošne bolnišnice Slovenj Gradec, ki so bili izmerjeni nad 5,9%, so po tej metodi izven referenčnih vrednosti. Teh preiskovancev je bilo 79. To pomeni, da ti preiskovanci po tej metodi nimajo urejene sladkorne bolezni. 21 preiskovancev je imelo vrednosti glikiranega hemoglobina, v območju referenčnih vrednostih, kar pomeni da imajo urejeno sladkorno bolezen.

4.3. STATISTIČNE VREDNOSTI

Preglednica III: Statistične vrednosti posameznega analizatorja

Izračunane vrednosti	Analizator Primus PDQ	Analizator Cobas C311	Enote
Povprečna vrednost	7,72	7,22	
Minimalna vrednost	4,8	4,8	
Maksimalna vrednost	12,5	11,3	
Standardni odklon	1,76	1,52	%
Število vzorcev:n=100			

Kot je razvidno iz zgornje preglednice, je pri analizatorju Primus PDQ povprečna vrednost 7,72, standardni odklon pa 1,7. Pri analizatorju Cobas c 311 znaša povprečna vrednost 7,22, standardni odklon pa 1,52. To pomeni, da pri obeh analizatorjih v populaciji 100 vzorcev nimamo velike razpršenosti podatkov. Analizator Cobas C311, ima nižji standardni odklon, nižjo povprečno vrednost in nižjo maksimalno vrednost kot analizator Primus. Iz tega lahko sklepamo, da tudi izmeri nižje vrednosti vzorcev.

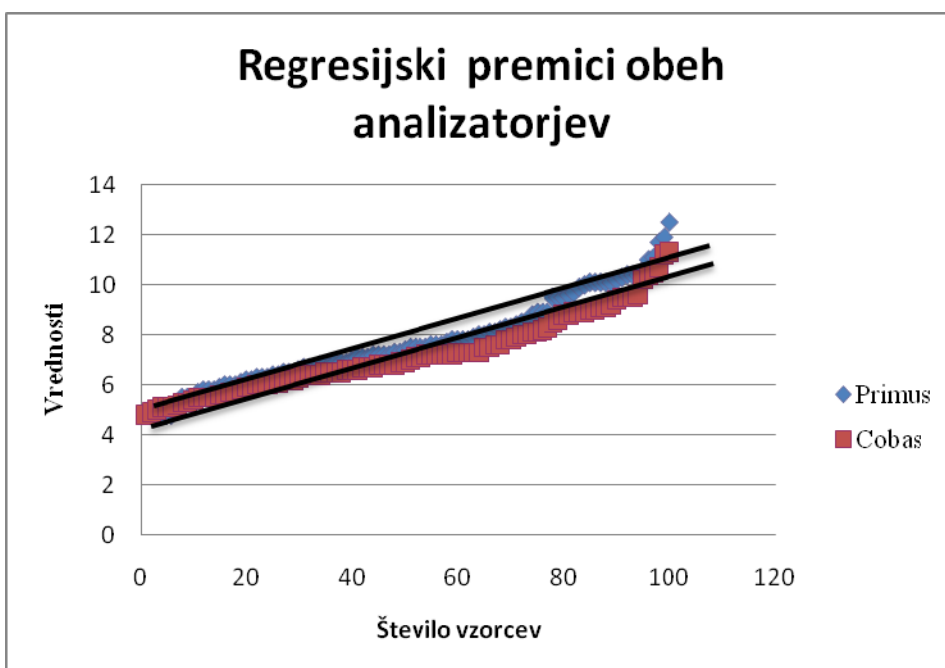
Izvedli smo t-test, iz katerega smo ugotovili, da se obe metodi med seboj razlikujeta ($p=0,02$) in srednja vrednost rezultatov je statistično pomembno različna. Statistično pomembno različna srednja vrednost, ker je $p<0,05$. Uporabili smo 95% verjetnost.

4.4. REGRESIJSKI PREMICI

Narisali smo dve regresijski premici, glede na posamezen analizator. Izračunali smo enačbo premice. Na sliki 10 sta dve regresijski premici, vsaka za posamezen analizator. Izračunali pa smo skupno regresijsko premico, za oba analizatorja.

Enačba premice $y(\text{mmol/L}) = -0,58637 + 1,14931 \cdot x(\text{število vzorcev})$

Izračunali smo tudi korelacijski koeficient, ki je $r=0,979869$. To pomeni, da je dobra povezanost podatkov meritev med analizatorjem Primus PDQ in Cobas C 311.



Slika10: Graf; Regresijski premici obeh analizatorjev

5. RAZPRAVA

Različne metode, ki se uporabljajo za določanje glikiranega hemoglobina, imajo različne prednosti in pomanjkljivosti. Pri metodah predstavljajo pomanjkljivosti: biološke in analitične interference, nezadostna specifičnost, kljub dobri korelaciji, usklajenost rezultatov med laboratoriji(5). Zaradi slabe primerljivosti, rezultatov HbA_{1c} in stalnega spremljanja glikiranega hemoglobina se je ustvarila potreba za standardizacijo.

Program za standardizacijo je začela izvajati ZDA, s skupno organizacijo nacionalnih društev za klinično kemijo (NGSP, AACC, ADA) in diabetologijo. Tekočinska kromatografija je bila uvedena, kot metoda primerjave, s strani DCCT in UKSPD. Program NGSP omogoča sledljivost rezultata s pomočjo nacionalnega referenčnega laboratorija, z DCCT standardom. Mreža primarnih in sekundarnih laboratorijev v ZDA in Evropi uporablja različne metode (afinitetna kromatografija, kapilarna elektroforeza in imunokemija), kalibrirane z DCCT sledljivimi vrednostmi, dobljenih od nacionalnega referenčnega laboratorija.

Programa NGSP in CAP sta znatno izboljšala ponovljivost določanja HbA_{1c} in med laboratorijsko usklajevanje rezultatov z DCCT standardom. Preko 98% ameriških laboratorijev, izpolnjuje kriterij ponovljivosti in usklajevanje z DCCT standardom. To je privedlo do napredka, v kvaliteti diabetološke nege in uporabe priporočenih ciljev terapije. Tekočinska kromatografija, ki je bila uvedena s strani DCCT ni dovolj specifična, in to je glava pomanjkljivost NGSP programa, kljub temu da ima dobro ponovljivost(15).

Tudi mednarodno združenje za klinično kemijo (IFCC), je ustanovilo delovno skupino za standardizacijo določanja glikiranega hemoglobina. Kot del tega programa je opredeljen analit, kot primarni referenčni material, ki je zmes prečiščenega kromatografskega HbA_{1c} in HbA₀ v liofilizirani obliki. Na podlagi referenčnega materiala, so uvedli referenčno metodo, ki temelji na kromatografskem ločevanju in indentifikaciji HbA_{1c}. Metoda ima dobro znotraj in med laboratorijsko ponovljivost (CV=1,5%).

Potrebno je bilo uskladiti standardizacijo glikiranega hemoglobina, ker sta bila uvedna dva načina standardizacije. Prvi načini je bil uveden iz strani DCCT in UKSPD, drugi način pa je bil uveden iz strani IFCC. Evropska unija je zahtevala, da se za vse proizvajalce, ki prodajajo svoje reagente na njenem območju, uporablja sledljivost rezultatov v skladu z IFCC referenčno metodo.

Zato so se naslednje organizacije: NGSP, IDF, ADA, ISPAD in ESAD sestale, da bi podprle referenčno metodo IFCC in priporočile njen način uporabe.

Pomembno pri standardizaciji glikiranega hemoglobina je analitična usklajenost, poenotenje rezultatov glikiranega hemoglobina med laboratoriji, uporaba navedene referenčne metode in čistega referenčnega materiala. Vedeti je potrebno, da so referenčne metode dovolj natančne, a ne dovolj specifične. Laboratorijska biomedicina je v primeru HbA_{1c}, upoštevala dejstvo, da delovna skupina za standardizacijo ne skrbi samo za metodologijo, ampak je potrebna za izpolnjevanje ciljev klinične medicine, v tem primeru diabetologije.⁽¹⁵⁾

Splošne uskladitve projekta za določanje HbA_{1c}, je danes vsaka temeljna naloga kliničnih in laboratorijskih področji, ki so vključene v diabetološko področje medicine. V ta projekt so vključene, tudi vse pomembne mednarodne ustanove, kar iz ene strani kaže na pomembnost reševanja tega problema in iz druge strani daje jamstvo, da se bo ustvaril postavljeni cilj, ki je vzpostavitev enotnih ukrepov in spremljanje glikemične urejenosti. Medicinska in biokemijska stroka v Sloveniji ima polno odgovornost za stalno spremljanje in primerjanje mednarodnih standardov. Zato se v Sloveniji, pripravlja standardizacija glikiranega hemoglobina, v okviru Nacionalnega programa za obvladovanje sladkorne bolezni na Ministrstvu za zdravje, strategija razvoja 2010-2020.⁽¹⁵⁾

V diplomskem delu smo primerjali referenčno afinitetno kromatografsko metodo, z imunokemijsko metodo. Primerjavo smo izvedli na način, da smo določili odstotek glikiranega hemoglobina v 100 vzorcih polne krvi z dodatkom EDTA bolnikov iz Diabetološke ambulante Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. Najprej smo določili odstotek glikiranega hemoglobina na analizatorju Primus PDQ, potem pa smo istim vzorcem določili odstotek glikiranega hemoglobina še na analizatorju Cobas C 311. Analizatorja nimata istih referenčnih vrednosti, analizator PDQ ima referenčne vrednosti: 4,2-6,4%; analizator Cobas C311 pa ima referenčne vrednosti: 4,8-5,9%. Da smo ugotovili, povezanost podatkov med analizatorjema, smo izračunali korelacijski koeficient ($r=0,979869$), kar pomeni dobro ujemanje izmerjenih rezultatov na analizatorjih. Iz statističnega t-testa smo ugotovili, da sta srednji vrednosti statistično različni, saj je $p<0,05$ ($p=0,02$). Pomembno dejstvo je, da če določamo odstotek glikiranega hemoglobina po imuno metodi, je potrebno upoštevati, razne hemoglobinopatije (Hb S, C, E, D, Graz, Sherwood Forest, in Padova), saj te motnje lahko povzročijo lažno zvišane vrednosti glikiranega hemoglobina. Afinitetna metoda, ima še vedno prednost pred imuno-kemijsko metodo, saj to metodo za določanje glikiranega hemoglobina ne motijo razne hemoglobinopatije (Hb S, C, E, D, Graz, Sherwood Forest, in Padova).

6. SKLEP

1. Določili smo odstotek glikiranega hemoglobina z metodo afinitetne kromatografije in imuno metodo na dveh različnih analizatorjih, v polni krvi 100 bolnikov z dodatkom EDTA iz Diabetološke ambulante Splošne bolnišnice Slovenj Gradec.
2. Pri določanju glikiranega hemoglobina z imunsko metodo je potrebno upoštevati, razne hemoglobinopatije (Hb S, C, E, D, Graz, Sherwood Forest, in Padova), saj te motnje lahko povzročijo lažno zvišane vrednosti glikiranega hemoglobina.
3. Afinitetna kromatografija ne motijo razne hemoglobinopatije (Hb S, C, E, D, Graz, Sherwood Forest, in Padova) pri določevanju odstotka glikiranega hemoglobina.
4. Izračunali smo korelacijski koeficient, ki je $r=0,979869$, kar pomeni da je dobro ujemanje podatkov med analizatorjem Primus PDQ in Cobas C 311.
5. Izvedli smo t-test in ugotovili, da se metodi med seboj razlikujeta ($p=0,02$). To pomeni, da sta srednji vrednosti statistično različni, ker je $p<0,05$.
6. Kromatografska afinitetna metoda ima območje referenčnih vrednosti od 4,2-6,4%. Tisti vzorci, ki so bili izmerjeni na analizatorju Primus PDQ in so imeli višje vrednosti od 6,4% so bili izven območja referenčnih vrednostih in teh je bilo 74, kar pomeni, da ti sladkorni bolniki nimajo urejene sladkorne bolezni.
7. Imunska metoda ima območje referenčnih vrednostih od 4,8-5,9%. Tisti vzorci, ki so bili izmerjeni na analizatorju Cobas C311 in so imeli višje vrednosti od 5,9% so bili izven območja referenčnih vrednostih, in teh je bilo 79, kar pomeni da ti bolniki nimajo urejene sladkorne bolezni.

8. V območje priporočenih vrednosti je bilo 25 vzorcev po metodi afinitetne kromatografije, in 21 vzorcev po imuno metodi. To pomeni, da imajo bolniki urejeno sladkorno bolezen.

9. Iz grafa normalnih vrednosti smo ugotovili, da je pet vzorcev izmerjenih na analizatorju Primus, PDQ, ki ima območje priporočenih vrednosti od 4,2-6,4%. Da je teh pet vzorcev glede na analizator Cobas C311 izven priporočenih vrednosti analizatorja Cobas C311, ki ima območje priporočenih vrednosti od 4,8-5,9%. Dve vrednosti, ki sta izmerjeni na imuno kemijskem analizatorju Cobas C 311 sta povišani, pri analizatorju Primus PDQ pa sta še v območju referenčnih vrednosti. Vse ostale vrednosti so pri obeh metodah zvišane in so izven referenčnih vrednosti analizatorjev.

7. LITERATURA

1. Lukač Bajalo J. Novelirani pristopi v laboratorijski diagnostiki in spremljanju sladkorne bolezni. Farmaceutski vestnik 2005; 56:241-248
2. Bruns E.D. and Boyd J.C. Few Point-of-Care Hemoglobin A1c Assay Methods Meet Clinical Needs. Clinical Chemistry 2010; 56:4-6
3. Lenters-Westra E. and Singerland R. J. Six of Eight Hemoglobin A1c Point-of-Care Instruments DoNot Meet the General Accepted Analytical Performance Criteria. Clinical Chemistry. 2010; 56:44-52
4. Internetni viri : Harmonizing hemoglobin A_{1c}. Testing <http://www.ngsp.org/>. 10.5.2010
5. Možina B, Zupančič M., Joković Ž., Prezelj M., Lukač Bajalo J., Glikohemoglobin-validacija in primerjava postopkov. Farmaceutski vestnik 1994;45:239-251
6. Mežnarc A. Standardiziran operacijski sistem, Splošne bolnišnice Slovenj Gradec. 2007:1-3
7. Navodila za uporabo analizatorja Cobas C311. 2006:1-4
8. Davis J. Navodila za uporabo analizatorja Primus Corporation (PDQ). 2009:1-143
9. Jerin A. Motnje v presnovi ogljikovih hidratov in sladkorna bolezen. Seminarska naloga 2000:20-24
10. Boyer R. Temelji biokemije, 2005:634-83
11. Internetni viri: Zveza društev diabetikov Slovenije. <http://www.diabetes-zveza.si/>.11.6.2010
12. Internetni viri: Sandwalk. <http://sandwalk.blogspot.com/2007/08/heme-groups.html>. 3.8.2010

13. Internetni viri:

MatFrisk Blogg .<http://diabetescenter.blogspot.com/2007/07/change-may-be-in-works-for-ba1c.html>. 15.7.2010

14. Internetni viri:

DiamondDiagnostic.http://www.diamonddiagnostics.com/equipment/Chem/Roche_Cobas_C311.htm. 18.7.2010

15. Vučić M., Topić E. Hemoglobin A_{1c}: Standardizacija "zlatnog standarda". *Biochemia Medica*. 2006;16:25-36

PRILOGA

Preglednica I: Rezultati koncentracije glikiranega hemoglobina v polni krvi na obeh analizatorjih.

Zaporedna številka	Primus PDQ	Cobas c 311	Spol	Starost
	%	%		
1.	7,6	7	Ž	84
2.	6,8	6,4	M	84
3.	8,4	7,9	Ž	59
4.	6,6	6,6	M	82
5.	8,3	7,6	Ž	52
6.	6,2	5,9	M	82
7.	10	8,9	Ž	53
8.	5,3	5,1	Ž	29
9.	7,5	6,4	M	51
10.	7,5	6,7	M	65
11.	7,6	6,5	M	60
12.	10,1	8,8	M	58
13.	6,7	6,5	Ž	79
14.	7,7	7,2	M	51
15.	5,3	4,9	Ž	25
16.	7,1	6,9	Ž	79
17.	6,3	5,9	M	64
18.	6	5,5	Ž	37
19.	9,7	8,3	M	63
20.	12,5	11,3	Ž	60
21.	10,4	9,6	Ž	63
22.	6,5	6,2	M	64
23.	5,5	5,3	Ž	39
24.	5,8	5,6	M	60
25.	6,9	6,5	M	75
26.	8,2	7,3	M	52
27.	7,8	7,8	Ž	39
28.	5,8	5,4	M	50
29.	11,9	10,5	M	38
30.	10,1	9	Ž	57
31.	5,7	5,5	Ž	55
32.	6,4	6,1	M	51
33.	8,5	7,2	M	60

Zaporedna številka	Primus PDQ	Cobas c311	Spol	Starost
34.	9,6	8,5	M	77
35.	10,3	9,2	Ž	55
36.	7,5	6,9	M	69
37.	8,3	7,5	M	23
38.	7,3	6,8	Ž	57
39.	9,5	8,9	Ž	60
40.	6,7	6,2	Ž	62
41.	6,5	6,1	M	58
42.	7,9	7,8	Ž	45
43.	8	7,5	Ž	71
44.	6	6	M	87
45.	7	7,3	M	80
46.	8,5	8	M	30
47.	6,7	6,4	M	79
48.	7,2	7,1	Ž	81
49.	8,9	8,8	M	62
50.	6,5	6,6	M	73
51.	4,8	5	Ž	25
52.	6,9	6,7	Ž	71
53.	5,2	5,5	Ž	31
54.	10,4	9,5	M	56
55.	10,2	9,4	M	59
56.	8	7,3	Ž	88
57.	5,5	5,2	Ž	23
58.	7,5	6,8	Ž	58
59.	6,4	6	Ž	78
60.	7,8	7,3	Ž	77
61.	7,4	7,1	Ž	64
62.	9,5	8,9	M	75
63.	6,9	6,3	M	70
64.	6,2	5,7	M	65
65.	5,1	5,1	Ž	39
66.	7,1	6,8	Ž	37
67.	10,4	10,2	Ž	74
68.	11,7	11,2	Ž	37
69.	7,2	6,8	M	68
70.	10,6	10,4	Ž	75
71.	7,2	7,2	Ž	64
72.	6,3	6,4	M	68
73.	5,9	5,6	Ž	29

Zaporedna številka	Primus PDQ	Cobas c311	Spol	Starost
74.	11	9,5	M	57
75.	7,8	7,2	M	62
76.	9,9	9,1	Ž	56
77.	8,9	8	Ž	42
78.	6,8	7,3	Ž	80
79.	6,3	6	M	66
80.	5,8	5,7	Ž	39
81.	8,8	8,1	Ž	60
82.	5,5	5,3	Ž	27
83.	6,1	5,8	M	55
84.	8,1	7,6	M	75
85.	10,1	9,5	Ž	67
86.	7,8	7,2	Ž	74
87.	7,2	6,6	Ž	52
88.	7,1	6,5	M	59
89.	7,3	7,2	Ž	71
90.	5,2	5,1	Ž	44
91.	7,6	6,7	M	23
92.	5	4,8	Ž	27
93.	11,1	10,7	M	2
94.	6	5,5	M	78
95.	10,1	9,1	Ž	61
96.	6,8	6,2	M	48
97.	8,1	8,1	M	50
98.	9,5	8,6	Ž	39
99.	8,9	8,2	Ž	37
100.	10,1	9	M	45