

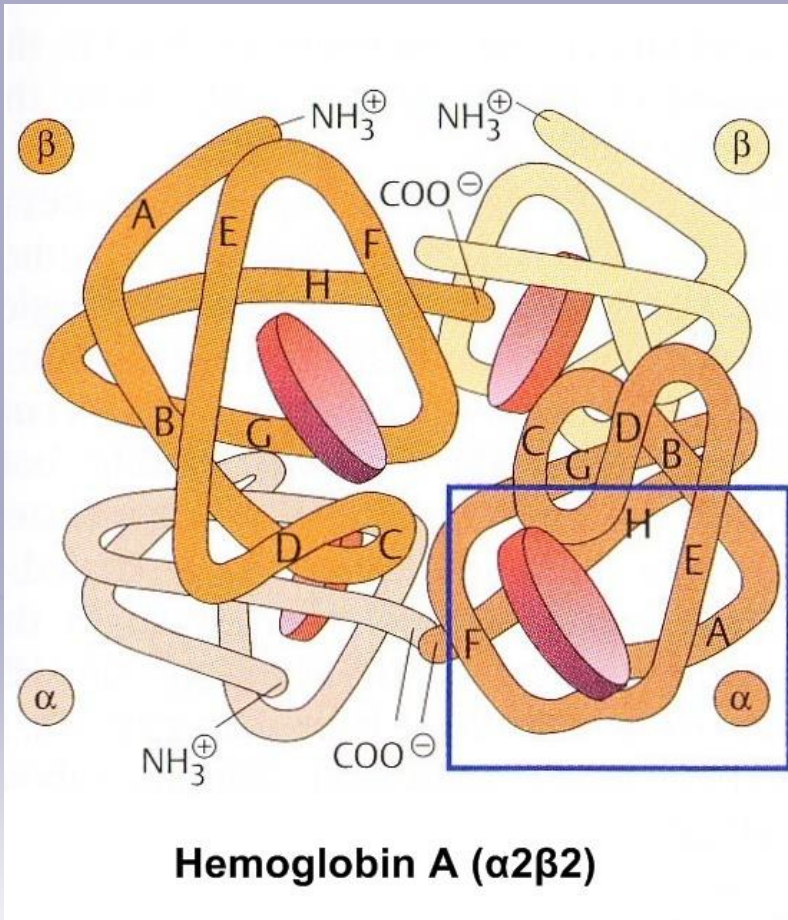
***Laboratorní parametry
kompenzace a stability
glukosového metabolismu
(diabetes mellitus)***

Richard Průša



Diabetes mellitus

- **DM 1. typu, IDDM, autoimunitní insulitis** (autoproti látky – anti GAD, anti insulin, anti IA-2, anti transportér zinku), LADA
- **DM 2. typu** (nadváha, obezita, metabolický syndrom)
- **Gestační DM**
- **MODY (11 typů)**
- **Mitochondriální DM**
- **Sekundární DM** (hemochromatóza, chronická pankreatitida, pankreatektomie, cystická fibróza, poruchy štítné žlázy atd.)



***Laboratorní
parametry
kompenzace a
stability
glukosového
metabolismu
(diabetu mellitu)***

Laboratorní ukazatelé kompenzace a stability d.m.

- Glukosurie (inhibitory SGLT2), ketonurie
- Glykovaný hemoglobin HbA1c, eAG
- Triacylglyceroly
- Albuminurie
- Fruktosamin, glykovaný protein (150 – 300 $\mu\text{mol/l}$ GSP)
- Glykovaný albumin
- 1,5-anhydroglucitol (snížení jako marker hyperglykemie)
- AGE
- Adiponektin, CDT, kotinin, (BMI, TK)

Laboratorní ukazatelé kompenzace a stability d.m.

- Glykemie na lačno, glykemie postprandiální
- Glykemický profil (7, 9, 11) v závislosti na jídle, SMBG
- Kontinuální monitorování glykemie (CGM)
- Aritmetický průměr glykemií, SD
- Amplituda glykemií
- Michaelisův index (GCI) (od r. 1982)
- M-hodnota, MAGE, MDD
- **LI, LBGI + HBGI (=ADRR), Clarke skóre, HYPO skóre**
- ADRR (od r. 2006): pod 20, 20 - 40, nad 40

Laboratorní parametry

	Fyziol, dobrá	uspokojivá	dekomp, labilní
Arit pr gly	3 - 6	6 - 9	> 12
Amplit gly	< 7	7 - 11	> 15
Michaelis i	< 10	10 - 15	> 20
M-hodnota	< 20	20 - 35	> 100
MAGE	< 3	3 - 5,6	> 8
MDD	< 3	3 - 5,6	> 8
Glukosurie	0,1 - 0,8	0,8 - 2,8	> 50 (24 h)
HbA1c	20 - 42	43 - 53	> 80
Triacylglyc	<1,7	1,7 - 2,3	> 5,7

GCI, Michaelisův index, 1982

- T_{1/2} glukosy = 30 – 60 min
- Glykemický profil – 7, 9, 11 glykemií/24 h
- $M + (G_{max} - G_{min})/2$
- Kompenzace – stabilita:

dobrá, < 10

uspokojivá, 10 -15

neuspokojivá, 15-20

dekompensace nebo labilita > 20

Rovnice pro výpočet indexů kompenzace a stability

$$\text{Michaelisův index} = x + (g_{\max} - g_{\min}) / 2$$

$$\text{M-hodnota (korig.)} = 1/n \sum_{i=1}^n \left| 10 \log \frac{g_i}{4,45} \right|^3 + (g_{\max} - g_{\min}) / 1,111$$

$$\text{MAGE} = 1/n \sum_{i=1}^n |x - g_i|$$

$$\text{MDD} = 1/n \sum_{i=1}^n |g_{\text{I}i} - g_{\text{II}i}|$$

x průměrná glykémie

g_{\max} .. nejvyšší glykémie

g_{\min} .. nejnižší glykémie

n počet glykemií

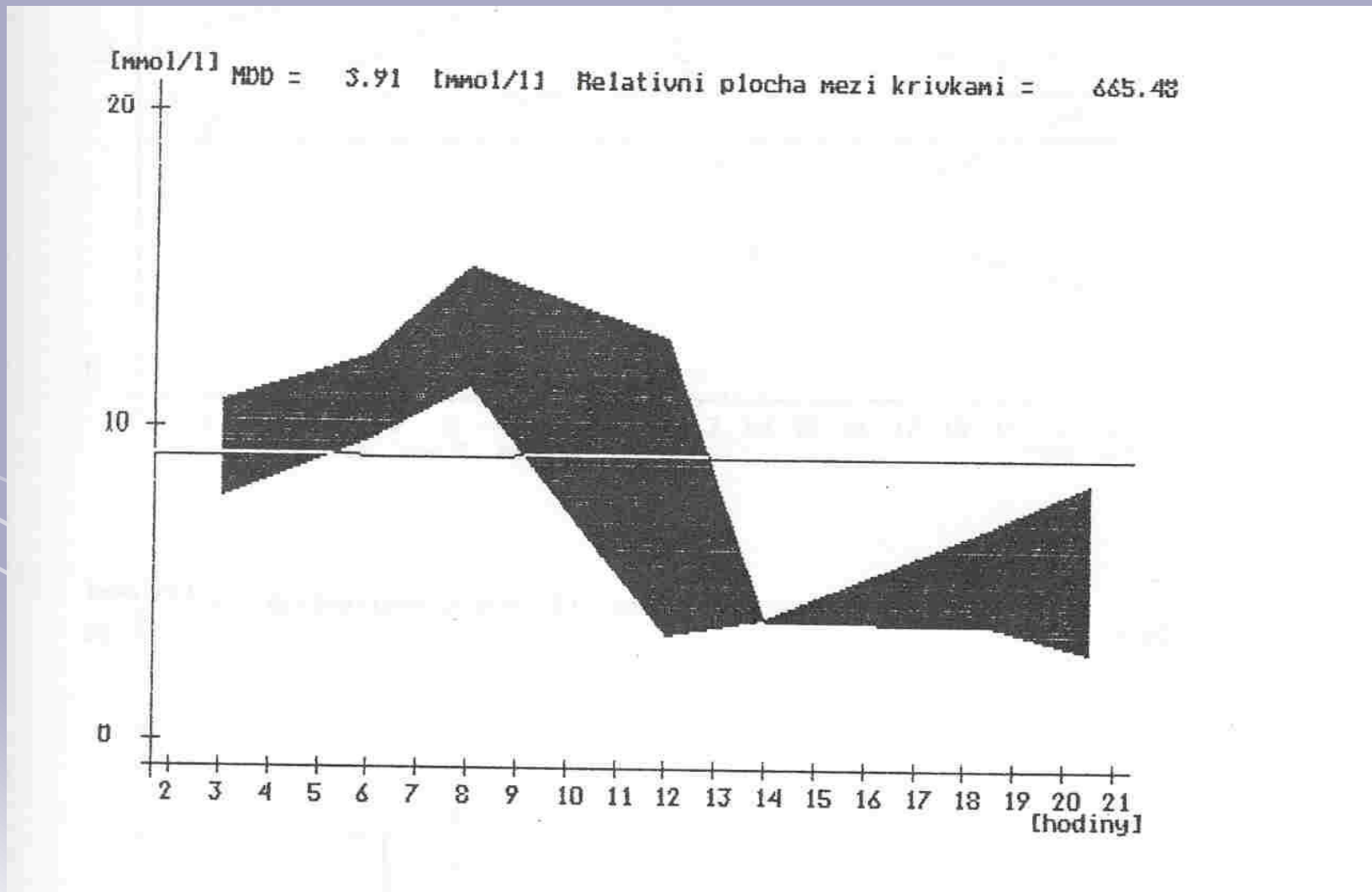
$g_{\text{I}}, g_{\text{II}}$... glykémie I., II. profi

g_i i -tá glykémie

M-hodnota 1.profilu – špatná kompenzace, denní rozdíl způsoben dietní chybou, infektem, prodělanou hypoglykemií, změnou schématu léčby nebo životosprávy

		GLYKEMIE - vysledky		
		1. profil		2. profil
Prumerna glykemie	[mmol/l]	8.76	[]*	7.30 []*
Smerodatna odchylka	[mmol/l]	5.12		2.87
Amplituda	[mmol/l]	12.20	[]**	7.90 []*
Michaelisuv index	[mmol/l]	14.86	[]*	11.25 []*
M-hodnota (korig.)		67.32	[]**	27.95 []*
MAGE		4.53	[]*	2.23 [*]
MDD	[mmol/l]			3.91 []*
Glykoprotein	[mmol/l]	NEZADANO		
Glykohemoglobin	[% celk Hb]	NEZADANO		
Triacylglycerol	[mmol/l]	NEZADANO		
Cholesterol	[mmol/l]	NEZADANO		
		I.	II.	III.
Albuminurie	[mg/l]	NEZADANO	NEZADANO	NEZADANO
Glykosurie - objem	[ml]	NEZADANO	NEZADANO	NEZADANO
- koncentrace	[mmol/l]	NEZADANO	NEZADANO	NEZADANO
- ztraty	[mmol]	NEZMERENO	NEZMERENO	NEZMERENO
- ztraty celkem	[mmol]	0.00	= 0.00 [g]	

M-hodnota 1.profilu – špatná kompenzace, denní rozdíl způsoben dietní chybou, infektem, prodělanou hypoglykemií, změnou schématu léčby nebo životosprávy



Hodnocení glykemické variability (lability)

Lability index (LI)

130 - 225 – 330 - **430** mmol/l²/hod.týden⁻¹

HYPPO score

45 - 145 - 425 – **1045**

Závažné rekurentní hypoglykemie a labilní d.m. =
indikace k transplantaci pankreatických L. ostrůvků

Monitorování brittle d.m., indikace k th. amylinem a inkretiny

Glykovaný hemoglobin, 1968

- HBA, HBA₂, HBF
- HBA₁ – glykace valinu v N-terminální části beta řetězce: aldimin (24 h), ketoamin
- HBA_{1a1} – fruktosa 1,6-bifosfát
- HBA_{1a2} – glukosa-6-fosfát
- HBA_{1b} – kyselina pyrohroznová
- **HBA_{1c}** – D-glukosa – tvoří cca 80 % HBA₁
- HBA_{2c} – D-glukosa
- Jiné glykace Hb – lysiny alfa řetězců atd.
- **HBA_{1c}** – 50 % je z posledních 30 dnů, klinicky relevantní změna je minimálně 5 mmol/mol, tj. asi 10 dnů trvalé změny průměrné glykemie

Glykovaný hemoglobín - eAG

● Glykémie (mg/dl) = $33,3 \times \text{HbA1c (\%)} - 86$ ($r = 0,96$)

● Glykémie (mg/dl) = $35,6 \times \text{HbA1c (\%)} - 77,3$

$r = 0,82$ (DCCT, 1993)

● Glykémie (mg/dl) = $28,7 \times \text{HbA1c (\%)} - 46,7$

$r = 0,84$ (ADAG, 2008)

eAG = $1,59 \times (0,09148 \times \text{HbA1c} + 2,152) - 2,59$

HbA1c (mmol/mol) 42.....53.....64.....75 =

Glykémie, eAG (mmol/l) 7,0...8,6...10,2...11,8

Dg. cut-off 48 mmol/mol (eAG = 7,8 mmol/l)

Ref. meze

Glyk. hemogl. (A1c)

81449 Glyk. hemogl. (A1c)

HPLC

53,00 []* mmol/mol

delta check: nevýznamný

20,00-42,00

Odhadnutá průměrná glykemie

8,5 mmol/l

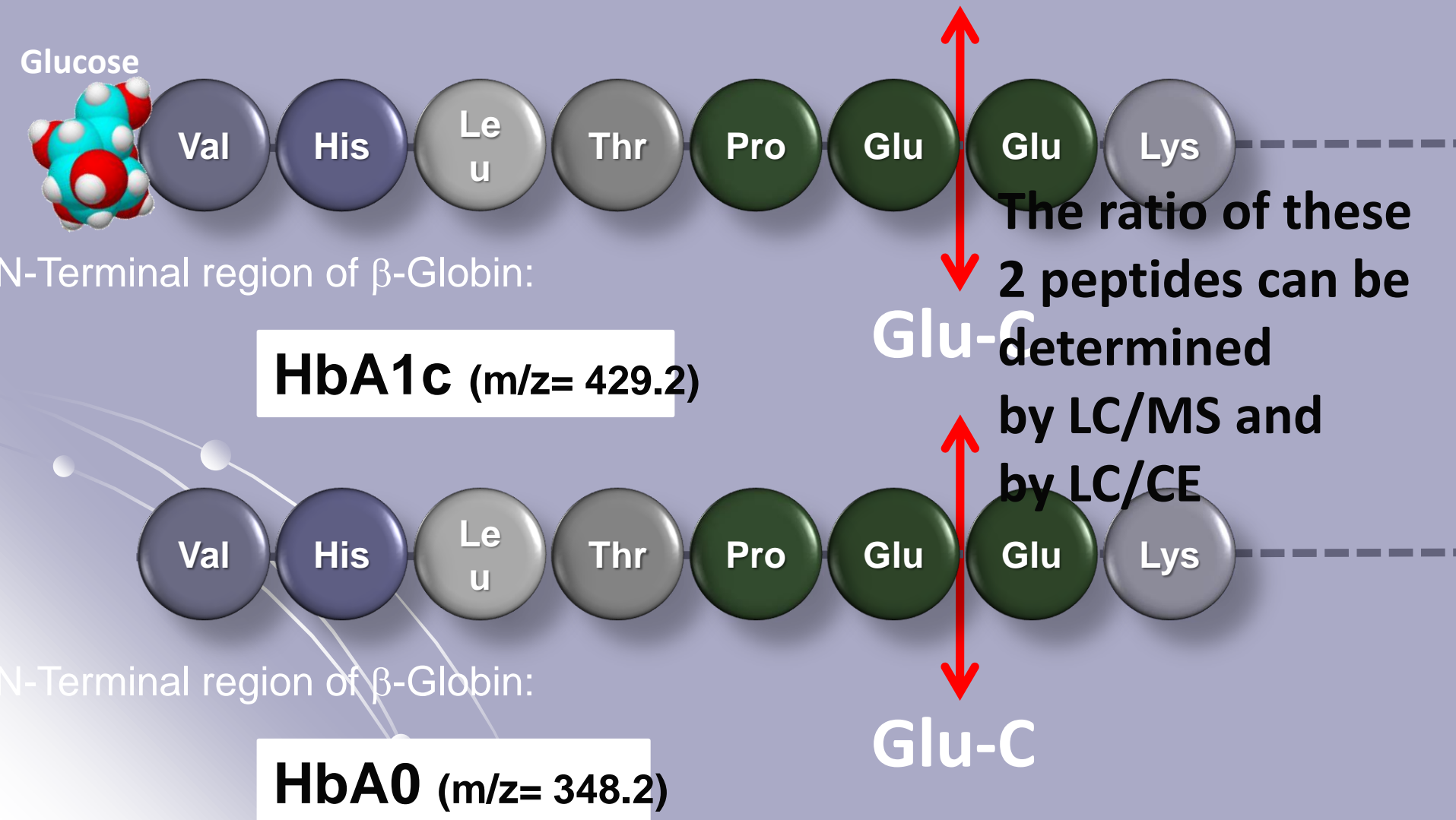
vypočítaná metoda

ND

THE IFCC REFERENCE METHODS

1st step: Enzymatic cleavage

Staphylococcus aureus Glu-C releases 2 hexapeptides:



Glykovaný hemoglobin

- Rovnice pro HbA1c dle IFCC referenční metody: $HbA1c = HbA1c : (HbA1c + HbA0)$
- Analytická přesnost a analytická správnost
- **versus**
- Klinická pravdivost a relevantnost vyšetření
- K dispozici je více než 40 různých metod schválených FDA a certifikovaných NGSP
- Doporučení ADA, NIDDK, CDC, ČSKB

Glykovaný hemoglobin

- Imunochemické stanovení
- HPLC
- Kapilární elektroforéza
- *Semiologická hodnota HbA1c ?? (analytické a/nebo patobiochemické interference):*
- Variantní hemoglobiny (heterozygoti)
- Životnost erytrocytů
- Kinetika neenzymové glykace hemoglobinu
- Reparační deglykace hemoglobinu

Glykovaný hemoglobin

- Hemoglobinopatie (více než 1000) interferují
- Nelze použít u novorozenců a kojenců do 9 m –HbF
- Přítomnost **HbF** ($\geq 5, 10, 15, 30 \%$)
- Životnost erytrocytů, léčba EPO, gravidita
- Chronická hemolýza – falešně nižší hodnota
- Akutní ztráta krve – falešně nižší hodnota
- Hypochr mikrocyt anemie – falešně vyšší hodnota
- **Karbamylovaný Hb (uremie, CHRI, hemodialýza)**
- **Acetylovaný Hb**
- Hodnota HbA1c nad **195 (150) mmol/mol** znamená přítomnost abnormálního Hb

Vliv životnosti erytrocytů na HbA1c

- Obtížné stanovit délku života erytrocytů
- Rozmezí je 100 – 140 dnů (průměr 120)
- Ery 110 dnů, HbA1c 46 mmol/mol
- Ery 120 dnů, HbA1c 53 mmol/mol
- Ery 130 dnů, HbA1c 60 mmol/mol

Glykovaný hemoglobin

- Imunochemické stanovení, imunoturbidimetrie
- Protilátka proti Amadoriho produktu glukosy a proti prvním 4 až 10 amk N-terminálního konce beta řetězce, **HbA1c/celkový Hb**
- Koreluje s HPLC, nižší hodnoty, CV = 3,5 - 7 %
- ??Nejsou interference abnormálních Hb?
- **Hb Hope** – HbA1c – 47,8 % (HPLC) x 44 % (imuno) x 6,8 % (CZE) (Hope – 42 %), beta 136 Asp/Gly

HPLC

Hb
A

%HbA1c =

HbA1c area / Σ HbA area

Hb A0

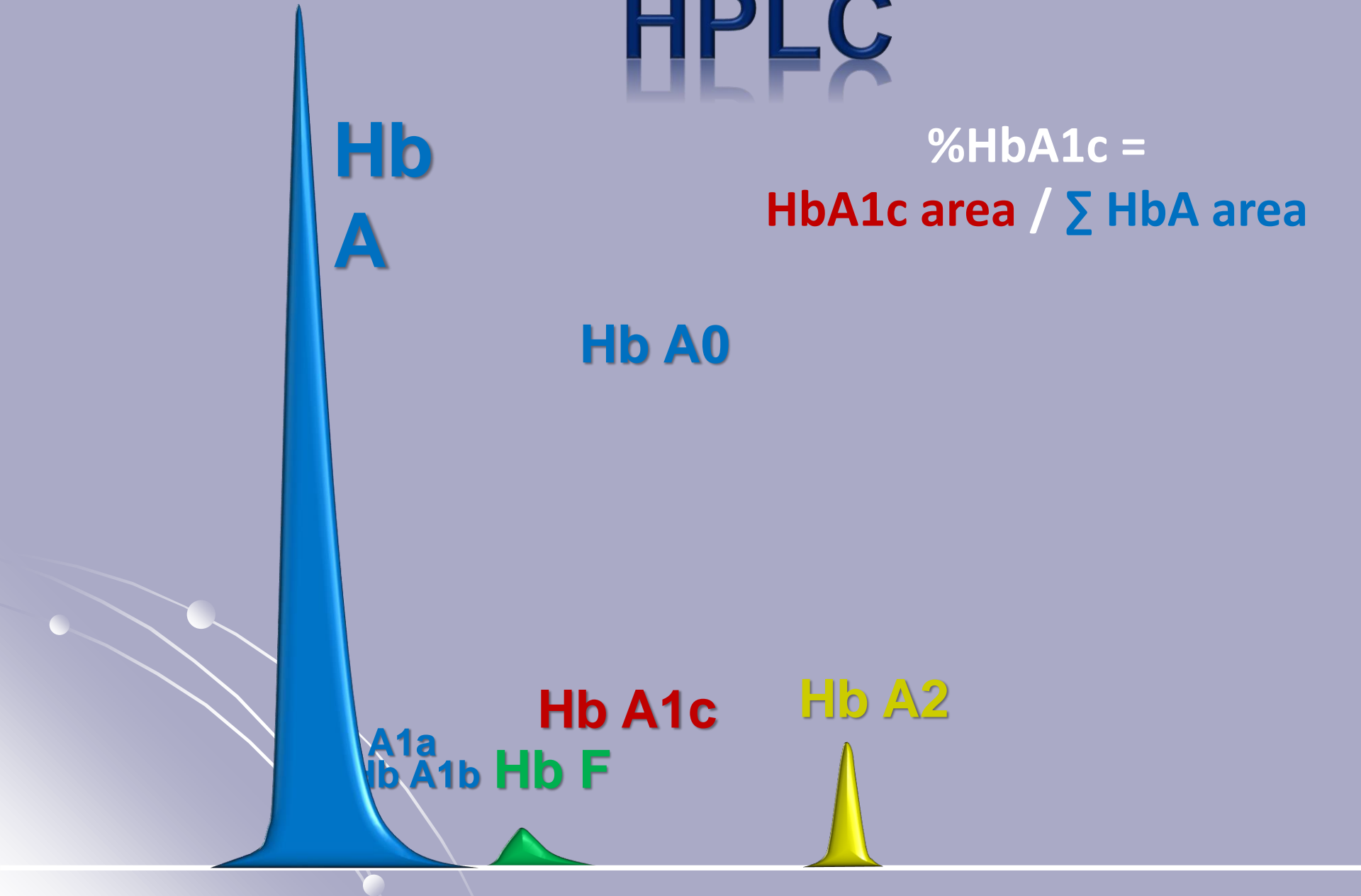
Hb A1c

Hb A2

A1a

Hb A1b

Hb F



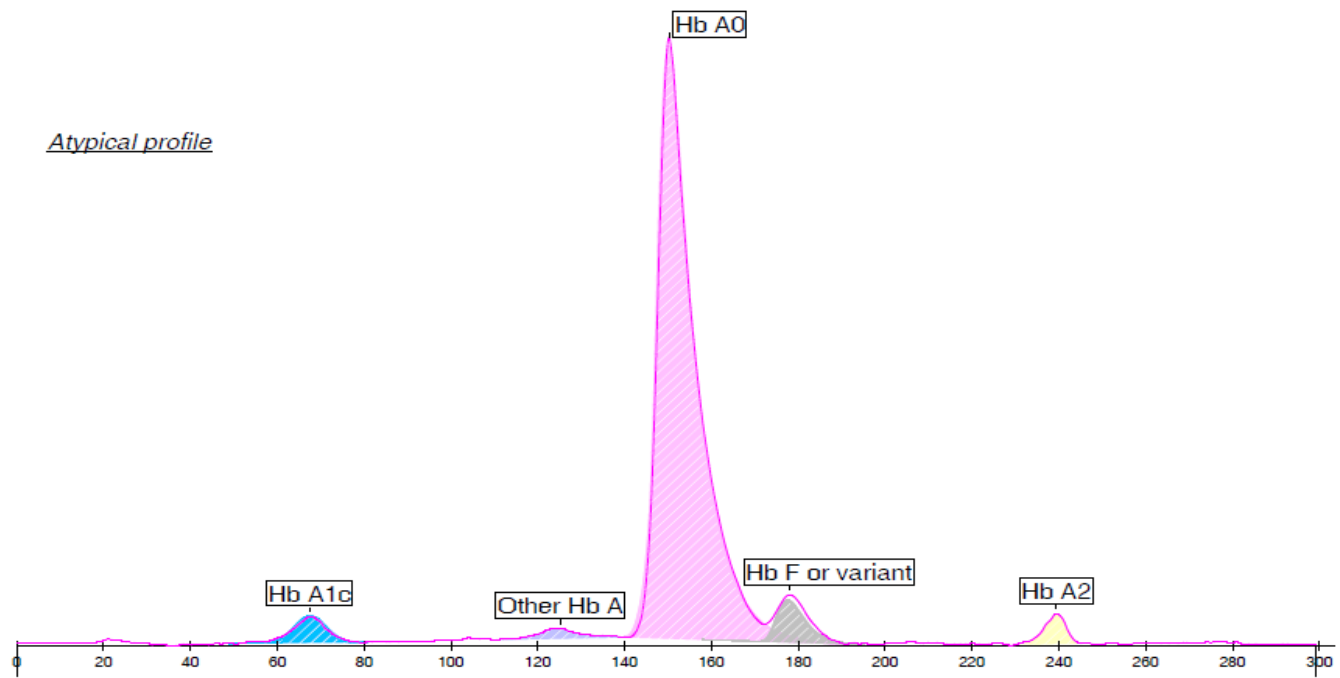
Sample num. **60** Date **28/5/2015**

ID : **A1505270048**

Depart :

Birth :

Atypical profile



A1c Haemoglobin Electrophoresis

Databáze NGSP

Method / Interference	HbC	HbS	HbE	HbD	elevated HbF
Arkray ADAMS A1c HA-8180V (Menarini)	No	No	HbA1c not quantified	HbA1c not quantified	No <30% HbF
Axis-Shield Afinion	No	No	No	No	\$
Beckman AU system	Yes	Yes	No	No	\$
Beckman Synchron System	No	No	No	No	\$
Bio-Rad D-10 (A1c program)	No	No	No	No	No <10% HbF
Bio-Rad Variant II NU	-	-	No	No	No <10% HbF
Bio-Rad Variant II Turbo	No	No	Yes	Yes	No <5% HbF
Bio-Rad Variant II Turbo 2.0	No	No	No/Yes (conflicting reports)	No	No <25% HbF

Kinetika glykace hemoglobinu

- Validní interpretace výsledku HbA1c předpokládá srovnatelnou kinetiku glykace HbA v přítomnosti variantních hemoglobinů (např. S, C, D, E, **F**)
- **Hb Görwihl** – ↓↓HbA1c, beta5 (A2) Pro/Ala
- **Hb Raleigh** – HbA1c – 46 % (HPLC) x 3,8 % (imuno)
beta Val/Ala = acetylace

Deglykace: fruktosamin 3-kináza

- reparační deglykační protektivní enzym
- Monomer, 309 amk, gen 17q25.3
- Vyšší aktivita v tkáních s proteiny s dlouhým T1/2: **erytrocyty, oční čočka, mozek**
- Hladovění a d.m. nezvyšují aktivitu FN3K
- Aktivita nízká v ery u kuřat a vepře
- Aktivita enzymu – polymorfismy FN3K genu
- Kompetitivní inhibitor deoxymorpholinofruktosa DMF

Deglykace: fruktosamin 3-kináza

- Alfa Lys139, Lys16...Lys61...beta Val1
- Fosforyluje fruktosamin na třetím uhlíku, destabilizace a uvolnění z proteinu
- FL3P (FV3P) – Lys (Val) + fosfát + 3-deoxyglucoson – 3-deoxyfruktosa nebo 2-deoxy-3-ketoglukonová k.
- Polymorfismy v promotoru a v exonech, např. c.900 CC – nízký HbA1c
- Interindividuální variabilita FN3K: **HbA1c nekoreluje s průměrnou glykemií, různé HbA1c u shodných AG**

Interpretace výsledků (dle Masopusta)

- **Hodnota výsledku:**
- Normální, Varovná, Kritická, Nesmyslná
- **Výsledek:**
- Pravděpodobný
- Nepravděpodobný
- Nesmyslný
- **Výsledek nebo změna výsledků (CD):**
- Klinicky relevantní
- Klinicky irelevantní (analyticky, patobiochemicky)

- **4,3 %** nálezů HbA1c
ve FN vyžadují interpretaci

- HbA1c 1,0 mmol/mol,
- Ery $1,56 \times 10^{12}$ /l, Hb 66 g/l

- Chemoterapie pro Ca pankreatu,
sekundární IDDM po pankreatektomii

- HbA1c:
- 0 mmol/mol (HPLC) x 44 mmol/mol (imuno)
- Zahraniční turista, DM, HPLC - HbSC

- HbA1c 1 mmol/mol, HbF 58 %, věk 3 roky
- Juvenilní myelomonocytická leukemie

- HbA1c 191,0 mmol/mol, věk 76 let
S-urea 23,7 mmol/l, S-kreatinin 124 umol/l

- Karbamylovaný Hb



- Chlapec, 10 let, DM1
- HbA1c 18,0 mmol/mol (při diab.ketoacidóze)
- Fe 27 umol/l, haptoglobin 0,7 g/l
- ↑bilirubin, ↑LD
- HbAS
- HbA1c 62 – 96 – 110 mmol/mol (různé metody)
- Horečka, hypoxie, hyperosmolární stavy (dehydratace, hyperglykemie)

G7 x G8



Glykovaný albumin

- Enzymová metoda s albumin specifickou proteinasou, ketoamin oxidasou a reagensy pro stanovení albuminu (Asahi Kasei Pharma, Tokyo, Japonsko)
- Referenční interval **GA pro dospělé:**
11,7 – 16,2 % (vs. starší metoda – 0,6 – 3,0 %)
- GA u novorozenců a kojenců (neonatální diabetes)
- **Age adjusted GA:**
- $Aa-GA = GA \times 14,0 / (1,77 \times \log \text{ věku ve dnech} + 6,55)$
- $Aa-GA = GA \times 14,0 / (1,77 \times \log \text{ věku v rocích} + 11,1)$
- *Shigeru Suzuki, Annals of Clinical Biochemistry, 2014, str. 602-605*

Glykovaný albumin

- Poměr GA/albumin v %
- Změny T1/2 albuminu:
- Děti
- Poruchy metabolismu albuminu u diabetiků:
- **Zvýšený GA:** jaterní cirhóza, hypothyreóza
- **Snížený GA:** nefrotický syndrom, hyperthyreóza, léčba glukokortikoidy