



# HbA<sub>1c</sub> 2020

prof. OLIVER RÁCZ, M.D., Ph.D.

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, UPJŠ. Cumulus s.r.o. biochemické laboratórium

## Veľmi krátky pohľad do histórie – glykácia a „serendipity“

Keď Samuel Rahbar (1929–2012), v Teheráne v roku 1969 zbadal niečo nezvyčajné v elektroforetickom obraze hemoglobínu u diabetikov, netušil, že je iniciátorom jedného z najväčších objavov v laboratórnej medicíne a v diabetológii.<sup>1,2</sup> Na rozdiel od dvoch predošlých opisov podobného nálezu (jeden bol publikovaný v japončine, autori druhého považovali zmenený hemoglobín za účinok tolbutamidu) mal to šťastie, že

vďaka dobrým kontaktom medzi Iránom a USA bol vyslaný na študijný pobyt do Albert Einstein College of Medicine v New Yorku\*, kde už vedeli, že existujú malé frakcie hemoglobínu. Princíp „serendipity“ v jeho prípade fungoval\*\*. Dať dokopy to, že tieto malé frakcie sú postsynteticky zmenené deriváty HbA, že glukóza sa neenzýmovo viaže na aminoskupiny bielkovín a to, že diabetici majú hyperglykémiu, bola už rutinná práca a prvý dlhodobý retrospektívny ukazovateľ glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus bol na svete. Od objavu nezvyčajného hemoglobínu uplynulo o niečo viac ako 50 rokov a dnes by každý chorý s diabetes mellitus (je ich viac ako 500 miliónov na celom svete) by mal mať tento ukazovateľ stanovený v pravidelných intervaloch.<sup>3</sup>



**Hemoglobín má viac voľných aminoskupín, na ktoré sa viažu rôzne endogénne aldehydy (nielen glukóza) a ketóny.**

Je to pravda, ale HbA<sub>1c</sub> je práve tá frakcia, ktorá obsahuje viazanú glukózu na terminálnu aminoskupinu beta reťazca hemoglobínu. Iné látky viazané na hemoglobín a väzba glukózy na iné miesta hemoglobínu nemajú žiadny praktický význam pri hodnotení glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus.



**Je tá reakcia úplne ireverzibilná?**

Prvý krok väzby glukózy na hemoglobín je reverzibilný, druhý krok nie. Diskutuje sa o enzýme, ktorý odstraňuje viazanú glukózu z hemoglobínu. Deglykácia HbA<sub>1c</sub> (ak vôbec existuje) nemá zatiaľ praktický význam pri hodnotení glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus.



**A čo, ak vyšetrený má v krvi iné hemoglobíny (HbF, HbS a iné)?**

Fetálny hemoglobín nemá beta reťazec, HbA<sub>1c</sub> z HbF nevzniká. Hemoglobíny pri hemoglobinopatiách a talasémiách môžu viazať glukózu, ale nie tak, ako HbA. U klinicky manifestných chorých je aj znížená životnosť erytrocytov. Chromatografické metódy odkrývajú problém, ale výsledok ani tak nie je použiteľný pre monitorovanie glykemickej kompenzácie. Pre prax je dôležité, že falošný výsledok merania sa však vyskytuje aj u zdravých heterozygotoch.



**A čo je v prípade skráteného prežívania červených krviniek?**

Pri hemolytických anémiách so skráteným prežívaním erytrocytov je porušený druhý axióm. Podľa niektorých údajov je to podobne aj pri sideropenickej (mikrocytovej) anémii. Pre prax platí, že pri koncentrácii hemoglobínu pod 100 g·L<sup>-1</sup> je potrebné výsledok HbA<sub>1c</sub> hodnotiť opatrne.



**Glykémie posledné 4 mesiace?**

Nie, pretože kinetika glykémie je zložitá a hladina HbA<sub>1c</sub> lepšie odráža hyperglykémiu, ktoré boli 8–12 týždňov pred meraním, ako tie, ktoré boli dávnejšie.

▲ Tab. č. 1: Provokatívne otázky čertíkov a odpovede na ich otázky



## Všetko je jasné (až na niekoľko detailov)

Dogmatické axiomy glykácie hemoglobínu boli známe už na konci 70. rokov minulého storočia:<sup>4</sup>

1. Glukóza sa neenzýmovo a ireverzibilne viaže na terminálnu aminoskupinu beta reťazca ľudského hemoglobínu. Adukt je malá frakcia HbA<sub>1c</sub>.
2. Životnosť červených krviniek človeka je 120 dní.
3. Z toho vyplýva, že koncentrácia HbA<sub>1c</sub> je integrovaným retrospektívnym ukazovateľom glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus za posledné 4 mesiace.

Čerti sa vždy skrývajú v detailoch a nemajú radi dogmatické axiomy. Ich provokatívne otázky a odpovede sú zhrnuté v tabuľke 1. Písali sme o nich v Labor Aktuell už predtým,<sup>5-8</sup> a preto ich na tomto mieste opakujeme len stručne.

## Všetko je jasné, ale vieme to merať?

Prvé dve desaťročia po objave glykácie hemoglobínu boli v znamení veľkého entuziazmu biochemikov a diabetológov. Určité vytriezvenie prišlo až v roku 1993, keď po ukončení štúdia DCCT bol publikovaný článok a nejednotnosti v metodikách a o potrebe harmonizácie výsledkov dosiahnutých rôznymi metódami.<sup>9</sup> Následne boli realizované národné štandardizačné systémy v USA, Švédsku a Japonsku. Bodku za neistotou a chýbaním nadväznosti za primárny analyt dala pracovná skupina IFCC v roku 2004.<sup>10</sup> Problémom bola definícia primárneho analytu, pretože „glykovaný hemoglobín“ nie je jednoznačne definovaná látka a „HbA<sub>1c</sub>“ je chromatografická frakcia hemoglobínu A, ktorá okrem formy s glukózou viazanou na terminálnu aminoskupinu beta reťazca môže obsahovať aj iné prímеси. Za primárny analyt bol deklarovaný terminálny hexapeptid hemoglobínu A s viazanou

### SEPARAČNÉ METÓDY

#### HPLC A KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA

Tieto metódy delia frakcie hemoglobínu podľa ich náboja a rozmeru. Technologické detaily jednotlivých metód sa líšia, ale všetky sú nadviazané na primárny IFCC analyt.

#### BORONÁTOVÁ AFINITNÁ CHROMATOGRÁFIA

Metódy sú založené na princípe väzby cis-diolových skupín (v molekulách glukózy) na nosič a v následnej elúcii frakcií hemoglobínu. Napriek odlišnému princípu by certifikované metódy viazané na primárny analyt mali poskytnúť také isté výsledky ako HPLC a kapilárna elektroforéza.

**Výhoda separačných metód je to, že „majú oči – vidia“ HbA<sub>1c</sub>.**

### IMUNOCHEMICKÉ METÓDY

Protilátky proti terminálnemu hexapeptidu sa viažu s HbA<sub>1c</sub> a koncentrácia HbA<sub>1c</sub> sa stanovuje pomocou turbidimetrie.

**Imunochemické metódy sú slepé, ale MAJÚ DOBRÝ HMAT**

### ENZÝMOVÁ – NOVÁ METÓDA

Hemoglobín vo vzorke je proteolyticky, natrávený na aminokyseliny. HbA<sub>1c</sub> má na terminálny valín naviazanú glukózu, ktorá reaguje s fruktozylvalínoxidázou (FVO) za vzniku peroxidu vodíka, čo sa stanovuje štandardnou peroxidázovou chromogénovou metódou.

**Počet konkrétnych metód je vysoký, ale všetky sú aplikované na bežné laboratórne analyzátory a dodané výrobcami „na kľúč“.**

▲ Tab. č. 2: Prehľad metód na stanovenie HbA<sub>1c</sub><sup>11</sup>

glukózou. Dnes všetky metódy používané v praxi sú nadviazané na primárny analyt a preto by mali dávať také isté výsledky. Prehľad metód, ktoré sa v súčasnosti používajú, je v tabuľke 2.

Diabetológovia (hlavne tí mladší) si postupne zvykli na nové jednotky – namiesto % HbA<sub>1c</sub> mmol<sub>(glykovaného hexapeptidu)</sub> na mol<sub>(hemoglobínu)</sub>, zjednodušene mmol·mol<sup>-1</sup>. Harmonizácia a plná nadväznosť však neznamenajú bezchybné výsledky, pretože presnosť a správnosť výsledkov nie je zaručená harmonizáciou IFCC.

Po ukončení IFCC štandardizácie tá istá pracovná skupina začala pracovať na celoeurópskom jednotnom hodnotení kvality kontroly meraní HbA<sub>1c</sub>. Na poslednom publikovanom hodnotení z roku 2018

sa zúčastnilo 17 krajín, 2166 laboratórií a 24 výrobcov. V roku 2019 sa tento počet zvýšil na 25 krajín a 4000 laboratórií. Výsledky boli prezentované a publikované vo forme, ktorá je zrozumiteľná aj pre odborníkov so základnými vedomosťami zo štatistiky. Hlavný výsledok projektu bol zhrnutý do jediného bodu: Celková chyba meraní bola v blízkosti 5 mmol·mol<sup>-1</sup>, čo je pre monitoring glykemickej kompenzácie chorých dostatočná (hoci nie ideálna) presnosť. Na dosiahnutie „bronzovej medaily“<sup>\*\*\*\*</sup> by tá chyba nemala byť vyššia ako 3,3 mmol·mol<sup>-1</sup>. Autori projektu konštatovali, že v uplynulom období došlo k zlepšeniu presnosti a správnosti metód väčšiny výrobcov na meranie HbA<sub>1c</sub>.<sup>12</sup> Druhá, veľmi dôležitá dimenzia zlepšenia je pravidelná externá kontrola kvality v jednotlivých krajinách.

\* Vtedy bol v Iráne pri moci Mohammad Reza Pahlavi, ktorý mal dobré kontakty so západnými krajinami a USA.

\*\* Výraz pochádza z Perzie (dnes Irán – aká náhoda?). Ide o bájku o troch princoch Serendipu, ktorí mali schopnosť objaviť dôležité veci tam, kde sa to vôbec nečakalo.

\*\*\* Na striebro by bola potrebná chyba do 2 % a na zlato 1 %, ale od toho sme zatiaľ ďaleko.

\*\*\*\* Pri študovaní odbornej literatúry (až na niektoré výnimky) má čitateľ pocit, že počuje pána cisára Franza Josefa, ktorý pri návšteve rôznych častí Monarchie vždy vyhlásil, že „všetko je veľmi pekné, všetko je veľmi dobré, so všetkým som veľmi spokojný“.



## **Dnes to už vieme merať, výsledky sú presné a správne, ale to nestačí.**

Na základe výsledkov EurA1c môžeme s kľudným svedomím prehlásiť, že na dodané hodnoty z akreditovaných laboratórií sa dá spoľahnúť. Nemali by sme však zabudnúť, že HbA<sub>1c</sub> je dôležitý nie pre diabetológov, ale predovšetkým pre chorých s diabetes mellitus. To znamená, že rozhodujúca je spoločná snaha diabetológa a chorého dosiahnuť dlhodobu dobrú glykemickú kompenzáciu, čo je základný predpoklad prevencie komplikácií diabetes mellitus. Ak sledujeme vývoj nových liekov a technológií, je jasné, že tento cieľ by sa dal dosiahnuť u každého chorého. Realita je žiaľ iná\*\*\*\*. Glykemická a celková metabolická kompenzácia veľkého počtu chorých s diabetes mellitus nie je dobrá, čo má za následok vysokú incidencia a prevalenciu chronických komplikácií choroby. Príkladom nesprávnej interpretácie pokroku v medicíne je často opakovaná veta z publikácií a iných materiálov, že „daný liek zníži HbA<sub>1c</sub> o určité percentá“. Toto tvrdenie je zmaťochné z viacerých dôvodov:

- Je veľký rozdiel, či sa znižuje HbA<sub>1c</sub> u zle alebo dobre kompenzovaného chorého.
- Podľa starých jednotiek nevieme, či zníženie o 5 % je zníženie z 13 % na 8 % alebo z 13,0 % na 12,75 %. Pri nových jednotkách tento problém nie je (zníženie z 65 mmol·mol<sup>-1</sup> o 5 % je 3,25 mmol·mol<sup>-1</sup>, t.j. na 61,75 mmol·mol<sup>-1</sup>).
- Hlavným problémom nie sú tieto matematické záležitosti, ale to, že **žiadny nový liek a žiadna nová technológia neznižuje HbA<sub>1c</sub>**. Zníženie HbA<sub>1c</sub> sa dá dosiahnuť len kreatívnou interpretáciou výsledkov vyšetrení, adekvátnou aplikáciou nových liekov a technológií, edukáciou, komunikáciou a hlavne spoluprácou lekára a chorého.

možné riešiť pomocou nového prístupu na základe koncepcie „RWE“ (real-word evidence, evidencie reálneho sveta), pomocou ktorej sa skúmajú konkrétne účinky rôznych intervencií na bežné klinické východiská.<sup>13</sup>

## **Dostali sme výsledok HbA<sub>1c</sub> z laboratória, čo s tým?**

Základný prístup je veľmi jednoduchý. Prvým krokom je, či výsledok vyšetrenia je v súlade s ostatnými ukazovateľmi glykemickej kompenzácie. Stále platí pravidlo, ktoré sme vyslovili už pred mnohými rokmi:

- Ak je hodnota HbA<sub>1c</sub> chorého s diabetes mellitus blízko norme, jeho glykemická kompenzácia je pravdepodobne dobrá, ale nedajú sa vylúčiť nepríjemné hypoglykemické epizódy. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).
- Ak je hodnota HbA<sub>1c</sub> chorého veľmi vysoká, je určite nedostatočne kompenzovaný, ale HbA<sub>1c</sub> nedáva informáciu o tom, čo je podstata problému. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).
- Hodnoty HbA<sub>1c</sub> v strednom pásme neposkytujú dostatočnú informáciu o jeho glykemickej kompenzáci. (Kontrolovať podľa glykémii a rozhovoru s chorým!).

Uvedené tri pravidlá sú platné aj v dobe stále širšieho používania kontinuálneho merania glykémie a „flash monitoringu“, ale dajú sa lepšie definovať. Boli zavedené nové pojmy, z ktorých je najdôležitejší „TIR – time in range“, t.j. časové obdobie, kedy chorý mal glykémie medzi 3,9 a 10,0 mmol·mol<sup>-1</sup> a mal by byť 70 % z celkového času sledovania. Hyperglykemické epizódy alebo „TAR – time above range“ sa delia na prvý a druhý stupeň (od 10 do 14 a nad 14 mmol·mol<sup>-1</sup> a mali by trvať menej ako 30 % času) a hypoglykémie, „TBR – time below range“ menej ako 5 % času. Tieto kritériá nie sú príliš prísne a dajú sa dosiahnuť u každého chorého s diabetes mellitus. Pre určité skupiny ľudí (mladí ľudia s prvým typom diabetu a tehotné diabetičky) je možné vytýčiť prísnejšie ciele a pre starších diabetikov s rôznymi inými chorobami asi bude potrebné uspokojiť sa s menším podielom TIR. Otázne je hodnotenie hypoglykémii celkovým časom – lepšie by bolo udávanie ich frekvencie ako čas. Je možné diskutovať o tom, či horná hranica glykémie 10 mmol·L<sup>-1</sup> pre „in range“ stačí na prevenciu chronických komplikácií. Systém TIR-TAR-TBR neberie do úvahy ani rýchle výkyvy glykémii, čo je pravdepodobne dôležitým faktorom rozvoja komplikácií.<sup>14</sup> Isté je to, že na základe metaanalýz zvýšenie TIR z 50 na 60 % času zníži hladinu HbA<sub>1c</sub> o 9 mmol·mol<sup>-1</sup>.<sup>15</sup> Náš návrh je zhrnutý v tabuľke 3, ale platí,

**„Time in range“ 70 a viac %; „Time above range“ menej ako 30 %.**

**Frekvencia a závažnosť hypoglykémii – čo najmenej a ak predsa, nie závažné.**

**Hodnoty HbA<sub>1c</sub> stanovených spoľahlivou metódou v pravidelných intervaloch.**

**Ideálne do 43 mmol·mol<sup>-1</sup>, uspokojivo do 58 mmol·mol<sup>-1</sup>, neuspokojivo 59–75 mmol·mol<sup>-1</sup> a veľmi zle nad 75 mmol·mol<sup>-1</sup>**

*Poznámky:*

*U chorých bez CGMS je možné vychádzať z výsledkov správne robeného domáceho monitorovania.*

*Odporúčame aj sledovať dlhodobý trend zmien HbA<sub>1c</sub>.*

*Odporúčame sledovať aj variabilitu glykémii.*

*Nezabudnúť, že chorý s diabetes mellitus nie je len „glykémia“ – sledovať zmeny hmotnosti, lipidy, elektrolyty, obličkové funkcie a i.*

Rozpor medzi optimistickými výsledkami rôznych štúdií a skutočnosťou je

▲ Tab. č. 3: Trojka komplexného hodnotenia glykemickej kompenzácie v ére kontinuálneho merania glykémie



že ku každému chorému je potrebné pristúpiť individuálne (personalizovaná medicína).

Uvedené tri ukazovatele je možné chápať aj ako novú formu známej „Joslinovej trojky“. Ak sú všetky tri „kone“ monitorovania kompenzácie stanovené správne a hodnotené ako jeden celok, sú dané predpoklady účinnej a správnej liečby každého chorého s diabetes mellitus.

### Je rozdiel medzi glykémiami a HbA<sub>1c</sub> – čo treba robiť?

Prvým krokom pri diskrepancii medzi hodnotou HbA<sub>1c</sub> a glykémiami je zistiť, či:

a. je tento problém jednorazový alebo sa opakuje a či

b. je HbA<sub>1c</sub> vyšší alebo nižší, ako by sa dalo očakávať podľa glykémii

Ak rozdiel nie je konzistentný a nie sú prítomné rušivé faktory, ktoré menia kinetiku glykácie (skrátaná doba života krviniek, hemoglobinopatie aj v heterozygotickej forme a i.), je potrebné veriť hodnote HbA<sub>1c</sub>. Zvlášť záľudná je situácia, ak sú glykémie relatívne dobré a HbA<sub>1c</sub> vysoká, na čo sme už upozornili pred 30 rokmi.<sup>4</sup> Títo ľudia sú ohrození rýchlym vývojom chronických komplikácií. Ak je diskrepancia konzistentná, je potrebné konzultovať s odborníkmi a starostlivo pátrať po rušivých faktoroch. Pri meraní HbA<sub>1c</sub> imunochemickými metódami odporúčame urobiť HPLC alebo kapilárnu elektroforézu, a analyzovať jednotlivé frakcie hemoglobínu.

Vo väčšine prípadov sa diskrepancie medzi HbA<sub>1c</sub> a glykémiami dajú objasniť a vyriešiť komunikáciou medzi diabetológmi a odborníkmi z biochemických laboratórií. V odbornej literatúre sa v poslednej dobe objavili práce, ktoré sa snažia tieto problémy riešiť vedecky. Ide o pojmy Haemoglobin Glycation Index (HGI, index glykácie hemoglobínu) a Glycation Gap (Ggap, glykačná medzera).<sup>16,17</sup> V prvom prípade ide o výpočet pomeru medzi očakávanou glykémiou počítanou z HbA<sub>1c</sub> (Estimated Average Glucose EAG) a priemerom z glykémii za určité obdobie, v druhom o ich rozdiel. Budúcnosť ukáže, či tieto ukazovatele majú skutočný význam pri hodnotení glykemicko-kompenzácie a prognózy rozvoja chronických komplikácií diabetes mellitus, alebo nie.



#### prof. Oliver Rácz, M.D., Ph.D.

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, UPJŠ. Cumulus s.r.o. biochemické laboratórium  
Kontakt: olliracz@gmail.com

Výskum v oblasti diabetes mellitus a antioxidantnej ochrany organizmu. Výskum moderných ukazovateľov lipidového metabolizmu, zrážania krvi a iných parametrov klinickej biochémie. Monografia: „Glykohemoglobín a glykované bielkoviny pri diabetes mellitus“ (1989 – ocenená cenou Slov. literárneho fondu). 16 kapitol v 7 iných monografiách, z ktorých dve boli ocenené. 2 kapitoly v medzinárodných monografiách, Vedecké práce v zahraničných časopisoch, zborníkoch 67. Vedecké práce domácich časopisoch a zborníkoch 127. Citácie: viac ako 650. Člen redakčnej rady eJIFCC (electronic Journal of Internal Federation of Clinical Chemistry). Člen medzinárodného poradného zboru časopisu Diabetologia Hungarica a Orvosi Hetilap (Maďarsko). Výkonný redaktor Laboratórna diagnostika.

## LITERATÚRA

1. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968; 22, 296-298.
2. Lippi G. The irreplaceable value of laboratory diagnostics: four recent tests that have revolutionized clinical practice. *eJIFCC* 2019; 30: 7-13.
3. Rácz O, Kuzmová D. Laboratórne vyšetrenia v diabetológii. In: Klimeš I. et al (Eds) *Všeobecná a klinická endokrinológia*. SAP Bratislava, 2004, kap. 12.3; 577 – 586.
4. Rácz O, Vicha T, Pačín J. Glykohemoglobín, glykácia bielkovín, a diabetes mellitus. *Osveta Martin*, 1989, 243 s.
5. Rácz O, Balla J, Kuzmová D, Lepejová K, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> – ak áno, tak ako? *Labor aktuell* 2008, č. 2, 16-19.
6. Rácz O, Kuzmová D, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> – otvorené otázky a pochybnosti. *Labor aktuell* 2008, č. 3, 9 – 11.
7. Rácz O, Kuzmová D, Lepejová K, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> – nekonečný príbeh? Prvá kapitola. *Labor Aktuell* 2012; 17/1:24-29.
8. Rácz O, Dombrovský P. HbA<sub>1c</sub> - nekonečný príbeh? Druhá kapitola. *Labor Aktuell* 2012; 17/2: 18-21.
9. Santiago JV. Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1993; 42: 1549-1554.
10. Weykamp, C a spol. The IFCC reference measurement system for HbA<sub>1c</sub>: A 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54: 240-248.
11. Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory diagnosis of HbA<sub>1c</sub>: A review. *J Named Res* 2017; 5: 1-10.
12. The EurA1c Trial Group. EurA1c: The European HbA<sub>1c</sub> Trial to Investigate the Performance of HbA<sub>1c</sub> Assays in 2166 Laboratories across 17 Countries and 24 Manufacturers by Use of the IFCC Model for Quality Targets. *Clin Chem* 2018; 64: 1183-1192.
13. Gokhale M, Stürmer T, Buse JB. Real-world evidence: the devil is in the detail. *Diabetologia* 2020 online.
14. McCarter RJ, Gomez R et al. Biological variation in HbA<sub>1c</sub> predicts risk of retinopathy in type 1 diabetes *Diabetes Care* 2004; 27: 1259-1264.
15. Advani A. Positioning time in range in diabetes management. *Diabetologia* 2020; 63, 242-252.
16. Soros AA et al. Hemoglobin glycation index: a robust measure of hemoglobin A1c in pediatric type 1 diabetes patients. *Pediatric Diabetes* 2010; 11: 455-461.
17. Rodriguez-Segade S et al. Estimation of the glycation gap in diabetic patients with stable glycemic control. *Diabetes Care* 2012; 35: 2447-2450.