

BIOHEMIJA FORMIRANJA I ANALIZA GLIKOHEMOGLOBINA

Marijana Dajak

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Kratak sadržaj: Glukoza i drugi monosaharidi reaguju, u zavisnosti od njihove koncentracije, sa slobodnim amino grupama proteina. S druge strane, konfiguracija proteina i reaktivnost njihovih amino grupa su odlučujući faktori za kinetiku reakcije. Glikoproteini se mogu dalje transformisati u Maillard-ove produkte, za koje se smatra da su uključeni u razvoj hroničnih komplikacija dijabetesa. Glikozilirani hemoglobin ima klinički značaj kao indikator dugoročne kontrole glikemije. Za njegovo određivanje razvijen je veliki broj analitičkih metoda i sve one se zasnivaju na razdvajanju glikozilirane i neglikozilirane frakcije iz hemolizata eritrocita na osnovu njihovih različitih fizičkih i hemijskih osobina. Kod metoda koje se danas koriste, razdvajanje frakcija se zasniva ili na razlikama u naelektrisanju (jonoizmenjivačka hromatografija i elektroforetske tehnike) ili na strukturnim razlikama (afinitivna hromatografija i imunohemijske metode). U zavisnosti od metode, pri određivanju glikohemoglobina mogu interferirati: labilna frakcija, abnormalni hemoglobini, ikteričnost ili lipemičnost uzorka, acetilisani hemoglobin, karbamilisani hemoglobin i hematološki poremećaji, pa se o tome mora voditi računa pri interpretaciji rezultata.

Ključne reči: glikohemoglobini, Maillard-ova reakcija, jonoizmenjivačka hromatografija, elektroendoosmoza, afinitivna hromatografija, imunoodređivanje, interferencije.

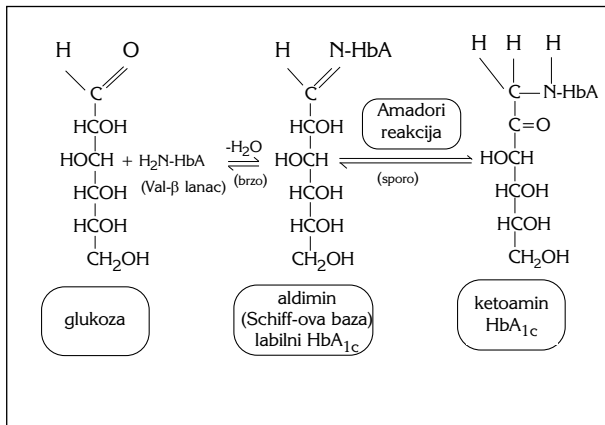
Uvod

Humani hemoglobin (Hb) se normalno sastoji iz HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) i HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Sinteza ovih hemoglobina je genetski kontrolisana; α , β , γ i δ lanci su kodirani različitim genima. Deo HbA koji podleže glikozilaciji označen je kao HbA₁. Hromatografskom analizom razdvojene su frakcije HbA₁ i to: HbA_{1a}, HbA_{1b} i HbA_{1c}. To su glikozilirani Hb ili glukozilirani Hb, a najčešće se zovu glikohemoglobini. Nazivaju se i »brzim« hemoglobinima zato što migriraju brže u električnom polju nego HbA₀. HbA_{1c} čini 75–80% od ukupnog glikoziliranog hemoglobina. HbA_{1a} se razdvaja u dve subfrakcije: HbA_{1a1} i HbA_{1a2}. Procentualna zastupljenost ovih frakcija je sledeća:

- HbA (95–97% od ukupnog Hb):
 - HbA₀ (90% od ukupnog Hb) - neglikozilirana frakcija
 - HbA₁ (5–7% od ukupnog Hb) - ukupan glikozilirani Hb
- HbA₂ (< 3% od ukupnog Hb)
- HbF (< 1% od ukupnog Hb).

Biohemija reakcije glikozilacije

U organizmu se glukoza i drugi ugljeni hidrati vezuju za proteine kao što su npr. hemoglobin, kolagen i albumin. Taj proces se naziva glikozilacija i neenzimske je prirode. Inicijalna faza u reakciji glikozilacije je kondenzacija slobodne aldehidne grupe ugljenog hidrata s ϵ -amino grupom ostatka lizina ili hidrosilizina ili s α -amino grupom N-terminalne aminokiseline proteina. Glukoza i drugi monosaharidi se nalaze uglavnom u vidu prstenastih struktura, a s proteinima reaguju samo njihovi aciklični oblici. Karbonilna grupa otvorenog lanca monosaharida napada kao nukleofil amino grupu proteina pri čemu se formira nestabilna Schiff-ova baza (aldimin). Ovaj intermedijer zatim podleže Amadori reakciji pri kojoj se transformiše u stabilan ketoamin (derivat 1-amino-1-deoksifruktoze) ili može ponovo da se hidrolizuje do šećera i proteina. Amadori reakcija je samo delimično reverzibilna. Aldimin i ketoamin su uglavnom u vidu svojih cikličnih formi i to: aldimin kao N-supstituisani aldozilamin, a ketoamin kao N-supstituisani-1-amino-deoksiketopiranoza. Brzina Amadori reakcije varira u zavisnosti od proteina; npr. ova reakcija je oko 5 puta brža kod albumina nego kod Hb (1–4).



Slika 1. Reakcija glikozilacije HbA

Pri glikozilaciji Hb glukoza se vezuje za N-terminalni valin β -lanca i nastali krajnji proizvod je HbA_{1c}. Intermedijer tj. Schiff-ova baza se u literaturi naziva labilni HbA_{1c} ili pre-HbA_{1c} (Slika 1). Ova reakcija je atipična jer se kod drugih proteina glukoza uglavnom vezuje za bočne lance preko ostataka lizina i hidroksilizina. Pored glukoze i drugi šećeri kao što su: glukoza-6-fosfat (prisutna kod HbA_{1a2}), fruktoza-1,6-difosfat (prisutna kod HbA_{1a1}), galaktoza, manoz, riboza i ksiluloza, mogu učestvovati u procesu glikozilacije (5). Među monosaharidima relativna aktivnost prema proteinima veoma varira i umnogome zavisi od ravnoteže između reaktivne, otvorene, aciklične (karbonil) i nereaktivne, zatvorene, ciklične (hemiacetal) konfiguracije šećera. Aldoze reaguju mnogo brže nego ketoze, zato što su njihove aldehidne grupe jači elektrofilni nego one kod ketoza. Glukoza je jedna od najmanje reaktivnih aldoza, ali je bez obzira na to najzastupljeniji monosaharid u humanim glikoziliranim proteinima. Glukoza u Hb ne reaguje samo s jedan ili oba N-terminalna valina α lanca, već i s N-terminalnim valinom α lanca kao i s ϵ amino grupama lizina oba α i β lanca.

Brzina neenzimske glikozilacije Hb zavisna je od koncentracije reaktanata i pristupa reaktivnim mestima u molekuli reaktanata, pH sredine i mikrosredine (6, 7). Koncentracija glukoze u cirkulaciji i dužina izloženosti Hb glukozi u eritrocitima su najodgovornije za visinu nivoa HbA_{1c}. Glukoza ulazi u eritrocite putem svog nosača. Eritrociti ne poseduju enzime koji su sposobni da razlože ketoamin, pa njihova eliminacija nije moguća sve dok ne dođe do razgradnje Hb u toku propadanja eritrocita. Prema tome, poluživot Hb, pa i HbA_{1c} je definisan dužinom života eritrocita koji je relativno konstantan i iznosi 100-120 dana. U bolestima gde je skraćen vek eritrocita (hemolitična anemija) dolazi do lažnog sniženja vrednosti HbA_{1c} i obrnuto u stanjima s produženim životom eritrocita (policitemija) povećava se nivo HbA_{1c}.

U procesu glikozilacije važna je pH sredina. Povećanje pH dovodi do povećanog prelaza glukoze u cikličnu, aktivnu strukturnu formu, kao i do povećanog pri-

sustva amino grupe N-terminalne aminokiseline globinskih lanaca u nenaelektrisanom odnosno aktivnom formi. pKa vrednost N-terminalnog valina je znatno niža nego pKa ϵ -amino grupa, što čini valin znatno efektivnijim nukleofilom u inicijalnoj kondenzaciji, tj. znatno brže reaguje pri formiranju Schiff-ove baze. Stvaranje sledećeg produkta, ketoamina, blago snižava vrednost pKa molekule Hb, što omogućava razdvajanje HbA_{1c} kao posebne komponente u jonoizmenjivačkoj hromatografiji i elektroforezi. Pošto je pKa ϵ -amino grupa oko 4 pH jedinice viši od pKa α -amino grupe, supstitucija glukoze na ostatke lizina neće dovesti do promene naelektrisanja molekule Hb. Zbog toga hromatografski pri pH 7 neće doći do razdvajanja supstituisanih lizina zato što su i supstituisane i slobodne ϵ -amino grupe kompletno pozitivno naelektrisane.

Pored pH bitna je i lokalna mikrosredina, odnosno lokalna acido-bazna kataliza i to naročito za drugu fazu glikozilacije Amadori reakciju. Da je ovaj efekat dominantan kod većine proteina pokazuje to da je Amadori produkt skoro uvek prisutan na njihovim bočnim lizinskim ostacima. Prisustvo negativno naelektrisanog 2,3-difosfoglicerata u blizini N-terminalnog valina β -lanca Hb podstiče baznu katalizu Amadori reakcije i objašnjava neobičnu i znatno povećanu reaktivnost α -amino grupa. S druge strane, odgovarajući N-terminalni valini α -lanca Hb se glikoziliraju za oko 10 puta manjom brzinom. Intraindividualne varijacije u nivoima HbA_{1c} se delimično objašnjavaju putem razlika u intraeritrocitnoj koncentraciji difosfoglicerata.

Krajnji produkti glikozilacije

Formiranje Amadori produkta smatra se da je prvi korak u Maillard-ovoj reakciji, koja se još zove i reakcija »braonjenja« (engl. browning reaction). Prvi put je opisana 1912. godine kada je primećeno da aminokiseline zagrevane u prisustvu redukujućih šećera razvijaju žuto-braon boju. Amadori produkt može dalje biti izložen seriji reakcija dehidratacije i reorganizacije (7). On može spontano da se fragmentira, oslobađajući reaktivna ketoaldehid-dikarbonil jedinjenja (deoksiglukozone), među kojima je 3-deoksiglukozon najznačajniji. Deoksiglukozoni dalje reaguju s amino grupama proteina i formiraju intraproteinske unakrsne veze poznate kao »uznapredovali glikozilacioni krajnji proizvodi« (engl. advanced glycation endproducts - AGE). Ovi produkti se mogu verovatno formirati i kondenzacijom dva Amadori produkta ili reakcijom deoksiglukozona s Amadori proizvodom. To su ireverzibilni produkti i akumuliraju se tokom životnog veka proteina. Većina produkata su fluorescentni, što je iskorišćeno za njihovo merenje u kliničkim ispitivanjima (9). Do sada je opisano nekoliko ovih produkata kao što su:

- 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazol (FFI)
- pentozidin
- 1-alkil-2-formil-3,4-diglikozilpirol (AFGP)
- 5-hidroksimetil-1-neopentilpirol-2-karbaldehid (piralin).

Smatra se da se FFI stvara kondenzacijom dva Amadori produkta, mada po nekim istraživanjima verovatnije je da se on stvara iz Amadori produkta prilikom merenja. Pokazano je da se pentozidin sastoji od lizina i arginina unakrsno povezanih ribozom ili nekim drugim jedinjenjima kao što su: glukoza, fruktoza ili askorbinska kiselina. Nivoi pentozidina u tkivu rastu sa starenjem i povećani su kod dijabetičara u krajnjoj fazi renalne insuficijencije. AFGP i piralin su takođe opisani u literaturi kao Maillard-ovi proizvodi, kao i njihova uloga u komplikacijama dijabetesa (10).

Krajnji produkti glikozilacije proteina su u vezi s poremećajem njihove funkcionalne aktivnosti, pa se predpostavlja da su uključeni i u razvoj hroničnih komplikacija dijabetesa (Tabela I).

Tabela I Primeri proteina uključenih u etiologiju dijabetičnih komplikacija za koje je pokazano da su podlegli Maillard-ovoj reakciji

Komplikacija	Protein
Nefropatija	Bazalna membrana glomerula Fibronektin i kolagen tip IV
Tromboembolički poremećaji	Fibrinogen Proteini trombocita Heparinski kofaktor II
Ateroskleroza	Lipoproteini veoma niske gustine Lipoproteini velike gustine Lipoproteini niske gustine Kolagen aorte
Neuropatija	Mijelin
Katarakta	Kristalini sočiva Aldolaza reduktaza
Heiroartropatija	Kolagen kože
Mikrovaskularne bolesti	Kolagen tip IV

Analiza glikohemoglobina

Glikohemoglobin je indikator dugoročne kontrole glikemije i odgovara prosečnoj koncentraciji glukoze u krvi u toku života eritrocita, tj. u toku poslednja 2-3 meseca. Za merenje glikohemoglobina razvijen je veliki broj analitičkih metoda i sve one se zasnivaju na razdvajanju glikozilirane (HbA_1) i neglikozilirane frakcije (HbA_0) iz hemolizata eritrocita na osnovu njihovih različitih fizičkih ili hemijskih osobina (11). Rezultati glikoziliranog Hb se izražavaju kao procenti u odnosu na ukupan Hb. Metode za određivanje glikohemoglobina se mogu podeliti u 3 grupe i to na osnovu toga da li se razdvajanje frakcija zasniva na:

- razlikama u naelektrisanju
- strukturnim razlikama ili
- hemijskim karakteristikama.

Od hemijskih metoda u literaturi se pominje određivanje gde se iz HbA_{1c} hidrolizom dobija 5-hidroksimetilfurfural koji reaguje s tiobarbiturnom kiselinom

i daje obojeni proizvod; kao i metoda gde s inozitolheksafosfatom reaguje HbA_0 i menja njegov apsorpcioni spektar (12). Ove metode se uglavnom više ne koriste.

S obzirom na to da između vrednosti HbA_1 i HbA_{1c} postoji visok stepen korelacije nema kliničkog značaja da li će biti određivan HbA_1 ili HbA_{1c} .

Metode koje se zasnivaju na razlikama u naelektrisanju

Vezivanje glukoze za N-terminalni valin β -lanca Hb snižava njegovu izoelektričnu tačku, odnosno dovodi do gubitka pozitivnog naelektrisanja na površini molekule. Ova blaga ali značajna promena u naelektrisanju omogućava razdvajanje HbA_1 , jer on brže migrira u električnom polju ili na katjonskoj izmenjivačkoj koloni u odnosu na HbA_0 . Zbog ovakvog ponašanja pri razdvajanju glikohemoglobini su dobili originalan naziv »brzi« hemoglobini.

Hromatografske procedure

Jonoizmenjivačka hromatografija. Kod jonoizmenjivačkih hromatografskih metoda jonska jačina i pH eluirajućeg pufera se biraju tako da su glikohemoglobini manje pozitivno naelektrisani od HbA_0 , pa se ne vezuju na negativno naelektrisanu smolu i eluiraju se prvi. Sekundarni pufer služi za eluciju preostalog Hb, a HbA_1 se izračunava kao procentualna vrednost u odnosu na ukupni Hb.

Prve hromatografske procedure su koristile duge kolone, a vreme separacije je trajalo i po nekoliko dana. Trivelli i sar. (13) su 1971. godine opisali metodu na kraćim jonoizmenjivačkim kolonama sa kojih je brza frakcija bila uklonjena s 0,055 mmol/L fosfatnim puferom, pH 6,70 (HbA_{1a+b} i HbA_{1c} su eluirani posebno). Posle toga preostali Hb (HbA_0 i HbA_2) su bili uklonjeni s 0,15 mmol/L fosfatnim puferom, pH 6,42. U sastavu oba pufera nalazi se i 0,01 mmol/L kalijum-cijanid. Apsorbancija eluiranih frakcija je izmerena na 415 nm. Hromatografske metode na minikolonama koje su kasnije korišćene su modifikacija originalne Trivelli metode i one su koristile slabo kiselu katjonsku izmenjivačku smolu (Bio-Rex 70). Međutim ove metode su pokazale slabu reproducibilnost jer zavise od promena temperature i pH vrednosti, a takođe interferiraju i lipemični uzorci i Schiff-ova baza (labilna frakcija). Promene u temperaturi mogu biti uklonjene kalibracijom, a labilna frakcija korišćenjem »blokatora glukoze« u reagensu za hemolizu (npr. boratni joni vezujući glukoze uklanjaju je iz povratne reakcije i time ravnotežu pomeraju u smeru razgradnje Schiff-ove baze).

Razdvajanje HbA_1 se može vršiti i u epruvetama (»batch« tehnika), vezivanjem HbA_0 na suspendovan jonski izmenjivač. Rastvor koji sadrži HbA_1 frakciju odvaja se filtriranjem ili centrifugiranjem.

HPLC tehnika. Metode koje se zasnivaju na tečnoj hromatografiji visokog učinka HPLC (high-performance liquid chromatography) su opisane još 1978. godine (14). Ove metode koriste katjonsku izmenjivačku smolu, dobro razdvajaju frakcije, brze su (20–30 minuta za analizu) i prihvatljive su reproducibilnosti (koeficijenti varijacije KV su 5–10%). Automatizovane HPLC metode su prvi put opisane sledeće godine i pokazale su odličnu unutar- i međuserijsku preciznost (15).

Trenutno HPLC sistemi za određivanje HbA_{1c} ili HbA_{1c} su široko komercijalno dostupni i većina je visoko automatizovana jer poseduje »bar code« čitanje, unošenje velikog broja uzoraka (putem nosača za uzorke »rack feed«), mogućnost rada s zatvorenim sistemom (uzorkovanje iz zatvorenih epruveta), kao i veliku protočnost analiza (*engl.* throughput) (16). Ovi sistemi se mogu podeliti na osnovu toga da li rade pod niskim ili visokim pritiskom.

HPLC sistemi s niskim pritiskom su sledeći analizatori: Glycomat (Ciba Corning), Diastat (Bio Rad) i Hb Gold (Menarini). Oni koriste binarni gradijent i minikolone na kojima može da se uradi i do 150 uzoraka, zadovoljavajuće su preciznosti (KV 3,9–6,6%) i mogu da urade 6–12 uzoraka na sat. Oni se obično koriste u manjim laboratorijama i kao »point of care« analizatori. Fetalni Hb (HbF) interferira u ovim metodama.

HPLC sistemi s visokim pritiskom. U ovoj grupi se nalazi Diamant (Bio Rad), analizator koji je korišćen u »Diabetes Control and Complication Trial« (DCCT). Ovaj automatizovani sistem ima visoku protočnost uzorka, ali zahteva predtretman (hemoliza eritrocita) kojim se uklanja labilna frakcija i traje 30 minuta. Diamant koristi tercijalni gradijent (3 fosfatna pufera rastuće jonske jačine), a rezultati se izračunavaju poređenjem s kalibracionim hromatogramima iz memorije aparata koji su neophodni i za korekciju širenja hromatografskog pika usled starenja kolone. Brži sistem od Diamant-a je Variant (takođe Bio Rad-ov), ali se i kod njega radi predtretman uzorka.

Noviji HPLC sistemi imaju poboljšanu protočnost uzorka. Međutim povećanje brzine analiza ide na račun smanjenja kvaliteta hromatografskog razdvajanja, tj. potpuno razdvajanje nije stvarno postignuto. Međutim, bez obzira na to, preciznost ovih aparata je odlična (KV < 1,5%).

Arkay Menarini Diagnostics AutoA_{1c} HA 8140 i HA 8121 su potpuno automatizovani jer mogu sami da razblaže, hemoliziraju uzorak i uklone Schiff-ovu bazu (17). Uklanjanje labilne frakcije se postiže inkubacijom s tetrapolifosfatom (pH 6,0) 2 minuta na 48 °C. Takođe imaju »bar code« očitavanje i pipetiraju uzorak iz zatvorene epruvete i s dna epruvete. Vreme analize je 4 minuta. Abnormalni Hb ne interferiraju. Kod Tosoh HPL-723 GHbV, A_{1c2.2} sistema interferencija labilne frakcije je rešena tako što se ona razdvaja kao posebna merljiva frakcija (18).

Jedno vreme je jonoizmenjivačka HPLC tehnika smatrana referentnom metodom zbog svoje velike preciznosti i strogo kontrolisanih uslova.

Elektroforeza

Elektroforetske metode za određivanje glikohemoglobina nisu osetljive na promene u temperaturi i pH, mogu da detektuju abnormalne hemoglobine i rezultati su im u korelaciji s HPLC tehnikom. Međutim ove metode su manje popularne zbog dugog vremena analize i posledične niske protočnosti uzorka.

Elektroendoosmoza na agar gelu. Glikozilacija Hb na N-terminalnom valinu menja njegovu izoelektričnu tačku, ali samo za 0,01 pH jedinicu. 1980. godine Menard i sar. (19) opisali su metodu u kojoj je razdvajanje HbA₁ postignuto elektroendoosmozom na agar gel pločama i uz korišćenje citratnog pufera. U ovom postupku HbA₀ je pozitivnije naelektrisan od HbA₁, pa jače reaguje s fiksiranim negativnim naelektrisanjem gel matriksa, dok je HbA₁ »odnošen« ka katodi elektroendoosmotskim protokom pufera. Razdvojene trake se denzitometrišu na 420 nm. Elektroforetski test firme CIBA Corning se zasniva na ovom principu. Ovom metodom mogu da se detektuju HbS i HbC, ali HbF interferira jer ima istu elektroforetsku mobilnost kao HbA₁ (20).

Poslednjih godina elektroforetske tehnike su znatno unapređene i automatizovane. Tako npr. elektroforetsko razdvajanje je poboljšano zamenom agar gela s agarozom gelom, što je slučaj kod Paragon EPG sistema (Diatrac, Beckman) koji meri HbA_{1c}. Takođe primenom *izoelektričnog fokusiranja* dobro se razdvajaju ne samo HbA_{1c} već i HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbS i HbF (12).

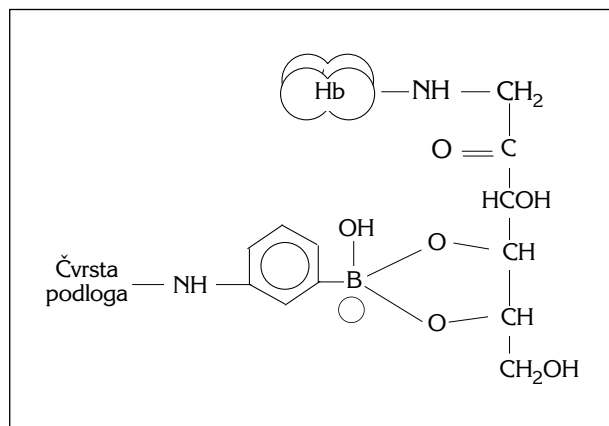
Primer *automatizovanog sistema* je elektroforetski sistem REP (Helena Laboratories) koji koristi kombinaciju agar elektroforeze i jonsko izmenjivačke tehnike za razdvajanje i određivanje HbA₁ (21).

Metode koje se zasnivaju na strukturnim razlikama

Afinitivna hromatografija

Princip ove metode je specifično ireverzibilno vezivanje 1,2-*cis* diol grupa glikohemoglobina za boronat koji je vezan na inertnu čvrstu podlogu.

Manuelna afinitivna hromatografija. Afinitivno razdvajanje glikohemoglobina su prvi put 1981. godine opisali Mallia i sar. (22). U afinitivnoj koloni *m*-aminofenilborna kiselina je kovalentno vezana za agarozni gel. U vodenom rastvoru ona se jonizuje i iz trigonalne strukture prelazi u tetraedalan anjon. U ovoj anjonskoj formi, gde je veza između kiseonika i bora kratka, borna kiselina je posebno reaktivna prema *cis*-1,2-diol grupama. Iz hemolizata koji se propušta kroz kolonu, glukoza vezana u HbA₁ se svojim *cis*-diol grupama vezuje za boratne jone, dok se HbA₀ direktno eluira s



Slika 2. Vezivanje glukoze iz HbA_{1c} za imobilizovanu *m*-aminofenilbornu kiselinu

kolone. U interakciji između *cis* diol grupa HbA_{1c} i boratnog jona stvara se kompleks ciklične strukture; vezivanju doprinose i jonske i hidrofobne sile (Slika 2). Posle eluiranja HbA₀, vezani HbA_{1c} se oslobađa s kolone korišćenjem polihidroksi jedinjenja s *cis*-hidroksi grupama (npr. sorbitol), koje se efektivno takmiče s vezanim HbA_{1c}. Apsorbancija frakcija Hb se meri na 414 nm. Na ovu metodu ne utiču promene u temperaturi, uremija, HbF ili labilna frakcija (23). Abnormalni hemoglobini imaju neznatan efekat. U dobroj korelaciji s drugim metodama, ima dobru preciznost, mada je slaganje među laboratorijama manje zadovoljavajuće (24). Međutim, metoda je manuelno zahtevna i protočnost uzorka zavisi od broja kolona koje se istovremeno primenjuju.

Afinitivna HPLC tehnika. Da bi se poboljšala brzina analize i ograničio manuelni rad HPLC tehnologija je primenjena na afinitivnu separaciju. Primus CLC 330 i Bio Rad Variant Express su dva primera HPLC boronat afinitivnih separacionih sistema (25, 26). Oni imaju visoku analitičku protočnost (2 minuta po uzorku) i mere HbA_{1c} s dobrom preciznošću (KV < 3%). Rezultati HbA_{1c} se mogu prevesti u »DCCT HbA_{1c} vrednosti« korišćenjem linearne regresione jednačine iz memorije aparata.

Automatizacija. Afinitivno određivanje na Abbott IMx analizatoru je potpuno automatizovano (27). Matriks od staklenih vlakana u reakcionoj ćeliji IMx-a je obložen s visokomolekularnim kvarternim amonijumovim jedinjenjem. To daje pozitivno naelektrisanje mreži matriksa koja omogućava vezivanje anjonskog analita. Anjonski kompleksi se formiraju između molekula glikohemoglobina i polianjonskog afinitivnog reagensa sastavljenog od poliakrilne kiseline i dihidroksiborona. Dihidroksiboronat reaguje s *cis*-diol grupama HbA_{1c}. Glikohemoglobin se razdvaja od HbA₀ preko elektrostatičke interakcije između poliakrilne kiseline i katjonske čvrste faze. HbA_{1c} se određuje merenjem gašenja fluorescencije koja se dešava usled njegovog prisustva u matriksu (porfirinska grupa u Hb snižava fluorescenciju).

»Point of care« aparati. Glycosal Analyzer (Provalis) je brzi »point-of-care« instrument kod koga se afinitivno razdvajanje frakcija Hb odvija u nosaču s platformom za separaciju i sakupljanje HbA_{1c} i HbA₀ (28). Ovaj nosač je tako napravljen da uz korišćenje džepnog fotometra (HaemaQuant, Chelsea Instruments) mogu da se izmere apsorbancije frakcija Hb i izračuna rezultat za HbA_{1c}. Aparat se može kalibrirati da daje korigovan rezultat kao HbA_{1c}.

Imunoodređivanje

Antitela (At) specifična za N-terminalnu glikozilaciju Hb su osnova svih imunohemijskih metoda. Prvo određivanje zasnovano na ovom principu opisano je 1978. godine, ali tek posle 10 godina su bile komercijalno dostupne metode s zadovoljavajućim afinitetom i bez unakrsne reaktivnosti.

Enzimsko imunoodređivanje (EIA). Prve EIA metode koristile su monoklonalna At protiv HbA_{1c} koja prepoznaju prvih 8 aminokiselina β-lanca i vezanu glukozu. HbA_{1c} iz hemolizata se vezuje za At u mikrotitarskoj ploči; nevezani Hb se uklanja ispiranjem. Zatim se dodaju At obeležena enzimom (peroksidaza); posle ispiranja dodaje se supstrat (TMB-tetrametilbenzidin), razvija se boja; reakcija se stopira kiselinom i intenzitet meri na 450 nm (29). Izračunavanje se vrši preko kalibracione krive (vrednosti HbA_{1c} u kalibratorima su određene HPLC metodom). Referentne vrednosti su niže u odnosu na druge metode (2,8 4,9%). HbS i HbC ne interferiraju jer su njihove promene u strukturi na šestoj terminalnoj aminokiselini β-lanca (kod HbC glutaminska kiselina je zamenjena lizinom, a kod HbS valinom), a At prepoznaju prvih 8 aminokiselina. Ova metoda se danas malo koristi.

Imunoturbidimetrija. Boehringer Mannheim (sada Roche Diagnostics Systems) metoda je zasnovana fotometrijskom određivanju ukupnog Hb i imunoturbidimetrijskom određivanju HbA_{1c}. At koje prepoznaje prve 4 aminokiseline i glukozu na β-lancu Hb, reaguje s HbA_{1c} i daje rastvorljiv imunokompleks. Višak At se vezuje za polihaptene i stvaraju se aglutinirajući kompleksi koji se mere turbidimetrijski na 340 nm. Koncentracija HbA_{1c} u uzorku je prema tome obrnuto proporcionalna veličini aglutinacije odnosno turbiditetu. Ukupni Hb se meri istovremeno fotometrijski na 570 nm (30). Ova metoda se koristi pre svega na Hitachi analizatoru (Roche), ali se može prilagoditi i za upotrebu na drugim biohemijskim analizatorima. Pošto se koriste visokospecifična At, nema unakrsnog reagovanja s HbA₀, HbA_{1a}, HbA_{1b}, acetilisanim Hb, karbamilisanim Hb ili labilnom frakcijom. Interferencija od strane HbS i HbC je moguća, ali za sada to nije još dovoljno ispitano.

Firma Roche je uvela još jednu sličnu metodu u kojoj se koristi pepsin u hemolizirajućem reagensu da proteolitički razgradi i oslobodi β-N terminalnu strukturu (prve 3 aminokiseline β-lanca Hb) za imunoreakciju. Ukupan Hb se meri kolorimetrijskom metodom

bez cijanida zasnovanoj na stvaranju braon-zelenog alkalnog hematina D-575.

Imunoodređivanje na HbA_{1c} analizatoru DCA 2000. DCA je automatizovani sistem koji meri HbA_{1c} i ukupni Hb (31). Sistem se sastoji od malog spektrofotometra i reagens nosača koji sadrže sve neophodne reagense za jedan uzorak. Za merenje ukupnog Hb koristi se kalijum-fericijanid da oksiduje Hb u uzorku do methemoglobina. MetHb se vezuje s tiocijanatom i daje obojeni kompleks koji se meri na 531 nm. Za specifično merenje HbA_{1c} koristi se inhibicija lateks aglutinacije. Aglutinator (sintetički polimer koji sadrži višestruke kopije imunoreaktivnog dela HbA_{1c}) dovodi do aglutinacije lateksa obloženih s specifičnim mišjim monoklonalnim At protiv HbA_{1c} (tj. protiv prve 3 aminokiseline i vezane glukoze). Aglutinacija dovodi do povećanog rasejavanja svetlosti što se meri kao povećanje u apsorbciji na 531 nm. HbA_{1c} u uzorku krvi se takmiči za ograničen broj At na lateksu uslovljavajući inhibiciju aglutinacije i smanjeno rasejavanje svetlosti. Koncentracija HbA_{1c} se izračunava korišćenjem kalibracione krive unete u program aparata.

Ovaj analizator je dizajniran za upotrebu na klinici. Uzorak je kapilarna krv iz prsta, analizira se pojedinačno i rezultat je dostupan za 9 minuta.

Referentne vrednosti

Vrednosti glikohemoglobina se izražavaju kao udeo pojedinih frakcija u odnosu na ukupni Hb. Prema međunarodnom mernom sistemu (SI) one treba da budu izražene udelom frakcije do jedinice, ali kod većine komercijalnih testova one su izražene u procentima. Referentne vrednosti zavise od metode i frakcije koja se meri (HbA_{1c} ili HbA₁), a neki dogovoreni konsenzus bi bio: za HbA₁ 5-8%, a za HbA_{1c} 3-6%. Ne postoji specifičan opseg za dobru kontrolu i rezultate pacijenata bi trebalo interpretirati po individualnoj osnovi (12). Svetska Zdravstvena Organizacija preporučuje za kontrolu glikemije sledeće vrednosti za HbA_{1c}: < 6,5% - dobro kontrolisan, 6,5-7,5% - granične vrednosti i > 7,5% - loše kontrolisan nivo glikemije (32).

Uzorak za merenje glikohemoglobina

Sve metode za merenje glikohemoglobina zahtevaju malu količinu uzorka krvi, pa se može koristiti kapilarna krv. Nikakvi specijalni uslovi za vađenje krvi nisu potrebni, pacijent ne mora biti na tašte. Venska krv se obično sakuplja s EDTA, ali se mogu koristiti i heparin i fluorid/oksalat kao antikoagulansi. Fluorid/oksalat može interferirati u metodama gde je razdvajanje na osnovu naelektrisanja.

Uzorak krvi se može sakupiti na filter papiru koji je predhodno nakvašen s rastvorom koji sadrži glukozu oksidazu. Glukoza oksidaza vezuje slobodnu glukozu i sprečava brzu *in vitro* glikozilaciju hemoglobina za

vreme sušenja. Međutim ovaj inhibicioni efekat nije potpun i % glikohemoglobina raste s vremenom, ali u toku 14 dana promene su minimalne (33).

Čuvanje uzorka

U literaturi postoje različiti podaci o stabilnosti glikohemoglobina u uzorku ili u hemolizatu. Stabilnost je zavisna i od metode koja se koristi. U uzorku krvi s EDTA glikohemoglobin je stabilan 7 dana (mada po nekim autorima samo 1 dan), a u krvi s heparinom 3 dana na 4°C. Hemolizati eritrocita koji su odmah pripremljeni su stabilni najmanje 1-2 nedelje na 4°C. Kod produženo čuvanih uzoraka (3-4 dana) u eritrocitima se stvara glutationski produkt hemoglobina (HbA_{1d} / HbA_c) koji eluira s HbA_{1(a+b)} u jonoizmenjivačkim kolonama (32). Preporučuje se da svaka laboratorija utvrdi uslove čuvanja uzoraka, naročito ako postoji potreba za dužim čuvanjem (11, 12).

Interferencije

Na »tačnost« merenja glikohemoglobina datom metodom mogu uticati brojni interferirajući uslovi i supstance. Oni mogu direktno uticati na određivani glikohemoglobin ili mogu biti fiziološkog porekla.

Akutne promene koncentracije glukoze u krvi

Brzina glikozilacije Hb je funkcija koncentracije reaktanata, glukoze i Hb. Koncentracija Hb u organizmu je relativno konstantna, a prolazne akutne promene u koncentraciji glukoze imaju ograničen efekat na nivo HbA_{1c}, tako da promene u nivou HbA_{1c} primarno odražavaju dugoročne promene u koncentraciji glukoze. Međutim, koncentracija labilnog HbA_{1c} se brzo menja kao posledica kratkotrajnih promena nivoa glikemije u krvi. U literaturi je pokazano da se vrednost labilne frakcije paralelno menja s promenama u koncentraciji glukoze (11). Ova frakcija interferira u metodama koje se zasnivaju na razlikama u naelektrisanju, jer se ne može razdvojiti od stabilne frakcije i zbog toga bi je trebalo ukloniti pre određivanja. Ovo se može postići pranjem eritrocita u fiziološkom rastvoru, niskim pH ili hemijskom eliminacijom (32). Najjednostavnija, ali vremenski duga procedura je inkubacija eritrocita u izotoničnom rastvoru 6 sati na 37 °C ili preko noći na sobnoj temperaturi. Na metode koje se zasnivaju na strukturnim razlikama labilni HbA_{1c} ne utiče.

Hematološki poremećaji

Interpretacija vrednosti glikohemoglobina zavisi i od toga da li eritrociti imaju normalnu dužinu života. Skraćivanje veka eritrocita a time i hemoglobina vodi smanjenju glikozilacije i obratno. Sve bolesti s skraćenim vekom eritrocita, kao što su hronične hemolitične anemije dovode do lažno niskih vrednosti glikohemoglobina. Kod ovih pacijenata kao zamena za informa-

ciju o metaboličkoj kontroli, može pružiti određivanje drugih glikoziliranih proteina (npr. fruktozamina).

Kao posledica splenektomije produžava se vek eritrocita, ali to je minimalno tako da uglavnom kod ovih pacijenata nema značajnog lažnog povećanja vrednosti glikohemoglobina. Visoki nivoi HbA_{1c} pronađeni su kod anemija usled nedostatka gvožđa, verovatno zbog velike proporcije starih eritrocita (12, 32).

Kod transfuzija mora se uzeti u obzir procenat glikohemoglobina u odnosu na Hb iz transfuzovane krvi, kao i to da ona sadrži visoku koncentraciju glukoze.

Hemoglobinopatije

Na određivanje glikohemoglobina jonoizmenjivačkom hromatografijom, HPLC tehnikom i enzimskim imunoodređivanjem utiče prisustvo abnormalnih hemoglobina kao što su HbF, HbS i HbC. HbF i neke druge varijante hemoglobina se hromatografski istovremeno razdvajaju s HbA_{1c} što dovodi do lažnog povišenja rezultata. Kod dece do devetog meseca života se takođe očekuje interferencija od strane HbF (HbF je oko 80% od ukupnog Hb prisutan kod novorođenčadi i u prvom mesecu života opada na 1%). HbS i HbC se razdvajaju kao posebni pikovi u hromatogramu, što može dovesti do sniženja rezultata HbA_{1c} (32).

Izvestan broj HPLC analizatora su unapređeni tako da omogućuju merenje HbA_{1c} u prisustvu abnormalnih Hb (npr. može se preračunati % HbA_{1c} preko pikova koji se odnose samo na HbA). Međutim, koliko je to uspešno postignuto zavisi od samog instrumenta kao i od tipa hemoglobinopatije. Očigledno je da se HbA_{1c} ne može meriti HPLC tehnikom ako nije prisutan u krvi, kao što je slučaj kod HbS ili HbC homozigota.

Afinitivna hromatografija je jedini analitički sistem na koji ne utiče prisustvo abnormalnih Hb (34). Afinitivni gel detektuje glukozu vezanu za Hb, i tip Hb (kao i tip proteina) ne utiču na separaciju. Ako je u krvi prisutna smeša hemoglobinskih varijanti, afinitivna hromatografija je metoda izbora.

Hemoglobinopatije su često udružene s smanjenom (poremećenom) hematopoezom i/ili skraćenim vekom eritrocita, a pored toga abnormalni Hb mogu se glikozilirati različitom brzinom u odnosu na HbA, što sve povećava teškoće u interpretaciji rezultata.

Žutica i hiperlipidemija

Ako se metode zasnivaju na razdvajanju na osnovu naelektrisanja i ako se koriste hemolizati pune krvi, lažno povećane vrednosti HbA_{1c} mogu se dobiti kod veoma ikteričnih i jako lipemičnih uzoraka (hiperlipidemija je relativno često prisutna kod dijabetičara). Bilirubin migrira zajedno s HbA_{1c} i apsorbuje na mernoj talasnoj dužini. Lipidi se eluiraju s prvom HbA_{1c} frakcijom i apsorbuju na 415 nm. Ovaj problem se može prevazići uzorkovanjem krvi postprandalno.

Interferencija aspirinom

Aspirin može da se veže na nekoliko mesta, i to uglavnom za lizine na oba α - i β -lanca HbA. Acetilizacija lizinskih ostataka daje negativno naelektrisanje na Hb. Ovako modifikovan HbA ima promenjene elektroforetske i hromatografske osobine i migrira ispred HbA₀, kao i HbA_{1c}. Ako se određuje HbA_{1c} kod pacijenata koji su na dugotrajnoj terapiji aspirinom u velikim dozama, mora se uzeti u obzir moguće prisustvo acetilisanog hemoglobina.

Interferencija kod renalnih poremećaja

Produkti razlaganja uree, amonijum jon i naročito cijanat formiraju stabilna jedinjenja s Hb i drugim proteinima karbamilizacijom. Cijanat reaguje s proteinskim aminogrupama i to uglavnom s α -amino grupama.

Karbamilisani Hb (karb Hb) je jedan od glavnih interferirajućih supstanci u određivanju glikohemoglobina elektroforetskim i jonoizmenjivačkim hromatografskim metodama i posebno je važan jer skoro 50% pacijenata na hemodijalizi su dijabetičari. Pri određivanju teško ga je razdvojiti od HbA_{1c}, pa dovodi do lažnog povišenja rezultata (35). Pri normalnoj koncentraciji uree približno ima 0,4% karb Hb u odnosu na ukupan Hb, dok pri koncentraciji uree od 15-30 mmol/L ima ga i do 1-2%.

Sem toga pacijenti koji su na dijalizi, se dijaliziraju prema rastvoru s velikim sadržajem glukoze. To može usloviti izvesno povećanje u HbA_{1c}. Isto tako pacijenti s hroničnom bubrežnom insuficijencijom obično imaju i abnormalnu eritrocitnu kinetiku tj. prisutna je anemija s skraćenim vekom eritrocita.

Prema tome kod pacijenata s renalnim poremećajima rezultati glikohemoglobina moraju se pažljivo interpretirati, naročito ako se koriste metode koje se zasnivaju na razlikama u naelektrisanju.

BIOCHEMISTRY OF FORMATION AND ANALYSIS OF GLYCATED HAEMOGLOBIN

Marijana Dajak

Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia and Montenegro

Summary: Glucose and other monosaccharides react, in relation to their concentrations, with free amino groups of proteins. On the other hand, configuration of the proteins and reactivity of their amino groups are crucial factors of reaction kinetics. Glycoproteins may further be transformed into Maillard products, which are considered to be involved in the development of chronic diabetic complications. Glycosylated hemoglobin has clinical significance as the indicator of long-term monitoring of glycemia. A large number of analytic methods have been devised for its detection, and all of them are based on separation of glycosylated and non-glycosylated fractions from hemolysates of erythrocytes according to their different physical and chemical characteristics. In methods currently used, the separation of fractions is based on difference of charge (ion exchange chromatography and electrophoresis techniques) or structural variations (affinity chromatography and immunochemical methods). Depending upon the method, the following parameters may interfere in glycohemoglobin measurement: labile fraction, abnormal hemoglobins, icteric or lipemic specimens, acetylated hemoglobin, carbamylated hemoglobin and hematological disorders, and therefore, they have to be taken into account in the interpretation of results.

Key words: glycated haemoglobin, Maillard reaction, ion exchange chromatography, electroendosmosis, affinity chromatography, immunoassay, interferences.

Literatura

- John WG, Gould BJ. Glycated haemoglobin: biochemistry of formation. In: John WG. Monitoring glycaemic control in the diabetic patient, IFCCSeries, Excerpta Medica Publications 2002; 65-78.
- Fisher RW, Winterhalter KH. The carbohydrate moiety in hemoglobin A_{1c} is present in the ring form. FEBS Lett 1981; 135: 145-47.
- Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM. The biosystem of human hemoglobin A_{1c}: slow glycosylation of hemoglobin *in vivo*. J Clin Invest 1976; 57: 1652-59.
- Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J Biol Chem 1981; 256: 5204-08.
- Dolhofer R, Weiland OH. *In vitro* glycosylation of hemoglobin by different sugars and sugar phosphates. FEBS Lett 1978; 103: 282-6.
- Lowrey CH, Lyness SJ, Soeldner JS. The effect of haemoglobin ligands on the kinetics of human haemoglobin formation. J Biol Chem 1985; 260: 11611-18.
- Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF. Sites of non-enzymatic glycosylation of human haemoglobin A. J Biol Chem 1980; 255: 3120-7.
- Dominiczak MH. The significance of the products of the Maillard (browning) reaction in diabetes. Diabet Med 1991; 8: 505-16.
- Pongor S, Urlich PC, Bencsath FA, Cerami A. Ageing of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 2684-8.
- Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. Diabetes Care 1988; 11 (Suppl.1): 73-9.
- John WG. Glycated haemoglobin analysis. In: John WG. Monitoring glycaemic control in the diabetic patient, IFCCSeries, Excerpta Medica Publications 2002; 79-102.
- Sacks DB. Glycated proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER ed. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1994: 980-8.
- Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. N Engl J Med 1971; 284: 353-7.
- Cole RA, Soeldner JS, Dunn PJ, Bunn HF. A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobin using high pressure liquid chromatography. Metabolism 1978; 27: 289-301.
- Dunn PS, Cole RA, Soeldner JS. Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobins. Metabolism 1979; 28: 777-9.
- Standing SJ, Taylor RP. Glycated haemoglobin; an assessment of high capacity liquid chromatographic and immunoassay methods. Ann Clin Biochem 1992; 29: 494-505.
- John WG, Bracinnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Arkray HA 8140 hemoglobin A_{1c} analyzer. Clin Chem 1997; 43: 968-75.
- Gibb I, Parnham A, Fonfr̃de M, Lecock F. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. Clin Chem 1999; 45: 1833-41.
- Menard L, Dempsey ME, Blankstein LA, Aleyassine H, Wacks M, Soeldner JS. Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis. Clin Chem 1980; 26: 1598-602.
- Read A, Tibi L, Smith AF. Assessment of a simple elec-

- trophoresis method for measuring HbA_{1c}. *Clin Chim Acta* 1980; 108: 487-91.
21. Keating J, Pattison A, Sherwood RA. Evaluation of the Helena REP automated electrophoresis instrument for the measurement of glycated haemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 185-6.
 22. Mallia AK, Hermanson GJ, Krohn RI, Fujimoto EK, Smith PK. Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal Lett* 1981; 14: 649-61.
 23. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, *et al.* Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. *Clin Chem* 1981; 28: 2088-94.
 24. John WG. Glycated haemoglobin analyses - assessment of within and between-laboratory performance in a large UK region. *Ann Clin Biochem* 1987; 24: 453-460.
 25. Herold CD, Andree K, Harold DA, Felder RA. Robotic chromatography: development and evaluation of automated instrumentation for assay of glycohemoglobin. *Clin Chem* 1993; 39: 143-47.
 26. Koethe SM, Zielinski J, Perry BW. Glycohemoglobin results in samples with C or S trait measured on the Bio-Rad Diamant and Variant Express. *Clin Chem* 1999; 45: 2041.
 27. Wilson DH, Bogarz JP, Forsythe CM, *et al.* Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott Imx Analyzer: novel approaches for separation and detection. *Clin Chem* 1993; 39: 2090-97.
 28. Stevenson T. GlycosalTM: the first rapid, point-of care test for the determination of hemoglobin A1c in patients with diabetes. *Diabetes Tech Therapeut* 1999; 1: 425-31.
 29. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham J. Enzyme immunoassay: a new method for the estimation of hemoglobin A_{1c}. *Clin Chem* 1993; 39: 663-6.
 30. Cully M, Burns G, Engel W-D, *et al.* Homogeneous immunoturbidimetric determination of haemoglobin A_{1c}. Scientific presentation, September 1992. Tutzing, Germany: Boehringer Mannheim GmbH.
 31. John WG, Edwards R, Price CP. Laboratory evaluation of the DCA 2000 clinic HbA_{1c} immunoassay analyzer. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 367-70.
 32. Niederau CM, Reinauer H. Glycohemoglobins. In Thomas L ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998:142-8.
 33. Little RR, McKenzie EM, Wiedmeyer H-M, England JD, Goldstein DE. Collection of blood on filter paper for measurement of glycated hemoglobin by affinity chromatography. *Clin Chem* 1986; 32: 869-71.
 34. Talwar D, Barr BB, Kesson CM, Robb DA. Determination of glycosylated adult and foetal haemoglobins by affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 61-67.
 35. Fikiger R, Harmon W, Meier W, Loo S, Gabbay KH. Hemoglobin carbamylation in uraemia. *N Engl J Med* 1981; 304: 823-7.