

Гликированный гемоглобин как ключевой параметр при мониторинге больных сахарным диабетом. Оптимальная организация исследований

А.В. Ильин, М.И. Арбузова, А.П. Князева

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, Москва
(директор – член-корр. РАМН Г.А. Мельниченко)

Компенсация нарушений углеводного обмена является единственным способом профилактики ранней инвалидизации и смертности людей, страдающих сахарным диабетом. В настоящее время в России зарегистрировано более 2,5 млн. больных с сахарным диабетом, по оценкам экспертов эта цифра в 2–3 раза больше [1]. При этом ежегодный прирост числа больных с сахарным диабетом сохраняется на уровне 4–5% [2].

Многочисленные публикации в отечественной и зарубежной литературе убедительно доказывают зависимость между степенью контроля гликемии и риском развития микрососудистых осложнений при диабете [3–6]. Единственным маркером степени компенсации углеводного обмена, следовательно, качества лечения и риска развития отдаленных осложнений сахарного диабета, является уровень гликированного гемоглобина (HbA1c). Учитывая это, диабетологами всего мира признается необходимость регулярных (4 раза в год) исследований гликированного гемоглобина [7–8]. Те же требования к частоте исследований предъявляются и в России [9, 10].

Гликированный гемоглобин (HbA1c) – это соединение гемоглобина с глюкозой, которое образуется в результате неферментативной химической реакции гемоглобина А, содержащегося в эритроцитах, с глюкозой крови. Скорость и объем этой реакции зависят от среднего уровня глюкозы крови на протяжении жизни эритроцита. Гликированный гемоглобин отражает гликемию, имевшую место на протяжении периода жизни эритроцитов (до 120 суток). Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов – 60 суток. Таким образом, по содержанию гликированного гемоглобина можно судить о том, какой была концентрация глюкозы в предшествующие исследованию 4–8 недель. В связи с этим больным сахарным диабетом и рекомендуется проводить исследование уровня гликированного гемоглобина раз в квартал для контроля терапии диабета и через 4–6 недель после изменения тактики лечения [11].

Существует несколько форм гликозилированных гемоглобинов: HbA1a, HbA1b, HbA1c. Последняя форма количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности гипергликемии, поэтому в ходе проспективного исследования DCCT (Diabetes Control and Complications Trial, 1983–1993 гг.) было определено, что из всех вариантов гликированного гемоглобина клинически значимо лишь определение фракции A1c.

Целевые уровни гликированного гемоглобина (HbA1c) – уровни, при которых риск осложнений СД существенно снижается, и, следовательно, достижение их является целью терапии – при контроле за качеством ведения больных регламентированы в Федеральной целевой программе «Сахарный диабет» в рамках «Алгоритмов специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом», в соответствии с типом диабета [12] (табл. 1).

Несмотря на признанную необходимость определения уровня гликированного гемоглобина, в настоящее время на территории России производится недостаточное количество тестов. По данным регистра сахарного диабета на территории России производится не более 10% тестов на HbA1c от необходимого согласно принятым стандартам, при этом средний уровень гликированного гемоглобина превышает 8,5%. В этой связи чрезвычайно важным являются обеспечение необходимого количества тестов и рациональная организация проведения тестирования на гликированный гемоглобин всем больным с сахарным диабетом.

Ниже приведены несколько самых основных причин недостаточного количества выполняемых тестов на гликированный гемоглобин, выявленных на основе проведенного недавнего опроса врачей-эндокринологов:

- 1) недостаточная информированность врачей и пациентов о клинической значимости теста;
- 2) использование портативных анализаторов с низкой пропускной способностью;
- 3) недостаточное качество проводимого тестирования на некоторых территориях и, как следствие, недоверие врачей к результату теста.

Таблица 1

Критерии компенсации нарушений углеводного обмена и целевые значения HbA1c при сахарном диабете [12]			
Целевые значения гликированного гемоглобина при сахарном диабете 1 типа			
Показатель	Норма (нет диабета)	Эффективная терапия	Неэффективная терапия
Hb A1c, %	<6,1	6,1–7,5	>7,5
Критерии компенсации нарушений углеводного обмена при сахарном диабете 1 типа			
Показатель	Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
HbA1c, %	<7,0	7,1–7,5	>7,5
Целевые значения гликированного гемоглобина при сахарном диабете 2 типа			
Показатель	Низкий риск ангиопатий	Риск макроангиопатий	Риск микроангиопатий
Hb A1c, %	≤6,5	>6,5	>7,5
Критерии компенсации нарушений углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа			
Показатель	Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
Hb A1c, %	<7,0	7,1–7,5	>7,5

Важной составной частью комплексного решения проблемы недостаточного количества проводимого тестирования является обеспечение качества тестирования гликированного гемоглобина и стандартизация используемых методов. Одним из решений проблемы недостаточного тестирования на гликированный гемоглобин является использование высокопроизводительных анализаторов с качеством, соответствующим международным требованиям.

Первые методы исследования гликированного гемоглобина появились еще в 50-х гг. прошлого века. В их основе лежало разделение фракций гемоглобина методом колоночной хроматографии, при этом все этапы анализа проводились вручную. Метод был крайне трудоемким и длительным. Далее исследования развивались по многим направлениям, результатом которых было появление большого числа различных методов определения гликированного гемоглобина, основанных на различии в зарядах, структуре, химических свойствах фракций гемоглобина – электрофорез, хроматография, иммунологические и биохимические методы.

В связи с многообразием используемых методов вскоре встал вопрос о сопоставимости результатов, полученных в различных лабораториях с использованием разных методов. Данная проблема впервые была затронута при проведении исследования DCCT (Diabetes Control and Complications Trial). Позднее была создана целая серия программ по стандартизации методов определения гликированного гемоглобина в различных странах мира: NGSP (The National Glycohemoglobin Standardization Program, США), JDS (Japan Diabetes Society, Япония), Mono S (Швеция), IFCC (The International Federation of Clinical Chemistry). Рабочей группой из представителей ADA (American Diabetes Association), EASD (European Association for the Study of Diabetes) и International Diabetes Federation (IDF) в 2004 г. было реко-

мендовано фирмам-производителям наборов приводить результаты исследований HbA_{1c} к значениям, стандартизованным по программе NGSP. В России также принята NGSP стандартизация методов определения гликированного гемоглобина.

Согласно рекомендациям NGSP главным требованием к стандартизованным методам является воспроизводимость результатов, коэффициент вариации (CV) между независимыми сериями результатов не должен превышать 4%. При этом наблюдается тенденция к постоянному ужесточению данного критерия и, начиная с 2008 г., прогнозируется снижение CV до 3% [13]. Важность данного критерия приобретает особое значение, когда полученные результаты совпадают с границей нормы и патологии и с точкой принятия решения о качестве проводимого лечения и риска развития отдаленных осложнений. В качестве примера можно привести диапазон получаемых значений для образца со средним уровнем HbA_{1c} 6,8%. В данном случае разброс значений будет лежать в диапазоне от 6,46 (норма) до 7,14% (диабет). Так же следует обратить внимание, что такие ограничения на воспроизводимость необходимы при определении гликированного гемоглобина в динамике, поскольку между тестами проходят относительно большие промежутки времени.

В настоящее время существует более 6 различных методов определения гликированного гемоглобина, которые используются в коммерческих тест-системах. В табл. 2 представлены наиболее часто встречаемые на практике анализаторы и методики для определения гликированного гемоглобина. В табл. 3 проведена сравнительная оценка анализаторов на основе таких методов относительно ключевых требований при определении гликированного гемоглобина в условиях современной лаборатории со средними и крупными объемами анализов.

Таблица 2

Основные лабораторные методы определения гликированного гемоглобина			
Используемый метод	Анализатор (диагностический набор)	Назначение	Особенности
Ионообменная хроматография высокого давления (ВЭЖХ)	Анализаторы D10 (Bio-Rad) Variant II (Bio-Rad)	Централизованные лаборатории (лаборатории областных и городских больниц, диагностические центры, центры диабета)	Достоинства: сертифицированный метод, полностью автоматический, высокая воспроизводимость, результаты не требуют подтверждения. Недостатки: необходимость использования специализированного оборудования
Аффинная хроматография	Анализаторы In2it (Bio-Rad) NycoCard (Axis-Shield)	Кабинет врача	Достоинства: сертифицированный метод, возможность выполнения единичных исследований в кабинете врача. Недостатки: высокая стоимость расходных материалов, не прямое определение фракции HbA _{1c}
Иммунотурбидиметрия	Диагностические наборы для автоматических биохимических анализаторов (Bayer, Beckman Coulter, Olympus, Roche и т.д.)	Биохимическая лаборатория со средним и низким потоком анализов	Достоинства: сертифицированный метод, возможность выполнения анализа на биохимическом анализаторе, установленном в лаборатории. Недостатки: необходимость ручной пробоподготовки. Клинически значимая интерференция в присутствии гемоглобинов F (>10%), C и S [14]
Ионообменная хроматография низкого давления	Анализаторы DiaStat (Bio-Rad) DS5 (Drew)	Биохимическая лаборатория с низким потоком анализов	Достоинства: хорошая корреляция с методом ВЭЖХ. Недостатки: необходимость пробоподготовки, низкая производительность, интерференция в присутствии HbF
Аффинная хроматография с использованием микроколонок	Диагностический набор «Диабет-тест» Фосфорсорб	Биохимическая лаборатория с низким потоком анализов	Достоинства: относительно низкая стоимость теста. Недостатки: не отвечает требованиям NGSP, высокие трудозатраты

Таблица 3

Сравнение анализаторов (методов) определения гликированного гемоглобина				
Анализатор (метод)	D 10	Hitachi	Фосфосорб	DiaSTAT
Воспроизводимость при нормальных значениях HbA1c (CV менее 4%)	✓	✓	✗	✓
Воспроизводимость при патологических значениях HbA1c (CV менее 4%)	✓	✗	✗	✓
Прямое определение фракции HbA1c	✓	✗	✗	✓
Время анализа менее 3 мин	✓	✓	✗	✗
Возможность использования первичных пробирок	✓	✗	✗	✗
Наличие встроенной системы контроля качества	✓	✗	✗	✗
Пропускная способность не менее 100 образцов в день	✓	✓	✗	✗
Возможность подключения к лабораторной информационной системе (ЛИС)	✓	✓	✗	✗
Русифицированное программное обеспечение	✓	✗	✗	✗

✓ – да, ✗ – нет.

Таблица 4

Средние значения и коэффициенты межсерийной вариации, полученные при определении содержания Hb A1c				
Контроль 1-го уровня	D-10	Tina-Quant «HbA1c»	Диабет-тест	DiaStat
Hb A1c, %	5,78±0,03	5,69±0,08	4,8±0,16	5,89±0,12
CV, %	1,1	3,0	6,8	4,1
Контроль 2-го уровня	D-10	Tina-Quant «HbA1c»	Диабет-тест	DiaStat
Hb A1c, %	10,06±0,09	9,46±0,24	7,91±0,3	9,55±0,09
CV, %	1,8	5,2	7,7	2,0

При всем многообразии методов, предлагаемых для определения гликированного гемоглобина, наиболее полно соответствует современным требованиям метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), принятый NGSP как референсный метод [15] и который используется в большинстве ведущих лабораторий мира. Суть метода состоит в сорбции всех вариантов гемоглобина на ионообменной смоле колонки, с последующим их разделением по различным фракциям под действием градиента pH буфера и детектированием.

На базе лаборатории клинической биохимии Эндокринологического научного центра была проведена сравнительная оценка точности и воспроизводимости результатов, полученных с помощью основных используемых в нашей стране методов определения гликированного гемоглобина: ВЭЖХ (анализатор D10 «Био-Рад»); хроматография низкого давления (анализатор DiaStat «Био-Рад»); иммунотурбидиметрия (диагностический набор Tina-Quant «HbA1c» «Roche» – исследования выполнялись на биохимическом анализаторе HITACHI 912); аффинная хроматография (диагностический набор «Диабет-тест» Фосфосорб). Целью данной работы было сравнение результатов определения уровня гликированного гемоглобина, полученных разными методами.

Результаты определения средних значений гликированного гемоглобина в образцах контрольной крови с нормальным (контроль 1-го уровня) и патологическим (контроль 2-го уровня) содержанием гликированного гемоглобина 4 разными методами представлены в табл. 4. Паспортные значения, представленные производителем контрольных образцов для референсного метода ВЭЖХ (анализатор D10), составили 5,9% и 10,0% HbA1c, соответственно. В табл. 4 также представлены значения межсерийного коэффициента вариации, рассчитанного на основании 16 определений содержания гликированного гемоглобина в течение месяца в названных контрольных образцах.

Данные определения гликированного гемоглобина в пробах пациентов позволяют видеть, что наименьшие значения коэффициента вариации (не более 2% для всех уровней гликированного гемоглобина) получены при использовании анализатора D10.

Значения, очень близкие к референсному методу ВЭЖХ (D10), были получены для анализатора DiaStat, значение CV при этом хотя и было выше в 2–4 раза, но не превышало принятых стандартов. Данный факт не вызывает удивления, поскольку в основе работы данных анализаторов лежит

использование общего принципа хроматографического разделения фракций гемоглобина. Однако в случае метода ВЭЖХ (D10) разделение происходит в стандартизованных условиях (температура, давление), что позволяет значительно повысить правильность и воспроизводимость анализа.

Среднее значение гликированного гемоглобина, полученное методом иммунотурбидиметрии (Tina-Quant «HbA1c») практически совпало с таковым, полученным референсным методом ВЭЖХ (анализатор D10), но при патологическом уровне HbA1c, где наиболее высок риск развития осложнений и критически необходима точность определения, значение CV превысило принятые стандарты.

Таким образом, результаты проведенной сравнительной оценки убедительно доказывают преимущества использования анализатора D10 на основе референсного метода ВЭЖХ для определения уровня HbA1c. В совокупности с удобством использования и высоким уровнем автоматизации данного метода, реализованного в современных анализаторах типа D10 «Био-Рад», можно считать, что в настоящий момент он является наилучшим вариантом для средних и крупных лабораторий.

В настоящее время оборудованием на основе метода ВЭЖХ оснащены более 80% NGSP сертифицированных лабораторий мира. Анализаторами на основе данного метода (D10 «Био-Рад») оснащены и многие российские учреждения здравоохранения: Научный эндокринологический центр Росмедтехнологий, МОНИКИ им. Владимирского, Эндокринологический Диспансер ДЗ г. Москвы, более 50 лабораторий областных и городских больниц и диагностических центров.

Помимо использования высокотехнологичного оборудования, другим важным аспектом в решении проблемы недостаточного тестирования гликированного гемоглобина является оптимальная организация лабораторной службы. Централизация потоков и осуществление исследований единой референсной методикой ВЭЖХ позволяет обеспечить полную сопоставимость результатов, выполненных в различных лабораториях, взаимозаменяемость лабораторий, оперативность доступа к результатам исследований для лечащих врачей и экономить средства на проведение данного исследования.

Начальный этап процесса централизации исследований гликогемоглобина был реализован в рамках Федеральной целевой программы «Сахарный диабет». Так в 2005 г. была осуществлена поставка 12 анализаторов D10 «Био-Рад» с комплектом реагентов в централизованные лаборатории субъектов Российской Федерации, а в конце 2007 г. такими анализа-

Анализатор гликозилированного гемоглобина (HbA1c) **D10** - точность и воспроизводимость референсного метода для малых, средних и крупных лабораторий

Качество

- Референсный метод ВЭЖХ
- CV < 4% (на практике 1-1,5%)
- Прямое определение фракции HbA1c
- Международная (NGSP, ISO) и российская сертификация

Удобство

- Полностью автоматизирован, результат в виде хроматограммы
- Исследование из первичных пробирок
- Программное обеспечение на русском языке
- Время анализа 3 минуты
- Возможность исследования капиллярной крови (5 мкл.)
- Большие сроки годности. Хранение реагентов при комнатной температуре.
- Пропускная способность от единичных исследований до 120 образцов в день
- Возможность подключения загрузчика штативов на 50 образцов

Надежность

- Более 30 лет опыта производства систем для определения гликогемоглобина
- Более 50 анализаторов в России (в том числе ЭНЦ Росмедтехнологий, МОНИКИ им. Владимирского, Московский Эндокринологический Диспансер)
- Сервисная и информационная поддержка пользователей



ООО «БИО-РАД Лаборатории»

125167 Москва, Ленинградский пр-т., дом 37А, корп. 14
Телефон: (495) 721-1404 • Факс: (495) 721-1412
post@bio-rad.ru

торами были оснащены еще 18 учреждений в регионах. В перспективе ожидается добиться увеличения потоков исследований HbA1c, обеспечить высокое качество тестирования и стандартизовать исследования на всей территории России.

Выводы

1. Необходимо организовать плановые обследования на гликированный гемоглобин всех больных СД на территории субъектов РФ.

2. Для определения гликированного гемоглобина предпочтительно использовать референсный метод ВЭЖХ, обеспечивающий:

- строгое соответствие международным требованиям (NGSP);
- высокую степень стандартизации и автоматизации;
- высокую производительность метода;
- снижение себестоимости реагентов;
- возможность проведения централизованных исследований.

Литература

1. Государственный регистр сахарного диабета, 2005.
2. Материалы VI пленума правления общественной организации «Российская ассоциация эндокринологов» по теме «Высокие медицинские технологии в диагностике, лечении, профилактике и реабилитации больных эндокринопатиями», Москва, 2007.
3. «Association of glycaemia with macro vascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study» BMJ 2000, 321: 405-412.
4. Diabetes, «The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial», 44: 968-983, 1995.
5. «Hemoglobin A1: An Indicator of the Metabolic Control of Diabetic Patients.» The Lancet 1977 Oct 8; 2(8041):734-7
6. «Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin Alc in Diabetes Mellitus.» N Engl J Med 1976, 295(8):417-20.
7. ADA. Diabetes Care «Standards of Medical Care in Diabetes—2006 V 29» V 29, suppl. 1, 2006.
8. Diabetes, "National Service Framework for Diabetes: Standards" 2001.
9. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 11 сентября 2007 г. N582 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с инсулинзависимым сахарным диабетом».
10. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 11 декабря 2007 г. N748 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с инсулинонезависимым сахарным диабетом».
11. Diabetes, "Hemoglobin Alc as an Indicator of the Degree of Glucose Intolerance in Diabetes", 25(3):230-2, 1976.
12. «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом (издание второе)», М., 2006.
13. <http://www.ngsp.org/prog/index.html> (accepted July 25, 2007).
14. Clin. Chem., «Effects of Hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods», 48, N°2, 2002.
15. Clin. Chem. Lab Med, «Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood», 40: 78-89, 2002.