

Influența anticoagulantelor, pH-ului și integrității hematiilor asupra procesului de glicozilare in vitro a hemoglobinei

Influence of anticoagulants, pH and integrity of blood cells on haemoglobin glycation process in vitro

Nemes-Nagy Enikő¹, Trefor Higgins², Becky L. Shank², Pap Zoltán³, Hobai Ștefan¹

1. UMF Târgu Mureș, Disciplina de Biochimie,
2. Centrul de Laboratoare Medicale Dynacare Kasper, Edmonton, Canada,
3. Clinica de Pediatrie II din Târgu Mureș

Rezumat

Dintre cele 5 anticoagulante studiate, citratul de Na și K₂EDTA s-au dovedit a fi cea mai bună alegere, iar pH-ul de 7,5-8 este ideal pentru urmărirea in vitro a procesului de glicare. Nu au fost observate diferențe reale între probele diluate cu soluție salină și tampon Hepes. Probele cu hematii intacte au prezentat o cinetică mai bună decât probele hemolizate.

Abstract

From the 5 anticoagulants studied, Na citrate and K₂EDTA proved to be the best choices, and pH of 7,5-8 was ideal for following in vitro glycation process. No real difference occurred between samples diluted with saline and Hepes buffer. Samples with intact blood cells presented a better kinetics compared to hemolized samples.

terapeutice individualizate [4].

Introducere

Există numeroase metode de determinare a hemoglobinei glicozilate (HbA1c), dintre care metoda cu HPLC este una foarte modernă și precisă [3]. În literatura de specialitate sunt raportate cazuri care prezintă discrepanță între valorile glicemice (satisfăcătoare) și cele de HbA1c (foarte ridicate), care sunt presupuși "glicatori rapizi", a căror depistare ar ajuta la alcătuirea unei scheme

Scopul studiului

Scopul acestui studiu a fost punerea la punct a unei metode de studiere in vitro a procesului de glicozilare a hemoglobinei și analiza efectului diferitelor substanțe anticoagulante, a hemolizei și a modificării pH-ului asupra desfășurării acestui proces.

Dacă s-ar putea dezvolta o metodă satis-

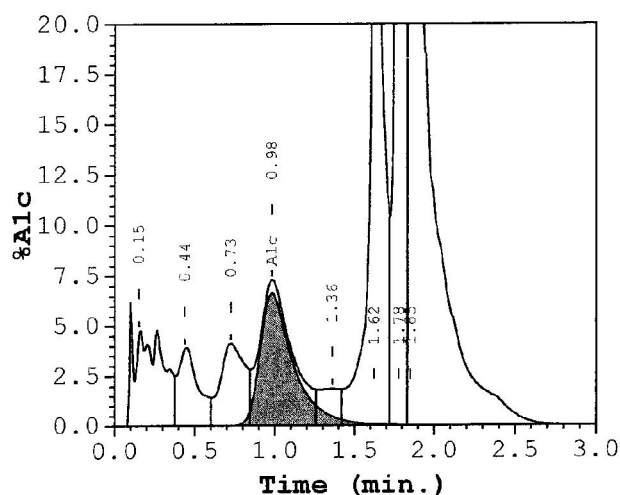


Figura 1. Aspectul unei cromatograme obținute cu ajutorul analizorului Variant II Hemoglobin Testing System

făcătoare pentru aprecierea ratei de glicozilare a hemoglobinei, acesta ar putea oferi un mod de testare a pacienților diabetici care sunt presupuși "glicatori rapizi", pentru a optimiza tratamentul acestora.

Material și metodă

S-a realizat incubarea eritrocitelor într-o soluție de glucoză de 25 mmol/l la 37°C și efectuarea unor cromatograme cu analizorul Variant II Hemoglobin Testing System (funcționând pe principiul cromatografiei lichide de înaltă presiune), de la firma Bio-Rad (Figura 1).

S-a încercat simularea cât mai reală a condițiilor din interiorul organismului uman. Astfel, nu s-a recurs la spălarea hematiilor, s-a încercat evitarea hemolizei prin utilizarea unor probe proaspete, și menținerea unui pH optim de 7,5.

Am urmărit în special modificarea procentuală a HbA1c și a formei intermediare labile (bază Schiff).

Am utilizat probe de sânge recoltate în eprubete vacutainer cu: 1). K₂EDTA 7,2 mg, 2). citrat de sodiu tamponat 0,105M, 3). fluorură de sodiu 15 mg și oxalat de potasiu 12 mg, 4). heparină 15,9 mg, cu gel și litu, 5). 1 ml de ACD soluție B conținând citrat trisodic 13,2g/l, acid citric 4,8 g/l și dextroză 14,7 g/l.

Mod de lucru

S-au utilizat probe de sânge de la pacienți diabetici și nediabetici, adulți și copii, recoltate pe diferite anticoagulate, cu maximum 24 de ore înainte de analiză. În prima etapă de tatonare s-au utilizat și probe de sânge proaspete recoltate de la voluntari.

Anticoagulant	Rata de glicare după adăugare de 10 μ l sol. G	Rata de glicare după 20 μ l sol. de glucoză	Rata de glicare după 30 μ l sol. de glucoză
K ₂ EDTA	0,575	1,250	1,505
Heparină	0,590	1,255	1,375
NaF/oxalat de K	0,870	1,360	1,615
ACD soluție B	0,980	1,490	1,615

Tabelul 1. Rate de glicare

Ore	LA1c% I	LA1c% H	A1c% I	A1c% H	P3% I	P3% H
3	1,895	2,03	0,056	-0,1	0,52	0,72
6	2,45	2,91	-0,003	-0,14	0,82	1,04
10	2,54	3,15	0,06	-0,09	1,35	5,61
25	2,02	4,06	0,14	-0,07	1,11	11,57
28	1,873	4,01	0,15	-0,042	1,202	12,26
31	1,88	4,17	0,2	-0,025	1,3	12,89
48	0,95	4,02	0,29	0,017	1,09	14,38

Tabelul 2. Evoluția fracțiunilor LA1c, HbA1c și P3 (%) la probele recoltate pe K₂EDTA (I: probe de sânge intacte, diluate cu ser fiziologic, H: probe de sânge hemolizate, diluate cu apă bidistilată)

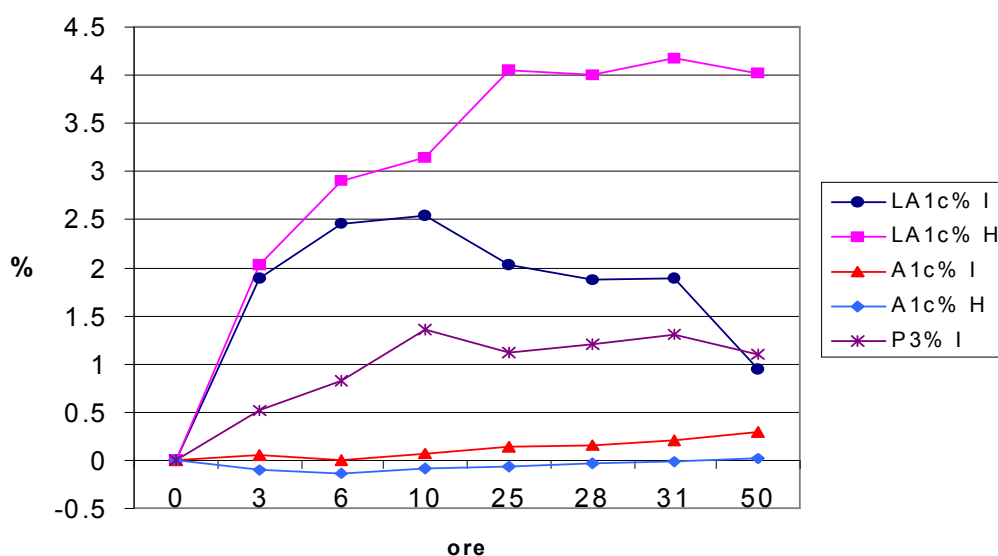
La probele recoltate pe EDTA am utilizat doar eprubete care au conținut cel puțin 3 ml de sânge în tubul de 4 ml, fiindcă soluția de EDTA la concentrații de peste 2 mg/ml micșorează talia eritrocitelor și afectează permeabilitatea membranară a acestora [2].

S-a efectuat o analiză cromatografică, după care s-a diluat sângele 1:1 cu ser fiziologic, apă bidistilată sau tampon Hepes (20 mmol/l) și s-a adăugat soluția de glucoză. S-a efectuat o nouă cromatogramă, apoi probele au fost incubate. Media procentelor fracțiunilor obținute

la aceste două cromatograme a fost considerată valoarea de bază.

S-a urmărit în timp modificarea aspectului cromatogramelor și s-au utilizat pentru calcul ariile corespunzătoare hemoglobinei glicozilate (HbA1c) și a fracțiunii labile ale acesteia (LA1c), transformate în procentaj, considerând 100% aria hemoglobinei A. S-a urmărit și evoluția fracțiunii P3, în care am presupus că ar fi eluate de asemenea unele forme glicozilate de hemoglobină. În vederea reprezentării grafice a rezultatelor, s-a calculat

Probe pe EDTA intacte și hemolitice



Figură 2. Evoluția fracțiunilor LA1c, HbA1c și P3 (%) la probele recoltate pe K₂EDTA (I: probe de sânge intacte, diluate cu ser fiziologic, H: probe de sânge hemolizate, diluate cu apă bidistilată)

diferența în procente între valorile obținute pe parcursul urmăririi procesului de glicozilare *in vitro* și valorile inițiale, considerate ca valori de bază.

Toate analizele pentru probe, controale, calibratori precum și manevrele de curățare ale aparatului au fost efectuate conform manualului de instrucțiuni corespunzător aparatului Variant II Hemoglobin Testing System de la firma Bio-Rad [1].

Rezultate

S-a constatat că evoluția procesului de glicozilare *in vitro* este cel mai favorabil când după adăugarea de glucoză, nivelul glicemiei plasmatice din probele utilizate se situează în jurul valorii de 30 mmol/l. Această concentrație se poate realiza prin adăugarea de 40 μ l din soluția de glucoză de 25 mmol/l la probele de sânge diluate (1 ml sânge total amestecat cu 1 ml ser fiziologic, tampon Hepes sau apă bidistilată).

S-au testat mai multe substanțe anticoagulante: heparină, K_2EDTA , ACD soluție B, NaF, citrat de sodiu, și s-a măsurat pH-ul plasma-

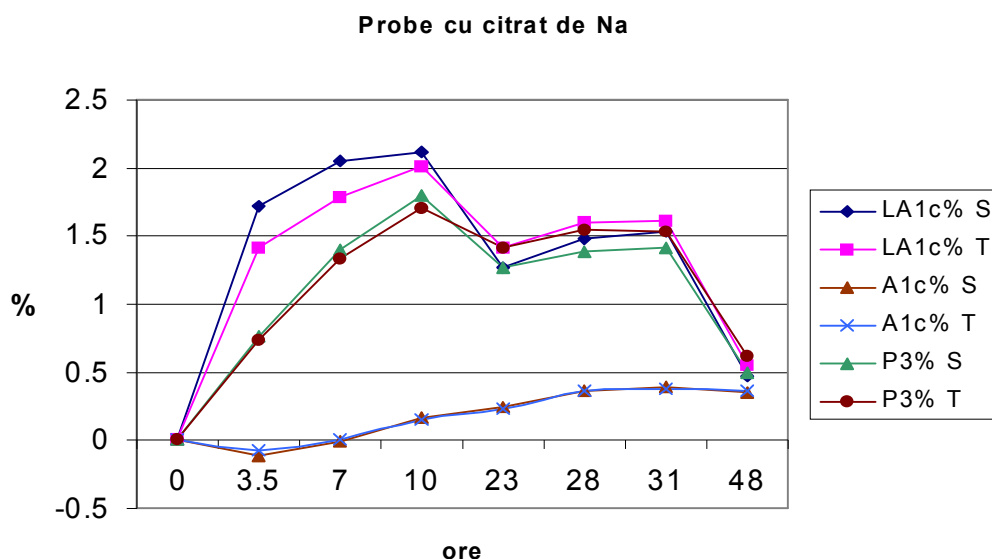
tic din probele recoltate pe acestea.

Eprubetele cu heparină au conținut un strat de gel care a separat faza de celule sanguine de plasmă, astfel aceste tuburi s-au putut utiliza doar pentru prelucrarea unor probe proaspete de sânge, recoltate de la voluntari. PH-ul acestor probe a fost de 8,5.

Probele care s-au recoltat pe NaF/oxalat de K au prezentat hemoliză evidentă, astfel acest amestec anticoagulant nu este o alegere bună pentru urmărirea glicozilării *in vitro* a hematiilor, dacă dorim să simulăm condițiile fiziologice și încercăm să menținem eritrocitele intacte. PH-ul acestor probe a fost de 8,5 unități.

Eprubetele cu ACD soluție B conțin dextroză în compoziția acestui amestec, astfel concentrația de glucoză plasmatică din probele recoltate în aceste tuburi a fost mult mai ridicată comparativ cu celelalte eprubete. PH-ul acestor probe a fost de 8 unități.

Rezultate satisfăcătoare s-au putut obține cu probe de sânge recoltate pe K_2EDTA și citrat de sodiu. PH-ul probelor recoltate pe K_2EDTA a fost de 8 unități, iar plasma probelor de citrat de sodiu au avut pH-ul de 7,5 unități, valoare optimă care simulează condițiile de ușoară alcalinitate



Figură 3. Evoluția fracțiunilor LA1c, HbA1c și P3 (%) la probele recoltate pe citrat de sodiu (S: probe diluate cu ser fiziologic, T: probe diluate cu tampon Hepes)

din torentul sanguin. Prin adăugare de tampon Hepes, același pH de 7,5 s-a putut obține și în cazul probelor de sânge recoltate pe K₂EDTA.

Am calculat și comparat rata de glicare în cazul probelor recoltate pe diferite substanțe anticoagulante (K₂EDTA, heparină, NaF/oxalat de K, ACD soluție B). Am luat în calcul procentajul fracțiunii labile (LA1c), mai exact diferența dintre valoarea obținută după diferite perioade de incubare și cea inițială, raportată la unitatea de timp (o oră). Probele au conținut sânge nediluat, la care s-au adăugat cantități diferite din soluția de glucoză de 25 mmol/l (10, 20, 30 μ l).

Mediile din primele două ore a ratelor de glicare corespunzătoare diferitelor condiții sunt cuprinse în *Tabelul 1*. În cadrul acestui experiment fiecare eprubetă a conținut sânge proaspăt prelevat de la aceeași persoană voluntară.

Pe baza tabelului ratele de glicare la probele cu K₂EDTA și heparină seamănă mult, după adăugare de 20 μ l din soluția de glucoză 25 mmol/l, cifrele sunt chiar identice.

Probele care au prezentat hemoliză (recoltate pe NaF/oxalat de K) arată rate de glicare mai ridicate, iar ratele cele mai mari sunt la probele recoltate pe ACD soluție B.

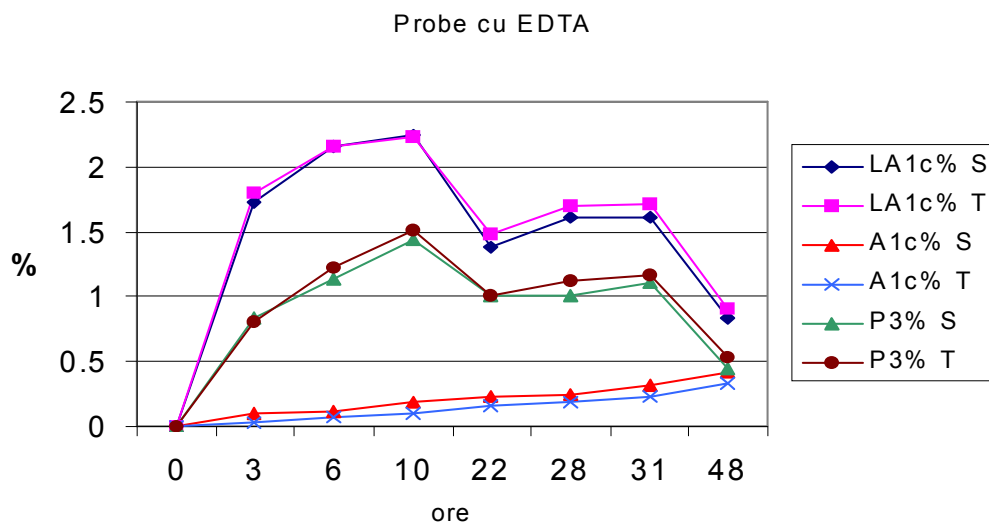
Pe baza rezultatelor de mai sus corobora-

te cu valorile glicemice obținute la aceste probe, s-a hotărât continuarea experimentelor utilizând 20 μ l soluție de glucoză 25 mmol/l la 1 ml de sânge integral, astfel la probele diluate 1:1, s-a adăugat 40 μ l din soluția de glucoză. Astfel am obținut glicemii plasmatice în intervalul 29,7 - 36,4 mmol/l (media fiind 31,86 mmol/l), în funcție de glicemia inițială a probelor respective.

În etapa următoare am comparat procesul de glicare la probele hemolizate (1 ml sânge integral + 1 ml apă bidistilată) și la probele la care am încercat să menținem hematiile intacte (1 ml sânge integral + 1 ml ser fiziologic), utilizând probe recoltate pe K₂EDTA, cu câte 40 μ l din soluția de glucoză (rezultate în tabelul 2 și pe figura 2).

Pe figura 2 nu a fost redată evoluția fracțiunii P3 (%) în cazul probelor hemolizate, datorită valorilor foarte ridicate obținute începând de la 10 ore de incubare, probabil din cauza unor cantități mari de produse de degradare acumulate în aceste probe.

S-a urmărit procesul de glicare timp de 48 ore, la probe pe K₂EDTA și citrat de sodiu. Fiecare probă a fost împărțită în trei. În prima eprubetă sângele a fost diluat 1:1 cu ser fiziologic și s-a adăugat 40 μ l din soluția de glucoză, în a



Figură 4. Evoluția fracțiunilor LA1c, HbA1c și P3 (%) la probele recoltate pe K₂EDTA (S: probe de sânge diluate cu ser fiziologic, T: probe de sânge diluate cu tampon Hepes)

doua eprubetă sângeră a fost diluat cu tampon Hepes și s-a adăugat 40 μ l din soluția de glucoză, iar sângeră din a treia eprubetă a fost diluată și incubată fără adăugare de glucoză pentru a vedea evoluția fracțiunilor în lipsa forțării procesului de glicare. Rezultatele apar pe figurile 3 și 4.

Pe grafic, fracțiunea P3 are o evoluție asemănătoare cu LA1c, astfel putem presupune că și P3 are legătură cu procesul de glicozilare. Ambele prezintă o maximă la 10 ore de incubare. Nu apar diferențe notabile între probele diluate cu tampon și cele diluate cu ser fiziologic. HbA1c după o mică variație negativă, crește evident de la 10 ore după adăugarea de glucoză, care corespunde cu panta descrescândă prezentată de LA1c.

Comparând figurile 3 și 4, la probele pe K_2 EDTA diferența dintre valorile de LA1c (%) și P3 (%) sunt mai mari, iar la probele pe citrat de sodiu, graficele lor au evoluții foarte apropiate. HbA1c prezintă o evoluție exclusiv deasupra liniei de bază în cazul probelor recoltate pe K_2 EDTA. Evoluția fracțiunilor la probele diluate și incubate fără adăugare de glucoză a fost complet diferită față de cele anterioare (Figura 5).

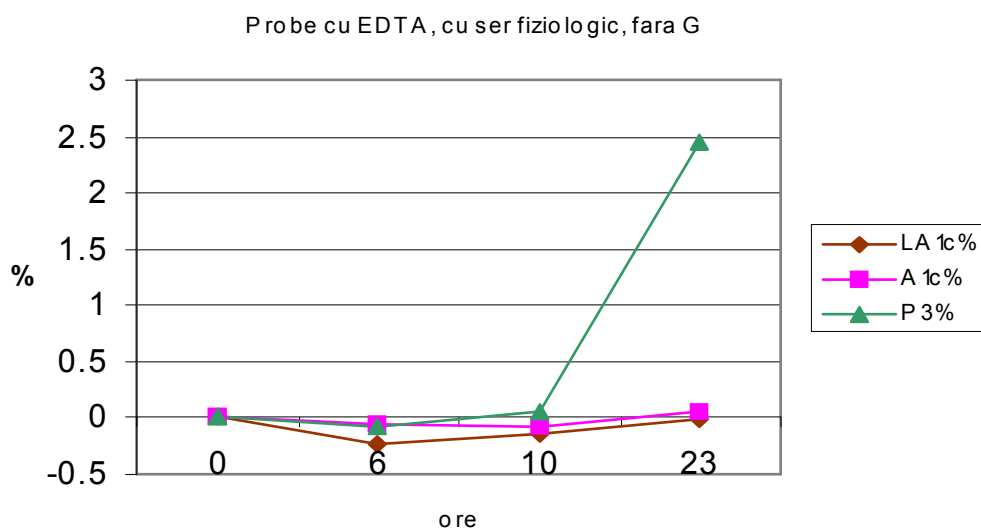
Concluzii și discuții

Dintre anticoagulantele utilizate am obținut cele mai bune rezultate cu citratul de sodiu și K_2 EDTA. Utilizarea tamponului Hepes pentru menținerea pH-ului fiziologic și a integrității celulelor nu a adus modificări importante în cinetica reacției de glicare.

Probele intacte au prezentat o cinetică reproductibilă, cu pantă ascendentă și descendentă, iar la cele hemolizate fracțiunile LA1c și P3 au avut valori tot mai mari după 10 ore, iar A1c a prezentat de multe ori valori mai mici decât cele inițiale. Astfel s-ar putea recomanda urmărirea procesului de glicozilare preferabil pe hematii intacte, minimalizând riscul ca produșii de degradare să modifice aspectul cromatogramelor.

Pe grafice se poate observa că la 21-25 de ore de incubare, survine o scădere importantă a procentajului fracțiunilor LA1c și P3, ceea ce s-ar putea explica prin lipsa amestecării probelor peste noapte, fiindcă aceste puncte au fost obținute de dimineață.

Pe baza datelor se poate afirma că fracțiunea P3 are legătură cu procesul de glicozilare, evoluția sa având aspect asemănător cu graficul



Figură 5. Evoluția fracțiunilor LA1c, HbA1c și P3 (%) pe parcursul incubării fără adăugare de glucoză la probele recoltate pe K_2 EDTA și diluate cu ser fiziologic

prezentat de fracțiunea LA1c.

Fracțiunea HbA1c are o evoluție în jurul liniei de bază, după care prezintă o creștere lentă, dar evidentă. Deși în literatură s-a semnalat posibilitatea ca reacția de transformare a bazei Schiff în cetimină să fie reversibilă [4], totuși aceste mici scăderi sub linia de bază ale HbA1c nu ar justifica pe deplin această explicație, fiindcă deviațiile sunt foarte mici și ar putea fi datorate unor inexactități de determinare ale aparatului.

Bibliografie

1. Bio-Rad Laboratories: Instruction Manual - Variant II Hemoglobin A1c program, 2003 Sept.,

L70200107

2. Choen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH: Discordance between HbA1c and fructosamine, *Diabetes Care*, 2003, 26(1): 163-7
3. Higgins T., Beutler E., Dumas B.: Hemoglobin, Iron and Bilirubin, in: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D. (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Ed. Elsevier Saunders, 2006, p. 1165-1208
4. Mortensen HB, Christophersen C: Glucosylation of human haemoglobin a in red blood cells studied in vitro. Kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A1c, *Clin Chim Acta*, 1983, 134(3):317-26