

Hemoglobinopátiák kórismezése magas nyomású folyadékkromatográfiás eljárással

Nemes-Nagy Enikő¹, Al-Aissa Zahra o.h.², Jákó Zsuzsanna o.h.², Kósa Beáta o.h.²,
Dobreanu Minodora³, Reid Deborah⁴, Higgins Trefor⁴

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Orvosi Biokémia Tanszék, ²egyetemi hallgató, ³Klinikai Biokémia és Laboratórium Tanszék,
⁴Dynacare-Kasper Medical Laboratories, Edmonton, Kanada

Diagnostizarea hemoglobinopatiilor prin cromatografie lichidă de înaltă presiune

Scopul lucrării este prezentarea unor hemoglobinopatii descoperite cu ocazia dozării HbA1c pe două aparate HPLC ale firmei Bio-Rad: analizorul Variant I (Târgu Mureș – 1940 probe prelucrate) și Variant II (Edmonton, Canada – 150 probe prelucrate). Cu aparatele Variant putem identifica diverse hemoglobinopatii (HbS, HbE, HbC, HbD, etc.), dar se recomandă confirmarea acestora prin electroforeză sau alte tehnici. Datorită diversității populației și a centralizării, hemoglobinopatiile apar frecvent în cazuistica canadiană comparativ cu lotul de pacienți autohtoni. Hemoglobinopatiile pot cauza probleme serioase de diagnostic și tratament la diabetici.

Cuvinte cheie: diabet zaharat, hemoglobină glicată, hemoglobinopatii

Diagnosis of hemoglobin variants with high pressure liquid chromatography

The aim is to present hemoglobin variants revealed while measuring HbA1c on two HPLC analyzers (Bio-Rad): Variant I (Târgu Mureș – 1940 samples processed) and Variant II (Edmonton, Canada – 150 samples processed). Working on Variants several pathological hemoglobins can be identified (HbS, HbE, HbC, HbD, etc.), but electrophoretic or other type of confirmation is recommended. Due to population diversity and centralization a larger number of hemoglobin variants were amongst Canadian samples compared to local patients. Hemoglobin variants can cause serious problems in diagnosis and treatment of diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, glycated hemoglobin, hemoglobin variants

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (1): 49-51

www.orvtudert.ro

A hemoglobinopátiák a legszokványosabb egy gént érintő genetikai betegségek, a globulinláncok aminosavsorrendjében végbemenő változások következtében számos patológiás hemoglobinféleség alakul ki. Jelenleg több mint 900 hemoglobinopátiát írtak le, ezek közül csak 9-nek van klinikai megnyilvánulása. A népesség vándorlása azokról a területekről, ahol magas a hemoglobinopátiák előfordulása (Délkelet-Ázsia és Afrika) olyan területek irányába, ahol alacsony (Nyugat- és Közép-Európa, Amerika), megnövelte a nyilvántartott esetek számát ezeken a területeken [10].

Egyes hemoglobin variánsok rátevéődnek a glikozilált hemoglobin (HbA1c) meghatározására különösen a régebbi manuális kromatográfiás eljárásoknál, de a magas nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer esetében is találkozunk ilyen természetű problémákkal [4]. A jellegzetes retenciósidők segítségével nagyrészt megíjósolható a hemoglobinopátia mibenléte, viszont ilyen esetekben ajánlott a pontos kórisme felállítása érdekében más vizsgálatok elvégzése, mint amilyen a bázikus vagy savas közegben történő hemoglobin elektroforézis [6, 8, 9, 12]. Ismertek olyan hemoglobinopátiák is, amelyek elektroforézissel nem mutathatók ki, viszont kromatográfiás eljárással különválaszthatók [3, 13].

A hemoglobinopátiák vizsgálatára használatos analitikai módszerek magukba foglalják a felsoroltakon kívül az oldhatósági próbákat, a sziklizálási tesztet (sarlósejt képződés), a globulinláncok szétválasztását, az izoelektromos fókuszálást, egyes immunológiai módszereket és néhány igen érzékeny elválasztási eljárást, mint amilyen a kapilláris elektroforézis, tömegspektrometria, DNS vizsgálat stb [2, 5].

Célkitűzés

A glikozilált hemoglobin alapvető fontosságú állapotjelző a cukorbetegség követésében, értéke döntő a kezelés szem-

pontjából, mivel a páciensek metabolikus egyensúlyát a segítségével pontosan fel tudjuk mérni, és a kezelés hatékonyságát meg tudjuk állapítani. A meghatározás pontossága nagy mértékben függ a választott módszertől, illetve a vérmintában található patológiás hemoglobin származékok jelenlététől.

Dolgozatunk célja a beteganyagunkban szereplő hemoglobinopátiák bemutatása, és az általuk okozott diagnosztikai és kezelési problémák ismertetése.

Anyag és módszer

A hemoglobinopátiák vizsgálatára, a HbA1c (glikált hemoglobin) meghatározásra szolgáló mintákhoz hasonlóan, a vérpróbákat alvadásgátlóra vesszük, leginkább EDTA (etiléndiaminotetraacetát) nátrium vagy kálium sójára. A minták leépülésének meggátolása érdekében a kémcsöveket 4°C-on tartjuk és 7 napon belül feldolgozzuk, vagy esetenként mélyhűtőben (-20 °C alatt) fagyasztva több ideig tárolhatók a minták.

Az általunk vizsgált vérpróbák esetében a meghatározás minden esetben a HbA1c kimutatására szolgáló reagenskészlettel történt. A glikált hemoglobin mindenki vérében jelen van, egészséges embereknél 4-6%-ban, cukorbetegyeknél ennél magasabb, az előző 3-4 hónap vércukor értékeinek függvényében [7].

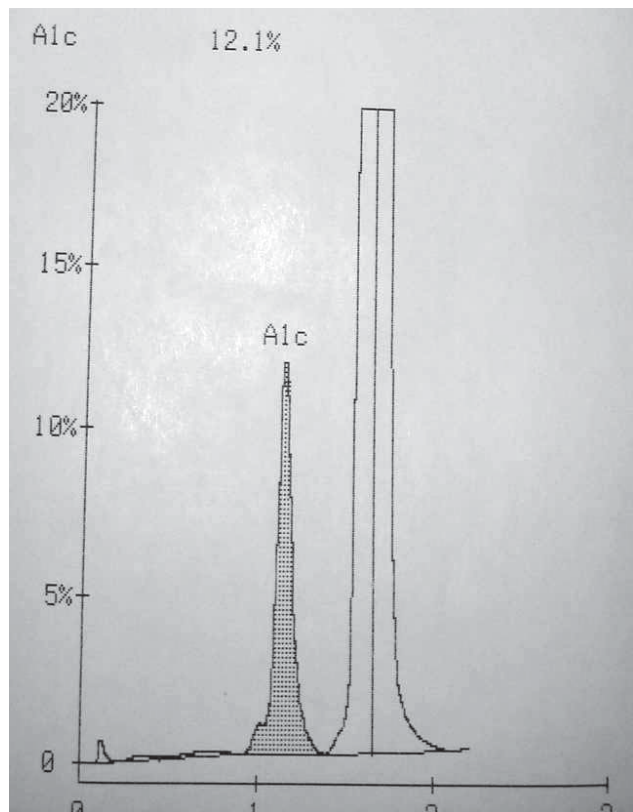
A meghatározások részben Marosvásárhelyen, a Megyei Kórház Központi Laboratóriumában zajlottak (1940 próbát dolgoztunk fel), a Bio-Rad cég reagenskészletével, a VariantTM Hemoglobin Testing System készüléken. Ez egy magas nyomású folyadék kromatográfián (HPLC) alapuló automata analizátor, beépített fotométere két hullámhosszon olvassa le az abszorbancia értékeket: 415 és 690 nm-en. A vérmintákat 1:200-as hígítással kell előkészíteni, ezután végighaladnak a kromatográfiás oszlopon, ahol a puffer

oldatok segítségével különválnak a különböző frakciók. Végül egy kromatogramot nyerünk, amelyen minden csúcs a megfelelő retenciós idővel jellemezhető, és a görbék alatti területet figyelembe véve százalékos eloszlásban láthatók a különböző frakciók. A próbák többi része (150 vérminta)

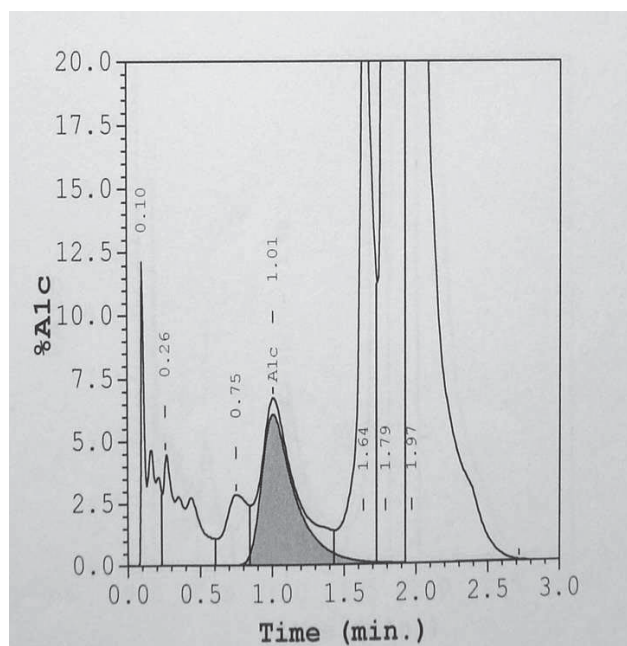
Edmontonban (Kanadában) volt feldolgozva, az előző készülék második, számítógépesített generációjának segítségével (Variant II).

Eredmények

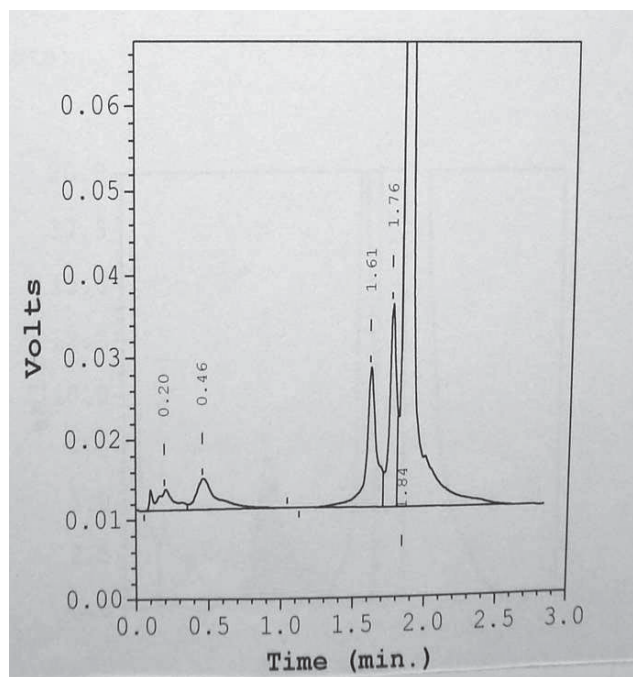
A Kanadában feldolgozott vérmintákban a Variant készülékkel sikerült kimutatnunk számos patológiás Hb származékot. Beteganyagunkban szerepelnek HbS és HbE homozigóták, illetve HbD, S, C, E, Camden, G Coughatta heterozigóták. A Maros megyei esetek közül megemlíthető egy Hb Tyne heterozigóta, illetve számos perzisztáló Hb F –



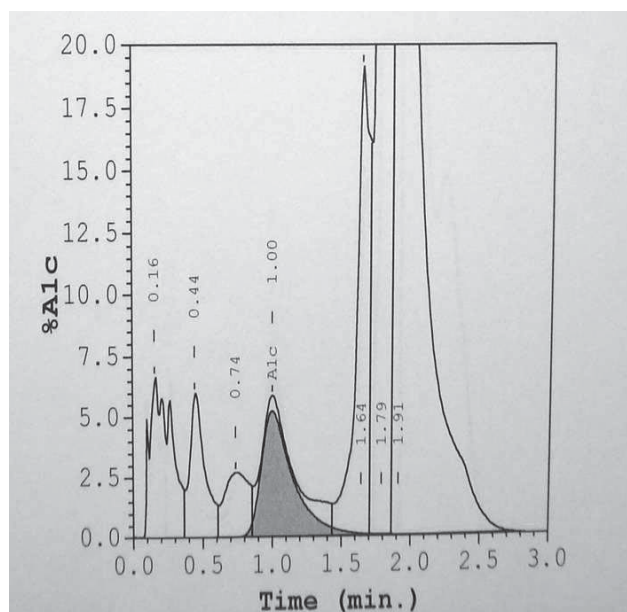
1. ábra. HbTyne heterozigóta kromatogramja



3. ábra. HbS heterozigóta kromatogramja



2. ábra. HbE homozigóta kromatogramja



4. ábra. HbD heterozigóta kromatogramja

ezeke esetében nem mindig történt meg részletes kivizsgálás pl. minor béta thalassaemia irányában [1].

A patológiás hemoglobin származékok glikált formája a kromatogramon más frakcióban található, mint a HbA1c, ami zavart okozhat a szénhidrát anyagcsere egyensúlyának felmérésében. Ezek pontos helyzetének meghatározása jelenleg zajló kutatások célja. Kutatócsoportunk in vitro glikoziláció vizsgálata során foglalkozott ezzel a problémával, és ígértesnek számító eredményeink vannak ezen a téren [11].

Egyes hemoglobin variánsok a magas nyomású kromatográfiás módszernél rátevéődhetnek a HbA1c frakcióra, ilyen pl. a beteganyagunkban szereplő Hb Camden, hatalmas (esetünknel 46,1%-os) glikált hemoglobin értéket mutatva. Bizonyos esetekben (pl. a beteganyagunkban szereplő HbE homozigótánál) annyira alacsony lehet a HbA részaránya (betegünknel 8%), hogy a HbA1c nem is jelenik meg a kromatogramon (3. ábra). Kevésbé specifikus fotometriás módszerekkel végezve a HbA1c meghatározását a megnövekedett HbF is rátevéődik a glikált hemoglobin frakcióra, hamisan magas értéket adva.

Megbeszélés

A hemoglobinopátiák jóval magasabb előfordulási arányt mutatnak a kanadai beteganyagánál, amely a központosított egészségügyi rendszernek és a populáció sokféleségének tudható be. A marosvásárhelyi eseteknél a páciensek 1,46%-ánál találtunk a megendedett 1%-nál magasabb HbF értéket. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a HPLC készülék pár hónapja történt beüzemelése előtt, manuális kromatográfiás fotometriás módszerrel követve a cukorbetegeket, egyes esetekben találtunk megmagyarázhatatlanul magas glikált hemoglobin értékeket. Megfigyeltük továbbá, hogy magas HbF értékhez szinte szabályszerűen emelkedett HbA1b frakció is társul, amely a HPLC-nél kevésbé specifikus módszerekkel szintén nem különíthető el a HbA1c frakciótól.

Következtetések

A különböző patológiás hemoglobin származékok pontos vagy valószínű diagnóza feltehető a magas nyomású folyadékkromatográfiás Variant készülék segítségével a HbA1c reagenskészletet használva. A hemoglobinopátiák jelenléte zavaró lehet a cukorbetegség diagnóza és követése szempontjából a HbA1c-re való rátevéődések miatt, illetve

a patológiás hemoglobin származékok glikált formájának kevésbé ismert, más frakcióban megjelenő helyzete következtében. Egyes homozigótánál a HbA1c hiányozhat a kromatogramról.

Irodalom

1. Bacărea A., Dobrea M., Dorcioman B. et al. - *Beta-talasemia în arealul Mureş*, Revista Română de Medicină de Laborator, 2005, 1:52-55.
2. Bains B. - *Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis*, In: Bain B.J. (szerk.): *Haemoglobinopathy diagnosis*, Blackwell Science, London, 2001, 20-48.
3. Bissé E., Zorn N., Heinrichs I. et al. - *Characterization of a new electrophoretically silent hemoglobin variant*, J. Biol. Chem., 2000, 275:21380-21384.
4. Bry L., Chen P. C., Sacks D. B. - *Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin*, Clin. Chem., 2001, 47:153-163.
5. Clarke G. M., Higgins T. N. - *Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update*, Clin. Chem., 2000, 46:1284-1290.
6. Dogaru M., Coriu D., Higgins T. - *Comparison of two analytical methods (electrophoresis and HPLC) to detect thalassemias and hemoglobinopathies*, Revista Română de Medicină de Laborator, 2007, 9(4):52-55.
7. Dronca M. - *Glicozilarea neenzimatică a proteinelor (semnificații clinice și funcționale)*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000, 54-100.
8. Honda S. A. A., Bhagavan N. V., Sugiyama C. E. et al - *Hemoglobinopathies detected by CBC analysis and HPLC hemoglobin A1c analysis*, Lab. Med., 1994, 25:1976-1981.
9. Higgins T. N., Ridley B. - *Tentative identification of hemoglobin variants in the Bio-Rad VARIANT II HbA1c method*, Clin. Biochem., 2005, 38:272-277.
10. Higgins T. N., Beutler E., Doumas B. T. - *Hemoglobin, Iron and Bilirubin*, In: Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns (szerk.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Elsevier Saunders, 2006, 1165-1208.
11. Nemes-Nagy E., Higgins T. N., Shank B.L. et al - *Influența anticoagulantelor, pH-ului și a integrității hematiilor asupra procesului de glicozilare in vitro a hemoglobinei*, Revista Română de Medicină de Laborator, 2005, 1:20-26.
12. Ou C.-N., Rognerud C. L. - *Diagnosis of hemoglobinopathies electrophoresis vs. HPLC*, Clin. Chem. Acta, 2001, 313:187-194.
13. Ou C.-N., Rognerud C.L. - *Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC*, Clin. Chem., 1993, 39:820-824.