

Περιεχόμενα

- Η ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΙΩΜΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (HBA1C): ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ, ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑ, ΠΑΡΕΜΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ
- ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΟΥΡΩΝ ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΟΙΑ

Συντακτική Επιτροπή

ΑΝΔΡ. ΓΡΗΓΟΡΑΤΟΥ
ΕΥΗ ΚΩΝΣΤΑ
ΑΓΓΕΛ. ΜΕΛΠΙΔΟΥ
ΜΑΡΙΛ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ 46 – ΙΟΥΝΙΟΣ 2023

Αγαπητοί συνάδελφοι,

σε αυτό το τεύχος του Δελτίου μας παρουσιάζονται ενδιαφέροντα άρθρα με θέμα τις μεθόδους μέτρησης της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης, τη μεταβλητότητα, τις παρεμβολές και την προτύπωση των μετρήσεων, τις φυσιολογικές και παθολογικές αιμοσφαιρίνες στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και ένα ενδιαφέρον περιστατικό γενικής ούρων με μπλε χροιά.

Θα βρείτε ακόμη, πληροφορίες για το 21^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας και άλλα ενδιαφέροντα συνέδρια.

Η τελευταία σελίδα του Δελτίου είναι αφιερωμένη στην Παγκόσμια Ημέρα Περιβάλλοντος, που γιορτάζεται στις 5 Ιουνίου.

Εύχομαι σε όλους καλό και ξεκούραστο καλοκαίρι

Εκ μέρους της Συντακτικής Επιτροπής

Μαριλένα Σταμούλη

Η ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΙΩΜΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (HbA1c): ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ, ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΤΗΤΑ, ΠΑΡΕΜΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Κωνσταντίνος Μακρής - Βιολόγος, Διευθυντής Βιοχημικού Τμήματος, Γενικό Νοσοκομείο Αττικής ΚΑΤ

Λουκία Σπανού – Ενδοκρινολόγος, Επιμελήτρια Β, Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτη και Μεταβολισμού-Διαβητολογικό Κέντρο, ΓΝΑ Κοργιαλένειο-Μπενάκειο ΕΕΣ

Εισαγωγή

Η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και η χρήση της, ως δείκτης γλυκαιμικού ελέγχου, έχει αυξηθεί από τότε σε σημείο που σήμερα να θεωρείται ως το “χρυσό πρότυπο” (gold standard) για την παρακολούθηση και την διαχείριση των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη (1). Στις δεκαετίες του 1970 και του 1980, η μέτρηση της εισήλθε επιτυχώς στην καθημερινή ιατρική πρακτική (2, 3). Με την βοήθεια μεγάλων κλινικών μελετών, οι οποίες δημοσιεύθηκαν στην δεκαετία του 1990, αποδείχθηκε ότι υπήρχε συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με τις μακροπρόθεσμες επιπλοκές του διαβήτη (4-6). Οι μελέτες αυτές έκαναν έκδηλη την ανάγκη για προτυπωμένες και πολύ καλά ελεγχόμενες εργαστηριακές μεθόδους μέτρησης της HbA1c, με αυστηρά προκαθορισμένες προδιαγραφές, που αφορούν στην αναλυτική απόδοση τους (7). Η προτύπωση των μετρήσεων, όπως και η έκδοση αυστηρών προδιαγραφών, που αφορούν την απόδοση των αναλυτικών συστημάτων για τη μέτρηση της HbA1c, επιτεύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 2000 και η εξέλιξη αυτή, έδωσε την δυνατότητα να ανοίξουν νέοι δρόμοι στη χρήση αυτού το βιοδείκτη και στην διάγνωση του διαβήτη (8, 9).

Η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη (ή αιμοσφαιρίνη A1c, ή HbA1c ή A1c) είναι η πιο συχνή μορφή “ελάσσοнос αιμοσφαιρίνης” (minor hemoglobin) η οποία απαντάται στα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια και η οποία είναι σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με διαβήτη. Τον όρο «HbA1c», τον χρησιμοποιούμε για να περιγράψουμε εκείνο το μόριο της αιμοσφαιρίνης A στο οποίο έχει προσκολληθεί γλυκόζη, με μη ενζυματική, αντίδραση, στην αμινοτελική βαλίνη των β αλυσίδων (10-12). Με το ίδιο τρόπο η γλυκόζη μπορεί να προσκολληθεί και σε άλλα σημεία του μορίου της αιμοσφαιρίνης, όπως για παράδειγμα στην αμινοτελική περιοχή είτε των α είτε των β αλυσίδων στο αμινοξύ λυσίνη (13). Οι μέθοδοι μέτρησης της HbA1c έχουν την δυνατότητα να μετρήσουν μόνο το αμινοτελικό κομμάτι της β αλυσίδας και στο αποτέλεσμα δεν λαμβάνεται η γλυκίωση του μορίου σε άλλα σημεία, είτε των β είτε άλλων αλυσίδων.

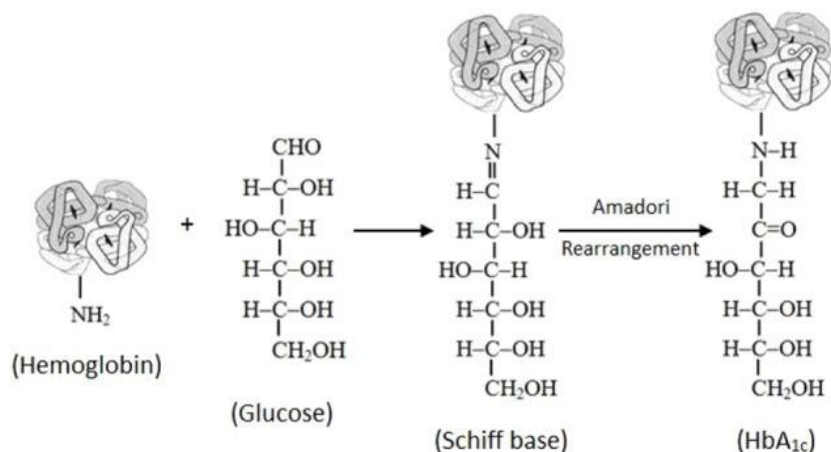
Όσο αυξάνεται η προσθήκη γλυκόζης στην HbA τόσο αυξάνεται η HbA1c και αυτή είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται το μόριο της. Η γλυκίωση της αιμοσφαιρίνης είναι μη αντιστρεπτή και παραμένει μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο για όλο το υπόλοιπο του χρόνου ζωής του ερυθρού (14). Ο ρυθμός γλυκίωσης της αιμοσφαιρίνης είναι μεταβλητός (μη γραμμικός) και εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Έτσι η

συγκέντρωση της HbA1c, μας παρέχει την δυνατότητα να έχουμε μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση των επιπέδων της γλυκόζης του ασθενούς, για τις προηγούμενες 90 έως 120 ημέρες. Εφόσον λοιπόν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, υπό φυσιολογικές συνθήκες, έχουν χρόνο ζωής περίπου 120 ημέρες, η HbA1c αντικατοπτρίζει τη μέση συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα για τις προηγούμενες 90 έως 120 ημέρες (14).

Ιστορική αναδρομή

Ήδη από το 1958 είχε βρεθεί ότι η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι ένα ετερογενές μόριο. Οι Allen και συν., με τη χρήση της τεχνικής της χρωματογραφίας ανταλλαγής κατιόντων, επιβεβαίωσε για πρώτη φορά ότι η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη δεν είναι ένα ομοιογενές μόριο (15). Στο χρωματογράφημα ανακάλυψαν ότι πριν από την κύρια αιμοσφαιρίνη, η οποία αποτελούσε το 90% των πρωτεϊνών που εκλούοντο από την στήλη της χρωματογραφίας, υπήρχαν τουλάχιστον τρεις κορυφές οι οποίες αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά μόρια αιμοσφαιρίνης. Στη συνέχεια επόμενοι ερευνητές επιβεβαίωσαν τα ευρήματα του Allen και προσδιόρισαν τη φύση αυτών των μορίων, τα οποία και ονομάστηκαν συνολικά ως “γρήγορες” αιμοσφαιρίνες (ή HbA1), μιας και εκλούοντο γρηγορότερα και πριν από την κύρια αιμοσφαιρίνη η οποία και ονομάστηκε (HbA0). Αυτές οι “γρήγορες” αιμοσφαιρίνες πήραν τις ονομασίες HbA1a έως HbA1e, με βάση το χρόνο εμφάνισης τους στο χρωματογράφημα πριν από την κύρια αιμοσφαιρίνη (16-18). Αν και στην αρχή θεωρήθηκαν ότι ήταν γενετικά καθορισμένες, ξεχωριστές μορφές της αιμοσφαιρίνης (hemoglobin variants), δηλαδή προϊόντα μεταλλάξεων, στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι αυτές οι κορυφές ήταν στην ουσία αιμοσφαιρίνη HbA0, στην οποία είχαν προστεθεί με χημική αντίδραση διάφορες ουσίες (adducts) (19).

Η προσθήκη αυτών των ουσιών έχει σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του μορίου της Hb, επιτρέποντας έτσι των διαχωρισμό τους με μια χρωματογραφική μέθοδο, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τους ως ξεχωριστές κορυφές (peaks) στο χρωματογράφημα. Στη συνέχεια οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στον προσδιορισμό αυτών των ουσιών που είναι προσδεμένες στο μόριο της αιμοσφαιρίνης και περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970, βρέθηκε ότι αυτές είτε ήταν διάφορα σάκχαρα είτε συνθέτες ενώσεις σακχάρων με φωσφορικές ρίζες (20). Επίσης, αυτό το οποίο αποδείχθηκε ήταν ότι από όλα αυτά τα ελάχιστα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης A1, το πλέον διαδεδομένο ήταν το κλάσμα A1c το οποίο προκύπτει από την ένωση της αιμοσφαιρίνης με τη γλυκόζη. Αυτή η μη αντιστρεπτή ένωση της γλυκόζης με την αιμοσφαιρίνη λαμβάνει χώρα (κυρίως) στο αμινοξύ βαλίνη, το οποίο βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της β αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Η φύση της χημικής αντίδρασης αποσαφηνίστηκε και βρέθηκε ότι πρόκειται για μια αντίδραση γλυκώσεως, δηλαδή μη ενζυματική προσθήκη σακχάρου στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Αναλυτικά μέσα στο ερυθροκύτταρο η γλυκόζη σχηματίζει ένα δεσμό αλδιμίνης με τη βαλίνη που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της β αλυσίδας του τετραμερούς μορίου της αιμοσφαιρίνης, σχηματίζοντας ένα ασταθές ενδιάμεσο μόριο (μια βάση του Schiff). Αυτή η βάση του Schiff στη συνέχεια υπόκειται σε μια αναδιάταξη του μορίου της (η οποία ονομάζεται Amadori rearrangement) με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πιο σταθερού τελικού προϊόντος που είναι μια κετοαμίνη (Εικ. 1)(2, 21).

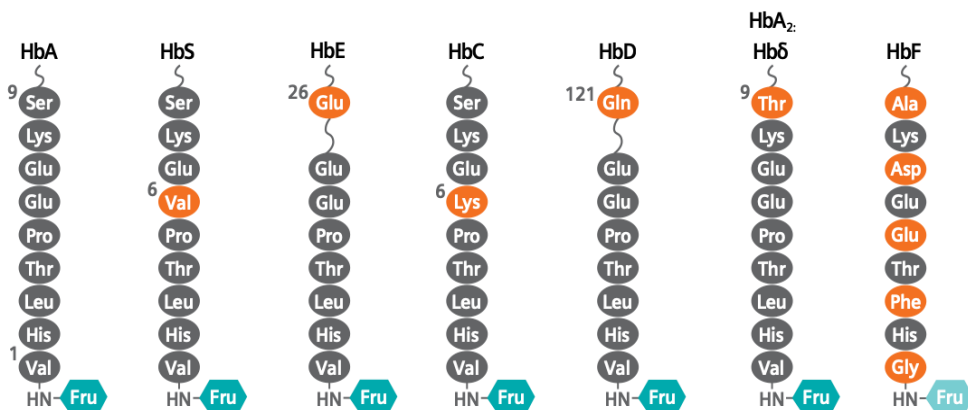


Εικόνα 1. Αντίδραση γλυκίωσης προς σχηματισμό HbA_{1c}

Αυτή η διαδικασία αποδείχθηκε ότι είναι μια αργή διαδικασία και λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια των 120 ημερών, που είναι και ο μέσος χρόνος ζωής των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επίσης βρέθηκε ότι τα πιο γηραιά ερυθροκύτταρα περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης από ότι τα νεότερα (2). Η πλήρης ανάλυση της κινητικής της αντίδρασης της γλυκίωσης περιγράφηκε επισήμως, για πρώτη φορά, το 1981 και το ενδιάμεσο προϊόν, η ασταθής βάση του Schiff, που προηγείται της αναδιάταξης Amadori του μορίου, ονομάστηκε labile-HbA_{1c} (ασταθής A_{1c}), αν και ήταν γνωστή από το 1966 (22). Η δομή των υπολοίπων ελασσόνων αιμοσφαιρινών ανακαλύφθηκαν τα επόμενα χρόνια (10, 20, 23).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 - αρχές της δεκαετίας του 1980, βρέθηκε ότι αν και η αμινοτελική βαλίνη της β αλυσίδας είναι το αμινοξύ που προτιμάει η γλυκόζη για να συνδεθεί στο μόριο της αιμοσφαιρίνης, εν τούτοις δεν είναι το μοναδικό. Υπάρχουν κι άλλα αμινοξέα. Για παράδειγμα η λυσίνη υπόκειται και αυτή στη διαδικασία της γλυκίωσης. Επίσης η βαλίνη γλυκιώνεται και στις τέσσερις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης και όχι μόνο στις β. Ακόμη πέραν της κύριας αιμοσφαιρίνης HbA έχει αποδειχθεί ότι και η HbF και η HbA₂, καθώς και όλες οι γενετικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης (Hb variants) γλυκιώνονται, με τη διαφορά ότι η κινητική της αντίδρασης διαφέρει από αυτή της HbA (11, 13, 24).

Τέλος έχει βρεθεί ότι η γλυκίωση δεν περιορίζεται μόνο στις αιμοσφαιρίνες, αλλά όλες οι πρωτεΐνες του ανθρώπου, ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας, είτε αυτές βρίσκονται εντός των ιστών είτε στη συστηματική κυκλοφορία, μπορούν να γλυκιωθούν (25-27). Η εξέλιξη της τεχνικής της χρωματογραφίας αύξησε την διακριτική της ικανότητα, με αποτέλεσμα την ανακάλυψη περισσότερων κορυφών που αντιστοιχούσαν σε φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες, όπως η HbF ή HbA₂ ή και σε γενετικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης, τα γνωστά hemoglobin variants (Εικ. 2) (28, 29).



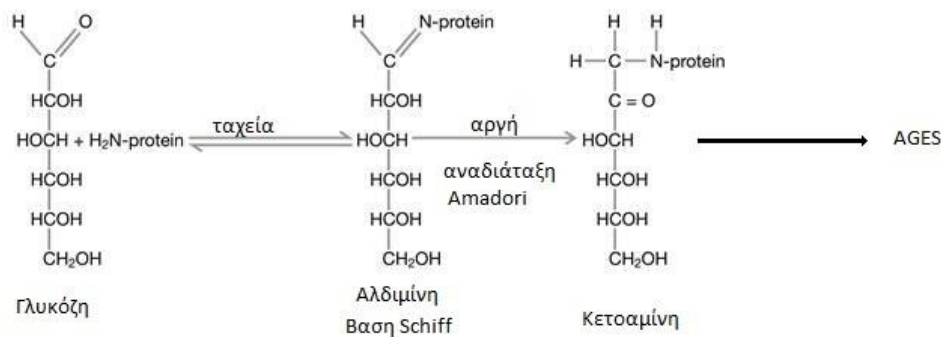
Εικόνα 2. Μεταλλάξεις, στα γονίδια που κωδικοποιούν τις α και β αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης, έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στο τελικό παραγόμενο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 1000 variants. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα πλέον κοινά από άποψη συχνότητας.

Για αρκετά χρόνια, ο μη ενζυματικός χαρακτήρας της αντίδρασης της γλυκίωσης δεν είχε αποδειχθεί επαρκώς. Αυτός είναι και ο λόγος που ο εσφαλμένος όρος «γλυκοσυλιωμένη» χρησιμοποιήθηκε αρχικά και ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται. Η γλυκίωση (αγγλικά glycation), η οποία συχνά αναφέρεται και ως μη ενζυμική γλυκοσυλίωση (επίσης λανθασμένος όρος), είναι η ομοιοπολική προσκόλληση ενός αναγωγικού σακχάρου σε μια πρωτεΐνη ή ένα λιπίδιο. Τυπικά σάκχαρα που συμμετέχουν στη γλυκίωση είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και τα παράγωγά τους. Η γλυκίωση είναι η μη ενζυματική διαδικασία που ευθύνεται για πολλές (μικρο- και μακρο-αγγειακές) επιπλοκές στον σακχαρώδη διαβήτη-επίσης εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία εμφάνισης κάποιων νόσων καθώς και στη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων. Αντίθετα, η γλυκοσυλίωση είναι η εξαρτώμενη, από το ένζυμο ATP, σύνδεση σακχάρων σε πρωτεΐνες ή λιπίδια. Η γλυκοσυλίωση συμβαίνει σε καθορισμένες θέσεις στο μόριο-στόχο. Είναι μια κοινή μορφή μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πρωτεϊνών και είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία της ώριμης πρωτεΐνης (21, 30).

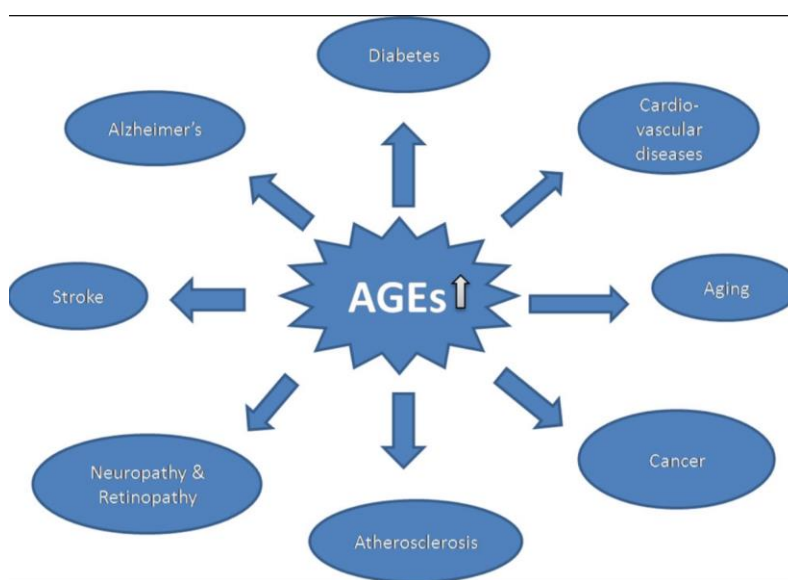
Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, αποδείχθηκε ότι η γλυκίωση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία η οποία δεν σταματά με την παραγωγή των κετοαμινών, αλλά συνεχίζει και είναι ιδιαίτερα εμφανής σε πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, όπως για παράδειγμα το κολλαγόνο (31). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή πολύπλοκων ετερογενών ενώσεων που είναι τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (Advanced Glycation end Products ή AGEs) (32, 33).

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί την κυριότερη αιτία δημιουργίας AGEs αλλά δεν είναι η μόνη. Το οξειδωτικό στρες είναι ο κύριος μηχανισμός δημιουργίας των AGEs. Συχνά η γλυκίωση συνδυάζεται με οξείδωση των λιπιδίων και τα μόρια που προκύπτουν αποτελούν προϊόντα γλυκοξειδίωσης. Τα AGEs δημιουργούνται μέσα από τη σταδιακή μοριακή συμπύκνωση και οξείδωση των προϊόντων Amadori (Εικ 3). Το στάδιο αυτό είναι μη αντιστρεπτό και η αντίδραση έχει μεγάλη χρονική διάρκεια, από μήνες έως και χρόνια. Για αυτό το λόγο τα μακρομόρια στα οποία παρατηρούνται αυτού του είδους οι

μετατροπές έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής. Από το σημείο του μεταβολικού μονοπατιού όπου τα προϊόντα Amadori υποβάλλονται στη διαδικασία μετατροπής τους σε AGEs, οι αντιδράσεις θεωρούνται ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα (33-36). Η δομή και οι παθοφυσιολογικοί τους ρόλοι σε νόσους (Εικ. 4) καθώς και η χρησιμότητα τους ως βιοδείκτες έχει αποδειχθεί σε αρκετά από αυτά τα μόρια (32).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης γλυκίωσης και δημιουργίας AGEs



Εικόνα 4. AGEs και νόσοι

Τα AGEs είναι αντίστοιχα των προϊόντων Maillard, τα οποία περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1912 από το Γάλλο χημικό Louis-Camille Maillard, ο οποίος περιέγραψε την αντίδραση (37). Η Αντίδραση Maillard είναι χημική αντίδραση μεταξύ αμινοξέων και αναγωγικών σακχάρων που λαμβάνει χώρα κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων, προσδίδει το

ρόδισμα, νοστιμίζει το φαγητό και χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων για την αποστείρωση των τροφών. Όλα τα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα υποβάλλονται σε αυτή την αντίδραση (38-40).

Είναι επίσης πολύ ενδιαφέρον ότι η γλυκόζη, από όλες τις αλδοεξόζες (σάκχαρα), παρουσιάζει την μικρότερη συγγένεια και αντιδραστικότητα με τις πρωτεΐνες, στη δημιουργία γλυκιωμένων προϊόντων. Από εξελικτικής άποψης ο οργανισμός έχει επιλέξει ως κύριο ενεργειακό “καύσιμο” τη γλυκόζη, μιας και είναι το σάκχαρο που έχει την μικρότερη ικανότητα να προκαλεί επιπλοκές, σε σχέση με τα υπόλοιπα (41).

Η ανάδειξη της HbA1c ως βιοδείκτη

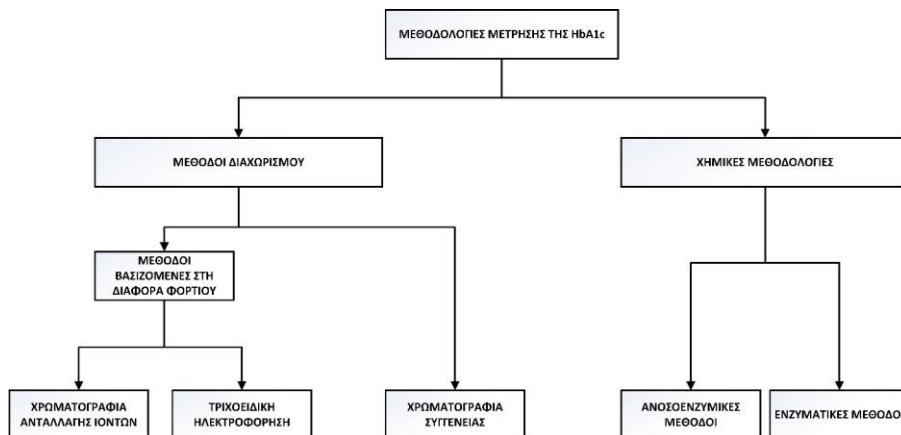
Ήδη από το 1962, οι Huisman και Dozy, είχαν δείξει ότι το HbA1 τμήμα της αιμοσφαιρίνης ήταν αυξημένο σε ασθενείς με διαβήτη, αλλά οι ερευνητές δεν το συσχέτισαν με την γλυκόζη (18). Υπέθεσαν ότι πιθανόν να οφείλεται σε αντίδραση της HbA0 με “άλλες ενώσεις εκτός της γλουταθειόνης” μιας και η μελέτη τους, για την ετερογένεια της αιμοσφαιρίνης, είχε ως θέμα την σύνδεση της αιμοσφαιρίνης με την οξειδωμένη γλουταθειόνη. Ο πρώτος ερευνητής που συνέδεσε τα αυξημένα επίπεδα του A1c τμήματος της αιμοσφαιρίνης με τον διαβήτη, ήταν ο Ιρανός Ιατρός Rahbar και οι συνεργάτες του. Το 1968 παρατήρησαν ότι, σε ασθενείς με διαβήτη ήταν αυξημένο (διπλάσιο σε σχέση με τους νορμογλυκαιμικούς) ένα συστατικό της αιμοσφαιρίνης, το οποίο χρωματογραφικά αντιστοιχούσε στο κλάσμα HbA1c (42, 43). Στη συνέχεια σε μια πιο συστηματική μελέτη οι Lilliana Trivelli και συν., επιβεβαίωσαν τα ευρήματα αυτά (44).

Τα επόμενα χρόνια, και παρά την έλλειψη μιας αξιόπιστης μεθόδου μέτρησης της HbA1c δημοσιεύθηκαν πολλές (μικρές σε μέγεθος) μελέτες στις οποίες περιγραφόταν μια στενή σχέση μεταξύ των επιπέδων της HbA1c και του βαθμού γλυκαιμίας των ασθενών με διαβήτη. Οι μελέτες έδειχναν ότι η HbA1c θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης της γλυκαιμικής ρύθμισης. Έτσι, προς τα τέλη της δεκαετίας του 1970 άρχισε να προτείνεται ο περιοδικός έλεγχος του νέου βιοδείκτη, για τον έλεγχο της γλυκαιμικής κατάστασης των ασθενών με διαβήτη και εισήλθε στην καθημερινή κλινική πράξη. Παρόλα αυτά, οι μελέτες που καθιέρωσαν την HbA1c ως τον κυριότερο βιοδείκτη για την παρακολούθηση του γλυκαιμικού ελέγχου, ήταν οι μελέτες DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) και UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) στις οποίες απεδείχθη η σχέση των επιπέδων της HbA1c και των μακροπρόθεσμων συνεπειών της νόσου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και 2, αντίστοιχα (2, 4-6).

Μεθοδολογίες μέτρησης της HbA1c

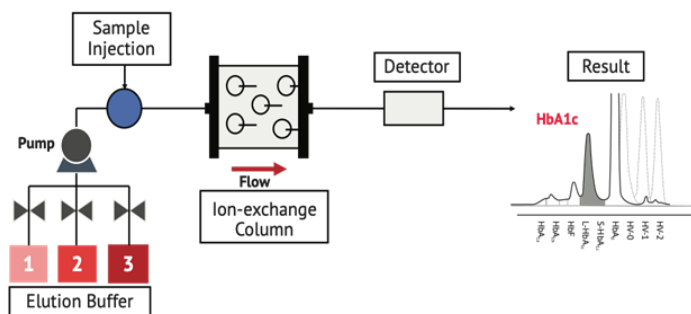
Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου η ζήτηση για μεθόδους ποσοτικής μέτρησης της HbA1c αυξήθηκε σημαντικά και άρχισαν να παρουσιάζονται στο εμπόριο μια σειρά από μεθόδους, οι οποίες βασίζονταν σε εντελώς διαφορετικές αναλυτικές αρχές, πολλές από τις οποίες ήταν αυτοματοποιημένες και άλλες πάλι όχι (45, 46). Οι μεθοδολογίες αυτές μπορούν αδρά να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες (Εικόνα 5). Η μία ομάδα επιτυγχάνει τη μέτρηση της HbA1c με το διαχωρισμό των διαφόρων κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης, με βάσει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ενώ η δεύτερη βασίζεται σε χημικές αντιδράσεις. Πιο αναλυτικά, οι μέθοδοι διαχωρισμού βασίζονται στο γεγονός ότι η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε σχέση με την μη γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη. Αυτή

η διαφορετικότητα επιτρέπει στα δύο αυτά κλάσματα της αιμοσφαιρίνης να εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους περνώντας μέσα από μια ρητινούχα στήλη, όταν ο διαχωρισμός τους πρόκειται να γίνει με χρωματογραφικές μεθόδους



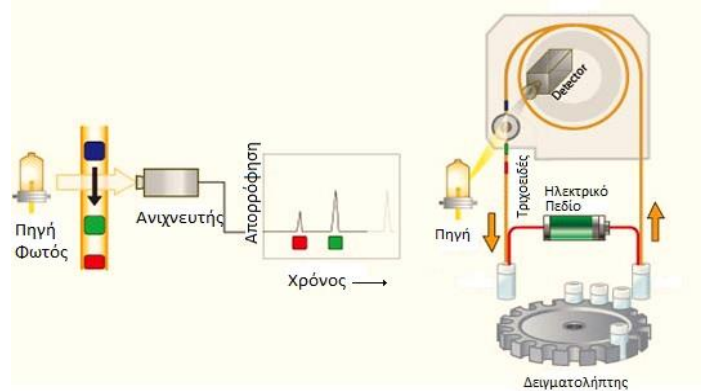
Εικόνα 5. Μεθοδολογίες μέτρησης HbA1c.

Η μέθοδος της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), είναι μια αναλυτική τεχνική με την οποία μπορούμε να διαχωρίσουμε, ταυτοποιήσουμε και ποσοτικοποιήσουμε διαφορετικές χημικές ουσίες μέσα σε ένα βιολογικό υλικό (Εικόνα 6). Η μέθοδος αυτή έχει αρκετές παραλλαγές (47). Στη περίπτωση του διαχωρισμού των αιμοσφαιρινών χρησιμοποιείται η *χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων*, στην οποία τα διαφορετικά κλάσματα της αιμοσφαιρίνης διαχωρίζονται σύμφωνα με τις διαφορές που παρουσιάζουν στο ηλεκτρικό φορτίο. Ο χρόνος που χρειάζεται για την έκλυση ενός κλάσματος αιμοσφαιρίνης από την στήλη ονομάζεται χρόνος κατακράτησης (retention time). Ο χρόνος κατακράτησης είναι αυτός που ταυτοποιεί τα διαφορετικά κλάσματα της αιμοσφαιρίνης. Η στήλη μέσα από την οποία διοχετεύεται το προς μέτρηση δείγμα αποτελείται από μια πολυμερή ρητίνη (48). Η ποιότητα της στήλης είναι καθοριστική για το σαφή διαχωρισμό των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης. Σήμερα υπάρχουν στην αγορά αρκετές αυτοματοποιημένες HPLC (49).



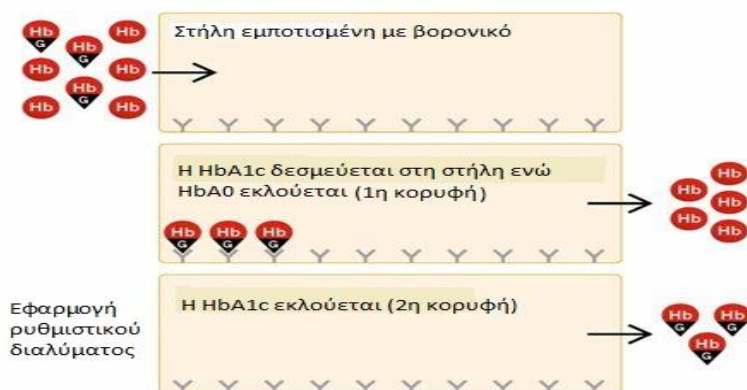
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων για τον διαχωρισμό/ ταυτοποίηση των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης και την ποσοτική μέτρησης της HbA1c

Η **τριχοειδική ηλεκτροφόρηση** (Capillary Electrophoresis) είναι μια ποιοτική και ποσοτική αναλυτική μέθοδος, η οποία δύναται να διαχωρίσει τα πρωτεϊνικά συστατικά σε ένα βιολογικό δείγμα, εφαρμόζοντας μια μορφή ηλεκτροφόρησης μέσα σε ένα τριχοειδικό σωληνάριο του οποίου η εσωτερική διάμετρος είναι μικρότερη 100 μm (Εικόνα 7) (50). Η εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς είναι αρνητικά φορτισμένη, γεγονός που κάνει τα κατιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα να προσκολληθούν στην επιφάνεια του. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο το οποίο προκαλεί τα κατιόντα να μετακινηθούν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο, με τη βοήθεια ενός διαλύτη. Αυτή η ροή καλείται ηλεκτροοσμωτική ροή. Το βιολογικό δείγμα υπόκειται στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, κατά τη διάρκεια αυτής της ηλεκτροοσμωτικής ροής, τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης διαχωρίζονται σύμφωνα με τις διαφορές του φορτίου που παρουσιάζουν και ποσοτικοποιούνται από ένα ανιχνευτή (50). Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των κλασμάτων με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται λόγω της διαφοράς φορτίου που παρουσιάζει η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη, σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα. Σήμερα υπάρχει στην αγορά αυτοματοποιημένη μέθοδος για την ποσοτική μέτρηση της HbA1c (51).



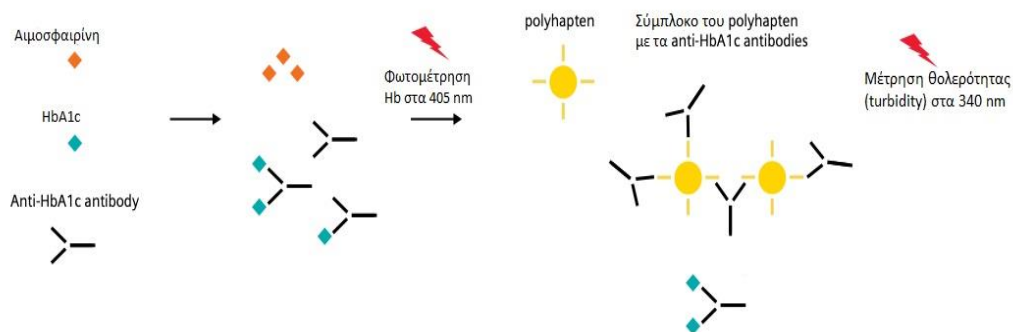
Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό, ταυτοποίηση των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης και της ποσοτική μέτρησης της HbA1c

Στη περίπτωση της **χρωματογραφίας συγγένειας** (Affinity Chromatography) (Εικ. 8) χρησιμοποιείται μια στήλη η οποία περιέχει ένα πορώδες πολυμερές υλικό που είναι εμποτισμένο με βορονικό οξύ. Η μέθοδος αυτή παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Mallia και συν., το 1981 (52). Η γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το βορονικό οξύ το οποίο και την κατακρατά, ενώ αφήνει τα μη γλυκιωμένα κλάσματα να περάσουν (Εικόνα 8). Θα πρέπει να τονίσουμε εδώ ότι το βορονικό οξύ κατακρατά όλα τα γλυκιωμένα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης και όχι ειδικά την HbA1c. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της στήλης με ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο απελευθερώνει τα γλυκιωμένα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης, τα οποία περνούν πλέον ελεύθερα μέσα από τη στήλη σε δεύτερο χρόνο. Γλυκιωμένα και μη γλυκιωμένα κλάσματα ανιχνεύονται στην άκρη της στήλης από ένα φωτομετρικό ανιχνευτή στα 413 nm (14).



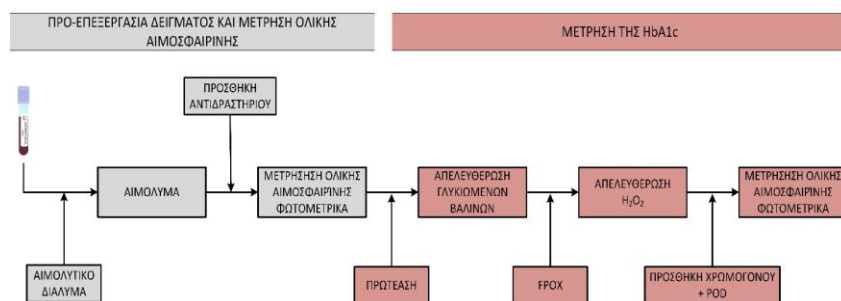
Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου της χρωματογραφίας συγγένειας

Στις **χημικές μεθόδους** η συγκέντρωση της HbA1c υπολογίζεται με βάση μια ειδική χημική αντίδραση, η οποία έχει σαν στόχο την γλυκιωμένη αμινοτελική βαλίνη των β αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Παράλληλα, η συνολική ποσότητα της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται φωτομετρικά. Συνεπώς δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους δοκιμασίες είναι απαραίτητες για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της HbA1c. Αυτή η βασική αρχή εφαρμόζεται και στις ανοσοενζυμικές και στις ενζυματικές δοκιμασίες υπολογισμού της HbA1c (45). Ειδικότερα οι **ανοσοχημικές δοκιμασίες** (immunoassays) βασίζονται στην επιλεκτική αντίδραση της HbA1c με ένα ειδικό αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την αμινοτελική περιοχή της β αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 9). Το ειδικό αντίσωμα στοχεύει είτε το αμινοτελικό εξαπεπτίδιο είτε το τετραπεπτίδιο. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και είναι αρκετά δημοφιλείς, ανάμεσα στα κλινικά εργαστήρια, λόγω της αυτοματοποίησης τους (εφαρμογές υπάρχουν για τους περισσότερους βιοχημικούς αναλυτές) (14, 53).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της ανοσοχημικής δοκιμασίας, αυτοματοποιημένης για εφαρμογή σε βιοχημικούς αναλυτές. Στην πλειοψηφία τους οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην τεχνική της θολοσιμετρίας και γίνονται σε τρία στάδια. Στο 1^ο στάδιο γίνεται η αιμόλυση του δείγματος. Στο 2^ο, γίνεται η ποσοτική μέτρηση της ολικής αιμοσφαιρίνης (alkaline hematin reaction) και στο 3^ο, γίνεται η προσθήκη του ειδικού αντισώματος που κατευθύνεται έναντι είτε του αμινοτελικού εξαπεπτιδίου είτε του τετραπεπτιδίου που περιέχει την γλυκιωμένη αμινοτελική βαλίνη.

Οι **ενζυματικές δοκιμασίες** αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 2000, και ενώ οι πρώτες εκδόσεις των μεθόδων απαιτούσαν την ξεχωριστή μέτρηση της HbA1c και της ολικής αιμοσφαιρίνης (54), οι νεότερες είναι πιο απλοποιημένες και μπορούν και μετρούν απευθείας μόνο την HbA1c (Εικόνα 10) (55). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην λύση των ερυθρών και επεξεργασία της αιμοσφαιρίνης με ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (proteolytic digestion), με σκοπό την απελευθέρωση των γλυκιωμένων βαλινών. Στη συνέχεια οι γλυκιωμένες βαλίνες δρουν ως υπόστρωμα για το ένζυμο φρουκτόζυλ-βαλίν-οξειδάση (FPOX), που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Αυτό με τη σειρά του μετράται μέσω μιας αντίδρασης, στην οποία το H₂O₂ αντιδρά με ένα χρωμογόνο, αντίδραση η οποία καταλύεται από την υπεροξειδάση της αρμοράκιας (horseradish peroxidase) (14, 46).



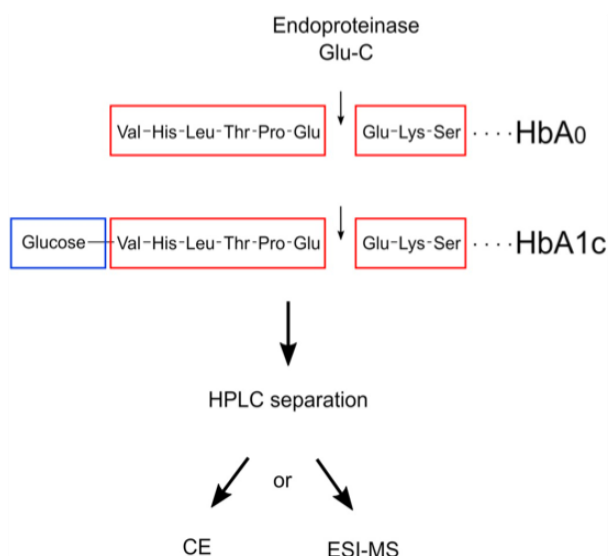
Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της ενζυματικής μεθόδου μέτρησης της HbA1c δύο σταδίων

Η ανάγκη για ακρίβεια και η προτύπωση των μετρήσεων της HbA1c

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, η HbA1c άρχισε να καθιερώνεται ως μια απαραίτητη εξέταση του ελέγχου της γλυκαιμίας στους ασθενείς με διαβήτη. Όμως, όλες αυτές οι μέθοδοι μέτρησης δεν ήταν προτυπωμένες. Αποτέλεσμα αυτού ήταν, η κάθε μία από αυτές να παράγει αποτελέσματα που δεν ήταν συγκρίσιμα, τόσο με τις άλλες μεθόδους μέτρησης, όσο και μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων που χρησιμοποιούσαν την ίδια μέθοδο. Η έλλειψη προτύπωσης της μέτρησης της HbA1c είχε ως αποτέλεσμα την πολύ μεγάλη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων (κυμαινόταν από 4.0% έως και 8% για το ίδιο δείγμα, ανάμεσα σε διαφορετικές μεθόδους) (56).

Για τη σημαντική μεταβλητότητα στη μέτρηση της HbA1c, υπεύθυνη θα μπορούσε να χαρακτηριστεί πρώτα απ' όλα η αναλυτική απόδοση των διαφορετικών εμπορικών μεθόδων, η οποία διέφερε σημαντικά από μεθοδολογία σε μεθοδολογία, και φυσικά η μη ύπαρξη ενός διεθνούς προτύπου, ενός διεθνούς συστήματος αναφοράς το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την κοινή βαθμονόμηση όλων των εμπορικών μεθόδων. Αυτό οδήγησε χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Ιαπωνία και η Σουηδία να αναπτύξουν η κάθε μία δικά τους συστήματα αναφοράς, με τα οποία προσπάθησαν να προτυπώσουν την μέτρηση της HbA1c (57-60). Ειδικά στις ΗΠΑ μετά τη μελέτη DCCT, για να μπορέσουν να εφαρμοστούν σε εθνικό επίπεδο οι στόχοι γλυκαιμικού ελέγχου που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή, έπρεπε όλα τα εργαστήρια να υπερκεράσουν τις διαφορές των αναλυτικών συστημάτων και όλα να εναρμονισθούν με τη μέθοδο που είχε χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη μελέτη. Έτσι δημιούργησαν το National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), το οποίο εγκατέστησε ένα δίκτυο εργαστηρίων αναφοράς σε όλη τη χώρα, με τα οποία κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα πρόγραμμα πιστοποίησης. Αυτό εξασφάλιζε ότι αρκετές μέθοδοι, που κυκλοφορούσαν στις ΗΠΑ, ήταν εναρμονισμένες με τη μέθοδο που είχε χρησιμοποιηθεί στην DCCT (61). Δυστυχώς η μέθοδος αυτή, η οποία και αποτελούσε την καρδιά του προγράμματος προτύπωσης του NGSP, βασιζόταν σε μια εμπορική χρωματογραφική μέθοδο ανταλλαγής κατιόντων, στην στήλη της οποίας χρησιμοποιούνταν μια ρητίνη, η Bio-Rex 70, η οποία δεν είχε την απαραίτητη ειδικότητα και αναλυτική ευκρίνεια ώστε να υποστηρίξει για μεγάλο χρονικό διάστημα ένα διεθνές πρόγραμμα προτύπωσης. Σύντομα η μέθοδος αυτή ξεπεράστηκε (σήμερα δεν κυκλοφορεί) από κοινές εμπορικές μεθόδους, οι οποίες όμως παρουσίαζαν πολύ καλύτερα αναλυτικά χαρακτηριστικά (αναλυτική ευαισθησία, ειδικότητα, λιγότερες παρεμβολές και ευκρίνεια) όχι μόνο στη μέτρηση της HbA1c, αλλά και στη διάκριση των παθολογικών αιμοσφαιρινών. Πολύ γρήγορα λοιπόν η μέθοδος καταργήθηκε και για το λόγο αυτό, στα μέσα της δεκαετίας του 1990, η παγκόσμια ομοσπονδία εργαστηριακής ιατρικής (IFCC) δημιούργησε μια διεθνή ομάδα εργασίας (working group, WG) για να διευθετήσει το πρόβλημα (57, 62). Σκοπός του WG ήταν να σχεδιάσει και να υλοποιήσει ένα σύστημα αναφοράς το οποίο θα περιελάμβανε μια μέθοδο αναφοράς και πρότυπα υλικά αναφοράς (βαθμονομητές), τα οποία θα περιείχαν την ουσία που θα έπρεπε να μετρηθεί, στην καθαρή της μορφή. Φυσικά, πρωταρχικός σκοπός της ομάδας ήταν να ορίσει ποιος είναι ο προς μέτρηση αναλύτης, δηλαδή το κομμάτι εκείνο του πρωτεϊνικού μορίου της αιμοσφαιρίνης που θα πρέπει να μετράμε. Αυτοί οι βαθμονομητές θα χρησιμοποιούνταν για τη βαθμονόμηση της μεθόδου αναφοράς, η οποία θα έδινε τιμές σε δευτερογενή πρότυπα υλικά (secondary reference materials), τα οποία με τη σειρά τους θα διανέμονταν στις εταιρείες παραγωγής αντιδραστηρίων για την μέτρηση της HbA1c, ώστε όλες οι εμπορικές μέθοδοι να χρησιμοποιούν το ίδιο πρότυπο υλικό για να βαθμονομηθούν. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να επιτευχθεί

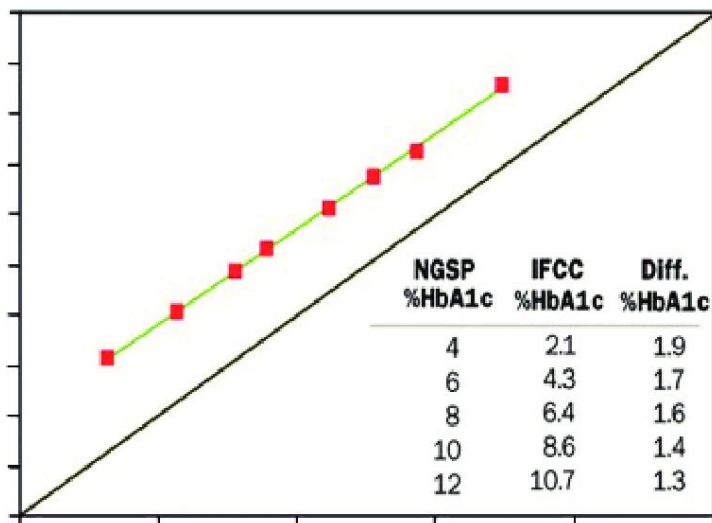
πραγματικά η διεθνής προτύπωση της μεθόδου και οι τιμές της HbA1c να είναι ανεξάρτητες εργαστηρίου, μεθόδου και χώρας. Πράγματι το 1998, το WG παρουσίασε τα υποψήφια πρότυπα υλικά, τα οποία είχαν παρασκευασθεί από 2 κεκαθαρμένα εξαπεπτιδία από το αμινοτελικό άκρο της β αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, ένα γλυκιωμένο (HbA1c) και ένα μη-γλυκιωμένο (HbA0), ορίζοντας επίσης ότι ο στόχος της μεθόδου αναφοράς είναι η μέτρηση με ακρίβεια αυτών των δύο εξαπεπτιδίων. Το 2002 το WG παρουσίασε τη μέθοδο αναφοράς, η οποία βασίζεται στον διαχωρισμό των δύο αυτών εξαπεπτιδίων με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και στη συνέχεια στον ποσοτικό προσδιορισμό τους, είτε με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είτε με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE)(Εικόνα 11) (8, 9, 12, 63).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προτύπωσης της μέτρησης της HbA1c. Η επεξεργασία της αιμοσφαιρίνης με μια ενδοπεπτιδάση όρισε τους δύο αναλύτες (τα δύο εξαπεπτιδία) που θα μετρούσε η μέθοδος αναφοράς. Ο διαχωρισμός με HPLC και η ποσοτική μέτρηση αυτών των εξαπεπτιδίων, είτε με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE) είτε με φασματομετρία μάζας (ESI-MS), έδειξε ισοδύναμα αποτελέσματα και έδωσε τη δυνατότητα προτύπωσης της μεθόδου.

Η εφαρμογή της προτύπωσης της μεθόδου απαιτούσε και σημαντικές αλλαγές στην διαχείριση των αποτελεσμάτων. Το πλέον σημαντικό ήταν η αλλαγή στις μονάδες μέτρησης. Εάν συνεχίζαμε να χρησιμοποιούμε τις μονάδες και τον τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων, που μέχρι τότε γνωρίζαμε (η HbA1c να δίνεται ως ποσοστό % της συνολικής HbA0), τότε οι τιμές που θα δίναμε στους ασθενείς θα ήταν μικρότερες κατά 2%, εάν το σύστημα μας ήταν βαθμονομημένο σύμφωνα με το πρότυπο που είχε αναπτύξει η IFCC. Ο λόγος γι' αυτό είναι ότι οι παλαιότερες μέθοδοι προτύπωσης (και ιδιαίτερα αυτή του NGSP), είχαν πολύ κακή ειδικότητα και μαζί με την HbA1c μετρούσαν και άλλα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης, τα οποία δεν είχαν σχέση με το μόριο που εμείς θέλαμε να ανιχνεύσουμε. Οι μέθοδοι αναφοράς που είχαν επιλεγεί από

τον NGSP, αλλά και τα άλλα εθνικά συστήματα προτύπωσης, και μεν ήταν χρωματογραφικές μέθοδοι ανταλλαγής κατιόντων, αλλά ήταν παλαιάς τεχνολογίας. Η HbA1c ορίζονταν αυθαίρετα, ως μια συγκεκριμένη κορυφή του χρωματογραφήματος που προέκυπτε από την ανάλυση του δείγματος σε μια HPLC, χωρίς όμως να υπάρχει σαφής μοριακός ορισμός. Το αποτέλεσμα ήταν ότι στην περιοχή αυτή, λόγω της μη ειδικότητας της μεθόδου, εκλούοντο και άλλα μόρια πέραν των «γλυκιωμένων στην αμινοτελική βαλίνη β αλυσίδων». Επι πλέον οι βαθμονομητές των μεθόδων αυτών δεν περιείχαν την ουσία που μας ενδιέφερε αποκλειστικά και μάλιστα στη πιο καθαρή της μορφή (14). Μια τέτοια αλλαγή δεν θα ήταν κατάλληλη για κλινική χρήση αλλά ούτε και επιστημονικά ορθή, καθώς και οι μονάδες που θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οφείλουν να ακολουθούν το σύστημα μονάδων SI, και έτσι επικράτησε η άποψη το αποτέλεσμα να δίνεται ως: **ο λόγος μοριακότητας (molar ratio) της HbA1c προς την HbA0 σε mmol/mol αντί του ποσοστού % του NGSP**. Ο απώτερος στόχος της IFCC ήταν αφενός μεν, η προτύπωση όλων των μεθόδων μέτρησης σε παγκόσμιο επίπεδο, και αφ' ετέρου τα αποτελέσματα να δίνονται σε μονάδες του συστήματος SI (mmol/mol). Δυστυχώς, ενώ το νέο σύστημα βαθμονόμησης των μεθόδων έγινε παγκοσμίως αποδεκτό από τις εταιρείες παραγωγής αντιδραστηρίων και αναλυτών μέτρησης της HbA1c, υπήρξε αντίδραση από αρκετές χώρες και κύρια τις ΗΠΑ, στο να μεταβούν στις νέες μονάδες έκφρασης των αποτελεσμάτων (64, 65). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, να επιμένουν στην έκφραση των αποτελεσμάτων ως ποσοστό %. Για να μπορέσει να γίνει εφικτό αυτό δημιουργήθηκαν *master equations* με σκοπό να μετατρέψουν τις τιμές του συστήματος της IFCC σε τιμές, όχι μόνο του αμερικανικού προγράμματος NGSP αλλά και των υπολοίπων όπως της Σουηδίας και της Ιαπωνίας. Και ενώ τελικά, η Σουηδία και η Ιαπωνία εναρμονίστηκαν με τις προτάσεις της IFCC στις μονάδες μέτρησης, πολλές από τις χώρες που ακολουθούσαν το αμερικανικό πρόγραμμα αρνούνται να μεταβούν στο νέο σύστημα μονάδων, με το αιτιολογικό ότι η αλλαγή αυτή θα επιφέρει αναστάτωση και σύγχυση στους ασθενείς, αλλά και στους θεράποντες ιατρούς. Αντικειμενικά, η εμμονή της μετατροπής του λόγου μοριακότητας, που μετρούν πλέον όλοι οι αναλυτές, σε ένα ξεπερασμένο σύστημα δεν είναι μόνο αντιεπιστημονική αλλά κυρίως, προσδίδει στο αποτέλεσμα έναν επιπλέον παράγοντα αβεβαιότητας. Στο συνολικό σφάλμα της μέτρησης της HbA1c, το οποίο είναι το άθροισμα του τυχαίου και του συστηματικού σφάλματος του αναλυτή, προσθέτουμε και το σφάλμα που προέρχεται από την αβεβαιότητα της *master equation* (66,67). Το ίδιο συμβαίνει και με τις εξισώσεις που προκύπτουν από την γραμμική παλινδρόμηση, μέσω της οποίας εξετάζουμε τη σχέση που έχουν τιμές οι οποίες προκύπτουν από δυο διαφορετικά μετρητικά συστήματα, με σκοπό η εξίσωση αυτή να προβλέψει τις τιμές του ενός μετρητικού συστήματος (NGSP) μέσω των τιμών του άλλου μετρητικού συστήματος (IFCC). Η γραμμική παλινδρόμηση δεν χαρακτηρίζεται μόνο από την εξίσωση και από το διάστημα εμπιστοσύνης της κεντρικής γραμμής (συνήθως αναφέρεται ως διάστημα όπου στο 95% των περιπτώσεων η κεντρική γραμμή θα βρίσκεται εντός αυτού), αλλά και από το διάστημα πρόβλεψης (*prediction interval*). Αυτό χαρακτηρίζει την αβεβαιότητα των προβλέψεων μας μέσω της εξίσωσης και είναι το διάστημα εκείνο μέσα στο οποίο θα βρίσκονται το 95% των προβλέψεων μας, που προέρχονται από την εξίσωση (Εικ. 12).

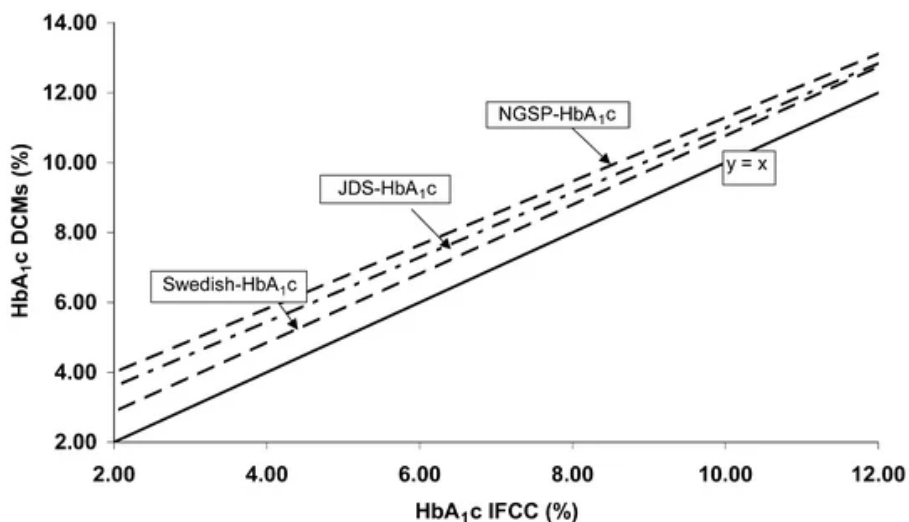


Εικόνα 12. Η σχέση μεταξύ της τιμής της HbA1c όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο NGSP και IFCC. Η πράσινη γραμμή είναι η γραμμή παλινδρόμησης. Η συμπαγής γραμμή είναι $y=x$.

Η σχέση ανάμεσα στο πρότυπο του NGSP και στο πρότυπο της IFCC περιγράφεται από την εξίσωση: $NGSP = [0.9148 * IFCC] + 2.152$. Αυτή η εξίσωση χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των τιμών της HbA1c, η οποία μετράται κατά IFCC από όλες τις εταιρείες, σε τιμές % του NGSP. Αντίστοιχες εξισώσεις δημιουργήθηκαν και για τα άλλα δύο πρότυπα, το Ιαπωνικό και το Σουηδικό. Και τα τρία εθνικά πρότυπα λόγω σημαντικής έλλειψης ειδικότητας παράγουν σημαντικά υψηλότερες τιμές HbA1c (Πίνακας 1 και Εικ. 13).

Πίνακας 1. Εξισώσεις μετατροπής των μονάδων που προέρχονται από το πρότυπο της IFCC στα εθνικά πρότυπα ΗΠΑ, Ιαπωνίας και Σουηδίας.

Εθνικό πρότυπο	Από IFCC σε Εθνικό Πρότυπο	Από Εθνικό Πρότυπο σε IFCC
NGSP (USA)	$NGSP = (0.09148 * IFCC) + 2.152$	$IFCC = (10.93 * NGSP) - 23.50$
JDS/JSCC (Japan)	$JDS = (0.09274 * IFCC) + 1.724$	$IFCC = (10.78 * JDS) - 18.59$
Mono-S (Sweden)	$Mono-S = (0.09890 * IFCC) + 0.884$	$IFCC = (10.11 * Mono-S) - 8.94$



Εικόνα 13. [από την αναφορά (57)] Οι γραμμές παλινδρόμησης (regression lines) όπως προέκυψαν μετά από 5 διαδοχικές μελέτες, οι οποίες εκτελέστηκαν από τα εργαστήρια αναφοράς του δικτύου εργαστηρίων της IFCC, και των εργαστηρίων των εθνικών προγραμμάτων NGSP, Ιαπωνίας και Σουηδίας. Όπως φαίνεται, η σχέση μεταξύ του προτύπου της IFCC και των τριών εθνικών προτύπων είναι γραμμική. Και τα τρία πρότυπα παράγουν σημαντικά υψηλότερες τιμές, λόγω της έλλειψης ειδικότητας, με το αμερικανικό να δείχνει την μεγαλύτερη απόκλιση, λόγω της πολύ κακής ειδικότητας της μεθόδου BIOREX 70 που είχε επιλεγεί ως μέθοδος αναφοράς και η οποία μαζί με την HbA1c μετρούσε και άλλα αιμοσφαιρικά κλάσματα.

Οι ισχυρισμοί των Αμερικανών, για την μη χρήση απευθείας των τιμών της IFCC, ήταν και είναι ότι μέσω της εξίσωσης τα αποτελέσματα μετατρέπονται σε τιμές που έχουν κλινικό νόημα για τους θεράποντες ιατρούς, μιας και συνδέονται με τα αποτελέσματα των δύο κυριότερων μελετών DCCT και UKPDS, και παράλληλα μέσω της εξίσωσης παρέχεται ανιχνευσιμότητα των τιμών του προγράμματος NGSP, σε μια μέθοδο αναφοράς υψηλότερης ακρίβειας, όπως αυτή της IFCC.

Η προσπάθεια μετατροπής της HbA1c σε εκτιμώμενη μέση τιμή γλυκόζης

Σε μια νεώτερη προσπάθεια για ένα ενιαίο τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων, το 2004, δημιουργήθηκε μια κοινή ομάδα εργασίας (ADA/EASD/IDF Working Group of the A1c Assay) με σκοπό να ξεπεραστεί το αδιέξοδο (68). Συμφωνήθηκε ότι όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού της HbA1c θα πρέπει να είναι προτυπωμένες και βαθμονομημένες σύμφωνα με το πρότυπο της IFCC, τα αποτελέσματα θα πρέπει να δίνονται σε μονάδες του συστήματος SI και όταν θα δίνονται και ως μονάδες NGSP %, θα πρέπει να υπολογίζονται με βάση την IFC-NGSP master equation. Συμφωνήθηκε επίσης, να γίνουν μελέτες μέσα στα επόμενα τρία χρόνια ώστε να ερευνηθεί η δυνατότητα ενιαίας έκφρασης της τιμής της HbA1c ως μέση τιμή γλυκόζης, με μονάδες μέτρησης είτε mg/dL είτε mmol/L, για όσους ακολουθούσαν το SI. Σκοπός ήταν να μετατρέψουν τις τιμές της HbA1c σε τιμές γλυκόζης ώστε να είναι πιο προσιτές, κυρίως στους ασθενείς. Τέλος

συμφωνήθηκε ότι οι γλυκαιμικοί στόχοι, στις εθνικές και διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, θα πρέπει να είναι σε μονάδες SI, NGSP και σε τιμές μέσης τιμής γλυκόζης (A1c-Average Derived Glucose, ADAG). Αν και παλαιότερα είχαν γίνει παρόμοιες προσπάθειες, τα αποτελέσματα είχαν μικρή χρησιμότητα, αφενός μεν γιατί είχαν γίνει πριν την προτύπωση της μέτρησης της HbA1c και αφ' ετέρου διότι είτε είχαν μικρό αριθμό συμμετεχόντων, είτε ο αριθμός των ημερήσιων μετρήσεων της γλυκόζης ήταν περιορισμένος είτε οι ημέρες παρακολούθησης ήταν λίγες (69-72).

Η μελέτη υπό την αιγίδα των ADA, EASD και IDF (διήρκεσε από το 2006 έως το 2008) συμπεριέλαβε 507 άτομα (με διαβήτη τύπου 1 και 2) και υγιείς. Διενεργήθηκε σε 10 κέντρα παγκοσμίως και οι μετρήσεις της HbA1c έγιναν με προτυπωμένη μέθοδο κατά IFCC (73). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η σχέση ανάμεσα στην HbA1c και στην υπολογιζόμενη μέση τιμή γλυκόζης (eAG) μπορεί να δοθεί από την ακόλουθη εξίσωση:

$$eAG_{\text{mg/dl}} = 28.7 \times \text{HbA1c} - 46.7 \quad (R^2 = 0.84, P < 0.0001).$$

$$\text{ή } eAG_{\text{mmol}} = 1.59 \times \text{HbA1c} - 2.59 \quad (R^2 = 0.84, P < 0.0001). \text{(Πίνακας 2)}$$

Και αυτή η μελέτη όπως και προηγούμενες (69, 71) έδειξε ότι η συσχέτιση των δύο παραμέτρων είναι πολύ ισχυρή, όπως δείχνει ο συντελεστής συσχέτισης (το R^2 κυμαίνεται στις μελέτες από 0.84 - 0.93). Παρ' όλα αυτά η προβλεπτική ικανότητα αυτών των εξισώσεων δεν είναι ικανοποιητική διότι το διάστημα πρόβλεψης είναι αρκετά μεγάλο (prediction interval), γεγονός που καθιστά την μετατροπή της HbA1c σε eAG να εμπεριέχει αρκετή αβεβαιότητα (69, 74). Για παράδειγμα μια τιμή HbA1c 6.5% (ή 48 mmol/mol) μεταφράζεται σε μέση τιμή γλυκόζης 144 mg/dL, με το διάστημα εμπιστοσύνης (CI 95%) να είναι από 120 mg/dL έως 170 mg/dL (69). Να σημειώσουμε εδώ ότι η σχέση μεταξύ HbA1c και eAG δεν φαίνεται να είναι πάντοτε γραμμική (75).

Πίνακας 2. Σχέση μονάδων HbA1c εκφρασμένες σε % κατά NGSP, mmol/mol σύμφωνα με το σύστημα μονάδων SI και κατά το πρότυπο της IFCC καθώς και η μέση τιμή γλυκόζης (eAG) όπως προκύπτει από την εξίσωση που προέκυψε από τη μελέτη ADAG.

NGSP HbA1c (%)	IFCC HbA1c (mmol/mol)	eAG (mg/dL)	eAG (mmol/l)
5.0	31	97	5.4
6.0	42	126	7.0
7.0	53	154	8.6
8.0	64	183	10.2
9.0	75	212	11.8
10.0	86	240	13.4

11.0	97	269	14.9
12.0	108	298	16.5

Έλεγχος της ποιότητας

Η Hba1c, αποτελεί ως τώρα, τον κυριότερο δείκτη για τη μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών με διαβήτη. Η θεραπεία των ασθενών βασίζεται στις περιοδικές μετρήσεις της και αποφάσεις για τροποποίηση της αγωγής ή και του τρόπου ζωής των ασθενών λαμβάνονται ανάλογα με τις μεταβολές της. Έτσι είναι απαραίτητο μαζί με την προτύπωση των μετρήσεων να υπάρχουν και αυστηροί κανόνες που να διασφαλίζουν την ποιότητα των μετρήσεων.

A. Προαναλυτική μεταβλητότητα.

Η συλλογή και η φύλαξη των δειγμάτων δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα. Η αιμοληψία μπορεί να γίνει οποιαδήποτε στιγμή της ημέρας και δεν είναι απαραίτητο ο ασθενής να είναι νηστικός. Το δείγμα πρέπει να συλλεγεί σε σωληνάριο με K2EDTA ή K3EDTA. Η σταθερότητα του δείγματος κατα την φύλαξη μέχρι να αναλυθεί, εξαρτάται από τη μεθοδολογία της μέτρησης. Η χρωματογραφικές μέθοδοι επηρεάζονται περισσότερο από τις άλλες μεθόδους, γι' αυτό και σαν γενικός κανόνας είναι τα δείγματα να μην παραμένουν πάνω από μία εβδομάδα όταν συντηρούνται στους +2 έως +8°C. Εάν τα δείγματα συντηρηθούν στους -70°C, τότε παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 1 χρόνο. Η φύλαξη στους -20°C έχει αρνητικές επιπτώσεις στα δείγματα και θα πρέπει να αποφεύγεται (64, 76).

B. Έλεγχος της αναλυτικής μεταβλητότητας –στόχοι απόδοσης

Σε κάθε εργαστήριο που θέλει να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα εφαρμόζονται 3 βασικές αρχές, που εξασφαλίζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων:

1. Διαπίστευση του εργαστηρίου σύμφωνα με το πρότυπο ISO 15189
2. Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας και
3. Συμμετοχή του εργαστηρίου σε προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας, είναι απαραίτητη η χρήση (κάθε φορά που γίνεται μέτρηση δειγμάτων στον αναλυτή) δύο δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις (ένα δείγμα αναφοράς με χαμηλή και ένα δείγμα αναφοράς με υψηλή συγκέντρωση HbA1c). Τα δείγματα αυτά μπορεί να είναι είτε πλήρες αίμα είτε αιμόλυμα, τα οποία συντηρούνται στους -70°C. Με αυτό τον τρόπο το εργαστήριο μπορεί να ελέγχει την επαναληψιμότητα (precision) των μετρήσεών του (46).

Το εργαστήριο οφείλει να συμμετέχει σε ένα πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, το οποίο να είναι “accuracy based” δηλαδή, τα δείγματα που στέλνει στο εργαστήριο να έχουν μετρηθεί με τη μέθοδο αναφοράς της IFCC, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί το συστηματικό σφάλμα του εργαστηρίου (bias), δηλαδή η απόκλιση του εργαστηρίου από τη πραγματική τιμή. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από το συστηματικό σφάλμα ή bias (το μέγεθος αυτού του

σφάλματος εξαρτάται από τη σωστή ή όχι βαθμονόμηση του αναλυτή) και από την επαναληψιμότητα ή precision (πρόκειται για την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων).

Για την HbA1c, οι στόχοι του bias και του precision καθορίζονται από το τι θεωρείται κλινικά σημαντική μεταβολή για τους θεράποντες ιατρούς. Έτσι θεωρείται ότι μια μεταβολή στην γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη της τάξης των 5mmol/mol ή 0.5%, σε δυο διαδοχικές μετρήσεις, αποτελεί σημαντική μεταβολή στη γλυκαιμική κατάσταση του ασθενούς. Για να μπορεί το εργαστήριο να ανταποκριθεί σε αυτή την απαίτηση θα πρέπει, για μεν την επαναληψιμότητα (precision) το CV (Coefficient of Variation) της μεθόδου- όπως αυτό προκύπτει από τα αποτελέσματα του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας - να είναι <3% και το συστηματικό του σφάλμα (bias) < 4.5% (77, 78). Προσπαθώντας να απαντηθεί το ερώτημα, αν η προτύπωση της μέτρησης που πέτυχε η IFCC βοήθησε στην εναρμόνιση και στη βελτίωση της απόδοσης των μεθόδων μέτρησης της HbA1c, μια πρόσφατη μελέτη που έγινε στην Ευρώπη υπό την αιγίδα της IFCC και στην οποία συμμετείχαν 2166 εργαστήρια, από 17 Ευρωπαϊκές χώρες και 24 κατασκευαστές αντιδραστηρίων, έδειξε ότι η πλειοψηφία των εργαστηρίων και κατασκευαστών, πληρούν τα αυστηρά κριτήρια ακρίβειας και επαναληψιμότητας που έχει θέσει η IFCC (79).

Γ. Τιμές αναφοράς – Όρια απόφασης – Μετα-αναλυτική μεταβλητότητα

Οι τιμές αναφοράς και τα όρια απόφασης για την HbA1c σε τιμές IFCC και NGSP φαίνονται στον Πίνακα 3, με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες της American Diabetes Association

Πίνακας 3. Τιμές αναφοράς της HbA1c, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της American Diabetes Association

Τιμές αναφοράς			IFCC	NGSP
			mmol/mol	%
			20 - 42	4 - 6
Όρια απόφασης	Παρακολούθηση θεραπείας	Στόχος	53	7
		Όριο για αλλαγή στη θεραπεία	64	8
	Διάγνωση	Χαμηλός κίνδυνος	<40	<5.8
		Αυξημένος κίνδυνος	40 -46	5.8 - 6.4
		Διαβήτης	>46	>6.4

Αποτελέσματα < 20 mmol/mol ή < 4% και >140 mmol/mol ή >15%, θα πρέπει να επαναλαμβάνονται με μια διαφορετική αναλυτική μεθοδολογία, ώστε να αποφευχθεί η λάθος ερμηνεία και να προσδιορισθεί η αιτία του πολύ υψηλού ή χαμηλού αποτελέσματος, ιδιαίτερα όταν αυτό δεν συνάδει με την κλινική εικόνα που παρουσιάζει ο ασθενής.

Παράγοντες που συμβάλουν στην μεταβλητότητα της HbA1c - Παρεμβολές

A. Βιολογική μεταβλητότητα

Η βιολογική μεταβλητότητα ορίζεται ως, τυχαίες μεταβολές στην τιμή μιας παραμέτρου κατά την επαναλαμβανόμενη μέτρηση της, όταν το εξεταζόμενο άτομο βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση υγείας. Υπάρχουν δύο είδη βιολογικής μεταβλητότητας: η *ενδοατομική* (intra-individual), η οποία μας δίνει το βαθμό μεταβλητότητας της παραμέτρου εντός το ίδιου ατόμου και η *διατομική* (inter-individual), η οποία μας δίνει τη μεταβλητότητα της παραμέτρου μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Μαθηματικά εκφράζεται ως CV (coefficient of variation). Η ενδοατομική βιολογική μεταβλητότητα (CV_i) της HbA1c είναι σχετικά μικρή και στους υγιείς κυμαίνεται από <0.7% έως 1.9% , ενώ η διατομική μεταβλητότητα (CV_g), είναι αρκετά μεγαλύτερη (κυμαίνεται από 3.3% έως 6.8%) (80-82). Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι ο υπολογισμός της βιολογικής μεταβλητότητας δεν είναι και τόσο εύκολος, μιας και το αποτέλεσμα επηρεάζεται από την αναλυτική απόδοση της μεθόδου. Σε μια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του ίδιου πληθυσμού δυο διαφορετικές μέθοδοι. Μια βασισμένη στην HPLC και μια βασισμένη στη χρωματογραφία συγγένειας, οι υπολογιζόμενες CV_i και VC_g ήταν 1.17% και 5.58% για την μέθοδο HPLC και 2.15% και 4.03% για την χρωματογραφία συγγένειας, αντίστοιχα (83). Να σημειωθεί ότι στη μελέτη αυτή το αναλυτικό σφάλμα των δύο μεθόδων (μαθηματικά εκφράζεται ως CV_a) ήταν 1.60% και 3.20% αντίστοιχα. Σε πρόσφατη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε μέθοδος η οποία ήταν προτυπωμένη κατά IFCC και παρουσίαζε πολύ χαμηλό αναλυτικό σφάλμα (CV_a=0.3%), η βιολογική μεταβλητότητα υπολογίστηκε ως CV_i=2.5% και CV_g=7.1% (84). Η ακριβής γνώση της βιολογικής μεταβλητότητας είναι απαραίτητη, διότι με βάση αυτή υπολογίζεται το ανώτατο επιτρεπτό αναλυτικό σφάλμα και τα επιθυμητά όρια της απόδοσης μιας μεθόδου.

Επιπλέον, δεδομένα από μελέτες έχουν δείξει ότι η HbA1c μπορεί να παρουσιάζει διακυμάνσεις ακόμη και ανάμεσα σε άτομα με όμοια προφίλ τιμών γλυκόζης. Αυτή η ιδιομορφία έχει ονομαστεί από αρκετούς ερευνητές ως glycation gap (χάσμα γλυκίωσης) και πρότειναν την υπόθεση ότι πρόκειται για άτομα που παρουσιάζουν διαφορετικούς ρυθμούς στην γλυκίωση της αιμοσφαιρίνης (high and low glycaters) (85). Μελέτες σε διδύμους (υγιείς και με διαβήτη τύπου 1) έδειξαν ότι, κατά κάποιο τρόπο, η τιμή της HbA1c είναι γενετικά καθορισμένη και ανεξάρτητη από τα γονίδια που επηρεάζουν τη γλυκόζη νηστείας και ότι το χάσμα γλυκίωσης είναι μια κληρονομούμενη ιδιότητα (86-88).

B. Η φυλή ως παράγων μεταβλητότητας

Σήμερα υπάρχουν στοιχεία από μελέτες που δείχνουν ότι υπάρχουν διαφορές στις τιμές αναφοράς της HbA1c ανάμεσα σε διαφορετικές εθνικότητες. Στις ΗΠΑ, δεδομένα δείχνουν ότι οι Αφροαμερικανοί έχουν υψηλότερες τιμές HbA1c σε σχέση με τους Μεξικανούς και τους μη Ισπανικής καταγωγής λευκούς (89). Σε άτομα με παρόμοιες τιμές γλυκόζης, στη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης, οι τιμές της HbA1c ήταν υψηλότερες τους Αφροαμερικανούς κατά 4 mmol/mol (0.4%) και 3

mmol/mol (0.3%) στους Ασιατικής καταγωγής, σε σύγκριση με τους Καυκάσιους Αμερικανούς (90). Οι μοριακοί μηχανισμοί που υπάρχουν πίσω από αυτές τις διαφορές δεν είναι γνωστοί. Δεν είναι ξεκάθαρο αν αυτές οι διαφορές της HbA1c μεταξύ διαφορετικών εθνικών ομάδων έχουν σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης, σε αυτές τις ομάδες, παθολογικών καταστάσεων που επηρεάζουν είτε το χρόνο ζωής των ερυθρών, είτε το ρυθμό με τον οποίο τα ερυθρά αιμοσφαίρια προσλαμβάνουν τη γλυκόζη και τον ενδοερυθροκυτταρικό της μεταβολισμό ή οφείλονται σε γενετικές διαφορές που επηρεάζουν τον ρυθμό γλυκίωσης της αιμοσφαιρίνης ή ακόμη και σε διαφορές αυτής καθαυτής της γλυκαιμίας, η οποία δεν διαγιγνώσκεται με τη μέτρηση της γλυκόζης νηστείας ή τη δίωρη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (91-93). Πάντως αυτά τα αποτελέσματα θέτουν ερωτηματικά για το κατά πόσο η δίωρη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης είναι το “gold standard” για την διάγνωση του διαβήτη (94).

Γ. Χρόνος ζωής των ερυθρών

Η ακρίβεια της HbA1c, ως μέτρο του επιπέδου της γλυκαιμίας ενός ατόμου, επηρεάζεται πρωταρχικά από το χρόνο ζωής των ερυθροκυττάρων του ατόμου. Σε κανονικές συνθήκες ο χρόνος ζωής των ερυθρών είναι περίπου 120 ημέρες (στους άνδρες τα ερυθροκύτταρα έχουν μέσο χρόνο επιβίωσης περίπου 117 ημέρες και στις γυναίκες 106 ημέρες) (2). Σε μια οποιαδήποτε χρονική στιγμή, σε ένα δείγμα αίματος περιέχονται ερυθροκύτταρα με ηλικία που ποικίλει και με διαφορετικούς βαθμούς έκθεσης στα επίπεδα γλυκόζης. Και ενώ τα πλέον γηρασμένα ερυθροκύτταρα είναι πιο πολύ εκτεθειμένα στο φαινόμενο της γλυκίωσης, τα νεότερα ερυθρά είναι πιο πολυάριθμα (95). Η συγκέντρωση της γλυκόζης τις τελευταίες 30 ημέρες συνεισφέρει περίπου το 50% στην τιμή της HbA1c που μετράμε, ενώ η χρονική περίοδος μεταξύ 90 και 120 ημερών συνεισφέρει μόνο το 10% και το υπόλοιπο ποσοστό συνεισφέρει το εναπομείναν χρονικό διάστημα των 60 ημερών (96). Παθολογικές καταστάσεις στις οποίες ο χρόνος ζωής των ερυθρών είναι μικρότερος από το κανονικό είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε πλασματικά χαμηλές τιμές HbA1c, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις αιμολυτικής αναιμίας, βαριάς ηπατικής νόσου και στην αναιμίας της χρόνιας νόσου. Επίσης φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική διατομική μεταβλητότητα στη μέση ηλικία των ερυθρών (σε άτομα χωρίς γνωστά αιματολογικά νοσήματα), γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει σε κάποιο βαθμό τη μεταβλητότητα που παρατηρείται στις τιμές της HbA1c ανάμεσα στα υγιή άτομα που δεν πάσχουν από διαβήτη (93). Αύξηση στη μέση ηλικία των ερυθρών συμβαίνει σε μειωμένη ερυθροποίηση, όπως στις περιπτώσεις της σιδηροπενικής αναιμίας, της έλλειψης βιταμίνης B12 και της έλλειψης ερυθροποιητίνης, στην περίπτωση της χρόνιας νεφρικής νόσου. Επίσης, σε περιπτώσεις καταστολής του μυελού των οστών όπως στην κύηση και στον αλκοολισμό (97-101). Αντίθετα αυξημένος αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία, μειώνει τη μέση ηλικία των ερυθροκυττάρων και κατά συνέπεια μειώνει και την HbA1c. Αυτό παρατηρείται στην αιμολυτική αναιμία, μετά την χορήγηση ερυθροποιητίνης στους νεφροπαθείς, τη χορήγηση σιδήρου στους ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία και την αναπλήρωση της B12 (97, 99,100). Αυξημένος αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων σε συνδυασμό με χαμηλή HbA1c έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με χρόνια ηπατική νόσο, ακόμη και απουσία κίρρωσης ή και σπληνομεγαλίας (102). Σημαντική επίπτωση στο χρόνο ζωής των ερυθρών έχει και η παρουσία γενετικών παραλλαγών της αιμοσφαιρίνης (Πίνακας 4). Η παρουσία τους έχει σημαντικές επιδράσεις και στην μέτρηση της HbA1c.

Πίνακας 4. Μέσος χρόνος ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων στις κυριότερες παραλλαγές αιμοσφαιρίνης

Παραλλαγή Αιμοσφαιρίνης	Μέσος χρόνος ζωής, σε ημέρες
Hb AA	120
Hb AS	93
Hb AC	87
Hb SS	17
Hb SC	28
Hb CC	28
Hb S-Beta-thal	75

Να σημειωθεί εδώ ότι σε περιπτώσεις ομοζυγωτίας όπως στην περίπτωση της Hb SS ή Hb CC η μέτρηση της HbA1c είναι αδύνατη, λόγω της απουσίας β αλυσίδων από το μόριο της αιμοσφαιρίνης και θα πρέπει να γίνει αναζήτηση άλλων παραμέτρων για την εκτίμηση της γλυκαιμικής κατάστασης του ασθενούς. Ακόμη, αρκετές εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι επηρεάζονται από την παρουσία παραλλαγών της αιμοσφαιρίνης, με τα αποτελέσματα να ποικίλουν (είτε ψευδώς αυξημένα είτε ψευδώς μειωμένα).

Ε. Αναλυτικές παρεμβολές

Πέραν των ανωτέρω παραγόντων που παρεμβάλλονται στην μέτρηση της HbA1c, υπάρχουν και μια σειρά από ουσίες και παθολογικές καταστάσεις που δημιουργούν προβλήματα σε αρκετές αναλυτικές μεθόδους (Πίνακας 5)

Πίνακας 5. Παράγοντες που επηρεάζουν την μέτρηση της HbA1c

Παθολογική κατάσταση	Επίπτωση στην HbA1c	Σχόλια
Αναιμία που σχετίζεται με μειωμένη διάρκεια ζωής ερυθροκυττάρων	ψευδώς αυξημένη	Σιδηροπενική αναιμία, έλλειψη B12, φυλλικού οξέος (χορήγηση ερυθροποιητίνης, σιδήρου ή B12 μπορεί να οδηγήσει σε μείωση)
Αναιμία που σχετίζεται με οξεία ή χρόνια απώλεια αίματος	ψευδώς μειωμένη	Συμπεριλαμβάνεται και η αιμολυτική αναιμία
Μετάγγιση αίματος (ερυθρών)	Ψευδής αύξηση ή μείωση	Παρουσία υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο συντηρητικό υλικό του ασκού/αραίωση του αίματος του λήπτη
Παρουσία αιμοσφαιρινοπάθειας /μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης	Ψευδής αύξηση ή μείωση	Εξαρτάται από την αναλυτική μεθοδολογία
Ασθενής με ασπληνία	ψευδώς αυξημένη	Αυξημένος χρόνος ζωής των ερυθρών
Σπληνομεγαλία /σφαιροκυττάρωση	ψευδώς μειωμένη	Μειωμένος χρόνος ζωής ερυθρών
Κύηση	ψευδώς μειωμένη	Μειωμένος χρόνος ζωής ερυθρών (μειωμένη HbA1c στα δύο πρώτα τρίμηνα)
Ουραιμία	ψευδώς αυξημένη	Ορισμένες μέθοδοι επηρεάζονται από την παρουσία καρβαμυλιωμένης αιμοσφαιρίνης σε ουραιμικούς ασθενείς
Ακραία υπερτριγλυκεριδαμία	ψευδώς αυξημένη	τριγλυκερίδια > 19.78 mmol/L (1750 mg/dL)
Ακραία υπερχολερυθρουναϊμία	ψευδώς αυξημένη	χολερυθρίνη > 342 mmol/L (20 mg/dL)
Χρόνια λήψη ασπιρίνης	ψευδώς αυξημένη	Ορισμένες μέθοδοι επηρεάζονται από τη δημιουργία ακετυλιωμένης αιμοσφαιρίνης/ σε χαμηλές δόσεις παρεμβάλλεται αρνητικά στην γλυκίωση
Χρόνια υπερκατανάλωση αλκοόλ	ψευδώς αυξημένη	Η δημιουργία του συμπλόκου ακεταλδεύδης-HbA1c επηρεάζει ορισμένες μεθόδους

Χρόνια κατανάλωση οπισοειδών	ψευδώς αυξημένη	Άγνωστος μηχανισμός
Δηλητηρίαση από μόλυβδο	ψευδώς αυξημένη	Άγνωστος μηχανισμός
Κατανάλωση βιταμίνης E	ψευδώς μειωμένη	Η βιταμίνη E παρεμβάλλεται αρνητικά στη γλυκίωση της Hb /ανάλογα του τρόπου μέτρησης
Αγωγή με ιντερφερόνη α και ριμπαβιρίνη	ψευδώς μειωμένη	Πιθανόν λόγω αιμολυτικής αναιμίας
Κατανάλωση βιταμίνης C	Ψευδής αύξηση ή μείωση	Η βιταμίνη C παρεμβάλλεται αρνητικά στη γλυκίωση της Hb /ανάλογα του τρόπου μέτρησης

Τελειώνοντας με τις αναλυτικές παρεμβολές, στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι κυριότερες εργαστηριακές μεθοδολογίες, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τους σχετικά με τις αναλυτικές τους παρεμβολές.

Πίνακας 6. Σύγκριση αναλυτικών μεθόδων –αναλυτικές παρεμβολές

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
HPLC (Χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων)	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα Αυτοματοποίηση Ξεκάθαρος διαχωρισμών κλασμάτων Hb Προσδιορίζει άμεσα HbA1c Ξεχωρίζει τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες Μικρή επίδραση της HbF 	Παλαιότερης γενιάς αναλυτές παρουσιάζουν μικρή διακριτική ικανότητα στο να ξεχωρίσουν τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες
Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα Αυτοματοποίηση Ξεκάθαρος διαχωρισμών κλασμάτων Hb Προσδιορίζει άμεσα HbA1c Ξεχωρίζει τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες Μικρή επίδραση από την HbF 	<ul style="list-style-type: none"> Υψηλό κόστος Μικρή ταχύτητα
Χρωματογραφία συγγένειας	<ul style="list-style-type: none"> Μικρή παρεμβολή από μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες και HbF 	<ul style="list-style-type: none"> Δεν μπορεί να ξεχωρίσει τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες Μετρά όλες τις γλυκιωμένες αιμοσφαιρίνες αδιακρίτως και όχι αποκλειστικά την HbA1c
Ανοσοχημικές δοκιμασίες	<ul style="list-style-type: none"> Αυτοματοποίηση 	<ul style="list-style-type: none"> Δεν μπορεί να ξεχωρίσει τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες

	<ul style="list-style-type: none"> • Οι νέες μέθοδοι παρουσιάζουν μικρές παρεμβολές από τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες 	<ul style="list-style-type: none"> • Αρκετές μέθοδοι επηρεάζονται από υψηλές τιμές HbF • Αναλόγως του χρησιμοποιούμενου αντισώματος μπορεί να επηρεάζεται από την παρουσία αιμοσφαιροπαθειών/μεταλλα γ-μένων μορφών
Ενζυματικές δοκιμασίες	<ul style="list-style-type: none"> • Αυτοματοποίηση • Οι νέες μέθοδοι παρουσιάζουν μικρές παρεμβολές από τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες 	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν μπορεί να ξεχωρίσει τις μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες • Αρκετές μέθοδοι επηρεάζονται από υψηλές τιμές HbF

Συμπεράσματα

Σε αυτό το άρθρο παρουσιάστηκαν οι πλέον πρόσφατες εξελίξεις στη μέτρηση της γλυκωμένης αιμοσφαιρίνης, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα αυτού του βιοδείκτη, αλλά και οι προβληματισμοί μας που συνοψίζονται στα εξής σημεία:

1. Τη συνεχιζόμενη λανθασμένη χρήση του όρου «γλυκοσυλιωμένη», για να περιγράψουμε την HbA1c
2. Την επιμονή έκφρασης των αποτελεσμάτων σε ένα ξεπερασμένο σύστημα μονάδων που δεν έχει καμία σχέση με το τι πραγματικά μετράται στο εργαστήριο.
3. Αυτή η πρακτική αναγκάζει τα εργαστήρια να προσπαθούν να μετατρέψουν τα αποτελέσματα (από mmol/mol σε %) χρησιμοποιώντας μαθηματικές εξισώσεις, οι οποίες το μόνο που κάνουν είναι να εισάγουν μεγαλύτερη αβεβαιότητα στο αποτέλεσμα.
4. Τέλος, η προσπάθεια μετατροπής του αποτελέσματος της HbA1c σε εκτιμώμενη μέση τιμή γλυκόζης, μάλλον δεν είναι δυνατόν να αντικαταστήσει την απ' ευθείας χρήση του αποτελέσματος της μέτρησης της HbA1c. Παρόλη την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους, υπάρχει αρκετή αβεβαιότητα κατά τη μετάφραση του αποτελέσματος, η οποία είναι κλινικά σημαντική.

Βιβλιογραφία

1. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. Diabetes Care. 2021;44(Suppl 1):S15-s33.
2. Gallagher EJ, Le Roith D, Bloomgarden Z. Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. J Diabetes. 2009;1(1):9-17.
3. Gonen B, Rubenstein A, Rochman H, Tanega SP, Horwitz DL. Haemoglobin A1: An indicator of the metabolic control of diabetic patients. Lancet. 1977;2(8041):734-7.
4. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993;329(14):977-86.

5. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):837-53.
6. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):854-65.
7. Miedema K. Laboratory tests in diagnosis and management of diabetes mellitus. Practical considerations. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(9):1259-65.
8. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(5):299-308.
9. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(1):78-89.
10. Garrick LM, McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, McManus M, Bunn HF. Structural analysis of the minor human hemoglobin components: Hb Ala1, Hb Ala2 and Hb Alb. *Eur J Biochem*. 1980;106(2):353-9.
11. Bunn HF, Shapiro R, McManus M, Garrick L, McDonald MJ, Gallop PM, et al. Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem*. 1979;254(10):3892-8.
12. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin Chem*. 1997;43(10):1944-51.
13. Shapiro R, McManus M, Garrick L, McDonald MJ, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin at multiple sites. *Metabolism*. 1979;28(4 Suppl 1):427-30.
14. Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory Diagnosis of HbA1c: A Review. *Journal of Nanomedicine Research*. 2017;5.
15. Allen DW, Schroeder WA, Balog J. Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(7):1628-34.
16. Clegg MD, Schroeder WA. A Chromatographic Study of the Minor Components of Normal Adult Human Hemoglobin Including a Comparison of Hemoglobin from Normal and Phenylketonuric Individuals. *Journal of the American Chemical Society*. 1959;81(22):6065-9.
17. Schnek AG, Schroeder WA. The Relation between the Minor Components of Whole Normal Human Adult Hemoglobin as Isolated by Chromatography and Starch Block Electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*. 1961;83(6):1472-8.
18. Huisman THJ, Meyering CA. Studies on the heterogeneity of hemoglobin: I. The heterogeneity of different human hemoglobin types in carboxymethylcellulose and in amberlite irc-50 chromatography: Qualitative aspects. *Clinica Chimica Acta*. 1960;5(1):103-23.
19. Holmquist WR, Schroeder WA. The in Vitro Biosynthesis of Hemoglobin A1c*. *Biochemistry*. 1966;5(8):2504-12.
20. Prome D, Blouquit Y, Ponthus C, Prome J, Rosa J. Structure of the human adult hemoglobin minor fraction A1b by electrospray and secondary ion mass spectrometry. Pyruvic acid as amino-terminal blocking group. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(20):13050-4.
21. Gillery P. A history of HbA1c through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2013;51(1):65-74.
22. Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(10):5204-8.
23. McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, Solway J, Bunn HF. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. Purification, identification, and partial structural analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(7):2327-32.
24. Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem*. 1980;255(7):3120-7.
25. Kim H-J, Kurup IV. Nonenzymatic glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence for in vitro and in vivo glucosylation. *Metabolism*. 1982;31(4):348-53.
26. Kennedy L, Baynes J. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia*. 1984;26(2):93-8.
27. Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(9):4258-61.
28. Szuberski J, Oliveira JL, Hoyer JD. A comprehensive analysis of hemoglobin variants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Int J Lab Hematol*. 2012;34(6):594-604.
29. Warghade S, Britto J, Haryan R, Dalvi T, Bendre R, Chheda P, et al. Prevalence of hemoglobin variants and hemoglobinopathies using cation-exchange high-performance liquid chromatography in central reference laboratory of India: A report of 65779 cases. *J Lab Physicians*. 2018;10(1):73-9.
30. Roth M. "Glycated hemoglobin," not "glycosylated" or "glucosylated". *Clin Chem*. 1983;29(11):1991.
31. Vasanth V, Frank K, Elmets C, Dauchot P, Monnier V. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. *Diabetes*. 1986;35:916-21.

32. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification–derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clinical chemistry*. 2010;56(9):1401-12.
33. Brownlee M, VLASSARA H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of internal medicine*. 1984;101(4):527-37.
34. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
35. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*. 2010;2(12):1247-65.
36. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):259-70.
37. Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *CR Acad Sci*. 1912;154:66-8.
38. Wellner A, Huettl C, Henle T. Formation of Maillard Reaction Products during Heat Treatment of Carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(14):7992-8.
39. Cui H, Yu J, Xia S, Duhoranimana E, Huang Q, Zhang X. Improved controlled flavor formation during heat-treatment with a stable Maillard reaction intermediate derived from xylose-phenylalanine. *Food Chem*. 2019;271:47-53.
40. Liu J, Liu M, He C, Song H, Chen F. Effect of thermal treatment on the flavor generation from Maillard reaction of xylose and chicken peptide. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;64(1):316-25.
41. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*. 1981;213(4504):222-4.
42. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clinica chimica acta*. 1968;22(2):296-8.
43. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and biophysical research communications*. 1969;36(5):838-43.
44. Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1971;284(7):353-7.
45. Weykamp C, John WG, Mosca A. A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009;3(3):439-45.
46. Weykamp C. HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects. *Ann Lab Med*. 2013;33(6):393-400.
47. Peacock I. Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use. *J Clin Pathol*. 1984;37(8):841-51.
48. Moldoveanu SC, David V, editors. *Basic Information about HPLC2013*.
49. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem*. 2004;50(10):1736-47.
50. Whatley H. *Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis*. In: Petersen JR, Mohammad AA, editors. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. p. 21-58.
51. Herpol M, Lanckmans K, Van Neyghem S, Clement P, Crevits S, De Crem K, et al. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 Systems for the Measurement of Hemoglobin A 1c. *American Journal of Clinical Pathology*. 2016;146(1):67-77.
52. Mallia AK, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Smith PK. Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Analytical Letters, Part B: Clinical and Biochemical Analysis*. 1981;14(8):649-61.
53. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham JL. Enzyme immunoassay--a new technique for estimating hemoglobin A1c. *Clin Chem*. 1993;39(4):663-6.
54. Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, Ishimaru K, Hirai K, Komori T, et al. New enzymatic assay for glycohemoglobin. *Clin Chem*. 2003;49(2):269-74.
55. Liu L, Hood S, Wang Y, Bezverkov R, Dou C, Datta A, et al. Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples. *Clin Biochem*. 2008;41(7-8):576-83.
56. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH, Jr., et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. *Clin Chem*. 1992;38(12):2472-8.
57. Miedema K. Towards worldwide standardisation of HbA1c determination. *Diabetologia*. 2004;47(7):1143-8.
58. Jeppsson JO, Jerntorp P, Sundkvist G, Englund H, Nylund V. Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. *Clin Chem*. 1986;32(10):1867-72.
59. Tominaga M, Makino H, Yoshino G, Kuwa K, Takei I, Aono Y, et al. Japanese standard reference material for JDS Lot 2 haemoglobin A1c. I: Comparison of Japan Diabetes Society-assigned values to those obtained by the Japanese and USA domestic standardization programmes and by the International Federation of Clinical Chemistry reference laboratories. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(Pt 1):41-6.
60. Kashiwagi A, Kasuga M, Araki E, Oka Y, Hanafusa T, Ito H, et al. International clinical harmonization of glycated hemoglobin in Japan: From Japan Diabetes Society to National Glycohemoglobin Standardization Program values. *Diabetologia International*. 2012;3(1):8-10.
61. Little RR. Glycated hemoglobin standardization--National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) perspective. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2003;41(9):1191-8.

62. Hörber S, Achenbach P, Schleicher E, Peter A. Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology Advances*. 2020;39:107359.
63. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J-O, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clinical chemistry*. 2004;50(1):166-74.
64. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*. 2011;57(6):e1-e47.
65. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2011;34(6):e61-e99.
66. Dhath GS, Agarwal MM, Bishawi B. HbA1c: a comparison of NGSP with IFCC transformed values. *Clin Chim Acta*. 2005;358(1-2):81-6.
67. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem*. 2004;50(1):166-74.
68. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. *Diabetes Care*. 2007;30(9):2399-400.
69. Makris K, Spanou L, Rambaouni-Antoneli A, Koniari K, Drakopoulos I, Rizos D, et al. Relationship between mean blood glucose and glycated haemoglobin in Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine*. 2008;25(2):174-8.
70. Sarwat S, Ilag LL, Carey MA, Shrom DS, Heine RJ. The relationship between self-monitored blood glucose values and glycated haemoglobin in insulin-treated patients with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*. 2010;27(5):589-92.
71. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2002;25(2):275-8.
72. Bonora E, Calcaterra F, Lombardi S, Bonfante N, Formentini G, Bonadonna RC, et al. Plasma glucose levels throughout the day and HbA(1c) interrelationships in type 2 diabetes: implications for treatment and monitoring of metabolic control. *Diabetes Care*. 2001;24(12):2023-9.
73. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ, et al. Translating the A1C Assay Into Estimated Average Glucose Values. *Diabetes Care*. 2008;31(8):1473-8.
74. Makris K, Spanou L. Is there a relationship between mean blood glucose and glycated hemoglobin? *J Diabetes Sci Technol*. 2011;5(6):1572-83.
75. Wilson DM, Kollman. Relationship of A1C to glucose concentrations in children with type 1 diabetes: assessments by high-frequency glucose determinations by sensors. *Diabetes Care*. 2008;31(3):381-5.
76. Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, Connolly S, Hanson S. Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement: evaluation of five different high performance liquid chromatography methods. *Diabetes Technol Ther*. 2007;9(1):36-42.
77. Weykamp CW, Mosca A, Gillery P, Panteghini M. The analytical goals for hemoglobin A(1c) measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different. *Clin Chem*. 2011;57(8):1204-6.
78. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem*. 2011;57(2):205-14.
79. EurA1c: The European HbA1c Trial to Investigate the Performance of HbA1c Assays in 2166 Laboratories across 17 Countries and 24 Manufacturers by Use of the IFCC Model for Quality Targets. *Clin Chem*. 2018;64(8):1183-92.
80. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG. Biological variation of glycated hemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring. *Diabetes Care*. 1998;21(2):261-4.
81. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennill A, England J, et al. Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem*. 2002;48(7):1116-8.
82. Braga F, Dolci A, Mosca A, Panteghini M. Biological variability of glycated hemoglobin. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(21):1606-10.
83. Ucar F, Erden G, Ginis Z, Ozturk G, Sezer S, Gurler M, et al. Estimation of biological variation and reference change value of glycated hemoglobin (HbA1c) when two analytical methods are used. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(15):1548-53.
84. Braga F, Dolci A, Montagnana M, Pagani F, Paleari R, Guidi GC, et al. Reevaluation of biological variation of glycated hemoglobin (HbA1c) using an accurately designed protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(15):1412-6.
85. Hempe JM, Gomez R, McCarter RJ, Jr., Chalew SA. High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control. *J Diabetes Complications*. 2002;16(5):313-20.

86. Snieder H, Sawtell PA, Ross L, Walker J, Spector TD, Leslie RDG. HbA1c Levels Are Genetically Determined Even in Type 1 Diabetes: Evidence From Healthy and Diabetic Twins. *Diabetes*. 2001;50(12):2858-63.
87. Cohen RM, Snieder H, Lindsell CJ, Beyan H, Hawa MI, Blinko S, et al. Evidence for independent heritability of the glycation gap (glycosylation gap) fraction of HbA1c in nondiabetic twins. *Diabetes Care*. 2006;29(8):1739-43.
88. Leslie RDG, Cohen RM. Biologic variability in plasma glucose, hemoglobin A1c, and advanced glycation end products associated with diabetes complications. *Journal of diabetes science and technology* [Internet]. 2009 2009/07//; 3(4):[635-43 pp.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/20144305>
<https://doi.org/10.1177/193229680900300403>
<https://europepmc.org/articles/PMC2769979>
<https://europepmc.org/articles/PMC2769979?pdf=render>.
89. Ziemer DC, Kolm P, Weintraub WS, Vaccarino V, Rhee MK, Twombly JG, et al. Glucose-independent, black-white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. *Ann Intern Med*. 2010;152(12):770-7.
90. Herman WH, Ma Y, Uwaifo G, Haffner S, Kahn SE, Horton ES, et al. Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care*. 2007;30(10):2453-7.
91. Rafat D, Ahmad J. HbA1c in pregnancy. *Diabetes Metab Syndr*. 2012;6(1):59-64.
92. Herman WH, Cohen RM. Hemoglobin A1c: teaching a new dog old tricks. *Ann Intern Med*. 2010;152(12):815-7.
93. Cohen RM, Franco RS, Khera PK, Smith EP, Lindsell CJ, Ciraolo PJ, et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*. 2008;112(10):4284-91.
94. Hughes RCE, Rowan J, Florkowski CM. Is There a Role for HbA1c in Pregnancy? *Current Diabetes Reports*. 2016;16(1):5.
95. Jeffcoate SL. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabet Med*. 2004;21(7):657-65.
96. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JL, Nathan D, Peterson CM, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(7):1761-73.
97. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol*. 2004;112(3):126-8.
98. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int*. 1999;41(4):357-62.
99. Gram-Hansen P, Eriksen J, Mourits-Andersen T, Olesen L. Glycosylated haemoglobin (HbA1c) in iron- and vitamin B12 deficiency. *J Intern Med*. 1990;227(2):133-6.
100. Ng JM, Jennings PE, Laboi P, Jayagopal V. Erythropoietin treatment significantly alters measured glycated haemoglobin (HbA1c). *Diabet Med*. 2008;25(2):239-40.
101. Hashimoto K, Noguchi S, Morimoto Y, Hamada S, Wasada K, Imai S, et al. A1C but not serum glycated albumin is elevated in late pregnancy owing to iron deficiency. *Diabetes Care*. 2008;31(10):1945-8.
102. Schnedl WJ, Wallner SJ, Pischwanger C, Krause R, Lipp RW. Glycated hemoglobin and liver disease in diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr*. 2005;155(17-18):411-5.

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΚΕΙΜΕΝΟ

Φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες

Η αιμοσφαιρίνη (Hb), αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (είναι ένα τετραμερές) με μοριακό βάρος 64500 Da. Αποτελείται από δύο α και δύο μη-α πολυπεπτιδικές αλυσίδες κάθε μία από τις οποίες συνδέεται ομοιοπολικά με μια ομάδα αίμης (heme group). Κάθε μια ομάδα αίμης συνίσταται από ένα άτομο σιδήρου, το οποίο είναι δεσμευμένο μέσα σε ένα δακτύλιο πρωτοπορφυρίνης (protoporphyrin IX ring).

Στους ανθρώπους υπάρχουν έξι γνωστές, διαφορετικές μεταξύ τους ως προς την πρωτοταγή τους δομή πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες δύνανται να σχηματίσουν τετραμερή. Οι αλυσίδες αυτές έχουν ονομασίες από τα ελληνικά γράμματα α, β, γ, δ, ε και ζ. Οι α και ζ αλυσίδες αποτελούνται από 141 αμινοξέα ενώ οι β, γ, δ, και ε έχουν 146 αμινοξέα στο μόριο

τους. Οι αλυσίδες ϵ , γ , και δ μοιάζουν αρκετά με τις β αλυσίδες. Οι ζ αλυσίδες μοιάζουν πολύ με τις α αλυσίδες και απαντώνται μόνο στα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα μαζί με τις ϵ αλυσίδες. Κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και μέχρι την 8η εβδομάδα της κύησης, η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από την αιμοσφαιρίνη Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), την αιμοσφαιρίνη Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) και την Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$). Όταν το έμβρυο φτάσει στην 4 με 5 εβδομάδα της κύησης αρχίζει η μείωση της σύνθεσης των ζ και ϵ αλυσίδων, και αρχίζει η παραγωγή των α και γ αλυσίδων. Σε αυτό το στάδιο της κύησης η σύνθεση των β αλυσέων αιμοσφαιρίνης στα δικτυοερυθροκύτταρα αντιπροσωπεύει το 4% όλων των μη- α αλυσέων και αυξάνεται βαθμιαία στη συνέχεια. Κατά την 8η εβδομάδα το μέρος που γίνεται η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης αλλάζει και γίνεται πλέον στο εμβρυϊκό ήπαρ, το οποίο πλέον παράγει σχεδόν αποκλειστικά αιμοσφαιρίνη F (HbF), ονομαζόμενη και εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (fetal hemoglobin) η οποία αποτελείται από δύο α και δύο γ αλυσίδες ($\alpha_2\gamma_2$). Στην αιμοσφαιρίνη των εμβρύων απαντάται και μια μικρή ποσότητα αιμοσφαιρίνης A (HbA) η οποία αποτελείται από δύο α και δύο β αλυσίδες ($\alpha_2\beta_2$). Έτσι πλέον για το υπόλοιπο της εμβρυϊκής ζωής η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η HbF. Με τη συμπλήρωση 18 εβδομάδων κύησης το κέντρο παραγωγής της αιμοσφαιρίνης μετατοπίζεται από το ήπαρ στο μυελό των οστών και αρχίζει μια σταδιακή στροφή στη παραγωγή της αιμοσφαιρίνης από την HbF στην HbA.

Στα νεογέννητα η πλειονότητα της αιμοσφαιρίνης (50-85%) είναι η Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), η οποία όμως αρχίζει να μειώνεται απότομα και η συγκέντρωσή της τον τέταρτο μήνα μετά την γέννηση έχει περιοριστεί στο 10 με 15% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης. Από το σημείο αυτό και μετά η μείωση της είναι πιο αργή και μέχρι το 3ο ή 4ο έτος της ζωής έχει φτάσει στα επίπεδα της ενήλικης ζωής, που είναι μικρότερα του 1%. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη μπορεί να είναι αυξημένη σε αρκετές ασθένειες όπως η μεσογειακή αναιμία, σε περιπτώσεις κληρονομικής επιμένουσας εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH), στην τρισωμία D1, σε μεγαλοβλαστικές και απλαστικές αναιμίες, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, σε αρκετές κακοήθειες που ενέχεται ο μυελός των οστών, σε μερικές περιπτώσεις θυρεοτοξίκωσης, και τέλος κατά την διάρκεια της κύησης. Η Hb F είναι ετερογενές μόριο εξ αιτίας της παρουσίας δύο ειδών γ αλυσίδων οι οποίες διαφέρουν κατά ένα αμινοξύ στην θέση 136 της αλυσίδας. Ο ένας τύπος αλυσίδας περιέχει το αμινοξύ αλανίνη ($^A\gamma$ -chains) και άλλος τύπος περιέχει το αμινοξύ γλυκίνη στην ίδια θέση ($^G\gamma$ -chains).

Στους ενήλικες το κυρίαρχο είδος αιμοσφαιρίνης είναι η αιμοσφαιρίνη A (HbA) αποτελούμενη από δύο α και δύο β αλυσίδες ($\alpha_2\beta_2$) και η οποία αποτελεί περίπου το 97% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης. Το υπόλοιπο μοιράζεται μεταξύ της αιμοσφαιρίνης HbA₂ [η οποία αποτελείται από δύο α και δύο δ αλυσίδες ($\alpha_2\delta_2$)] και αποτελεί περίπου το 2-3% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης και την αιμοσφαιρίνη HbF η οποία είναι κάτι λιγότερο από το 1% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης. Η HbA₂ παρουσιάζεται αυξημένη στην πλειονότητα των περιπτώσεων της β μεσογειακής αναιμίας και στις μεγαλοβλαστικές αναιμίες και παρουσιάζεται μειωμένη στις σιδηροπενικές αναιμίες (iron deficiency and sideroblastic anemias)

Πίνακας 1. Οι φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου και η συχνότητα που απαντώνται στους ενήλικες

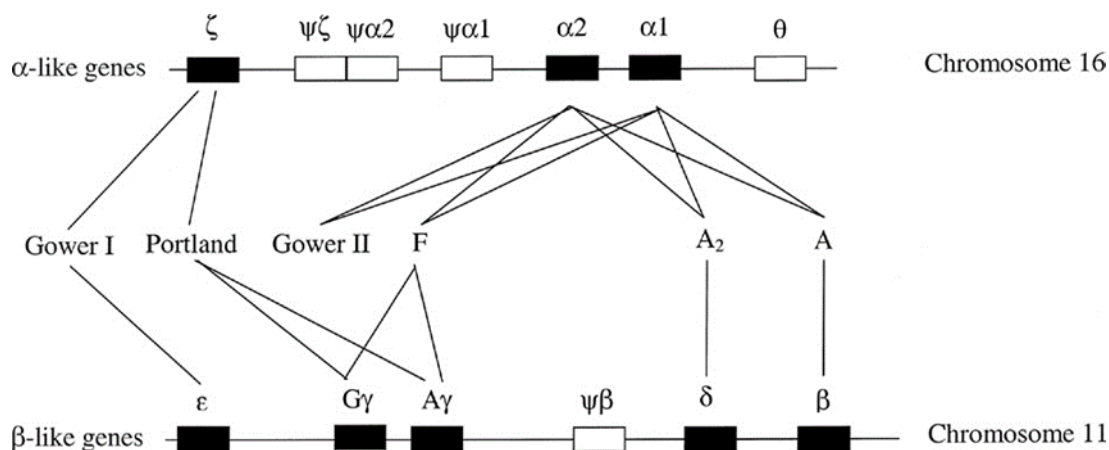
Αιμοσφαιρίνη	Στάδιο ανάπτυξης	Δομή	Ποσοστό στους ενήλικες	Παθολογικές / φυσιολογικές καταστάσεις που είναι αυξημένη
Hb A	Ενήλικη ζωή	$\alpha_2\beta_2$	97	
Hb A ₂		$\alpha_2\delta_2$	2-3	β μεσογειακή αναιμία
Hb H		β_4	0	σε μερικές περιπτώσεις α μεσογειακής αναιμίας
Hb F	Εμβρυϊκό -Νεογνικό	$\alpha_2\gamma_2$	< 1	Στα νεογνά, σε περιπτώσεις β μεσογειακής αναιμίας, ΗΡFH, κύηση, περιπτώσεις όπου ο μυελός βρίσκεται υπό στρες
Hb Bart's		γ_4	0	σε μερικές περιπτώσεις α μεσογειακής αναιμίας
Hb Gower I	Εμβρυϊκό	$\zeta_2\varepsilon_2$	0	εμβρυϊκή ζωή < 8 εβδομάδων
Hb Gower II	Εμβρυϊκό	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	εμβρυϊκή ζωή > 8 εβδομάδων
Hb Portland	Εμβρυϊκό	$\zeta_2\gamma_2$	0	εμβρυϊκή ζωή < 8 εβδομάδων και στην α ⁰ -μεσογειακή αναιμία (hydrops fetalis)

Οι αιμοσφαιρίνες H (Hb H) και Bart's (Hb Bart's) αποτελούν περιπτώσεις τετραμερών όπου αποτελούνται αποκλειστικά από β και γ αλυσίδες αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές αιμοσφαιρίνες παρουσιάζουν πολύ μειωμένη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου και παρατηρούνται σε μερικές περιπτώσεις α μεσογειακής αναιμίας, όπου χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια παραγωγής α αλυσίδων και μόνο από παραγωγή β και γ αλυσίδων αντίστοιχα σε τέτοιο βαθμό, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η δημιουργία τετραμερών αποτελούμενων μόνο από β ή γ αλυσίδες.

Η βιοσύνθεση των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης – Genetics

Η παραγωγή κάθε μιας από τις διαφορετικές αλυσίδες που συνθέτουν τους διαφορετικούς τύπους αιμοσφαιρίνης ελέγχεται από ξεχωριστά γονίδια. Όλα τα γονίδια προέρχονται εξελικτικά από ένα μοναδικό αρχέγονο γονίδιο. Στους ανθρώπους υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων που κατευθύνουν την σύνθεση των αιμοσφαιρινών. Η πρώτη ομάδα (α περιοχή) η οποία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 (στο βραχύ σκέλος ανάμεσα στο p13.2 και στο τελομερές) περιέχει το εμβρυονικό γονίδιο ζ και τα δύο α γονίδια. Η δεύτερη ομάδα (β περιοχή) η οποία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (στο βραχύ σκέλος στην τελική του περιοχή) περιέχει τα γονίδια ε, ⁶γ, ^Aγ, δ και β. Η φυσική διάταξη και ο προσανατολισμός των γονιδίων στην κάθε ομάδα σχετίζεται με τη σειρά έκφρασης τους κατά την οντογένεση και την ερυθροποίηση.

Συνολικά λοιπόν υπάρχουν 8 ξεχωριστοί γενετικοί τόποι¹ (genetic loci) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την κωδικοποίηση των έξι διαφορετικών τύπων αλυσίδων. Μια σχηματική απεικόνιση των προϊόντων αυτών των γονιδίων καθώς και των αλληλεπιδράσεων τους φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 1:



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των συνδυασμών των προϊόντων των γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που χρησιμεύουν στην βιοσύνθεση των τετραμερών της αιμοσφαιρίνης.

Το φάσμα των κληρονομούμενων διαταραχών της αιμοσφαιρίνης-αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν ετερογενή ομάδα κληρονομικών διαταραχών οι οποίες αφορούν τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και διακρίνονται σε

- ποσοτικές** οι οποίες είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων και οι οποίες οδηγούν σε επιλεκτική ανεπάρκεια της σύνθεσης είτε των α είτε των β πολυπεπτιδικών αλύσεων, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των α και β αλύσεων και τη συσσώρευση των μη παθολογικών αλύσεων που περισσεύουν, οι οποίες τελικώς επειδή δεν μπορούν να σχηματίσουν τετραμερή μόρια αιμοσφαιρίνης, καθιζάνουν ως ενδοκυτταρικά έγκλειστα και πυροδοτούν μέρος του παθολογικού μηχανισμού της νόσου (βλ. μεσογειακά σύνδρομα ή θαλασσαιμίες)
- ποιοτικές** στις οποίες έχουμε παραγωγή παθολογικών πολυπεπτιδικών αλύσεων εξ αιτίας μεταλλάξεων οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην β αλυσίδα. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τις β αλυσίδες μπορεί να οδηγήσουν στη παραγωγή αιμοσφαιρίνης με διαφορετικές συμπεριφορές και επακόλουθα ιδιαίτερη κλινική εικόνα.

¹ γενετικός τόπος = είναι μια συγκεκριμένη σταθερή θέση σε ένα χρωμόσωμα όπου εδράζει ένα συγκεκριμένο γονίδιο

Οι γονιδιακές βλάβες που οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή αιμοσφαιρινικών αλύσεων ή παραγωγή παραλλαγών της αιμοσφαιρίνης είναι παρά πολλές. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 700 μεταλλάξεις που αφορούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α, β, γ, και δ, αιμοσφαιρινικές αλυσίδες. Οι πιο συχνές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης παγκοσμίως είναι (με μειούμενη συχνότητα) οι αιμοσφαιρίνες HbS, HbE, HbC και HbD. Όλες αυτές οι αιμοσφαιρίνες αφορούν μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέως στη β αλυσίδα. Σε αρκετές περιπτώσεις δεν προκαλούν νόσο, παρόλα αυτά μερικές μπορεί να προκαλέσουν τέτοιες δομικές αλλαγές στη πολυπεπτιδική αλυσίδα, οι οποίες να έχουν επίδραση στη σταθερότητα ή και στις λειτουργικές ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης με αποτέλεσμα να οδηγούν σε κλινική διαταραχή. Για την ονομασία τους χρησιμοποιούνται γράμματα του λατινικού αλφαβήτου ή και οι γεωγραφικές τοποθεσίες που ανακαλύφθηκαν (Π.χ. HbS, HbC, HbE, HbD-Punjab, HbO-Arab) Αντίθετα οι θαλασαιμίες ή μειωμένη σύνθεση φυσιολογικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις, είτε σε ελλείψεις βάσεων, είτε σε μερική ή και πλήρη απουσία γονιδίου. Οι θαλασαιμίες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη ατελώς συντιθέμενη αλυσίδα. Από άποψη δημόσιας υγείας οι α και β θαλασαιμίες είναι οι πλέον σημαντικές. Οι περισσότερες αιμοσφαιρινοπάθειες κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, με συνέπεια την εμφάνιση ετεροζυγτών (αυτοί οι οποίοι φέρουν μόνο ένα ελαττωματικό γονίδιο) που είναι συνήθως ασυμπτωματικά άτομα και την εμφάνιση των ομοζυγτών οι οποίοι εκδηλώνουν βαρύτερα την μορφή της νόσου.

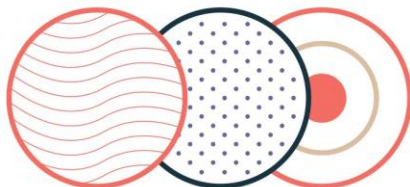
Αιμοσφαιρινοπάθειες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την Ελλάδα

Γονίδια αιμοσφαιρινοπαθειών ανευρίσκονται στο 20% του Ελληνικού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα τα γονίδια της β-μεσογειακής αναιμίας ανευρίσκονται στο 8-9% του πληθυσμού της α-μεσογειακής αναιμίας στο 10-12% του πληθυσμού της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας στο 1% του πληθυσμού.

Τα **Δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα** που περιλαμβάνουν την δρεπανοκυτταρική αναιμία (ομόζυγη HbS/HbS) και τις ετεροζυγωτίες του γονιδίου της αιμοσφαιρίνης S με τα γονίδια της β-μεσογειακής αναιμίας (HbS/Hbβ^{thal} επονομαζόμενη και μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία), της αιμοσφαιρίνης C (HbS/HbC), της αιμοσφαιρίνης D (HbS/HbD) και άλλων σπάνιων συνδυασμών (π.χ. συνύπαρξη HbS με κληρονομική παραμονή HbF) και έχουν κλινικές εκδηλώσεις. Αντίθετα οι ασθενείς με ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι ασυμπτωματικοί. Η ετεροζυγωτία αναγνωρίζεται μόνο από την εξέταση της αιμοσφαιρίνης με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία (HPLC) όπου το παθολογικό κλάσμα της αιμοσφαιρίνης αντιπροσωπεύει περίπου το 40 % της ολικής αιμοσφαιρίνης (το ποσοστό της HbS είναι πάντοτε μικρότερο εκείνου της HbA αντίθετα η ομοζυγωτία η οι μικτές ετεροζυγωτίες χαρακτηρίζονται από πλήρη απουσία αιμοσφαιρίνης A στο χρωματογράφημα).

21^ο

Πανελλήνιο
Συνέδριο
Κλινικής
Χημείας



12-14

Οκτωβρίου 2023

Royal Olympic Hotel



www.eekx-kb.gr

Ο καθοριστικός ρόλος των εργαστηρίων στη
δημόσια υγεία και την κλινική πράξη

Γενικές πληροφορίες:

Ημερομηνίες διεξαγωγής: 12 – 14 Οκτωβρίου 2023

Τόπος διεξαγωγής: Ξενοδοχείο Royal Olympic, Αθήνα

Οργάνωση: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας

Υπό την αιγίδα των:

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Σημαντικές ημερομηνίες:

Προθεσμία υποβολής περιλήψεων: 25 Αυγούστου, 2023

Απαντήσεις Αποδοχής εργασιών: 20 Σεπτεμβρίου, 2023



Calendar of IFCC Congresses/Conferences and Regional
Federation's Congresses



[Challenges of digital technologies and artificial intelligence in laboratory medicine](#)

July 27, 2023

Live webinar



Laboratory medicine – a critical role for patients in disease diagnosis and monitoring

September 13, 2023

Live webinar



[2023 JCTLM Workshop on: 'EQA schemes elucidating the clinical suitability of laboratory results'](#)

December 4 - 5, 2023

Sèvres, FR



AFCC Congress 2024

February, 2024

Egypt



AFCB Congress in conjunction with the XXVI IFCC WorldLab Dubai 2024 Congress

May 26 - 30, 2024

Dubai, AE



[XXVI IFCC
WORLDLAB DUBAI 2024](#)

May 26 - 30, 2024

Dubai, AE



**XXVI COLABIOCLI
Congress 2024**

October 03 - 10, 2024

Cartagena, CO



[APFCB 2024 SYDNEY](#)

*October 31 November 03,
2024*

Sydney, AU

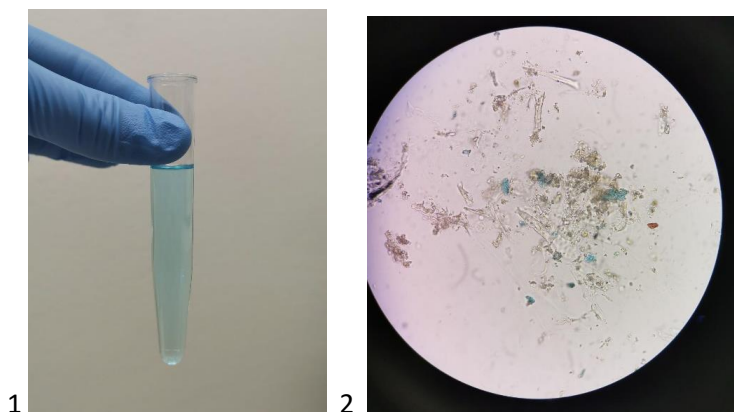
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΟΥΡΩΝ ΜΕ ΜΠΛΕ ΧΡΟΙΑ

Χριστίνα Σεϊτοπούλου, Ιατρός Βιοπαθολόγος, Βιοπαθολογικό Εργαστήριο, ΚΥ Νίκαιας 2^η ΥΠΕ

Γυναίκα ασθενής προσέρχεται για τακτικό έλεγχο ρουτίνας (αιματολογικός έλεγχος, βιοχημικός έλεγχος και γενική εξέταση ούρων), στο Βιοπαθολογικό εργαστήριο του ΚΥ Νίκαιας. Η ασθενής είναι 46 ετών, καπνίστρια, μητέρα 2 παιδιών, με ιστορικό ρευματοειδούς αρθρίτιδας τα τελευταία 15 χρόνια, υπερχοληστερολαιμία, ημικρανίες από την ηλικία των 20 ετών, με συχνά σε αριθμό παροξυσμικά επεισόδια. Λαμβάνει θεραπευτική αγωγή με ινδομεθακίνη (indometacin) για την ρευματοειδή αρθρίτιδα, και την ημικρανία. Στο οικογενειακό ιστορικό αναφέρεται μητέρα με ρευματοειδή αρθρίτιδα και πρώτη εξαδέλφη με ιστορικό ημικρανιών από την ηλικία των 20 ετών.

Η γενική ούρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο multistix των 10 παραμέτρων. Η χροιά του δείγματος των ούρων, ήταν μπλε (Εικόνα 1), με ίζημα μετά την φυγοκέντρηση. Στην μικροσκοπική εξέταση των ούρων ανευρέθησαν ολίγα πυοσφαίρια, ολίγα ερυθρά αιμοσφαίρια, ολίγα πλακώδη κύτταρα, ολίγοι μικροοργανισμοί, αρκετό άμορφο ουρικό άλας, αρκετοί κρύσταλλοι ουρικού οξέος, καθώς και άλλοι κρύσταλλοι χροιάς μπλε (Εικόνα 2). Η ασθενής αποκλείει τις διατροφικές συνήθειες όσον αφορά στην ιδιαιτερότητα της χροιάς του δείγματος των ούρων, όπως και την εμφάνιση παρόμοιας περίπτωσης στο παρελθόν.

Η γενική ούρων επηρεάζεται από οποιαδήποτε αλλαγή στην ομοιόσταση του οργανισμού, καθώς και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως στην παρούσα περίπτωση από την χορήγηση ινδομεθακίνης. Πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα και τροφές μπορεί να επηρεάσουν τη χροιά των ούρων. Στην περίπτωση της ασθενούς, η ινδομεθακίνη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες σκεύασμα, η οποία χορηγείται για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της ημικρανίας, χρωματίζει τα ούρα σε μπλε απόχρωση, δίνοντας το στίγμα για περαιτέρω αναζήτηση των αιτιών αυτής της κατάστασης και τον αποκλεισμό άλλων. Ο χρωματισμός των ούρων διαρκεί όσο και η θεραπεία με την ινδομεθακίνη και αποκαθίσταται με τη λήξη της χορήγησης της.



Yet we can be certain of one thing: life on our planet is endangered. Our unthinking cult of progress together with the very advances in our struggle to exploit nature have turned into a

suicidal race. Just as we are beginning to unravel the secrets of the galaxies and the atomic particle, as we explore the enigmas of molecular biology and the origins of life, we have wounded the very heart of nature. This is why the most immediate and most urgent question is the survival of the environment, regardless of whatever forms of social and political organization nations may choose. The defence of nature is the defence of mankind.

Octavio Paz, Βραβείο Νόμπελ Λογοτεχνίας 1990

