



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**








**Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική και Ειδική
Νοσολογία**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΥ
B-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ HbA1c
ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ»**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΙΛΙΓΓΙΡΗΣ
Ιατρός Παθολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ 2020**

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΨΕΙΝ,  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ,  ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ,  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΨΙΟΣ ΤΗΣΔΕ,  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ,  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ,  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 14.06.2016

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 08.07.2017

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Αναπληρωτής Καθηγητής Κωνσταντίνος Μακρυλάκης (Επιβλέπον μέλος)

Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

Αναπληρωτής καθηγητής Αλέξανδρος Κόκκινος

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 15.05.2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα.

(ΝΟΜΟΣ 5343/1932, Άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	9
Βιογραφικές πληροφορίες.....	11
Γενικό Μέρος	
1. Εισαγωγή.....	16
1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	16
1.2. Κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ και προδιαβήτη.....	17
1.3. Πλεονεκτήματα της χρήσης της HbA1c ως διαγνωστικού και θεραπευτικού κριτηρίου για το ΣΔ.....	20
1.4. Μειονεκτήματα της χρήσης της HbA1c ως διαγνωστικού και θεραπευτικού κριτηρίου για το ΣΔ.....	21
2. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη HbA1c.....	24
2.1. Φυσιολογία – Βιοχημεία.....	24
2.2. Αιτίες της επικράτησης της HbA1c σε σχέση με τα λοιπά κλάσματα της HbA1.....	25
2.3. Ιστορικά στοιχεία.....	27
2.4. Μέθοδοι εργαστηριακού προσδιορισμού της HbA1c.....	29
2.5. Πώς ορίζεται το «σημαντικό» σφάλμα στον προσδιορισμό της HbA1c?.....	32
2.6. Εναλλακτικές μέθοδοι παρακολούθησης της μακροπρόθεσμης γλυκαιμίας.....	32
2.6.1. Μέθοδοι μη βασιζόμενες στην πρωτεϊνική γλυκοζυλίωση.....	32
2.6.2. Μέθοδοι βασιζόμενες στην πρωτεϊνική γλυκοζυλίωση.....	34
2.7. Χάσμα γλυκοζυλίωσης (Glycation Gap) και Δείκτης Γλυκοζυλίωσης (Glycation Index).....	36
3. Οι θαλασσαιμίες.....	38
3.1. Παθοφυσιολογία των θαλασσαιμικών συνδρόμων.....	38
3.2. Γενετικό υπόβαθρο της β-θαλασσαιμίας.....	40
3.3. Επιδημιολογία της β-θαλασσαιμίας.....	41
3.4. Κλινικοί φαινότυποι θαλασσαιμίας.....	42
3.5. Φαινοτυπική έκφραση των θαλασσαιμιών αναλόγως του υποκειμένου γενετικού υποβάθρου.....	43
3.5.1. α-θαλασσαιμία.....	43
3.5.2. β-θαλασσαιμία.....	44
3.6. Ετερόζυγος β-θαλασσαιμία.....	44
3.6.1. Γενικά στοιχεία.....	44
3.6.2. Διάγνωση της εβΜΑ.....	45
4. Ετερόζυγος β-μεσογειακή αναιμία και HbA1c.....	46
4.1. Βραχεία ανασκόπηση της δημοσιευμένης βιβλιογραφίας.....	48
Ειδικό Μέρος	
Σκοπός της διατριβής.....	51
1. Υλικό και μέθοδοι.....	51
2.1. Μελέτη 1: άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη.....	51
2.2. Μελέτη 2: άτομα με σακχαρώδη διαβήτη.....	52
2.3. Διαδικασίες μελέτης.....	53
2.4. Διάγνωση της εβΜΑ.....	54
2.5. Μέτρηση της HbA1c.....	54
2.6. Λοιπές μετρήσεις.....	55

2.7.	Στατιστική ανάλυση.....	55
3.	Αποτελέσματα.....	56
3.1.	Αποτελέσματα Μελέτης 1 – Άτομα χωρίς ΣΔ.....	56
3.1.1.	Πληθυσμός της μελέτης.....	56
3.1.2.	HbA1c, φρουκτοζαμίνη και λοιπές εργαστηριακές παράμετροι.....	57
3.1.3.	Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αναιμία και HbA1c.....	58
3.1.4.	Συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με την παρουσία εβΜΑ και άλλες παραμέτρους.....	61
3.1.5.	HbA1c, ερυθροκυτταρικοί δείκτες και λοιπές παράμετροι.....	64
3.2.	Αποτελέσματα Μελέτης 2 – Άτομα με ΣΔ.....	67
3.2.1.	Πληθυσμός της μελέτης.....	67
3.2.2.	Σύγκριση εργαστηριακών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων.....	69
3.2.3.	Συσχέτιση μεταξύ των μέτρων εκτίμησης της γλυκαιμίας	70
3.2.4.	Συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με την παρουσία εβΜΑ και άλλες παραμέτρους.....	72
3.2.5.	Υπολογισμός του χάσματος γλυκοζυλίωσης (Glycation Gap - GG) και σχετιζόμενες παράμετροι.....	75
4.	Συζήτηση	77
4.1.	Σύνοψη των ευρημάτων.....	77
4.2.	Συζήτη των ευρημάτων της 1 ^{ης} μελέτης.....	78
4.2.1.	Χαρακτηριστικά των υπό εξέταση πληθυσμών χωρίς ΣΔ.....	78
4.2.2.	εβΜΑ, Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και HbA1c.....	79
4.2.3.	Συσχέτιση της HbA1c με παραμέτρους της γενικής εξέτασης αίματος.....	80
4.3.	Συζήτη των ευρημάτων της 2 ^{ης} μελέτης.....	82
4.3.1.	Χαρακτηριστικά των υπό εξέταση πληθυσμών με ΣΔ.....	82
4.3.2.	Συσχέτιση μεταξύ των εξετασθεισών γλυκαιμικών παραμέτρων.....	82
4.3.3.	Επίδραση της εβΜΑ και λοιπών παραμέτρων επί του χάσματος γλυκοζυλίωσης.....	83
5.	Συμπεράσματα.....	85
6.	Περίληψη.....	86
7.	Abstract.....	87
	Βιβλιογραφία.....	89

Στους γονείς μου

Στην αδερφή μου

Στην Έλσα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Διαβητολογικό Εργαστήριο «Νικόλαος Κατσιλάμπρος» της Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα προτού ολοκληρωθεί η εκπόνηση της Διδακτορικής αυτής Διατριβής να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς:

- Τον αναπληρωτή Καθηγητή κο Κωνσταντίνο Μακρυλάκη για την εμπιστοσύνη, την επίβλεψη, τις πολύτιμες κατευθύνσεις και την ενθάρρυνση της πρωτοβουλίας μου τόσο στα πλαίσια της διατριβής αυτής όσο και της ευρύτερης προσπάθειάς μου.
- Τον Καθηγητή κο Νικόλαο Τεντολούρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντας μου κλινικά κι ερευνητικά καθήκοντα ακαδημαϊκού υποτρόφου, τις πολύτιμες ευκαιρίες, τον πλούτο των γνώσεων και των εφοδίων που του χρωστώ.
- Τον Καθηγητή και Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Α΄ΠΠΚ κο Πέτρο Σφηκάκη για την παρουσία του και την ευόδωση αυτής της προσπάθειας τόσο στα πλαίσια της περιόδου της ειδικότητας μου όσο και σε αυτά της δραστηριότητας μου ως ακαδημαϊκού υποτρόφου.
- Τον αναπληρωτή καθηγητή κο Αλέξανδρο Κόκκινο για τα κλινικά κι ερευνητικά εφόδια που μου παρείχε στους τομείς της παθολογίας, του σακχαρώδους διαβήτη και ιδιαιτέρως της ενδοκρινολογίας του γαστρεντρικού σωλήνα.
- Ιδιαιτέρως θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπο του Διευθυντή Ε.Σ.Υ. Στάυρου Λιάτη, όχι μόνο για τη σύλληψη του συνόλου της ιδέας που οδήγησε στην πραγμάτωση αυτής της διατριβής αλλά για το ότι σε αυτόν οφείλω εξ αρχής την ενασχόληση μου με την κλινική έρευνα και την παραμονή μου στην ειδικότητα της εσωτερικής παθολογίας.

- Την αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κα Μίνα Ψυχογιού γιατί τη μετάδοση διαχρονικής γνώσης και το παράδειγμα πώς είναι να είσαι κλινικός γιατρός και συνάνθρωπος.
- Όλο το έμψυχο δυναμικό του διαβητολογικού εργαστηρίου της Α'ΠΠΚ και ιδιαίτερος (με αλφαβητική σειρά) τους Ιωάννα, Ιωάννα, Κατερίνα, Ράνια, Τάσο γιατί στους κόλπους της ομάδας μας είχα την τύχη να βρω όχι μόνο τους καλύτερους συναδέλφους-συνεργάτες που θα μπορούσε να ευχηθεί κανείς αλλά διαχρονικούς φίλους.
- Τους υπέροχους φίλους μου.
- Τους θείους μου Λευτέρη και Χριστίνα Τσιλιγγίρη στο παράδειγμα των οποίων οφείλω εξαρχής την ενασχόληση με την ιατρική.
- Εσχάτως κι εξόχως τους γονείς μου, Παναγιώτη και Φωτεινή, για τόσα πολλά και πολυποίκιλα που δε χωρούν στις παρούσες σελίδες.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ιούνιος 2020

Προσωπικά στοιχεία

Ημερομηνία γέννησης: 18/08/1985

Τόπος Γέννησης: Ρέντιγκ, Μ Βρετανίας

Ηλεκτρονική διεύθυνση: tsilingirisd@gmail.com

Εκπαίδευση

[Απρ2018-Νοέ2019] Ακαδημαϊκός υπότροφος στο διαβητολογικό κέντρο της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο ΓΝ Λαϊκό (επιστημονικός υπεύθυνος: Νικόλαος Τεντολούρης, Καθηγητής Παθολογίας ΕΚΠΑ Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική)
[Ιουλ2017-Μαρ2018] Επιστημονικός συνεργάτης Διαβητολογικού Εργαστηρίου Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής, ΓΝ "Λαϊκό"

[Ιουλ2017] Τίτλος ειδικότητας Εσωτερικής Παθολογίας

[Οκτ2012-Νοε2017] Ειδικότητα στην Εσωτερική Παθολογία, στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Γ.Ν. «Λαϊκό»

[Ιουν2016] Έναρξη εκπόνησης διδακτορικής διατριβής με τίτλο «Επίδραση της ετεροζύγου β-Μεσογειακής Αναιμίας στα επίπεδα της HbA1c σε ασθενείς με και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη». Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Κωνσταντίνος Μακρυλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ

[2003-2009] Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α) με βαθμό «Άριστα» 8.84/10

[1997-2003] Πειραματικό Ενιαίο Λύκειο Ευαγγελικής Σχολής Σμύρνης, αποφοίτηση με βαθμό «Άριστα»

Διακρίσεις-Υποτροφίες

[Μαρ2020] 2ο βραβείο προφορικής ανακοίνωσης στο 18^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο για την εργασία «Βραχυπρόθεσμες μεταβολικές επιδράσεις της πρωινής διαλειμματικής νηστείας σε σύγκριση με 2 συνήθη πρωινά γεύματα μεταξύ νορμοβαρών ατόμων»

Δ. Τσιλιγγίρης, Α. Τεντολούρης, Ιωάννα Ελευθεριάδου, Ιωάννα Αναστασίου, Ουρανία Κώστα, Χ. Δημοσθενόπουλος, Ν. Τεντολούρης

[Φεβ2020] 2^ο βραβείο προφορικής ανακοίνωσης στο 14^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Παχυσαρκίας για την εργασία «Οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις της γαστρικής παράκαμψης κατά Roux-en-Y και της επιμήκους γαστρεκτομής στο σωματικό βάρος, τη γλυκαιμία, και το λιπιδαιμικό προφίλ: δεκαετής εμπειρία»

Δ. Τσιλιγγίρης, Σ. Σιμάτη, Γ. Αργυρακοπούλου, Α. Μεροπούλη, Ν. Τεντολούρης, Ν. Κατσιλάμπρος, Α. Αλεξάνδρου, Α. Κόκκινος

[Νοε2007] Βραβείο του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για το ακαδημαϊκό έτος 2004-05 (Πρώτος στην κατάταξη βαθμολογίας του ακαδημαϊκού έτους)

[Οκτ2007] Τιμητική υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για το ακαδημαϊκό έτος 2004-05

[Ιαν2006] Τιμητική υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για το ακαδημαϊκό έτος 2003-04

Εργασιακή εμπειρία

[Απρ2018-Νοε2019] Ακαδημαϊκός υπότροφος στο διαβητολογικό κέντρο της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο ΓΝ Λαϊκό (επιστημονικός υπεύθυνος:

Νικόλαος Τεντολούρης, Καθηγητής Παθολογίας ΕΚΠΑ Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική)

[Σεπ2017-Μαρ2018] Επιστημονικός συνεργάτης Διαβητολογικού Κέντρου Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γ.Ν.Α. «Λαϊκό»

[Οκτ2012-Νοε2017] Ειδικότητα στην Εσωτερική Παθολογία, στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Γ.Ν.Α. «Λαϊκό»

[Φεβ2012-Οκτ2012] Εργασία στη γενική κλινική «Πειραϊκό Θεραπευτήριο» σε επίπεδο κλινικών και εξωτερικών ιατρείων.

[Δεκ2010-Δεκ2011] *Υπηρεσία Υπαίθρου*

[Μαρ2011-Δεκ2011] Αγροτικός ιατρός στο Κέντρο Υγείας Λεωνιδίου Αρκαδίας

[Δεκ2010-Μαρ2011] Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γ.Π. Νοσοκομείο Τριπόλεως "Η Ευαγγελίστρια"

[Νοε2009-Αυγ2010] *Στρατιωτική Θητεία*

[Ιαν2010-Απρ2010] Οπλίτης ιατρός στο 618 Μ/Κ ΤΠ, υπεύθυνος αναρρωτηρίου στο ΣΤ.ΕΠ. φρουράς Πλάτης Έβρου

[Απρ2010-Αυγ2010] Οπλίτης ιατρός στο Τμήμα Υγειονομικής Υποστήριξης της Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων

[Ιουλ2008] Κλινική άσκηση στο καρδιολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Santa Anna στο Brno της Τσεχίας στα πλαίσια ανταλλαγής του προγράμματος IFMSA

[Σεπτ2005] Κλινική άσκηση στο καρδιολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Debrecen της Ουγγαρίας στα πλαίσια ανταλλαγής του προγράμματος IFMSA

Ερευνητικό έργο

Δημοσιεύσεις

1. The fight against obesity escalates: new drugs on the horizon and metabolic implications
Tsilingiris D, Liatis S, Dalamanga M, Kokkinos A.
Curr Obes Rep. 2020. [In press]
2. Metabolic regulation of activins in healthy individuals and in obese patients undergoing bariatric surgery
Perakakis N, Kokkinos A, Peradze N, Tentolouris N, Ghaly W, **Tsilingiris D**, Alexandrou A, Mantzoros CS.
Diabetes Metab Res Rev. 2020. doi: 10.1002/dmrr.3297.
3. Association of circulating Osteopontin levels with lower extremity arterial disease in subjects with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional observational study.
Ioanna Eleftheriadou, **Dimitrios Tsilingiris**, Anastasios Tentolouris, Iordanis Mourouzis, Pinelopi Grigoropoulou, Christos Kapelios, Constantinos Pantos, Konstantinos Makrilakis, Nikolaos Tentolouris.
Int J Low Extrem Wounds. 2020. doi: 10.1177/1534734619898097
4. Carbohydrate restriction in the morning increases weight loss effect of a hypocaloric Mediterranean type diet: a randomized, parallel group dietary intervention in overweight and obese subjects.
Dimitrios Dellis, **Dimitrios Tsilingiris**, Ioanna Eleftheriadou, Anastasios Tentolouris, Pavlos P. Sfikakis Jr, Georgios Dellis, Menia Karanasiou, Aikaterini Meimari, Charilaos Dimosthenopoulos, Spyros Lazarou, Nikolaos Tentolouris.
Nutrition. 2020 Mar;71:110578. doi: 10.1016/j.nut.2019.110578.
5. Remission of Type 2 Diabetes Mellitus after Bariatric Surgery: Fact or Fiction?
Tsilingiris D, Koliaki C, Kokkinos A.
Int J Environ Res Public Health. 2019 Aug 30;16(17). pii: E3171. doi: 10.3390/ijerph16173171
6. Will medications that mimic gut hormones or target their receptors eventually replace bariatric surgery?
Kokkinos A, **Tsilingiris D**, le Roux CW, Rubino F, Mantzoros CS.

- Metabolism. 2019 Aug 11; 100:153960. doi: 10.1016/j.metabol.2019.153960.
7. Effect of heterozygous beta thalassemia on HbA1c levels in individuals without diabetes mellitus: A cross sectional study.
Tsilingiris D, Makrilakis K, Voskaridou E, Pagkrati S, Dalamaga M, Liatis S.
Clin Chim Acta. 2019 Jul; 494:132-137. doi: 10.1016/j.cca.2019.03.1611.
 8. Endothelium as a Therapeutic Target in Diabetes Mellitus: From Basic Mechanisms to Clinical Practice.
Tentolouris A, Eleftheriadou I, Tzeravini E, **Tsilingiris D**, Paschou SA, Siasos G, Tentolouris N.
Curr Med Chem. 2019 Jan 19. doi: 10.2174/0929867326666190119154152.
 9. The association of diabetic microvascular and macrovascular disease with cutaneous circulation in patients with type 2 diabetes mellitus.
Eleftheriadou I, Tentolouris A, Grigoropoulou P, **Tsilingiris D**, Anastasiou I, Kokkinos A, Perrea D, Katsilambros N, Tentolouris N.
J Diabetes Complications. 2019 Feb;33(2):165-170. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.10.008.
 10. Follistatins in glucose regulation in healthy and obese individuals.
Perakakis N, Kokkinos A, Peradze N, Tentolouris N, Ghaly W, **Tsilingiris D**, Alexandrou A, Mantzoros CS.
Diabetes Obes Metab. 2019 Mar;21(3):683-690. doi: 10.1111/dom.13572.
 11. Effect of 12-month intervention with low-dose atorvastatin on pulse wave velocity in subjects with type 2 diabetes and dyslipidaemia.
Grigoropoulou P, Tentolouris A, Eleftheriadou I, **Tsilingiris D**, Vlachopoulos C, Sykara M, Tentolouris N.
Diab Vasc Dis Res. 2019 Jan;16(1):38-46. doi: 10.1177/1479164118805320.
 12. Plasma Irisin Levels in Subjects with Type 1 Diabetes: Comparison with Healthy Controls.
Tentolouris A, Eleftheriadou I, **Tsilingiris D**, Anastasiou IA, Kosta OA, Mourouzis I, Kokkinos A, Pantos C, Katsilambros N, Tentolouris N.
Horm Metab Res. 2018 Nov;50(11):803-810. doi: 10.1055/a-0748-6170.
 13. Meningitis-Retention Syndrome.
Basoulis D, Mylona M, Toskas P, **Tsilingiris D**, Fytili C.
Int Neurourol J. 2015 Sep;19(3):207-9. doi: 10.5213/inj.2015.19.3.207.
 14. Impact of waist circumference on cardiac phenotype in hypertensives according to gender.
Tsioufis CP, Tsiachris DL, Selima MN, Dimitriadis KS, Thomopoulos CG, **Tsiliggiris DC**, Gennadi AS, Syrseloudis DC, Stefanadi ES, Toutouzas KP, Kallikazaros IE, Stefanadis Cl.
Obesity (Silver Spring). 2009 Jan;17(1):177-82. doi: 10.1038/oby.2008.462.

Προφορικές ανακοινώσεις

1. Ψευδοσηπτική αρθρίτιδα: Μια διαφοροδιαγνωστική πρόκληση
Χ. Φυτιλή, Μ. Μυλωνά, Δ. Τσιλιγγίρης, Μ. Πολυζώης, Α. Τόσκας
41ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Αθήνα 10-13 Ιουνίου 2015
2. Ρήξη ανευρύσματος σπληνικής αρτηρίας
Δ. Μπασούλης, Δ. Τσιλιγγίρης, Ν. Πατελης, Α. Αλεξάνδρου, Χ. Κλωνάρης
41ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Αθήνα 10-13 Ιουνίου 2015

Αναρτημένες ανακοινώσεις

Σε εθνικά συνέδρια

1. Ένα σπάνιο αίτιο νεφρικής ανεπάρκειας
Χ. Φυτιλή, Δ. Μπασούλης, Δ. Τσιλιγγίρης, Σ. Καλατζή
41ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Αθήνα 10-13 Ιουνίου 2015
2. Κρυπτοκοκκική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα ως πρώτη κλινική εκδήλωση σε ασθενή με Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
Δ. Τσιλιγγίρης, Χ. Λιάσκος, Δ. Μπασούλης, Μ. Ψυχογιού
15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα 6-8 Μαρτίου 2015

Σε διεθνή συνέδρια

1. Early left ventricular systolic dysfunction in asymptomatic patients with type 1 diabetes is frequent and associated with increased adiposity.
2. CJ Kapelios, M. Bonou, A. Bampagianni, S. Driva, I. Eleftheriadou, V. Lambadiari, K. Masoura, E. Papachristoforou, A. Tentolouris, D. Tsilingiris, K. Makrilakis, N. Katsilampros, J. Barbetseas, S. Liatis. 55th Annual Meeting of the European Association of the Study of Diabetes (EASD). Barcelona, Spain 16-20 September 2019
3. Association of HbA_{1c} values with hemopoietic parameters in a selected population of healthy individuals
Makrilakis K, Tsilingiris D, Voskaridou E, Pagkrati S, Liatis S.
53rd European Association for the Study of Diabetes (EASD) annual meeting, Lisbon 11-15 September 2016
4. Progressive multifocal leukoencephalopathy – IRIS in a patient with HIV infection
Kalantzi S., Basoulis D., Tsilingiris D., Psychogiou M.
9th International Congress of Internal Medicine, Athens 9-11 March 2017
5. Effect of beta thalassemia trait on hemoglobin A1c levels in individuals without diabetes mellitus
Makrilakis K, Tsilingiris D., Voskaridou E, Pagkrati S, Liatis S.
52nd European Association for the Study of Diabetes (EASD) annual meeting, Munich, 12-16 September 2016
6. Recurrent episodes of life-threatening vasodilatory shock following unintentional intoxication with calcium channel blocker, amlodipine.
C. Kapelios, G. Karamanakis, S. Liatis, M. Polizois, M. Sarafadi, D. Basoulis, D. Tsilingiris, C. Fytili, I. Papoutsis, A. Kokkinos European Heart Failure Congress, Florence 21-25 May 2016
7. Late-onset tenofovir-induced acquired Fanconi's syndrome in a chronic hepatitis B monoinfected individual
Tsilingiris D., Basoulis D., Liaskos C., Kapelios C., Psychogiou M.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
8. Roux-en-Y gastric bypass is superior to sleeve gastrectomy in improving postprandial glycemia and lipid profile
Liaskos C., Sergentanis T., Psaltopoulou T., Fytili C., Tsilingiris D., Alexiadou K., et al.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
9. Wernicke-Korsakoff syndrome in a non-alcoholic patient
Basoulis D., Tsilingiris D., Fytili C., Kapelios C., Liaskos C., Psychogiou M.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
10. Ewing's sarcoma in a department of internal medicine
Kouveletsou M., Basoulis D., Tsilingiris D., Polyzos K., Diakoumopoulou E., Daikos G.L.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
11. Mediterranean Kaposi sarcoma related hemophagocytic lymphohistiocytosis
Basoulis D., Tsilingiris D., Fytili C.D., Kapelios C., Liaskos C., Psychogiou M
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
12. It's not only about opportunistic infections
Fytili C., Tsilingiris D., Karamanakis G., Petsa P., Psychogiou M.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
13. Peritoneal tuberculosis in a Sudanese non-HIV immigrant patient
Polyzos K., Basoulis D., Mylona M., Fytili C., Tsilingiris D., Liaskos C., Toskas P., Petsa P., Arvanitis M., Psychogiou M.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
14. Case report: infective endocarditis of an implantable cardiac electronic device caused by *Enterococcus durans*
Liaskos C., Tsilingiris D., Basoulis D., Fytili C., Psychogiou M., Moysakakis I., Daikos G.L.

- 14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
15. An unusual case of infected aneurysm
Basoulis D., Tsilingiris D., Fytili C., Psychogiou M., Doulaptsis M., Klonaris C.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
16. Rhabdomyolysis and multiple serous effusions due to hypothyroidism
Kouveletsou M., Fytili C., Tsilingiris D., Mylona M., Toskas P., Toskas A.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
17. Comparative evaluation of assessment methods of dry skin of the feet in diabetic patients and correlation with peripheral neuropathy
Tsokos N., Liaskos C., Siami E., Tsilingiris D., Fytili C., Kokkinos A., Makrilakis K., Sfikakis P., Katsilambros N., Tentolouris N.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
18. Disseminated sarcoidosis: a diagnosis not to be missed
Fytili C., Tsilingiris D., Kapelios C., Lambrou P., Taktikou E.
14th European Congress of Internal Medicine, Moscow 14–16 October 2015
19. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension – an elusive clinical entity
D. Basoulis, C. Fytili, D. Tsilingiris, A. Traulos, A. Toskas
European and Swiss Congress of Internal Medicine, Geneva 14-16 May 2014
20. Meningitis – Retention Syndrome
D. Basoulis, M. Mylona, P. Toskas, D. Tsilingiris, A. Toskas
European and Swiss Congress of Internal Medicine, Geneva 14-16 May 2014

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Άριστο επίπεδο, πτυχία Cambridge & Michigan Proficiency (2001)

Γερμανικά: C1 Stufe auf Fachsprachenkenntniss (Ärzttekammer Nordbaden)

Göthe B2 Zertifikat

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Υπό τον όρο «σακχαρώδης διαβήτης» (ΣΔ) περιλαμβάνονται μία ποικιλία μεταβολικών διαταραχών κοινό γνώρισμα των οποίων αποτελεί το αυξημένο επίπεδο γλυκόζης στο πλάσμα (υπεργλυκαιμία), οι οποίες συσχετίζονται με την ανάπτυξη βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων επιπλοκών. Με βάση την παθογένεια και τις συνθήκες ανάπτυξης της υπεργλυκαιμίας διακρίνονται οι ακόλουθοι τύποι ΣΔ:

- 1) ΣΔ τύπου 1 (ΣΔτ1): παλαιότερα γνωστός ως «ινσουλινοεξαρτώμενος» ή «νεανικός» διαβήτης, οφείλεται στην ενωρίς ανάπτυξη ενός ποσοτικού ελλείμματος ινσουλίνης που κατά κανόνα απορρέει από την απώλεια της εκκριτικής μάζας των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων του παγκρέατος μέσω αυτοάνοσης καταστροφής τους.
- 2) ΣΔ τύπου 2 (ΣΔτ2): παλαιότερα γνωστός ως «μη-ινσουλινοεξαρτώμενος» διαβήτης, κατά τον οποίον η εξαρχής παρατηρούμενη διαταραχή είναι η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης σε ιστικό επίπεδο, με την υπεργλυκαιμία να εμφανίζεται ως απότοκος της ανάπτυξης ενός σχετικού ή απολύτου ελλείμματος ινσουλίνης.
- 3) ΣΔ της κύησης: εμφανίζεται στην περίοδο της κύησης σε θήλεις χωρίς προηγούμενο ιστορικό ΣΔ και συχνά υποστρέφει μετά τον τοκετό.
- 4) Λοιπές μορφές διαβήτη (πχ σχετιζόμενες με παθήσεις τις εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, λήψη φαρμάκων, μονογονιδιακός διαβήτης κτλ)¹.

1.1. Επιδημιολογικά Στοιχεία

Ο ΣΔτ2 απαρτίζει την πλειονότητα των περιπτώσεων ΣΔ (~85%). Η τάση για γήρανση του παγκόσμιου πληθυσμού, η ανησυχητική συχνότητα ανεπαρκούς φυσικής δραστηριότητας σε όλες τις ηλικιακές ομάδες καθώς και η αύξηση του επιπολασμού παχυσαρκίας σε υπό ανάπτυξη και ανεπτυγμένα κράτη² συνιστούν βασικές αιτίες για το διπλασιασμό του διεθνούς επιπολασμού του ΣΔτ2 μεταξύ των ετών 1980 - 2014 (από 4.7% σε 8.5%) και της αύξησης του απολύτου αριθμού των ατόμων με ΣΔτ2 από 108 σε 422 εκατομμύρια

παγκοσμίως³. Στον αντίποδα, η επίπτωση του ΣΔτ1 ποικίλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, κυμαινόμενη από 0.1 ανά 100.000/έτος σε περιοχές της Βενεζουέλας και της Κίνας έως 40.9 ανά 100.000/έτος στη Φινλανδία, με τάση για ετήσια άυξηση κατά 3% παγκοσμίως⁴ και 3.9% στην Ευρώπη⁵. Οι αιτίες αυτής της αύξησης μεταξύ άλλων θεωρείται ότι πιθανώς σχετίζονται με τη βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης, που οδηγούν σε μειωμένη έκθεση σε παθογόνα και τη συνακόλουθη ευόδωση φαινομένων αυτοανοσίας⁶.

Για τον ελλαδικό χώρο, τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από μικρής κλίμακας μελέτες σε γεωγραφικά περιορισμένους πληθυσμούς. Σε μελέτη εθνικού βεληνεκούς από τους Τεντολούρη Ν. και συνεργάτες, με δεδομένα που συνελλέχθησαν κατά την περίοδο 1996-1999, ο επιπολασμός ΣΔ μεταξύ των ενηλίκων κατά δήλωση των συμμετεχόντων υπολογίστηκε σε 0.17% και 4.11% για τον ΣΔτ1 και ΣΔτ2, αντίστοιχα⁷. Οι Λιάτης Σ. και συνεργάτες, αξιοποιώντας δεδομένα του ελληνικού εθνικού συστήματος ηλεκτρονικής συνταγογράφησης από το διάστημα 2014-2015 υπολόγισαν το συνολικό επιπολασμό του (συνταγογραφούμενης αγωγής) ΣΔτ1 σε 0.24% (24.535 άτομα) και του ΣΔτ2 σε 7% (720.764 άτομα)⁸.

Επιπλέον, ο επιπολασμός του μη διαγνωσθέντος ΣΔτ2 σε παγκόσμια κλίμακα είναι αξιοσημείωτος, φτάνοντας το 1/5 του πληθυσμού ατόμων μεταξύ 60-80 ετών στο Ηνωμένο Βασίλειο⁹, το ¼ των περιπτώσεων ΣΔτ2 (και περίπου το ήμισυ των περιπτώσεων μεταξύ Ασιατών και Ισπανοφώνων πληθυσμών) στις ΗΠΑ¹⁰ και σημαντικά ποσοστά επί του πληθυσμού στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου¹¹, στις χώρες της Αφρικής¹² και το Πακιστάν¹³. Οι περιπτώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για σημαντικό τμήμα της σχετιζόμενης με ΣΔ νοσηρότητας, εφόσον η διάγνωση γίνεται συχνά ως απότοκος πρόδηλων κλινικών εκδηλώσεων σχετιζόμενων με μακροχρόνιες επιπλοκές του ΣΔ¹⁴.

1.2. Κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ και προδιαβήτη

Ο υψηλότερος επιπολασμός του ΣΔτ2 σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες σε συνδυασμό και τα υπολογίσιμα ποσοστά των περιπτώσεων που διαλάβουν της διάγνωσης καθιστά αυτονόητη την αναγκαιότητα της παρουσίας αρκούντως ευαίσθητων κι

αξιόπιστων κριτηρίων διάγνωσης. Με δεδομένο ότι ο στόχος της πρόληψης και της θεραπείας του ΣΔ είναι πρωτίστως η πρόληψη των χρονίων επιπλοκών που τεκμηριωμένα σχετίζονται με την υπεργλυκαιμία, ιδανικά τα χρησιμοποιούμενα διαγνωστικά όρια θα πρέπει να καθορίζονται με βάση τις τιμές γλυκαιμίας που προλέγουν την ανάπτυξη των επιπλοκών αυτών παρά αυτά να τίθενται επί τη βάση «φυσιολογικών τιμών πληθυσμού», όπως συχνά εφαρμόζεται σε άλλες εργαστηριακές παραμέτρους.

Τον πρώτο σταθμό στη διαμόρφωση κριτηρίων διάγνωσης του ΣΔ αποτέλεσαν οι συστάσεις της Επιτροπής ειδικών για τη Διάγνωση και Ταξινόμηση του Σακαρώδους Διαβήτη το 1997. Γνώμονας για τις συστάσεις της επιτροπής υπήρξε η εστίαση στη σχέση των διαγνωστικών κριτηρίων με την πιθανότητα ανάπτυξης χρονίων επιπλοκών του ΣΔ, αξιοποιώντας δεδομένα από τρεις συγχρονικές επιδημιολογικές μελέτες (σε Αιγυπτιακό πληθυσμό, σε πληθυσμό Ινδιάνων Pima και από τους συμμετέχοντες του προγράμματος NHANES). Τα προτεινόμενα διαγνωστικά όρια για τις τιμές γλυκόζης πλάσματος ορίστηκαν ως αυτά ύπερθεν των οποίων παρατηρείτο γραμμικά αυξητική τάση της πιθανότητας ανάπτυξης διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας¹⁵.

Ένα εξίσου σημαντικό ορόσημο αποτέλεσε και η γνωμοδότηση διεθνούς επιτροπής ειδικοί για το ρόλο της μέτρησης της HbA1c στη διάγνωση του ΣΔ. Αντιπρόσωποι της αμερικανικής διαβητολογικής εταιρίας (ADA), της ευρωπαϊκής εταιρίας για τη μελέτη του ΣΔ (EASD) και της διεθνούς ομοσπονδίας του διαβήτη (IDF), επί τη βάση δεδομένων από προοπτικές μελέτες παρατήρησης¹⁶ και τις τυχαιοποιημένες DCCT για το ΣΔτ1¹⁷ και UKPDS για το ΣΔτ2¹⁸ που τεκμηριώνουν τη σχέση των επιπέδων της HbA1c με την πιθανότητα ανάπτυξης χρονίων επιπλοκών (ίδια αμφιβληστροειδοπάθειας), εισήγαγαν ως επιπλέον προτεινόμενο διαγνωστικό κριτήριο την ανεύρεση τιμής HbA1c $\geq 6.5\%$, εξαιρουμένου του ΣΔ κύησης¹⁹. Στις συστάσεις της η επιτροπή αναφερόταν σε μεθόδους προσδιορισμού της HbA1c «προτυποποιημένες και εναρμονισμένες με αυτές των μελετών DCCT/UKPDS» δηλαδή υπαγόμενες στο διεθνές πρόγραμμα προτυποποίησης της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (National Glycohemoglobin Standardisation Program – NGSP) μολονότι κάτι τέτοιο δε διατυπωνόταν μονοσήμαντα στο αντίστοιχο κείμενο¹⁹. Ακολούθως ή προσθήκη αυτή έγινε αποδεκτή τόσο από την ADA το 2010²⁰ όσο και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) το 2011²¹.

Τα ισχύοντα κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ όπως διατυπώνονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της ADA είναι τα κάτωθι¹:

Γλυκόζη πλάσματος νηστείας (>8 ώρες) ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L).*
Γλυκόζη πλάσματος 2 ωρών ≥ 200 mg/dl (≥ 11.1 mmol/L) κατά την τυποποιημένη δοκιμασία από του στόματος ανοχής 75 γρ. άνυδρης γλυκόζης.*
Γλυκόζη πλάσματος ≥ 200 mg/dl (≥ 11.1 mmol/L) σε τυχαία χρονική στιγμή, σε άτομο με συμπτωματολογία ενδεικτική υπεργλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμική κρίση
Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) $\geq 6.5\%$ (≥ 48 mmol/mol).*#

Πίνακας 1: Κριτήρια για τη διάγνωση του Σακχαρώδους Διαβήτη κατά την ADA

*Απαιτούνται δύο παθολογικές μετρήσεις στο ίδιο ή σε δεύτερο δείγμα πλάσματος/ολικού αίματος.

#Απαραίτητο είναι η μέτρηση να έχει διενεργηθεί με μέθοδο τυποποιημένη κατά NGSP.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ADA, ο ΣΔτ1 οφείλει να διαγιγνώσκεται μόνον επί τη βάση εκπλήρωσης των κριτηρίων που αφορούν τη γλυκόζη πλάσματος¹.

Τα κριτήρια αυτά υιοθετούνται επιπλέον από τον ΠΟΥ²¹ και από την βρετανική εταιρία για το Σακχαρώδη Διαβήτη «Diabetes UK»²².

Από τις οδηγίες τους ίδιου ADA προτείνονται επιπλέον κριτήρια για το χαρακτηρισμό του προδιαβήτη¹. Ο προδιαβήτης αποτελεί κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τιμές γλυκόζης υπερθεν του φυσιολογικού χωρίς να φτάνουν σε επίπεδα διαγνωστικά του ΣΔ. Άτομα με προδιαβήτη χαρακτηρίζονται από υψηλό κίνδυνο μετέπειτα εξέλιξης σε ΣΔ και δύνανται να ωφεληθούν από στρατηγικές προσαρμογής του τρόπου ζωής ή/και φαρμακοθεραπεία ως προς τη μείωση του κινδύνου αυτού²³. Ο ΠΟΥ και η EASD δεν έχουν προσώρας υιοθετήσει το χαρακτηρισμό του προδιαβήτη με βάση την HbA1c:

Γλυκόζη πλάσματος νηστείας (>8 ώρες) 100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/L) (IFG)
Γλυκόζη πλάσματος 2 ωρών 140-199 mg/dl (7.8-11.0 mmol/L) κατά την τυποποιημένη δοκιμασία από του στόματος ανοχής 75 γρ. άνυδρης γλυκόζης (IGT)
Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) 5.7-6.4% (39-47 mmol/mol).

Πίνακας 2: Κριτήρια για τον χαρακτηρισμό του προδιαβήτη κατά την ADA
IFG: Διαταραχή γλυκόζης νηστείας, IGT: Διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός της απουσίας από τα διαγνωστικά κριτήρια και τους θεραπευτικούς στόχους του ΣΔ των λοιπών γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών (Γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη και φρουκτοζαμίνη)

1.3. Πλεονεκτήματα της χρήσης της HbA1c ως διαγνωστικού και θεραπευτικού κριτηρίου για το ΣΔ

Σε σχέση με τη μέτρηση των τιμών της γλυκόζης πλάσματος, στις οποίες βασίζονται τα λοιπά κριτήρια διάγνωσης και θεραπευτικής παρακολούθησης του ΣΔ, ο προσδιορισμός της HbA1c φέρει σημαντικά πλεονεκτήματα.

Από τη σκοπιά της εφαρμοσμένης κλινικής καθ' ημέρα πράξης, η μέτρησή της δεν απαιτεί συνθήκες νηστείας πολλώ δε μάλλον την προετοιμασία μιας από του στόματος καμπύλης ανοχής γλυκόζης, επιτρέποντας την ευχερή έως και απρογραμματίστη μέτρησή της «παρά την εξεταστική κλίνη» (point-of-care testing). Με την ανάπτυξη αναλυτών οι οποίοι χορηγούν αποτέλεσμα προσδιορισμού της HbA1c σε δείγμα τριχοειδικού ή φλεβικού αίματος εντός 3-5 λεπτών²⁴⁻²⁶ καθίσταται ευχερής μια ευρείας κλιμακας διαλογή (screening) για τον ΣΔτ2 στα σημεία παροχής υπηρεσιών υγείας. Επιπλέον, ο ορισμός εξατομικευμένων θεραπευτικών στόχων για τον εκάστοτε πάσχοντα από ΣΔ επιτρέπει ταχείες και αποτελεσματικές επισκέψεις παρακολούθησης χωρίς την ανάγκη κοπιώδους ανασκόπησης μακροσκελών και επιρρεπών σε σφάλματα καταγραφής και ανάγνωσης αρχείων μετρήσεων τριχοειδικής γλυκόζης.

Επιπλέον, ως βιολογική παράμετρος η HbA1c χαρακτηρίζεται από σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό προ-αναλυτικής σταθερότητας σε σχέση με τη γλυκόζη πλάσματος. Είναι αρκούτως σταθερή για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου²⁷ και για τουλάχιστον μια εβδομάδα μετά

από αποθήκευση στους 4°C²⁷⁻²⁹. Αντιθέτως, διαφοροποιήσεις στη συντήρηση, το χρόνο που μεσολαβεί από τη λήψη και τη μεταφορά βιολογικών δειγμάτων δύνανται να επηρεάσουν σημαντικά τον προσδιορισμό των μετρούμενων τιμών γλυκόζης³⁰, εφόσον για τιμές πλησίον των φυσιολογικών ορίων η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται κατά 5-8%/ώρα λόγω της γλυκόλυσης των ερυθροκυττάρων³¹.

Τέλος, σε αναλυτικό επίπεδο, ο εργαστηριακός προσδιορισμός της HbA1c χαρακτηρίζεται από σημαντικά μεγαλύτερη επαναληψιμότητα σε σχέση με αυτόν της γλυκόζης πλάσματος³² ενώ σημαντικά μικρότερη είναι η μεταβολητότητα των τιμών της από ημέρα σε μέρα στο ίδιο άτομο^{33,34}.

1.4. Μειονεκτήματα της χρήσης της HbA1c ως διαγνωστικού και θεραπευτικού κριτηρίου για το ΣΔ

Η τιμή της HbA1c μεταβάλλεται δυναμικά στο χρόνο με τρόπο απόλυτα εξαρτώμενο από τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης των προηγούμενων 3 μηνών. Σε καταστάσεις ταχύτατα μεταβαλλόμενης γλυκαιμίας όπως ενδεικτικά απαντώνται κατά την πρωτοδιάγνωση του ΣΔτ1 η χρήση της HbA1c ως διαγνωστικού κριτηρίου μπορεί να είναι παραπλανητική. Η αυτοάνοση καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων και η συνακόλουθη ραγδαία εγκατάσταση ινσουλινοπενίας και επιδεινούμενης υπεργλυκαιμίας δύνανται να οδηγήσει σε μη διαγνωστικά επίπεδα HbA1c παρά τις δραματικά αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης πλάσματος¹⁹. Δεδομένης της πρόδηλης κλινικής εικόνας και υπεργλυκαιμίας κατά την εμφάνιση του ΣΔτ1 το στοιχείο αυτό θα αποτελούσε κλινικό πρόβλημα, η χρήση της HbA1c ως κριτηρίου διάγνωσης του ΣΔτ1 αποθαρρύνεται από σημαντικό αριθμό διεθνών κι εθνικών διαβητολογικών εταιριών^{1,22,35}. Η σημασία των ανωτέρω συσχετισμών καθίσταται πλέον προφανής από το γεγονός ότι σε κανέναν από τους διαθέσιμους θεραπευτικούς αλγορίθμους για το ΣΔτ2 (ενδεικτικά αναφέρονται οι οδηγίες της ADA, της αμερικανικής ενδοκρινολογικής εταιρίας και της ΕΔΕ) δεν προτείνεται ο έλεγχος της τιμής της HbA1c ανα διαστήματα βραχύτερα των 3 μηνών κατά τη λήψη αποφάσεων στην έναρξη ή κλιμάκωση της αντιυπεργλυκαιμικής θεραπείας³⁶⁻³⁸.

Με την εξαίρεση των ανωτέρω ακραίων κλινικών σεναρίων, υπάρχουν συνθήκες υπό τις οποίες η αξιοπιστία της τιμής HbA1c ως δείκτη του μεσοπρόθεσμου γλυκαιμικού φορτίου παραβλάπτεται και συνεπώς η χρήση της για τη διάγνωση και θεραπευτική παρακολούθηση του ΣΔ αποθαρρύνεται. Οι συνθήκες αυτές υπαγορεύονται από την επίδραση παραμέτρων οι οποίες δύνανται να επηρεάσουν τον προσδιορισμό HbA1c παρεμβαλλόμενες στο ρυθμό ανακύκλωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, στη διαδικασία της γλυκοζυλίωσης ή σε αυτή καθαυτή την αντίδραση του εργαστηριακού προσδιορισμού της.

Καταστάσεις εμπλεκόμενες σε αναλυτικό σφάλμα στον προσδιορισμό της HbA1c
<p>Γενετικές ποιοτικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρινοπάθειες)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Αιμοσφαιρινοπάθεια S (HbS, δρεπανοκυτταρική αναιμία) • Αιμοσφαιρινοπάθεια C (HbC) • Αιμοσφαιρινοπάθεια D (HbD) • Αιμοσφαιρινοπάθεια E (HbE) • Λοιπές (Lepore, Constant Spring, Pisa, D-Punjab, Pylos, G-Philadelphia κ.α.)
<p>Περίσσεια φυσιολογικών αιμοσφαιρινών</p> <ul style="list-style-type: none"> • βδ-θαλασαιμία • Κληρονομική επιμονή της αιμοσφαιρίνης F λόγω μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου της γ-αιμοσφαιρινικής αλυσού • Θεραπεία με υδροξουρία
<p>Περίσσεια τροποποιημένων μορφών φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης (HbA)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Καρβαμυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (χρόνια νεφρική νόσος σταδίου 4-5^{39,40}, θεραπεία με υδροξουρία⁴¹) • Ακεταλδεΐδ-HbA (χρόνιος αλκοολισμός⁴²) • Ακυλ-HbA (λήψη υψηλών δόσεων σαλικυλικών⁴³) • Μεθαιμοσφαιρίνη (λήψη Δαψόνης⁴⁴)
<p>Άλλες καταστάσεις</p> <ul style="list-style-type: none"> • Υπερτριγλυκεριδαιμία^{45,46} • Υπερχολερυθριναιμία⁴⁷ • Κατάχρηση οπιοειδών⁴⁸

<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (χημικές μέθοδοι)⁴⁹
<p>Καταστάσεις συμβάλλουσες στη βιολογική μεταβλητότητα της HbA1c</p>
<p>Αυξημένος ρυθμός ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων⁵⁰</p> <ul style="list-style-type: none"> • Χρόνιες απώλειες αίματος (π.χ. εκ του γαστρεντερικού συστήματος) • Αιμολυτικές καταστάσεις (π.χ. ανεπάρκεια G6PD, θαλασσαιμίες, αιμοσφαιρινοπάθειες, κληρονομική σφαιροκυττάρωση, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, μικροαγγειοπαθητικές) • Υπερσπληνισμός • Θεραπεία με παράγωγα ερυθροποιητίνης • Λοιπά φάρμακα (σουλφοναμίδες, δαψόνη, αντιρετροϊκά) • Κύηση
<p>Μειωμένος ρυθμός ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων⁵⁰</p> <ul style="list-style-type: none"> • Σιδηροπενική αναιμία • Ένδεια βιταμίνης B12/φυλλικού οξέος • Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και απλασία του οστικού μυελού • Αναιμία χρόνιας νόσου • Ηλικία
<p>Καταστάσεις που επιδρούν στην αντίδραση γλυκοζυλίωσης</p> <ul style="list-style-type: none"> • Εξωγενής χορήγηση βιταμίνης C^{51,52} • Εξωγενής χορήγηση βιταμίνης E⁵² • Χρόνια λήψη σαλικυλικών σε μικρή δόση⁵³ • Αυξημένα επίπεδα μαλονδιαλδεϋδης (ένδεια σιδήρου, οξειδωτικό stress)⁵⁴ • Αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης⁴⁷ • Φυλή⁵⁵
<p>Λοιπές παράμετροι σχετιζόμενες με τη βιολογική μεταβλητότητα της HbA1c</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ενδοερυθροκυτταρικό pH⁵⁶ • Συγκέντρωση 2,3 -διφωσφογλυκερινικού οξέος στο ερυθροκύτταρο⁵⁶

Πίνακας 3: Κλινικές καταστάσεις σχετιζόμενες με βιολογικό ή αναλυτικό σφάλμα στο προσδιορισμό της HbA1c

2. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη HbA1c

2.1. Φυσιολογία – Βιοχημεία

Οι ανθρώπινες αιμοσφαιρίνες είναι τετραμερείς πρωτεΐνες αποτελούμενες από δύο ζεύγη σφαιρινικών αλυσίδων προσδένουσες έναν πυρρολικό δακτύλιο αίμης έκαστη. Στον αιματολογικώς φυσιολογικό ενήλικη η αιμοσφαιρίνη A (HbA) αποτελεί το σύνολο σχεδόν της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (97-98%). Το σφαιρινικό της κλάσμα απαρτίζεται από 2 α (2 κωδικεύοντα αλληλία στο χρωμόσωμα 16) και 2 β αλυσίδες (1 κωδικεύον αλληλία στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11, στην περιοχή του συμπλέγματος του γονιδίου της β-αλύσου που περιλαμβάνει επιπλέον τα γονίδια των αλυσίδων γ, δ και ε). Δευτερεύουσες αιμοσφαιρίνες στον ενήλικη αποτελούν η αιμοσφαιρίνη A2 (HbA2, 2 α και 2 δ αλυσί, 2-3% της συνολικής) και η αιμοσφαιρίνη F (HbF, 2α και 2 γ αλυσί, 0.5-1% της συνολικής).

Κατ' αντιστοιχία με μια σημαντική ποικιλία πρωτεϊνών του πλάσματος (αλβουμίνη, σφαιρίνες, απολιποπρωτεΐνες) κατά την έκθεσή της σε δεδομένες συγκεντρώσεις γλυκόζης η αιμοσφαιρίνη δύναται να υποστεί μη-αντιστρεπτή γλυκοζυλίωση σε αμινοτελικά αμινοξικά κατάλοιπά της. Η αντίδραση γλυκοζυλίωσης ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης (επισυμβαίνει μη-ενζυμικά και με ρυθμό ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης γλυκόζης), αποτελεί κατ' εξοχήν παράδειγμα της αντίδρασης συμπύκνωσης Maillard⁵⁷ στα βιολογικά συστήματα και ακολουθεί πανομοιότυπη πορεία με το εγγύς τμήμα του σχηματισμού των προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs). Στην αντίδραση αναγνωρίζονται 2 βασικά στάδια⁵⁸:

- 1) Η καρβονυλ-ομάδα της γλυκόζης αντιδρά αντιστρεπτά με την αμινομάδα ενός αμινοξέος με προϊόντα της αντίδρασης 1 μόριο ύδατος και μία βάση του Schiff.
- 2) Η προκύπτουσα βάση του Schiff σε δεδομένο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον υφίσταται ισομερισμό προς το σχηματισμό μιας σταθερής κετοαμίνης (μετασχηματισμός Amadori).

Στην περίπτωση της γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης HbA, αυτή μπορεί να συμβεί σε πολλαπλές αμινομάδες σε αμινοξέα (κυρίως βαλίνη και λευκίνη) της τεταρτοταγούς δομής της⁵⁹ οδηγώντας σε ποικιλία γλυκοζυλιωμένων παραγόντων. Αυτά, συλλήβδην με λοιπά

προϊόντα αμινοσακχάρων (HbA1a1, HbA1a2, HbA1b από την προσθήκη 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, 6-φωσφορικής γλυκόζης και του πυροσταφιλικού οξέος στην αμινοτελική βαλίνη της β-αλύσου, αντίστοιχα⁶⁰⁻⁶²) απαρτίζουν το κλάσμα της «ολικής» γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1 ή GHb). Το αφθονότερο παράγωγο αποτελεί η γλυκοζυλιωμένη στο αμινοτελικό κατάλοιπο βαλίνης της β-αλύσου αιμοσφαιρίνη (HbA1c)⁵⁹ που αποτελεί το 70-80% της ολικής⁶³. Η HbA1c και όχι η ολική HbA1 αποτελεί αφενός το κλάσμα που μετράται και αναφέρεται ως αποτέλεσμα από τις σύγχρονες κατά NGSP- ή IFCC-τυποποιημένες μεθόδους προσδιορισμού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, αφετέρου το υπόστρωμα για τη διάγνωση και τη θεραπευτική στοχοθέτηση στον ΣΔ (ιδέ παρακάτω).

Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης (σχηματισμός βάσης Schiff) χαρακτηρίζεται από αντιστρεπτότητα. Η προκύπτουσα βάση Schiff αναφέρεται ως «ασταθής» HbA1c (Labile-LaA1c), αυξημένα επίπεδα της οποίας πιθανώς να οδηγούν σε ψευδώς υψηλές προσδιοριζόμενες τμές της HbA1c με ορισμένες παλαιές μεθόδους προσδιορισμού^{64,65}. Κατόπιν του μετασχηματισμού Amadori η αντίδραση θεωρείται μη αντιστρεπτή.

2.2. Αιτίες της επικράτησης της HbA1c σε σχέση με τα λοιπά κλάσματα της HbA1

Οι βασικοί λόγοι για την επικράτηση της χρήσης της HbA1c στην κλινική πράξη εντοπίζονται στη γραμμική της σχέση με τη συγκέντρωση γλυκόζης των τελευταίων 3-4 μηνών καθώς και στην τεκμηριωμένη συσχέτιση της με την πιθανότητα ανάπτυξης χρόνιων επιπλοκών του ΣΔ.

Η στενή και σταθερή σχέση των επιπέδων της HbA1c με τη μέση γλυκόζη πλάσματος (MPG) των τελευταίων 3-4 μηνών βασίζεται σε δεδομένη σταθερή μέση διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων και συνακόλουθα σταθερό ρυθμό παραγωγής τους από το μυελό των οστών. Η μέση διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων αντιστοιχεί σε 117 ημέρες για τα άρρενα άτομα και 106 ημέρες στα θήλεα (η διαφορά αντικατοπτρίζει τουλάχιστον εν μέρει τις καταμήνιες απώλειες)⁶⁶. Το γλυκοζυλιωμένο κλάσμα της αιμοσφαιρίνης στο εκάστοτε ερυθροκύτταρο εμφανίζει αύξουσα σχέση με την ηλικία του, διάστημα κατά το οποίο αυτό βρίσκεται στην κυκλοφορία και εκτεθειμένο στα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος⁶⁷. Τα πλέον γηρασμένα ερυθροκύτταρα είναι αυτά με το μέγιστο κλάσμα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και τα νεαρότερα με το ελάχιστο⁶⁸, ωστόσο εξαιτίας του ότι τα τελευταία

απαρτίζουν ποσοστιαία το μεγαλύτερο μέρος του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού⁶⁹, οι τελευταίες 30 ημέρες συνεισφέρουν σε δυσανάλογα μεγαλύτερο ποσοστό στη διαμόρφωση της τιμής της HbA1c (περίπου 50%, σε αντίθεση ~10% για τα ερυθροκύτταρα ηλικίας 90-120 ημερών)⁶⁹. Η γραμμική αυτή σχέση διαπιστώθηκε ήδη από το προφίλ 7 σημείων τριχοειδικής γλυκόζης των συμμετεχόντων στη μελέτη DCCT, μέσω της συνάρτησης

$$MPG \text{ (mg/dl)} = [35.6 \times HbA(1c)] - 77.3 \text{ (} r=0.82\text{)}^{70}$$

Περαιτέρω τεκμηρίωση της σχέσης αυτής προήλθε από την πολυκεντρική μελέτη A1c-Derived Average Glucose (ADAG) το 2008, μέσω δεδομένων παρακολούθησης της γλυκαιμίας με συνεχή καταγραφή διάμεσης γλυκόζης και τριχοειδικού προφίλ 7 σημείων επι 3 μήνες μεταξύ 507 αιματολογικώς υγιών συμμετεχόντων (268 άτομα με ΣΔτ1, 159 με ΣΔτ2, και 80 νορμογλυκαιμικοί μάρτυρες). Η προκύπτουσα σχέση μεταξύ MPG και HbA1c είναι η κάτωθι:

$$MPG \text{ (mg/dl)} = [28.7 \times HbA(1c)] - 46.7 \text{ (} r = 0.92\text{)}^{71}$$

Από τη σχέση αυτή προκύπτουν οι χρησιμοποιούμενοι στην καθ' ημέρα πράξη πίνακες αντιστοίχισης της MPG με τις τιμές της HbA1c:

HbA1c (NGSP, %)	HbA1c (IFCC, mmol/mol)	MPG (mg/dl)
6	42	126
7	53	154
8	64	183
9	75	212
10	86	240
11	97	269
12	108	298

Πίνακας 4: Αντιστοιχία μεταξύ των τιμών μέσης γλυκόζης και HbA1c

Ο έτερος και πιθανώς σημαντικότερος λόγος για την επικράτηση της χρήσης της εντοπίζεται στα αποτελέσματα μεγάλων τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών που σκοπό είχαν τη διερεύνηση της επίδρασης της αυστηρής γλυκαιμικής ρύθμισης στην πιθανότητα ανάπτυξης των χρονίων επιπλοκών του ΣΔτ1 και ΣΔτ2⁷²⁻⁷⁶. Δεδομένου ότι στις μελέτες αυτές η αυστηρή γλυκαιμική ρύθμιση τυπικά προσδιορίζεται από την κλινική στοχοθέτηση

χαμηλών τιμών HbA1c, επικράτησε η εφαρμογή της στην περιοδική παρακολούθηση του γλυκαιμικού ελέγχου, με στόχο την πρόληψη ή επιβράδυνση των επιπλοκών του ΣΔ.

2.3. Ιστορικά στοιχεία

Έναυσμα για τον τελικό χαρακτηρισμό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης υπήρξε η αναπάντεχη ανεύρεση «ελασσόνων αιμοσφαιρινικών» κλασμάτων που δύναντο να διαχωριστούν χρωματογραφικώς ή ηλεκτροφορητικώς λόγω της μεγάλης ταχύτητας διαχωρισμού τους από τη «μείζονα» αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων (αργότερα συμβολιζόμενη ως HbA₀) κατά την έναρξη της δεκαετίας του 1960^{77,78}. Τα κλάσματα αυτά χαρακτηρίστηκαν ως HbA1(a-e) και ενώ αρχικώς θεωρήθηκε ότι αποτελούν γενετικώς καθορισμένες διακριτές δομικά μορφές αιμοσφαιρίνης, σύντομα (1966) ανεδείχθη η προέλευση τους από την τροποποίηση της αιμοσφαιρίνης A⁷⁹. Το 1969 διεπιστώθησαν αυξημένα επίπεδα του νέου αιμοσφαιρινικού κλασματος μεταξύ ατόμων με ΣΔ από τους Rahbar και συνεργάτες⁸⁰. Ο ρόλος της μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης του N-τελικού άκρου της HbA στο σχηματισμό HbA1c τεκμηριώθηκε το 1976 από τους Bunn και συνεργάτες, στις παρατηρήσεις των οποίων συμπεριλήφθη ο σημαντικός αντίκτυπος της παρουσίας μειωμένης διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων (αιμόλυσης) στον καθορισμό των επιπέδων της HbA1c⁸¹. Κατά το ίδιο έτος αναδείχθηκε η σημαντικότερη χρησιμότητα του κλάσματος HbA1c σε σχέση με τα HbA1a/b για την παρακολούθηση του πρόσφατου γλυκαιμικού ελέγχου σε άτομα με ΣΔ⁸². Κατά τα ακόλουθα έτη μέσα από σειρά ερευνητικών εργασιών χαρακτηρίστηκε *in vitro* η βιοχημική ακολουθία σχηματισμού της HbA1c⁸³ ενώ χαρακτηρίστηκαν τα προσδέματα του N-τελικού άκρου της β-αλυσίδας για τις HbA1a1, HbA1a2 και HbA1b ως η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, η 6-φωσφορική γλυκόζη και το πυροσταφυλικό οξύ, αντίστοιχα⁶⁰⁻⁶².

Η δεκαετία του 1990 σηματοδοτήθηκε από την έλευση των αποτελεσμάτων των μεγάλων τυχαίοποιημένων κλινικών μελετών παρέμβασης που σφυρηλάτησαν το χάρτη της σύγχρονης θεραπευτικής του ΣΔ και ανέδειξαν το αναντικατάστατο της χρήσης της HbA1c στην κλινική πράξη. Ο προσδιορισμός της HbA1c στην παρακολούθηση της αντιυπεργλυκαιμικής θεραπείας του ΣΔτ2 εφαρμοζόταν από μεμονωμένα εργαστήρια ήδη από τη δεκαετία του 1970. Μολαταύτα, οι μελέτες Diabetes Control and Complications Trial

(DCCT) για το ΣΔτ1⁷² το 1993 και United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) για το ΣΔτ2 1998⁸⁴ ανέδειξαν την στερέη συσχέτιση των τιμών της με την πιθανότητα ανάπτυξης των χρονίων (ίδια μικροαγγειακών) επιπλοκών του ΣΔ και αντιστρόφως, κατέδειξαν ότι η εισαγωγή της ως θεραπευτικό στόχο στη θεραπεία δύναται να προλάβει την ανάπτυξη των επιπλοκών αυτών.

Κατά την ίδια περίοδο, σημαντικό εμπόδιο για την ανάπτυξη κι εφαρμογή διεθνών συστάσεων για τους θεραπευτικούς στόχους της HbA1c αποτέλεσε η παντελής απουσία τυποποίησης του εργαστηριακού προσδιορισμού και της αναφοράς των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Δεν ήταν ασύνηθες η αναφορά των αποτελεσμάτων να γίνεται ως «ολική γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη», γεγονός που δημιουργούσε δυνάμει επικύνδυνες μεταβολές στη διαδικασία λήψης κλινικών αποφάσεων. Το 1996 ξεκίνησε στις ΗΠΑ το διεθνές πρόγραμμα τυποποίησης της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP) με σκοπό την τυποποίηση του βιοχημικού προσδιορισμού της μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και μεθόδων χρησιμοποιώντας σα μέθοδο τυποποίησης⁸⁵ το σύστημα BioRex 70 HPLC που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη DCCT. Το πρόγραμμα συνεχίζεται μέχρι και σήμερα παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την αξιοπιστία και πιθανούς κινδύνους από τη χρησιμοποίηση των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων προσδιορισμού της HbA1c. Αντίστοιχες πρωτοβουλίες σε εθνικό επίπεδο ευοδώθηκαν στη Σουηδία, Ιαπωνία, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία⁸⁶.

Το 1994 ξεκίνησε και η λειτουργία ομάδας εργασίας για την HbA1c του διεθνούς οργανισμού κλινικής χημείας κι εργαστηριακής ιατρικής (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine -IFCC)⁸⁷. Από το 2011 από το πρόγραμμα IFCC, η HbA1c εκφράζεται σε μονάδες mmol/mol⁸⁸. Με τις εκφραζόμενες από το NGSP σε μονάδες % τιμές τις συνδέει η σχέση:

$$NGSP-HbA1c (\%) = 0.915 * (IFCC-HbA1c [mmol/mol]) + 2.15\%$$

Τέλος, σταθμό στην ιστορική πορεία της κλινικής χρήσης της HbA1c αποτέλεσε η εισαγωγή της στα κριτήρια της διάγνωσης του ΣΔ το 2009 (βλ. σχετική παράγραφο).

2.4. Μέθοδοι εργαστηριακού προσδιορισμού της HbA1c

Διακρίνονται δύο μείζονες κατηγορίες στην προσέγγιση του εργαστηριακού προσδιορισμού της HbA1c, στις οποίες εμπίπτουν πρακτικώς όλες οι διαθέσιμες μέθοδοι:

- 1) Μέθοδοι διαχωρισμού: αξιοποιούνται οι διαφορετικές ηλεκτρικές ή/και βιοχημικές ιδιότητες των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης έτσι ώστε να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση εκάστου με τη χρήση κατά περίπτωση διαφορετικών μεθοδολογιών. Στις μεθόδους διαχωρισμού ανήκουν οι κάτωθι:
 - I. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ανιόντων ή κατιόντων, κατά περίπτωση), κατά την οποία πολικά μόρια δύνανται να απομονωθούν με βάση την ηλεκτρική συγγένειά τους προς ένα μέσον που δρα ως ανταλλάκτης ιόντων. Σε αυτή την κατηγορία εμπίπτουν οι μέθοδοι που αξιοποιούν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)⁸⁹.
 - II. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης διαχωρίζονται ηλεκτροοσμωτικά μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης⁹⁰.
 - III. Χρωματογραφία συγγένειας. Κατά τη δίοδο του αιμολυμένου δείγματος από σωλήνα επιστρωμένο με βορονικό άλας τα γλυκοζυλιωμένα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης κατακρατούνται λόγω χημικής συγγένειας στο τοίχωμα και ακολούθως ποσοτικοποιούνται. Μειονέκτημα της μεθόδου συγγένειας βορονικού (boronate affinity assay) αποτελεί ότι προσμετρώνται το σύνολο των γλυκοζυλιωμένων καταλοίπων λυσίνης/βαλίνης και συνεπώς προσδιορίζεται η συνολική HbA1. Η HbA1c υπολογίζεται ακολούθως με χρήση νομογράμματος⁹¹.
- 2) Χημικές μέθοδοι: περιλαμβάνουν δύο ανεξάρτητα αναλυτικά στάδια. Αρχικώς, η συγκέντρωση της HbA1c προσδιορίζεται μέσω προτυποποιημένης χημικής αντίδρασης με το γλυκοζυλιωμένο N-τελικό κατάλοιπο βαλίνης της β-αλυσίδας. Ακολούθως προσδιορίζεται με φωτομετρική μέθοδο η συγκέντρωση της ολικής

αιμοσφαιρίνης και υπολογίζεται ο % λόγος μεταξύ των δύο. Στις χημικές μεθόδους ανήκουν:

- I. Ανοσολογικές μέθοδοι: σε αυτές γίνεται χρήση μιας περίσσειας αντισώματος έναντι του γλυκοζυλιωμένου αμινοτελικού άκρου της β-αλυσίδας. Μετά από τη συγκόληση με το μόριο της HbA1c, αυτή προσδιορίζεται μέσω νεφελομετρίας ή θολοσυμμετρίας⁹².
- II. Ενζυμικές μέθοδοι: το προς μέτρηση δείγμα επωάζεται με ειδική πρωτεάση κατά την οποία προκύπτουν διπεπτιδικά κλάσματα της β-αλυσίδας, τα οποία ακολούθως εκτίθενται σε ένζυμο (φρουκτοζυλ-πεπτιδική οξειδάση) με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Η HbA1c προσδιορίζεται εμμέσως μέσω της ποσοτικοποίησης του H₂O₂⁹³.

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη στις ΗΠΑ μέθοδος είναι αυτή της ανοσοθολοσυμμετρίας (Turbidimetric Inhibition Immunoassay - TINIA) με δεύτερη σε συχνότητα την HPLC⁹⁴. Το αντίστροφο ισχύει για τον ευρωπαϊκό χώρο⁹⁵.

Η εκάστοτε μέθοδος χαρακτηρίζεται από μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα που με τη σειρά τους υπαγορεύουν τις συνθήκες της εκάστοτε κλινικής χρήσης της.

Οι μέθοδοι διαχωρισμού και ίδια η HPLC χαρακτηρίζονται από υψηλή ταχύτητα και επαναληψιμότητα. Επιπλέον, μέσω της HPLC και της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης μπορούν στον ίδιο χρόνο με τη μέτρηση της HbA1c να ανιχνευθούν παθολογικά κλάσματα αιμοσφαιρινών. Δεν είναι ασυνήθης η ευκαιριακή διάγνωση ετερόζυγων αιμοσφαιρινοπαθειών κατά τις μετρήσεις ρουτίνας HbA1c σε ασυμπτωματικά άτομα⁹⁶. Συνεπώς, με τη χρήση των μεθόδων προκύπτει η εν δυνάμει σημαντική πληροφορία της παρουσίας καταστάσεων που δύνανται να συμβάλλουν και στη βιολογική διακύμανση της HbA1c, δεδομένου ότι κάθε αιμοσφαιρινοπάθεια δύναται να συνοδεύεται από κάποιου βαθμού χρόνια αιμολυτική νόσο. Το πλεονέκτημα αυτό αποτελεί ταυτόχρονα και αδυναμία για ορισμένες, ίδια παλαιότερες από αυτές τις μεθόδους, δεδομένου ότι το κλάσμα της

HbA1c ενίοτε δε διαχωρίζεται ικανοποιητικά από την HbF, την καρβαμυλαιμοσφαιρίνη (αυξημένη στην προχωρημένη νεφρική νόσο) ή ακόμα κι από την La1c⁹⁷. Οι μέθοδοι συνάφειας βορονικού οξέος δεν ανιχνεύουν παθολογικά αιμοσφαιρινικά κλάσματα και σε γενικές γραμμές δεν επηρεάζονται αναλυτικά από την παρουσία τους⁹⁷.

Οι χημικές μέθοδοι είναι ταχείς, δεν ανιχνεύουν και δεν υπόκεινται σε παρεμβολές από παθολογικά κλάσματα αιμοσφαιρινών λόγω της αναλυτικής τους αρχής⁹⁷. Φέρουν ωστόσο το μειονέκτημα της παρουσίας δύο ανεξάρτητων, υποκείμενων σε σφάλμα (bias) αναλυτικών σταδίων. Χαρακτηριστικά δύναται η παρουσία αναιμίας ανεξαρτήτως υποκειμένου αιτίου να επηρεάσει θετικά (positive bias) τα αποτελέσματα ορισμένων ανοσοθολοσοσυμμετρικών μεθόδων⁴⁹.

Η μέθοδος συνάφειας βορονικού και η ανοσοθολοσοσυμμετρική μέθοδος αξιοποιούνται στην πλειονότητα των αναλυτών που χρησιμοποιούνται για μετρήσεις «παρά την εξεταστική κλίνη» (point-of-care measurements)⁹⁸.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της εκάστοτε μεθόδου παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα⁹⁹:

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ανοσοθολοσοσυμμετρική	↑ειδικότητα,	Αδύνατη η ανίχνευση αιμοσφαιρινοπαθειών, πιθανά αναλυτικά σφάλματα σε σοβαρή αναιμία, υψηλές τιμές HbF
HPLC	Δυνατή η ανίχνευση αιμοσφαιρινοπαθειών, ↑επαναληψιμότητα, επικύρωση στη DCCT	↓ειδικότητα, αναλυτικά σφάλματα από την παρουσία αιμοσφαιρινοπαθειών
Συνάφειας βορονικού	Ελάχιστες παρεμβολές από την παρουσία αιμοσφαιρινοπαθειών	Έμμεση μέτρηση HbA1 με βάση την ολική HbA1
Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση	↑επαναληψιμότητα, ↑ειδικότητα, δυνατή η ανίχνευση αιμοσφαιρινοπαθειών	Κοστοβόρα και χρονοβόρα μέθοδος

Πίνακας 5: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των πιο διαδεδομένων μεθόδων αναλυτικού προσδιορισμού της HbA1c

Αναλυτικές πληροφορίες για το ενδεχόμενο από την παρουσία των κυριότερων αιμοσφαιρινοπαθειών (HbS, HbC, HbD, HbE) ή την παρουσία υψηλών τιμών HbF προκαλούμενο αναλυτικό σφάλμα παρέχονται στην ιστοσελίδα του Εθνικού Προγράμματος Τυποποίησης της Γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης⁸⁵.

2.5. Πώς ορίζεται το «σημαντικό» σφάλμα στον προσδιορισμό της HbA1c?

Δεδομένου ότι μεταβολές της HbA1c της τάξης του $\pm 0.5\%$ έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην εκδήλωση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών του ΣΔ¹⁰⁰, από τη σκοπιά της θεραπευτικής στοχοθέτησης της αντιϋπεργλυκαιμικής θεραπείας και ενδεχομένως της χρήσης της HbA1c στη διάγνωση του ΣΔ κλινικά σημαντικές θεωρούνται αποκλίσεις $\pm 0.5\%$ ¹⁰¹. Σε δήλωση συναίνεσης (consensus statement) τον Ιανουάριο του 2002 αναφορικά με τα κριτήρια της ακρίβειας του εργαστηριακού προσδιορισμού της HbA1c, με συμμετοχή, μεταξύ άλλων, εκπροσώπων του EASD, ADA και IDF, υποστηρίχθηκε η ανάγκη σημαντικά στενότερου εύρους αβεβαιότητας των μετρήσεων, δεδομένης της αναγκαιότητας λήψης κλινικών αποφάσεων σε εύρος μεταβολών της HbA1c μεταξύ $\pm 0.35-0.5\%$. Επομένως, κάθε παρεμβολή που δύναται να προκαλέσει σφάλμα μεγαλύτερο $\pm 0.3\%$ θεωρείται σημαντική. Το κριτήριο αυτό έχει υιοθετηθεί από αριθμό εταιριών που έχουν εκδόσει αντίστοιχες οδηγίες¹⁰².

2.6. Εναλλακτικές μέθοδοι παρακολούθησης της μακροπρόθεσμης γλυκαιμίας

Αυτές μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες σε κλινικά σενάρια κατά τα οποία η αξιοπιστία της HbA1c παραβλάπτεται (λχ ομόζυγες θαλασσαιμίες κι αιμοσφαιρινοπάθειες, τελικού σταδίου ΧΝΝ), όπως επίσης σε περιπτώσεις που οι τιμές της HbA1c κατ' επανάληψη δε συνάδουν με το προφίλ τιμών τριχοειδικής γλυκόζης του εξεταζομένου. Μεταξύ των μεθόδων για τη μακροπρόθεσμη παρακολούθηση της γλυκαιμίας μπορούμε να διακρίνουμε δύο κατηγορίες:

2.6.1. Μέθοδοι μη βασιζόμενες στην πρωτεϊνική γλυκοζυλίωση

- 1) Συνεχής καταγραφή διάμεσης γλυκόζης (Continuous Glucose Monitoring – CGM). Η μέθοδος αυτή αφορά σε αισθητήρες οι οποίοι φέρονται σταθερά από τους

ασθενείς και καταγράφουν της τιμές γλυκόζης του διαμέσου υγρού σε πραγματικό χρόνο. Οι τιμές μεταφέρονται στον ενδιαφερόμενο (ασθενή, θεράποντα, οικείο) είτε με συνεχή τρόπο ασύρματα σε παρακείμενο δέκτη (τυπικά σε αντλία ινσουλίνης) είτε κατ' επίκληση (flash glucose monitoring)¹⁰³. Τα συστήματα αυτά δύνανται να φέρονται εείτε αυτονόμως είτε σε σύζευξη με αντλία συνεχούς χορήγησης ινσουλίνης, με ποικίλη αυτονομία της μεταξύ τους λειτουργίας (sensor augmented pump έως closed loop insulin delivery system).

- 2) 1,5 Ανυδρογλυκικόλη (1,5 AG ή 1-δεοξυγλυκόζη). Η 1,5 AG αποτελεί μη μεταβολιζόμενο μονοσακχαρίτη φυσιολογικά απαντώμενο στο ανθρώπινο σώμα και στις περισσότερες τροφές¹⁰⁴. Το 99.9% της διηθούμενης στο νεφρικό σπείραμα 1,5 AG υφίσταται επαναρρόφηση στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο από το συµμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης-4 (SGLT4). Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα προσεγγίζουν τον ουδό της γλυκοζουρίας (~180mg/dl) η επαναρρόφηση της 1,5 AG αναστέλλεται και συνεπώς τα επίπεδά της μειώνονται. Η συγκέντρωση 1,5 AG στον ορό συσχετίζεται με το ύψος των γλυκαιμικών (ίδια μεταγευματικών) αιχμών των τελευταίων ημερών έως εβδομάδων, με τη βέλτιστη συσχέτιση να διαπιστώνεται με τις τιμές της 2ωρης μεταγευματικής γλυκόζης των τελευταίων 2 εβδομάδων^{105,106}. Διατίθεται εµπορικά μέθοδος χρωματομετρικού προσδιορισµού της (GlucoMark™) κατάλληλη για πλειάδα αυτόµατων αναλυτών¹⁰⁷. Αδρά, η αντιστοιχία μεταξύ της συγκέντρωσης 1,5 AG και μέσης μεταγευματικής γλυκόζης είναι η κάτωθι¹⁰⁶:

1,5 Ανυδρογλυκικόλη (µg/ml)	Μέση μεταγευματική (2h) γλυκόζη πλάσματος (mg/dl)
>12	<180
10	185
8	190
6	200
4	225
<2	>290

Πίνακας 6: Αναφερόµενη αντιστοιχία των τιμών της 1,5 ανυδρογλυκικόλης (1,5 AG) με τη μέση μεταγευματική γλυκόζη

Η 1,5 AG δεν είναι χρήσιμη στην περίπτωση προχωρημένης (σταδίου 4 και 5) νεφρικής νόσου ή στην περίπτωση λήψης φαρμάκων της κατηγορίας των αναστολέων SGLT2 οπότε και μεταβάλλεται ο ουδός της γλυκοζουρίας⁹⁹.

2.6.2. Μέθοδοι βασιζόμενες στην πρωτεϊνική γλυκοζυλίωση

Αυτές αξιοποιούν τον προσδιορισμό πρωτεϊνών πέραν της HbA1c οι οποίες ομοίως έχουν υποστεί μη ενζυμική γλυκοζυλίωση μέσω της αντίδρασης Maillard.

- 1) Φρουκτοζαμίνη (1-άμινο-1-δεοξυφρουκτόζη, ΦΑ). Υπό τον όρο αυτό αναφέρονται συλλήβδην όλες οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος. Επειδή η κύρια κυκλοφορούσα πρωτεΐνη είναι η αλβουμίνη η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνο ημιζωής 19 ημερών¹⁰⁸, η φρουκτοζαμίνη αντικατοπτρίζει τη μέση συγκέντρωση της γλυκόζης πλάσματος κατά τις τελευταίες 30 ημέρες¹⁰⁹. Άλλες πρωτεΐνες όπως αποπρωτεΐνες (το πρωτεϊνικό κλάσμα των λιποπρωτεϊνών) και σφαιρίνες συνεισφέρουν σε μικρότερο βαθμό στη διαμόρφωση των τιμών της φρουκτοζαμίνης¹¹⁰.
- 2) Γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη (ΓΑ). Στην περίπτωση αυτή μετράται ειδικά η συγκέντρωση της γλυκιωμένης αλβουμίνης στο πλάσμα. Αποτελεί νεότερα εισηγμένο μέγεθος σε σχέση με τη φρουκτόζαμίνη και ομοίως είναι ενδεικτική του γλυκαιμικού φορτίου των τελευταίων 40 ημερών^{99,109}.

Οι διαφορές μεταξύ φρουκτοζαμίνης και ΓΑ δεν περιορίζονται στη μεγαλύτερη ειδικότητα της τελευταίας ως προς την αλβουμίνη. Για τα δύο μεγέθη υπάρχουν διαφορετικές διαθέσιμες μέθοδοι βιοχημικού προσδιορισμού (δεύτερης γενιάς μπλέ του τετραζολίου-χρωματομετρική για τη φρουκτοζαμίνη, HPLC, χρωματογραφία συγγένειας και ενζυμικές μέθοδοι για τη ΓΑ) οι οποίες συμβάλλουν στη μη συγκρισιμότητά τους. Χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι ορισμένες ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι προσδιορισμού της φρουκτοζαμίνης αξιοποιούν τις αναγωγικές ιδιότητές της σε αλκαλικές συνθήκες, δύνανται να επηρεαστούν σημαντικά από την παρουσία άλλων μορίων με αναγωγικές ιδιότητες (χολερυθρίνη, βιταμίνες) όπως επίσης και από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος⁹⁹.

Σε αντίθεση με την HbA1c οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος δεν επηρεάζονται από την παρουσία αιμοσφαιρινοπαθειών και καταστάσεων στις οποίες μεταβάλλεται ο ρυθμός ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση τους συνιστάται για τη μεσοπρόθεσμη εκτίμηση της γλυκαιμίας εναλλακτικά της HbA1c σε καταστάσεις ομοζύγων αιμοσφαιρινοπαθειών και θαλασσαιμικών συνδρόμων, καθώς και στην προχωρημένη (σταδίου 4 και 5) νεφρική νόσο¹¹¹. Η αλβουμίνη και οι λοιπές πρωτεΐνες του πλάσματος υφίστανται γλυκοζυλίωση με περίπου 9-10 φορές ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με την HbA1c, επιτρέποντας έτσι την ταχύτερη ανίχνευση τυχόν αιφνίδιων μεταβολών της συγκέντρωσης γλυκόζης¹¹⁰.

Όπως συμβαίνει και με την HbA1c η φρουκτοζαμίνη και η ΓΑ δύνανται να επηρεαστούν ανεξαρτήτως της γλυκαιμίας σε διάφορες κλινικές καταστάσεις. Σε συνθήκες που χαρακτηρίζονται από διαφοροποιημένο μεταβολισμό πρωτεϊνών (ενδεικτικά αναφέρονται το νεφρωσικό σύνδρομο, ηπατική κίρρωση, εντεροπάθεια με απώλεια λευκώματος, εκτεταμένη εγκαυματική νόσος, παθήσεις του θυρεοειδούς, θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή) οι τιμές της φρουκτοζαμίνης και ΓΑ δύνανται να μεταβληθούν μέσω του διαφοροποιημένου ρυθμού παραγωγής, όγκου κατανομής ή των απωλειών των πρωτεϊνών του πλάσματος. Επιπλέον, δύνανται να επηρεαστούν ανεξαρτήτως των τιμών γλυκόζης αλγεβρικός αρνητικά σε συνθήκες οξείας φλεγμονής¹¹² καθώς και από τον αυξημένο ΔΜΣ¹¹³. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η παχυσαρκία επηρεάζει τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος δεν είναι αποσαφηνισμένος, πιθανώς όμως σχετίζεται με τη χρόνια ηπίου βαθμού φλεγμονή που συνοδεύει την κατάσταση αυτή¹¹⁴.

Σε πρόσφατη ανάλυση στον πληθυσμό της μελέτης Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), υπολογίστηκαν τα 95% όρια αξιοπιστίας της φρουκτοζαμίνης μεταξύ 194.8 - 258.0 μmol/L και της ΓΑ μεταξύ 10.7%-15.1%¹¹³. Ωστόσο, ελλείπουν τα μέτρα αυτά από τις οδηγίες των περισσότερων διαβητολογικών εταιριών, είτε ως διαγνωστικά μέτρα είτε κατά τη στοχοθέτηση της αντιυπεργλυκαιμικής θεραπείας, κατά μείζονα λόγο λόγω της απουσίας προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών που θα τεκμηρίωναν τη συσχέτιση μεταξύ της επίτευξης χαμηλών τιμών γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών και πρόληψης των χρονίων επιπλοκών του διαβήτη, όπως συνέβη με την HbA1c στις DCCT και UKPDS⁹⁴.

2.7. Χάσμα γλυκοζυλίωσης (Glycation Gap) και Δείκτης Γλυκοζυλίωσης (Glycation Index)

Όπως νωρίτερα αναπτύχθηκε, οι τιμές HbA1c και των λοιπών γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών καθορίζονται από επιπρόσθετες παραμέτρους πέραν της γλυκαιμίας. Δεδομένης της κινητικής πρώτης τάξης που χαρακτηρίζει την αντίδραση Maillard, αναμένονται γραμμικές σχέσεις των τιμών των ανωτέρω μέτρων και της μέσης γλυκόζης πλάσματος (MPG) του παρελθόντος διαστήματος στο οποίο αναφέρονται. Η γραμμική αυτή σχέση μεταξύ της MPG και της HbA1c τεκμηριώθηκε στις μελέτες DCCT και ADAG^{70,71}.

Μπορεί να θεωρηθεί δεδομένη η στενή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των διαφορετικών γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών (μεταξύ της HbA1c και φρουκτοζαμίνης ή ΓΑ), ίδια στα άτομα με σταθερό γλυκαιμικό έλεγχο κατά τους προηγούμενους 3 μήνες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον υπολογισμό μιας *αναμενόμενης* τιμής γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, βασιζόμενης σε δεδομένη τιμή Φρουκτοζαμίνης ή ΓΑ. Η διαφορά μιας τέτοιας αναμενόμενης από μία κατά το ίδιο χρονικό σημείο εισημμένης τιμής HbA1c καλείται γλυκαιμικό χάσμα (Glycation Gap - GG) και εκφράζει την επίδραση του συνόλου των παραμέτρων εκτός της γλυκαιμίας που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τις HbA1c, φρουκτοζαμίνη και ΓΑ σε βιολογικό, προ-αναλυτικό ή αναλυτικό επίπεδο (ιδέ ανωτέρω). Επιπλέον, διαφοροποιήσεις στην ενδοερυθροκυτταρική μεταφορά της γλυκόζης μεταξύ των ατόμων θεωρείται ότι συμβάλλουν στη διαμόρφωση του GG¹¹⁵. Συλλήβδην οι παράμετροι που καθορίζουν το GG χαρακτηρίζονται από ισχυρή γενετική συνιστώσα. Οι Rodriguez-Segade και συνεργάτες διεπίστωσαν αξιοσημείωτα σταθερό GG μεταξύ ατόμων με αμετάβλητο γλυκαιμικό έλεγχο ($r=0.95$ μεταξύ GG μετρημένων με διαφορά ενός μήνα και σε βάθος χρόνου¹¹⁶).

Το GG προκύπτει ως το υπόλοιπο της αφαίρεσης

$$GG = HbA1c \text{ (προσδιορισμένη)} - HbA1c \text{ (αναμενόμενη)}$$

όπου η αναμενόμενη HbA1c υπολογίζεται αναμενόμενη από τη φρουκτοζαμίνη τιμή HbA1c. Στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, ο υπολογισμός του GG γίνεται συνήθως με βάση το διώνυμο (regression equation) μεταξύ HbA1c και φρουκτοζαμίνης^{115,117-119}. Η μέθοδος αυτή είναι η απλούστερη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη, παρουσιάζει ωστόσο το μειονέκτημα της εξ' ορισμού γραμμικής σχέσης με την HbA1c, γεγονός που καθιστά μεθοδολογικώς αμφισβητούμενη την ταυτόχρονη εισαγωγή της HbA1c και του GG σε πολυπαραγοντικά μοντέλα παλινδρόμησης. Ως εκ τούτου, από τους McDonald και συν εφαρμόστηκε μια εναλλακτική προσέγγιση υπολογισμού της αναμενόμενης HbA1c, χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις (SD) της φρουκτοζαμίνης και HbA1c του δείγματος ως ακολούθως¹²⁰:

$$SND^*(f) = (\text{Φρουκτοζαμίνη} - \text{Μέση Φρουκτοζαμίνη}) / SD (\text{Φρουκτοζαμίνης})$$

$$HbA1c (\text{αναμενόμενη}) = SND^*(f) \times SD (HbA1c) + \text{Μέση} (HbA1c)$$

(SND*=Standard Normal Deviate)

Πλην των συνιστωσών που αφορούν την εκάστοτε μέθοδο, η τιμή του GG παρουσιάζει αύξουσα σχέση με την ηλικία και την τιμή της HbA1c¹¹⁹. Το GG εμφανίζεται αυξημένο σε άτομα με νεφροπάθεια (ίδια μακρολευκωματουρία)^{117,121} κι ενδεχομένως με αμφιβληστροειδοπάθεια¹²². Επιπλέον, κατά τους Rodriguez-Segade και συνεργάτες, μεταξύ ατόμων με ΣΔτ2 το αυξημένο GG προοπτικά σχετίζεται σημαντικά και ανεξάρτητα από την HbA1c με την επιδείνωση της νεφροπάθειας μετά από 6.5 έτη παρακολούθησης (για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός της επιδείνωσης της νεφροπάθειας όπως αυτή ορίστηκε στη μελέτη DCCT¹²³).

Όμοιο στον υπολογισμό και στο υπόβαθρο είναι και το μέγεθος του δείκτη γλυκοζυλίωσης αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin Glycation Index, HGI), με μόνη διαφορά ότι η αναμενόμενη τιμή της HbA1c υπολογίζεται με βάση το διώνυμο της σχέσης μεταξύ HbA1c και μέσης τιμής γλυκόζης¹²⁴ ή της γλυκόζης νηστείας^{125,126}. Ένας αυξημένος HGI σχετίζεται προοπτικά με αυξημένη θνητότητα και την πιθανότητα ανάπτυξης χρονίων επιπλοκών σε άτομα με

ΣΔτ2 αλλά η συσχέτιση αυτή οδηγείται κυρίως από τα αυξημένα επίπεδα της HbA1c, η οποία αποτελεί ισχυρότερο δείκτη των ανωτέρω εκβάσεων¹²⁶⁻¹²⁸.

Μολονότι η αντίδραση Maillard θεωρείται μη αντιστρεπτή, ένας εν δυνάμει σημαντικός ρόλος που έχει υποτεθεί στη διαφοροποίηση των τιμών της HbA1c από αυτές της φρουκτοζαμίνης, GA και MPG (και συνεπώς, στη διαμόρφωση των GG και HCl) είναι αυτός της ενδοκυττάριας (και συνεπώς ενδοερυθροκυτταρικής) ενζυμικά διαμεσολαβούμενης άπο-γλυκοζυλίωσης. Η φρουκτοζαμίνη-3-κινάση (FN3K) αποτελεί ένζυμο απαντώμενο κυρίως ενδοερυθροκυτταρικά, με υψηλό βαθμό έκφρασης στα ερυθροκύτταρα¹²⁹. Η FN3K καταλύει τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινομάδων σε παράγωγα Amadori, συμπεριλαμβανομένης της HbA1c, με αποτέλεσμα την απο-γλυκοζυλίωσή τους¹³⁰. Η ενδοερυθροκυτταρική ενεργότητα της FN3K έχει διαπιστωθεί 3- έως 4-πλάσια μεταξύ ατόμων με αρνητικό σε σχέση με τα άτομα με θετικό GG¹³¹. Γενετικώς καθοριζόμενες διαφοροποιήσεις στην ενεργότητα του ενζύμου αυτού πιθανώς συμμετέχουν στη διαμόρφωση των τιμών των GG και HGI ανεξαρτήτως από τους λοιπούς μη-σχετιζόμενους με τη γλυκαιμία καθοριστές των τιμών της HbA1c ή να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των χρονίων επιπλοκών του ΣΔ¹³².

3. Οι θαλασσαιμίες

Οι θαλασσαιμίες (μεσογειακές αναιμίες) αποτελούν κληρονομικές διαταραχές της σύνθεσης των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων. Αν και συχνά αναφέρονται συλλήβδην υπό τον όρο «αιμοσφαιρινοπάθειες» δεν αποτελούν ποιοτικές διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης (δε σχετίζονται με την παρουσία δομικά και λειτουργικά διαταραγμένων αιμοσφαιρινών) αλλά μάλλον ποσοτικές.

3.1. Παθοφυσιολογία των θαλασσαιμικών συνδρόμων

Σε αιματολογικώς φυσιολογικά άτομα, στις πρώιμες ερυθροκυτταρικές μορφές του οστικού μυελού η γονιδιακή έκφραση και η σύνθεση των δομικών λίθων της κύριας αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (HbA) δηλαδή των α και β αλυσίδων, γίνεται σε ίσομοριακές ποσότητες (σε αναλογία 1:1). Στα άτομα με α- και β- θαλασσαιμία υπολείπεται η σύνθεση των α και β αλυσών αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την καθίζηση των υπερβαλουσών ποσοτήτων β και α

αλυσίδων εντός του ερυθροκυττάρου και το συνακόλουθο σχηματισμό αδιάλυτων εγκλείστων. Το φαινόμενο αυτό επιδεινείται από την παρουσία οξειδωμένου τρισθενούς σιδήρου στις ασύζευκτες α-αλυσούς, μέσω του οποίου επάγονται περαιτέρω οξειδωτικές βλάβες στη λιπιδική διπλοστιβάδα του κυττάρου και των οργανιδίων του¹³³. Τελικό αποτέλεσμα είναι η καταστροφή του ερυθροκυττάρου (αιμόλυση), η οποία μπορεί να λαμβάνει χώρα είτε ήδη στο στάδιο των πρόδρομων μορφών (ενδομυελική αιμόλυση – αναποτελεσματική ερυθροποίηση) είτε μετά από την απελευθέρωση του ερυθροκυττάρου στην κυκλοφορία (μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων – περιφερική αιμόλυση)¹³⁴.

Ειδικά για την εκδήλωση του κλινικού κι εργαστηριακού φαινοτύπου της β-θαλασσαιμίας, αναγνωρίζεται ένας επιπλέον ρόλος στην σταθεροποιητική πρωτεΐνη της α-αιμοσφαιρίνης (alpha hemoglobin stabilizing protein – AHSP) καθώς και στα πρωτεολυτικά μονοπάτια της ουβικουιλίνωσης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος¹³³. Αμέσως μετά από τη σύνθεση των α-αλυσών αυτές αλληλεπιδρούν με την ASHP και λαμβάνουν την απαραίτητη τεταρτοταγή διαμόρφωση, έτσι ώστε να σχηματίσουν το τετραμερές της HbA με 2 β-αλυσίδες. Στην περίπτωση της β-θαλασσαιμίας, όταν η περίσσεια των α-αλυσίδων λόγω της ελλειμματικής σύνθεσης των β υπερβεί την προσδετική ικανότητα της AHSP αυτές σχηματίζουν συμπλέγματα τα οποία καθιζάνουν προκαλώντας βλάβες στην κυτταρική και στις οργανοδιακές μεμβράνες. Δομικές διαταραχές της α-αλυσού που παρεμποδίζουν την αποτελεσματική πρόσδεση στην ASHP επάγουν έναν ήπιο «θαλασσαιμικό φαινότυπο» (υποχρωμία και μικροκυττάρωση) στον άνθρωπο¹³⁵. Επιπλέον, σε μεμονωμένα άτομα, μικρές γενετικώς-καθοριζόμενες διαφοροποιήσεις στην ενεργότητα της ASHP δύνανται να επηρεάσουν σε κλινικά σημαντικό βαθμό το φαινότυπο μιας ετεροζύγου (ιδέ παρακάτω) β-θαλασσαιμίας¹³⁶.

Οι διεργασίες αυτές εκκινούν από τα πρώτα στάδια της ζωής του κυττάρου της ερυθράς σειράς στο μυελό και κορυφώνονται σε ένταση στο στάδιο της πολυχρωματόφιλης ερυθροβλάστης, οπότε και επισυμβαίνει κατά μέγιστο βαθμό η ενδομυελική αιμόλυση¹³⁷. Στους προστατευτικούς μηχανισμούς του ερυθροκυττάρου περιλαμβάνονται τα προαναφερθέντα πρωτεολυτικά συστήματα (ουβικουιλίνωσης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος) που απομακρύνουν την περίσσεια των α-αλυσίδων, μολαταύτα η δυνατότητα αυτή κορέννυται σε βαρύτερες μορφές β-θαλασσαιμίας¹³³.

3.2. Γενετικό υπόβαθρο της β-θαλασσαιμίας

Το γονίδιο της β-θαλασσαιμίας εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11, στο καλούμενο «σύμπλεγμα γονιδίων β-σφαιρινών» (beta globin gene cluster). Κάθε χρωμόσωμα 11 φέρει ένα αλληλίο β-αλυσίδας, σε αντίθεση με το γονίδιο της α-αλυσίδας εκ του οποίου δύο αντίγραφα εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 16¹³⁴. Το σύμπλεγμα φέρει 5 γονίδια (ε, Gγ, Αγ, δ, β) που παρατίθενται με τη χρονική σειρά της γονιδιακής του έκφρασης καθώς κι ένα ψευδογονίδιο (ψη). Το γονίδιο της β-αλυσίδας (HBB) έχει μήκος 1.6 κιλοβάσεων, φέρει 3 εξόνια και υποκινητή δίπλα στην 5'-μη κωδική περιοχή φέροντα πλαίσια TATA, CAAT και CACCC. Επιπροσθέτως, στη ρύθμιση της έκφρασης του HBB εμπλέκονται λοιπές ρυθμιστικές περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρούν ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων¹³⁸.

Η ετερόζυγος β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά ετερογενές γονιδιακό υπόβαθρο με περισσότερες από 200 αναγνωρισμένες υπαίτιες μεταλλάξεις. Αυτές είναι συνηθέστερα σημειακού τύπου (αντικατάσταση ή προσθήκη νουκλεοτιδίου) ή ολιγονουκλεοτιδιακές προσθήκες σε σημαντικές ρυθμιστικές ή κωδικές περιοχές του HBB. Συχνό είναι το φαινόμενο της επικράτησης συγκεκριμένων γονοτύπων ανά γεωγραφική περιοχή, γεγονός πιθανά σχετιζόμενο με το «Φαινόμενο του ιδρυτή». Διαφορετικές γενετικές διαταραχές οδηγούν σε ποσοτικά διαφορετικού βαθμού διαταραχή της σύνθεσης της β-αλυσίδας επάγοντας διαφορετικής βαρύτητας κλινικοεργαστηριακούς φαινοτύπους με τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Μπορεί να χαρακτηρίζονται από πλήρη απουσία έκφρασης β-αλυσίδων (β^0) από το προσβεβημένο χρωμόσωμα, οφειλόμενες σε ευρείες διαγραφές, σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης ή λήξης, μετατόπιση πλαισίου ή σε αναποτελεσματικό μάτισμα της πρωτογενούς mRNA παραγωγού αλυσού. Σε αντίθεση, μεταλλάξεις στα πλαίσια του υποκινητή του HBB κατά κανόνα οδηγούν σε ποικίλλης βαρύτητας μείωση της παραγωγής β-αλυσών (β^+)¹³⁸. Σπανίως οι μεταλλάξεις βρίσκονται εκτός του HBB ή ακόμα και του συμπλέγματος των β-αλυσών, οπότε ο προκύπτων φαινότυπος περιλαμβάνει περαιτέρω χαρακτηριστικά όπως συμβαίνει στην περίπτωση της X-φυλοσύνδετης θρομβοπενίας με θαλασσαιμία¹³⁹ ή της θαλασσαιμίας συνοδευόμενης από μελαγχρωματική ξηροδερμία¹⁴⁰.

Αναλυτική λίστα των υπαιτίων για τη β-θαλασσαιμία μεταλλάξεων είναι διαθέσιμη από την ιστοσελίδα <http://globin.cse.psu.edu>. Στην Ελλάδα και Κύπρο η συνηθέστερα απαντώμενη γενετική διαταραχή είναι η IVS I-110 G>A, μολονότι διαπιστώνεται αξιοσημείωτη διακύμανση των επικρατουσών μεταλλάξεων μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών¹⁴¹.

3.3. Επιδημιολογία της β-θαλασσαιμίας

Όλες οι κλινικές εκφάνσεις της β-θαλασσαιμίας είναι συνηθέστερες στο σύνολο της λεκάνης της Μεσογείου, τη μέση και άπω ανατολή, την Ινδία, το νότιο τμήμα της Κίνας, χώρες της νοτίου Αφρικής και της Λατινικής Αμερικής¹⁴². Η επικράτηση των θαλασσαιμικών γονιδίων, παράλληλα με την αυξημένη συχνότητα άλλων χρονίων αιμολυτικών διαταραχών (αιμοσφαιρινοπάθειες, έλλειψη G6PD, σφαιροκυττάρωση κ.ο.κ.), θεωρείται ότι πιθανόν να σχετίζεται με την υψηλή επίπτωση της ελονοσίας στις εν λόγω περιοχές. Οι φορείς ετερόζυγων κληρονομικών αιμολυτικών διαταραχών πιθανώς εξελικτικά ευνοήθηκαν λόγω ηπιότερης κλινικής διαδρομής της ελονοσίας οφειλόμενης αφενός στα ευχερέστερα λυόμενα ερυθροκύτταρα και αφετέρου στον ταχύτερο ρυθμό ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων που παρουσιάζουν στα πλαίσια της χρόνιας αιμολυτικής διαταραχής. Άλλες παράμετροι που πιθανώς συμβάλλουν στο δεδομένο μοτίβο διασποράς της β-θαλασσαιμίας είναι το «φαινόμενο του ιδρυτή» και τυχαίες μεταλλάξεις ανεξαρτήτως φυσικής επιλογής (γονιδιακή παρέκκλιση)¹³⁸.

Οι μετακινήσεις πληθυσμών και η απόκτηση απογόνων από ζεύγη διαφορετικού εθνοτικού υποβάθρου έχει οδηγήσει στη διασπορά της β-θαλασσαιμίας σε περιοχές όπου προηγουμένως ήταν απύσχα, όπως η Ωκεανία, η βόρεια Ευρώπη και η βόρεια Αμερική¹⁴³. Κατ' εκτίμηση, περίπου το 1.5% του παγκοσμίου πληθυσμού (~90.000.000) είναι ετεροζυγώτες β-θαλασσαιμίας¹⁴⁴. Στην περιοχή της Μεσογείου ο μέγιστος επιπολασμός ετεροζυγωτίας (φορείας) β-θαλασσαιμίας διαπιστώνεται στην Κύπρο (15-18%, με τάση για μείωση κατά τις τελευταίες δεκαετίες^{145,146}) και στη Σαρδηνία (12.6%¹⁴⁷).

Στον ελλαδικό χώρο οι βασικότερες πληροφορίες προέρχονται από επιδημιολογική μελέτη των καθηγητών Μαλάμου, Φέσσα και Σταματογιαννόπουλου το 1960, κατά την οποία ο συνολικός επιπολασμός της ετεροζυγωτίας υπολογίστηκε στο 7.4%. Διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ της συχνότητας της φορείας αναλόγως γεωγραφικού

διαμερίσματος, με πεδινές, εύκρατες περιοχές (Θεσσαλία, παράλια Ηπείρου, δυτική Πελοπόννησος) να παρουσιάζουν επιπολασμό 10-14% ενώ σημαντικά μικρότερες συχότητες διαπιστώθηκαν για τις βόρειες (Μακεδονία, Θράκη) περιοχές¹⁴⁸. Οφείλει να σημειωθεί ότι λόγω της αωρότητας των τότε διαγνωστικών μέσων, οι υπολογισμοί της μεέτης αυτής ενδεχομένως πάσχουν από αυξημένη συχνότητα περιπτώσεων που διέφυγαν της διάγνωσης καθώς και άλλων που ταυτοποιήθηκαν λανθασμένα ως περιπτώσεις ετεροζύγου β-θαλασσαιμίας.

3.4. Κλινικοί φαινότυποι θαλασσαιμίας

Η χρησιμότερη κατηγοριοποίηση των θαλασσαιμιών γίνεται με βάση την κλινική τους βαρύτητα, η οποία κατά το μείζον υπαγορεύεται από το βαθμό της ανισσοροπίας μεταξύ της σύνθεσης των α- και β-αλύσων της αιμοσφαιρίνης και παρουσιάζει μία αδρή αντιστοιχία με το γενετικό τους υπόβαθρο.

Κλινικά διακρίνονται οι κάτωθι μορφές θαλασσαιμικών συνδρόμων :

- Ελάσσων θαλασσαιμία: αφορά σε συνήθως ασυμπτωματική φορεία παθολογικού γονιδίου (ετερόζυγη θαλασσαιμία ή «στίγμα» θαλασσαιμίας, με ήπια ενδομυελική και περιφερική αιμόλυση και ήπια έως μετρίου βαθμού αναιμία.
- Μείζων θαλασσαιμία: Βαρεία αναιμία λόγω σοβαρού βαθμού αιμόλυσης και αναποτελεσματικής ερυθροποίησης καθώς και εκτεταμένη εξωμυελική αιμοποίηση. Κλινικώς γίνεται αντιληπτή από το πρώτο έτος της ζωής οπότε επισυμβαίνει η μετάπτωση της παραγωγής από την παραγωγή εμβρυικής HbF στην αιμοσφαιρίνη HbA. Απαιτείται ένταξη σε τακτικό πρόγραμμα μεταγγίσεων ερυθροκυττάρων σε συχνότητα τέτοια ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ~10 g/dl, με στόχο τη φυσιολογική ανάπτυξη και την καταστολή της εξωμυελικής αιμοποίησης. Από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής τα άτομα με μείζονα θαλασσαιμία βρίσκονται σε κίνδυνο των επιπλοκών από υπερφόρτωση σιδήρου (δευτεροπαθή αιμοσιδήρωση) οφειλόμενη στις συχνές μεταγγίσεις αλλά και στον πρωτογενώς αυξημένο ρυθμό απορρόφησης σιδήρου, οφειλόμενο σε απρόσφορη καταστολή της εψιδίνης¹⁴⁹. Εκτός από τις σχετιζόμενες με την υπερφόρτωση σιδήρου επιπλοκές, η μείζων θαλασσαιμία αντιπροσωπεύει κατάσταση υπερπηκτικότητας και οι πάσχοντες βρίσκονται σε ιδιαίτερος αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων.

- Ενδιάμεση θαλασσαιμία. Αντιπροσωπεύει ετερογενούς κλινικής βαρύτητας κατηγορία με κοινό χαρακτηριστικό τη μετάπτωση σε βαρύτερο κλινικό φαινότυπο αργότερα στη ζωή του προσβεβλημένου ατόμου με άλλοτε άλλου βαθμού εξάρτηση από μεταγγίσεις ερυθροκυττάρων και εξωμυελική αιμοποίηση. Ήδη προ της μετάπτωσης στο εξαρτώμενο από μεταγγίσεις στάδιο τα άτομα αυτά παρουσιάζουν, κατά όμοιο με την περίπτωση της μείζονος θαλασσαιμίας τρόπο, αυξημένο κίνδυνο υπερφόρτωσης σιδήρου, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αξιοσημείωτα αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης¹⁵⁰. Η πλειονότητα των ατόμων με ενδιάμεση θαλασσαιμία αποτελούν διπλούς ετεροζυγώτες β-θαλασσαιμικών γονιδίων ή 3 παθολογικών γόνων α-θαλασσαιμίας (ιδέ παρακάτω), μολαταύτα η γενετική βάση της ενδιάμεσης θαλασσαιμίας είναι εξαιρετικά ετερογενής¹⁵¹.

3.5. Φαινοτυπική έκφραση των θαλασσαιμιών αναλόγως του υποκειμένου γενετικού υποβάθρου

Μολονότι η παρουσία πολλαπλών άλλων γόνων εκτός από τα γονίδια ενδιαφέροντος μπορεί να μεταβάλλει σημαντικά τον κλινικό φαινότυπο μιας θαλασσαιμίας, η αντιστοιχία του γενετικού υποβάθρου με την εκάστοτε κλινική έκφραση φαίνεται στους παρακάτω πίνακες¹⁵².

3.5.1 α-θαλασσαιμία

Κατάσταση	Γονότυπος	Παθολογική αιμοσφαιρίνη	Φαινοτυπική έκφραση
Σιωπηλή φορεία	α-/αα	-	Κλινικά κι αιματολογικά κατά φύση
Ετερόζυγος α-θαλασσαιμία	α-/α- ή αα/--	-	Ελάσσων θαλασσαιμία
Αιμοσφαιρινοπάθεια Η	α/--	HbH (β ₄)	Ενδιάμεση θαλασσαιμία
Αιμοσφαιρινοπάθεια Bart's (μείζων α-θαλασσαιμία)	--/--	HbBart's (γ ₄)	Ενδομήτριος θάνατος (εμβρυϊκός ύδρωψ)

Πίνακας 7: Αδρή γενετική και φαινοτυπική έκφραση της α-θαλασσαιμίας

3.5.2. β-θαλασσαιμία

Κατάσταση	Γονότυπος	Παθολογική αιμοσφαιρίνη	Φαινοτυπική έκφραση
Ετερόζυγος β-θαλασσαιμία	β/β^0 ή β/β^+	$\uparrow\text{HbA}_2 \pm \uparrow\text{HbF}$	Ελάσσων θαλασσαιμία
Ενδιάμεση β-θαλασσαιμία	β^0/β^+ ή β^+/β^+ ή $\beta/\beta^{0/+}$ με πολλαπλασιασμό του α-γονιδίου	$\uparrow\text{HbA}_2 \pm \uparrow\text{HbF}$	Ενδιάμεση θαλασσαιμία
Μείζων β-θαλασσαιμία (αναιμία Cooley)	β^0/β^0 ή β^+/β^0	$\uparrow\uparrow\uparrow\text{HbF}$, απουσία ΗβΑ	Ενδομήτριος θάνατος (εμβρυϊκός ύδρωψ)

Πίνακας 8: Αδρή γενετική και φαινοτυπική έκφραση της β-θαλασσαιμίας

3.6. Ετερόζυγος β-θαλασσαιμία

3.6.1. Γενικά στοιχεία

Η ετερόζυγος β-θαλασσαιμία ή ετερόζυγος β-μεσογειακή αναιμία (εβΜΑ) αντιπροσωπεύει την κλινικώς ηπιότερη μορφή β-θαλασσαιμίας και αποτελεί τη συχνότερη κληρονομική διαταραχή της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης στον ελλαδικό χώρο. Σχετίζεται με μικρή ανισορροπία στη σύνθεση των α- και β- αλύσων και συνοδεύεται από συνήθως ηπίου βαθμού αναιμία, οφειλόμενη σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση και ηπίου βαθμού μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση)¹⁵³. Αφ' εαυτής αποτελεί καλοήγη και ασυμπτωματική κατάσταση. Λόγω της χρόνιας αιμόλυσης που καταμαρτυρείται στα αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης που τη χαρακτηρίζουν^{154,155}, συνοδεύεται από ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο λιθιασικής νόσου των χοληφόρων¹⁵⁵. Η παρουσία της σχετίζεται με ευνοϊκότερο προφίλ παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου^{156,157} και πιθανώς προσφέρει κάποιου βαθμού προστασία από καρδιαγγειακά συμβάματα^{158,159}. Το βασικότερο πρόβλημα τόσο σε ατομικό επίπεδο όσο και επίπεδο κοινωνικής υγείας αποτελεί η πιθανότητα απόκτησης απογόνων με μείζονα ή ενδιάμεση β-θαλασσαιμία ή διπλή ετερόζυγη αιμοσφαιρινοπάθεια (λ.χ. β^0/S ή μικρο-δρεπανοκυτταρική αναιμία) από δύο γονείς ετεροζυγώτες για το εκάστοτε χαρακτηριστικό (δεδομένης της

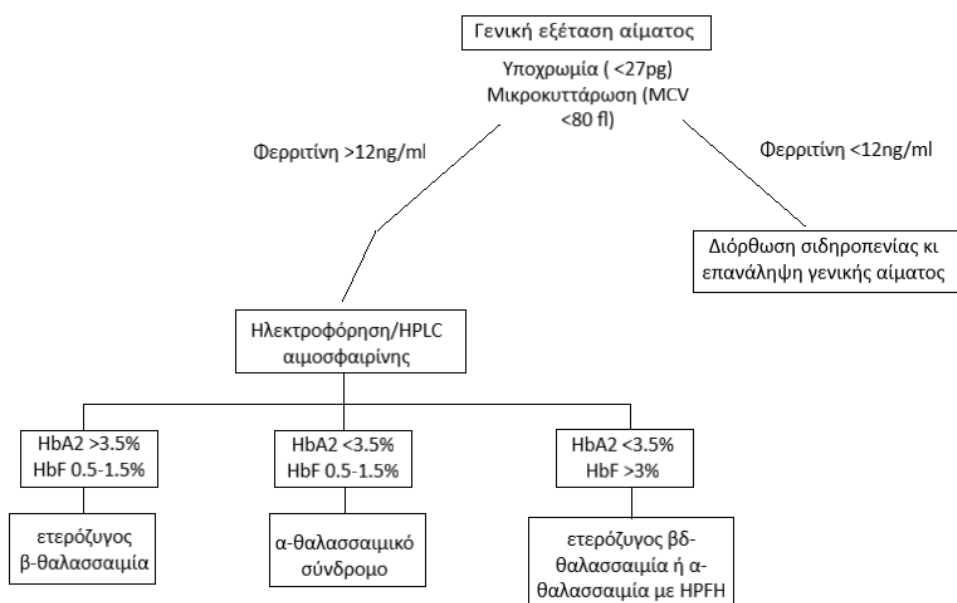
μενδελιανής κληρονομικότητας της εν λόγω μονογονιδιακής κατάστασης, η πιθανότητα αυτή ανέρχεται στο 25% των γεννήσεων). Το γεγονός αυτό επιβάλλει την παρουσία μιας αξιόπιστης και οικονομικής διαγνωστικής μεθόδου διαλογής για την ανίχνευση των ετεροζυγών σε πληθυσμούς με υψηλό επιπολασμό της εβΜΑ.

3.6.2. Διάγνωση της εβΜΑ

Το εργαστηριακό εύρημα της υποχρωμίας με μικροκυττάρωση, ανεξαρτητως από τη συνύπαρξη και το βαθμό της αναιμίας οφείλει να εγείρει την υποψία υποκειμένου ετεροζύγου θαλασσαιμικού συνδρόμου. Επι φυσιολογικών μελετών σιδήρου (σίδηρος και φεριτίνη ορού, σιδηροδεσμευτική ικανότητα, συγκέντρωση και κορεσμός τρανσφερίνης, διαλυτοί υποδοχείς τρανσφερίνης), διαφοροδιαγνωστικό δίλημμα τίθεται μεταξύ της παρουσίας α-ετεροζύγου θαλασσαιμίας και εβΜΑ. Η διάγνωση της εβΜΑ γίνεται με τη διαπίστωση αυξημένου ποσοστού HbA₂ (>3.5% της συνολικής αιμοσφαιρίνης) με ή χωρίς την παρουσία αυξημένης HbF (>1.5% της συνολικής αιμοσφαιρίνης), με μια από τις μεθόδους διαχωρισμού των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων (συνήθως τριχοειδική ηλεκτροφόρηση ή HPLC). Η παρουσία σιδηροπενίας έστω και χωρίς σημαντική αναιμία, εκτός από το ότι αποτελεί αίτιο υπόχρωμης και μικροκυτταρικής αναιμίας δύναται να μειώσει την ευαισθησία της ηλεκτροφόρησης ή HPLC ως εργαλείου διαλογής προκαλώντας μια επίπλαστη μείωση του κλάσματος της HbA₂. Το γεγονός αυτό επιβάλλει τη διόρθωση της σιδηροπενίας πριν τη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων διαχωρισμού των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων¹⁶⁰.

Η παρουσία φυσιολογικών ποσοστών αιμοσφαιρινικών κλασμάτων επί παθολογικώς χαμηλών ερυθροκυτταρικών δεικτών μη αποδιδόμενων σε σιδηροπενία ενισχύει την πιθανότητα της ετεροζύγου α-θαλασσαιμίας ή οποία οφείλει να επιβεβαιωθεί με χαρτογράφηση των γόνων της α-αλύσου στο χρωμόσωμα 16¹⁶¹. Επίσης, περιπτώσεις με ισχυρή προ-αναλυτική υποψία αλλά ηλεκτροφορητικά ευρήματα μη διαγνωστικά της εβΜΑ δύναται να επιβεβαιωθούν με χαρτογράφηση του συμπλέγματος της β-αλύσου στο χρωμόσωμα 11¹⁶².

Ένας αδρός διαγνωστικός αλγόριθμος για τη διαγνωστική προσέγγιση της ετεροζύγου β-μεσογειακής αναιμίας φαίνεται στο κάτωθι σχήμα:



Εικόνα 1: Διαγνωστική προσέγγιση του της υποχρωμίας/μικροκυττάρωσης στη γενική εξέταση αίματος. HbA2: Αιμοσφαιρίνη A2; HbF: Αιμοσφαιρίνη F; HPFH: κληρονομική παραμονή αιμοσφαιρίνης F.

4. Ετερόζυγος β-μεσογειακή αναιμία και HbA1c

Σύμφωνα με όσα ανεπτύχθησαν στο γενικό μέρος, η χρησιμότητα της HbA1c ως μέσο διάγνωσης και παρακολούθησης του ΣΔ επαφίεται στην υπόθεση της σταθερής, φυσιολογικής διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων. Στην οικεία παράγραφο αναφέρθηκε ότι σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων οι τιμές της HbA1c πιθανώς είναι απρόσφορα χαμηλές συναρτήσει των τιμών γλυκόζης των προηγούμενων μηνών, οφειλόμενες στο αυξημένο ποσοστό των κυκλοφορούντων «νεαρών» ερυθροκυττάρων.

Οι Cohen και συνεργάτες κατέδειξαν ότι μικρές διαφοροποιήσεις της διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων σε αιματολογικώς φυσιολογικά άτομα δύνανται να επηρεάσουν σε κλινικά σημαντικό βαθμό τις τιμές της HbA1c. Σε άτομα χωρίς γνωστό αιματολογικό νοσολογικό υπόβαθρο και τιμές εκ της γενικής αίματος εντός φυσιολογικών ορίων οι διαφορές στα επίπεδα της HbA1c μπορεί να ανέρχονται σε 2.5 απόλυτες μονάδες για τα ίδια επίπεδα γλυκαιμίας, τιμές που οπωσδήποτε μπορεί να επηρεάζουν τη διαδικασία

λήψης κλινικών αποφάσεων¹⁶³. Συνεπώς, παρά το γεγονός ότι στην εβΜΑ διαπιστούται μια μόνο ηπίως μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων¹⁵³, αυτή θα μπορούσε να έχει έναν εν δυνάμει σημαντικό αντίκτυπο στα επίπεδα της HbA1c.

Η διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων δεν είναι η μόνη παράμετρος που διαφοροποιείται του φυσιολογικού στα άτομα με εβΜΑ και θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα της HbA1c. Αναλόγως της υποκείμενης γενετικής μετάλλαξης, ποικίλλου βαθμού αυξήσεις της HbF μπορούν να παρατηρηθούν στη εβΜΑ¹⁶⁴. Η αυξημένη HbF μπορεί να επηρεάσει σε αναλυτικό επίπεδο τις τιμές της HbA1c κατά τρόπο ισχυρά εξαρτώμενο από την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη μέθοδο προσδιορισμού¹⁶⁵. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι η πλειονότητα των τρεχόντως χρησιμοποιούμενων μεθόδων επηρεάζονται σε κλινικά σημαντικό βαθμό από αυξήσεις της HbF οι οποίες σπανίως απαντώνται στην εβΜΑ⁸⁵. Αναλυτικό σφάλμα επιπλέον θα μπορούσε να προκύψει με τη χρήση ορισμένων ανοσολογικών μεθόδων προσδιορισμού, λόγω της παρουσίας ήπιας έως μέτριας αναιμίας που συνοδεύει την εβΜΑ⁴⁹.

Επιπλέον, μια σειρά μεταβολικών προσαρμογών που επισυμβαίνουν στα θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα θα μπορούσαν να έχουν αντίκτυπο στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c. Η σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού της γλυκόλυσης και του παρακυκλώματος των φωσφορικών πεντοζών στα β-θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα πιθανώς σηματοδοτεί έναν αυξημένο ρυθμό ενδοκυττάριας εισροής γλυκόζης και συνεπώς αυξημένο δυναμικό γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες¹⁶⁶. Το αυξημένο ενδοκυττάριο οξειδωτικό φορτίο καθώς και τα αντιροπιαστικά αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης, της γλουταθειόνης περοξειδάσης και υπεροξειδικής δισμουτάσης σε ερυθροκύτταρα φορέων β-θαλασσαιμίας¹⁶⁷, μπορεί να αποτελούν παραμέτρους που επηρεάζουν άμεσα την κινητική της αντίδρασης Maillard. Τέλος, στα ερυθροκύτταρα των ατόμων με εβΜΑ έχουν διαπιστωθεί αυξημένες συγκέντρωσεις του 2,3 διφωσφογλυκερινικού οξέος (2,3 DPG)¹⁶⁸. Ο βιολογικός ρόλος του παραπροϊόντος αυτού της βιοχημικής οδού της γλυκόλυσης είναι η μετατόπιση της καμπύλης κορεσμού-αποκορεσμού της αιμοσφαιρίνης προς τα δεξιά, ωστόσο έχει καταδειχθεί ότι το 2,3 DPG αυξάνει το ρυθμό γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης για δεδομένη συγκέντρωση γλυκόζης στο ερυθροκύτταρο¹⁶⁹.

Συνοπτικά το σύνολο των παραμέτρων μέσω των οποίων τα επίπεδα της HbA1c δύνανται να επηρεαστούν στα άτομα με εβΜΑ φαίνεται στον κάτωθι πίνακα:

Παράμετρος	Δείκτης	Παρεμβολή	Αναμενόμενη επίδραση
Μειωμένη διάρκεια ζωής ερυθροκυττάρων	Συγκέντρωση χολερυθρίνης Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης Ποσοστό ΔΕΚ	Βιολογική	↓
↑HbF	%HbF στην ηλεκτροφόρηση	Αναλυτική	↑↓
Αναιμία	Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης	Αναλυτική	↑*
Οξειδοαναγωγικό περιβάλλον ερυθροκυττάρου		Βιολογική	↑↓
↑ 2,3 DPG	Ενδοερυθροκυτταρική συγκέντρωση 2,3 DPG	Βιολογική	↑

Πίνακας 9: Παράμετροι σχετιζόμενες με την εβΜΑ που εν δυνάμει θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c. HbF: αιμοσφαιρίνη F. 2,3 DPG: 2,3 διφωσφογλυκερικό οξύ; *αναφέρεται κυρίως στις χημικές μεθόδους εργαστηριακού προσδιορισμού

4.1. Βραχεία ανασκόπηση της δημοσιευμένης βιβλιογραφίας

Σε επίπεδο κλινικής πράξης είναι σαφές ότι η χρήση της HbA1c θα πρέπει να αποφεύγεται σε περιπτώσεις ομοζύγου β-θαλασσαιμίας. Πρωτίστως η δραματικά μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων και οι τακτικές μεταγίσεις καθιστούν την HbA1c εντελώς μη ενδεικτική της πρόσφατης γλυκαιμίας¹⁷⁰.

Στην περίπτωση της ετεροζύγου β-θαλασσαιμίας, η απάντηση αυτή είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Η αναδίφηση της βιβλιογραφίας αποκαλύπτει πενία ερευνητικών εργασιών σχετικών με αυτό το αντικείμενο. Οι Danesku και συνεργάτες παρουσίασαν την περίπτωση ενός ασθενούς με ΣΔτ2 και εβΜΑ και εξαιρετικά μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (25% του φυσιολογικού) και αναπάντεχα χαμηλή τιμή HbA1c (1.6%)¹⁷¹. Οι Polage και συν, συνέκριναν την απόδοση 5 διαφορετικών αναλυτών στη μέτρηση της HbA1c σε ένα μικρό δείγμα μη-διαβητικών ατόμων (27 με εβΜΑ και 30 άτομα στην ομάδα ελέγχου). Μεταξύ των ομάδων δε διαπιστώθηκαν διαφορές στις τιμές της HbA1c παρά

μόνο ένα θετικό bias στην ομάδα της εβΜΑ με τη χρησιμοποίηση των παλαιότερων ανοσολογικών μεθόδου προσδιορισμού Synchron CX70 και LX20¹⁷². Όμοια ευρήματα ανέφεραν οι Al-Fadhli και συνεργάτες σε ένα δείγμα 81 ατόμων (28 με εβΜΑ) με τη χρήση του Synchron LX20¹⁷³. Επιπλέον, με τη χρήση διαδεδομένης μεθόδου HPLC (Variant II Turbo) οι Ji και συνεργάτες διαπίστωσαν προς τα πάνω απόκλιση μεγαλύτερη της κλινικά σημαντικής τιμής του 0.5% σε 16 από 31 δείγματα ατόμων με β-θαλασσαιμία, χωρίς ωστόσο στη μελέτη αυτή να καθίσταται σαφής ο ακριβής φαινότυπος (εβΜΑ, ενδιάμεση ή μείζων β-θαλασσαιμία) των συμμετεχόντων¹⁷⁴.

Είναι προφανές ότι στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, το ερώτημα της επίδρασης της εβΜΑ στα επίπεδα της HbA1c έχει προσώρας προσεγγιστεί σε μικρούς και ετερογενείς πληθυσμούς, με ελάχιστη έως εντελώς απύσχα προσπάθεια συσχέτισης με τα ιδιαίτερα κλινικά κι εργαστηριακά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθούν δύο ακόμα πρόσφατες ερευνητικές εργασίες επί συναφούς αντικειμένου, οι οποίες δεν αφορούν την εβΜΑ αλλά δύο συναφείς συχνές διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης. Οι Lacy και συνεργάτες, συγκρίνοντας τις τιμές HbA1c, γλυκόζης στη νηστεία και στις 2 ώρες μετά από δοκιμασία από του στόματος ανοχή γλυκόζης μεταξύ αιματολογικών φυσιολογικών (n=4252) και με ετερόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία (n=367) ατόμων διαπίστωσαν μια απόλυτη διαφορά της τάξης του -0.3% στις τιμές της HbA1c, η οποία παρουσίαζε επιπλέον αύξουσα απόλυτη τάση στις υψηλότερες τιμές γλυκόζης. Το γεγονός αυτό είχε σημαντικότερο αντίκτυπο στην πιθανότητα διάγνωσης προδιαβήτη και ΣΔ με τη χρήση της HbA1c ως κριτηρίου (29.2% vs. 48.6% για τον προδιαβήτη και 3.8% vs. 7.3% για τον ΣΔ για τα άτομα με και χωρίς ετερόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία, αντίστοιχα. Δεδομένης της χρήσης μεθόδων προσδιορισμού της HbA1c ελευθέρων από αναλυτική παρεμβολή από την αιμοσφαιρίνη S στη μελέτη, οι συγγραφείς υποθέτουν ότι τα ευρήματα κατά μεγάλο μέρος οφείλονται στην ελαφρώς μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων που απαντώνται στην κατάσταση αυτή¹⁷⁵. Επιπλέον, οι Xu και συνεργάτες αναλύοντας δείγματα από άτομα χωρίς ΣΔ και ποικίλλης βαρύτητας ετεροζυγωτία α-θαλασσαιμίας διεπίστωσαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της HbA1c στα άτομα με 3 παθολογικούς γόνους α-αλύσου (αιμοσφαιρινοπάθεια H) και τιμές αντίστοιχες της ομάδας ελέγχου στα άτομα με 1 ή 2 παθολογικά γονίδια¹⁷⁶.

Δεδομένου του υψηλού επιπολασμού της εβΜΑ στην Ελλάδα, την Κύπρο και λοιπές περιοχές της Μεσογείου, το βιβλιογραφικό κενό αυτό αποκτά προφανή κλινική σημασία, ιδιαίτερα στην περίπτωση που η HbA1c χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό για τον ΣΔ κριτήριο. Η ελληνική διαβητολογική εταιρία (ΕΔΕ) στις κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαχείριση του διαβητικού ασθενούς του 2013¹⁷⁷, αναφέρει:

«Επιπλέον, η διάγνωση του διαβήτη δεν μπορεί να βασιστεί στα επίπεδα της

HbA1c σε ασθενείς με διάφορες μορφές αναιμίας ή σε άτομα με αιμοσφαιρινοπάθειες

(ετεροζυγώτες - ομοζυγώτες), καταστάσεις συχνές στην Ελλάδα»

Μολονότι δε γίνεται ειδική μνεία στην εβΜΑ, η σημασία της από αυτή τη σκοπιά ασφαλώς δεν πρέπει να υποτιμάται δεδομένου ότι αυτή αποτελεί τη συνηθέστερη στον ελλαδικό χώρο κληρονομική διαταραχή της αιμοσφαιρίνης.

Επιπλέον, στην περίπτωση των ατόμων με ήδη διαγνωσμένο ΣΔ, μια κλινικά σημαντική παρεμβολή στις τιμές της HbA1c θα σηματοδοτούσε εσφαλμένη θεραπευτική στοχοθέτηση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνηθεί το κατά πόσον η παρουσία ετεροζύγου β-θαλασαιμίας δύναται να επηρεάσει τις τιμές της HbA1c μεταξύ ατόμων (α) χωρίς σακχαρώδη διαβήτη, τα οποία αποτελούν τον πληθυσμό στον οποίο η HbA1c χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό μέσον και (β) με σακχαρώδη διαβήτη, στα οποία η HbA1c χρησιμεύει για τη θεραπευτική στοχοθέτηση και παρακολούθηση της αντιυπεργλυκαιμικής θεραπείας. Επιπλέον στόχο αποτελεί να συσχετισθούν τυχόν διαπιστωθείσες διαφορές με τα κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων και τα ιδιαίτερα εργαστηριακά ευρήματα που χαρακτηρίζουν την εβΜΑ.

2. Υλικό και μέθοδοι

Η παρούσα διατριβή διαρθρώνεται σε δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους μελέτες οι οποίες θα περιγραφούν ξεχωριστά. Από τη σκοπιά του σχεδιασμού τους αποτελούν συγχρονικές μελέτες παρατήρησης (cross-sectional).

Αμφότερες οι μελέτες διενεργήθηκαν στο ΓΝ «Λαϊκό» σύμφωνα με τις οριζόμενες από τη συνθήκη του Ελσίνκι συνθήκες. Γραπτή συναίνεση συμμετοχής ελήφθη από όλους τους συμμετέχοντες κατόπιν ενημέρωσης και παροχής χρόνου για ανοικτές ερωτήσεις από την πλευρά των συμμετεχόντων. Οι μελέτες ενεκρίθησαν από το επιστημονικό συμβούλιο του ΓΝ «Λαϊκό» (Αρ. Έγκρισης 3/2-2-16).

2.1. Μελέτη 1: άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη

Εξετάστηκαν δύο ομάδες ατόμων χωρίς σακχαρώδη διαβήτη, μία αποτελούμενη από άτομα με εβΜΑ και μία από υγιείς εθελοντές (ομάδα ελέγχου). Ο πληθυσμός της μελέτης συνελλέχθη από 2 κέντρα του Γ.Ν. «Λαϊκό».

- 1) Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική (Α'ΠΠΚ): από τα εξωτερικά παθολογικό, διαβητολογικό ιατρείο και το εξωτερικό ιατρείο παχυσαρκίας της Α'ΠΠΚ. Επιπλέον

από τους εργαζόμενους και φοιτητές ιατρικής και νοσηλευτικής της Α'ΠΠΚ κατόπιν κατάλληλης ενημέρωσης.

- 2) Από το κέντρο αναφοράς Θαλασσαιμίας και Δρεπανοκυτταρικής νόσου του Γ.Ν. «Λαϊκό» (Σεβαστουπόλεως 16, Αμπελόκηποι. Διευθύντρια: κα Έρση Βοσκαρίδου, Διευθύντρια Ε.Σ.Υ.). Αποτελεί κέντρο αναφοράς για τη διάγνωση θαλασσαιμιών και αιμοσφαιρινοπαθειών. Το δείγμα συνελέχθη από τους προσερχόμενους για προγεννητική διάγνωση αιμοσφαιρινοπαθειών.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν τα κάτωθι:

- Ηλικία <18 ή >65 ετών
- Κάθε νοσηλεία ή εθελοντική αιμοδοσία κατά τους τελευταίους 4 μήνες
- Σιδηροπενία προκαλούσα αναιμία ή (στην ομάδα ελέγχου) παθολογικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες
- Ιστορικό από του στόματος ή ενδοφλέβιας σιδηροθεραπείας κατά τους τελευταίους 4 μήνες
- Κάθε οξεία ή χρόνια αιμολυτική κατάσταση
- Κύηση κάθε ηλικίας και οι 4 πρώτοι μήνες της λοχείας
- Χρόνια νεφρική νόσος σταδίου III (υπολογιζόμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης [eGFR] <60 ml/min/1.73m²) ή πλέον προχωρημένου
- Οποιαδήποτε αιμοσφαιρινοπάθεια (S, C, κτλ), άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα (α-θαλασσαιμία, ομόζυγος β-θαλασσαιμία) και παθολογικά αυξημένη HbF (>10%)
- Μείζονες συν-νοσηρότητες (κακοήθειες, καρδιακή ανεπάρκεια κλινικού σταδίου NYHA ≥II , χρόνιες υποξαιμικές νόσοι, χρόνια ηπατική νόσος, χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι)
- Κάθε άλλη κατάσταση μη αναφερόμενη ανωτέρω που θα μπορούσε εν δυνάμει να επηρεάσει την αιμοποίηση ή/και τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων

2.2. Μελέτη 2: άτομα με σακχαρώδη διαβήτη

Εξετάστηκαν δύο ομάδες ατόμων με ΣΔ (τύπου 1 και 2), μία αποτελούμενη από άτομα με εβΜΑ και μία από αιματολογικώς υγιείς εθελοντές (ομάδα ελέγχου). Ο πληθυσμός της μελέτης συγκεντρώθηκε από το εξωτερικό διαβητολογικό ιατρείο και το ιατρείο αντλιών ινσουλίνης της Α'ΠΠΚ.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν τα κάτωθι:

- Κάθε νοσηλεία ή εθελοντική αιμοδοσία κατά τους τελευταίους 4 μήνες
- Σιδηροπενία προκαλούσα αναιμία ή (στην ομάδα ελέγχου) παθολογικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες
- Ιστορικό από του στόματος ή ενδοφλέβιας σιδηροθεραπείας κατά τους τελευταίους 4 μήνες
- Κάθε οξεία ή χρόνια αιμολυτική κατάσταση
- Κύηση κάθε ηλικίας και οι 4 πρώτοι μήνες της λοχείας
- Χρόνια νεφρική νόσος σταδίου IIIb (υπολογιζόμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης [eGFR] <45 ml/min/1.73m²) ή πλέον προχωρημένου
- Οποιαδήποτε αιμοσφαιρινοπάθεια (S, C, κτλ), άλλα θαλασσαιμικά σύνδρομα (α-θαλασσαιμία, ομόζυγος β-θαλασσαιμία) και παθολογικά αυξημένη HbF (>10%)
- Μείζονες συν-νοσηρότητες (κακοήθειες, καρδιακή ανεπάρκεια κλινικού σταδίου NYHA ≥II, χρόνιες υποξαιμικές νόσοι, χρόνια ηπατική νόσος, χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι)
- Κάθε άλλη κατάσταση μη αναφερόμενη ανωτέρω που θα μπορούσε εν δυνάμει να επηρεάσει την αιμοποίηση ή/και τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων
- Πρόσφατη (κατά τους τελευταίους 3 μήνες) μεταβολή στο αντιυπεργλυκαιμικό θεραπευτικό σχήμα

2.3. Διαδικασίες μελέτης

Κατόπιν της συναίνεσης κι ένταξης στη μελέτη, γινόταν στοχευμένη λήψη ιστορικού και καταγραφή των σωματομετρικών στοιχείων (ύψος, βάρος). Από όλους τους εθελοντές ελήφθη δείγμα 20ml φλεβικού αίματος μετά από 10ωρη τουλάχιστον ολονύκτια νηστεία. Σε περίπτωση που το κριτήριο της νηστείας δεν πληροίτο κατά την ενημέρωση και ένταξη του συμμετέχοντα, κανονίστηκε μια δεύτερη προσέλευση σε κατάσταση νηστείας.

Από το δείγμα αίματος, εξασφαλίστηκαν 3 φιαλίδια 2ml ολικού αίματος με EDTA προς διενέργεια γενικής εξέτασης αίματος (και αριθμού δικτυοερυθροκυττάρων – ΔΕΚ στη

μελέτη 2), μέτρησης HbA1c (ιδέ παρακάτω) και ηλεκτροφόρησης αιμοσφαιρίνης (ιδέ παρακάτω). Το υπόλοιπο δείγμα κατανέμετο σε 2 φιαλίδια με γέλη (φιαλίδια πήγματος, Alchem Diagnostics/BioPro Serum Collection Tube). Μετά από αναμονή 15 λεπτών για την κατάλληλη πήξη των δειγμάτων, διενεργείτο φυγοκέντρηση (4000 RPM σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά). Ακολούθως συνελέγετο ο ορός ο οποίος χρησιμοποιείτο για τη διενέργεια βασικού βιοχημικού ελέγχου (Γλυκόζης νηστείας, κρεατινίνης, αλβουμίνης, φερριτίνης, υψηλής ευαισθησίας-hsCRP, στη μελέτη 2 επιπλέον χολερυθρίνης) και για τη μέτρηση της φρουκτοζαμίνης ορού. Η υπόλοιπη ποσότητα ορού ετίθετο προς φύλαξη στους -80°C σε φιαλίδια τύπου Eppendorf.

Στη μελέτη 2 ελήφθη επιπλέον δείγμα ούρων τυχαίας ούρησης για τον προσδιορισμό του λόγου αλβουμίνης προς κρεατινίνη ούρων (ACR).

2.4. Διάγνωση της εβΜΑ

Σε όλους τους συμμετέχοντες διενεργήθη διαχωρισμός των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων σε αιμολυμένο δείγμα ολικού αίματος με μέθοδο HPLC (VARIANT™ II Turbo, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA¹⁷⁸). Κατ' αυτό τον τρόπο εξασφαλίστηκε η ποσοτικοποίηση των HbA2 και HbF στους συμμετέχοντες ενώ αποκλείστηκε η παρουσία λοιπών κληρονομικών διαταραχών της αιμοσφαιρίνης. Η διάγνωση της εβΜΑ βασίστηκε στην παρουσία τιμής HbA2 $\geq 3.5\%$ της συνολικής αιμοσφαιρίνης, επί σύγχρονης παρουσίας υποχρωμίας (MCH $< 27\text{pg}$ και μικροκυττάρωσης MCV $< 80\text{fl}$)¹⁶².

2.5. Μέτρηση της HbA1c

Σε αμφότερες τις μελέτες, μετρήσεις της HbA1c διενεργήθησαν με μέθοδο ανοσοθολοσομετρίας (2nd Generation Tina-quant® TINIA, CV $< 2\%$, F. Hoffman-La Roche AG, Basel, Switzerland¹⁷⁹). Στη δεύτερη μελέτη διενεργήθη επιπροσθέτως μέτρηση της HbA1c με μέθοδο HPLC (VARIANT™ II Turbo, CV 1.6%, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA¹⁷⁸), από την οποία αντλήθηκαν επιπλέον οι τιμές του κλάσματος ασταθούς HbA1c κλάσματος (La1c).

2.6. Λοιπές μετρήσεις

Η γλυκόζη νηστείας και η φρουκτοζαμίνη ορού χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες της γλυκαιμίας, καθόσον παραμένουν ανεπηρρέαστες από τυχόν διαταραχές της σύνθεσης ή/και επιβίωσης των ερυθροκυττάρων. Η φερριτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των σιδηραποθηκών προς διάγνωση τυχόν σιδηροπενίας και επιπλέον εξασφάλιση της ευαισθησίας της HPLC για την ποσοτικοποίηση της HbA2. Η κρεατινίνη χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της νεφρικής λειτουργίας των συμμετεχόντων, μέσω του υπολογισμού του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (eGFR) διά της εξίσωσης της Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)¹⁸⁰.

2.7. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (Statistical Package for Social Sciences version 24.0, IBM Corporation, Armonk, New York). Για τη διαπίστωση διαφορών σε κατηγορικές μεταβλητές μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Όλες οι συνεχείς μεταβλητές ελέχθησαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Αναφορικά με την περιγραφική στατιστική οι κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση και οι μη κανονικά κατανεμημένες ως διάμεση τιμή [25, 75 ενδοτεταρτημοριακό εύρος]. Για συγκρίσεις κανονικά κατανεμημένων μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το Student's T-test ή ανάλυση διασποράς (ANOVA) ενώ για μη κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές οι μη παραμετρικές δοκιμασίες Mann-Whitney και Kruskal-Wallis. Για διαστρωμάτωση των μέσων τιμών ως προς συγχυτικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκε ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA). Πολυπαραγοντική γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ύπαρξης και ανεξαρτησίας συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων.

Διενεργήθη a priori ανάλυση ισχύος (power analysis) η οποία κατέδειξε ότι για την ανάδειξη μιας απόλυτης διαφοράς 0.3% στις τιμές της HbA1c μεταξύ των ομάδων στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% με ισχύ 95% απαιτείτο δείγμα 36 ατόμων (18 σε έκαστη ομάδα). Απεφασίσθη η συγκομιδή δείγματος μεγέθους 70-100 ατόμων ανά ομάδα ανά μελέτη έτσι ώστε να είναι εφικτή η πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης.

3. Αποτελέσματα

Παρατίθενται για κάθε μελέτη ξεχωριστά

3.1. Αποτελέσματα Μελέτης 1 – Άτομα χωρίς ΣΔ

3.1.1. Πληθυσμός της μελέτης

Στο σύνολο εξετάστηκαν 233 άτομα. 33 εθελοντές αποκλείστηκαν κατόπιν της ένταξής τους στη μελέτη, λόγω της διαπίστωσης της παρουσίας κριτηρίων αποκλεισμού (19 λόγω σιωπηλής φορείας ή ετεροζύγου α-θαλασσαιμίας, 2 λόγω εξαιρετικά αυξημένης HbF [$>10\%$], 2 λόγω της παρουσίας αιμοσφαιρινοπάθειας Lepore/Pylos, 4 λόγω σοβαρής σιδηροπενικής αναιμίας ή σιδηροπενίας με επηρεασμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες, 1 λόγω εθελοντικής αιμοδοσίας προ 10 ημερών, 4 λόγω αναιμίας ασαφούς αιτιολογίας και 1 λόγω μεταλλικής αορτικής βαλβίδας, δυνάμενης να αποτελεί εστία αιμόλυσης). Τελικώς 200 συμμετέχοντες (100 με εβΜΑ και 100 χωρίς) συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση.

Αναφορικά με την προέλευση του πληθυσμού, η συμβολή των εξωτερικών ιατρείων της Α΄ΠΠΚ (κέντρο 1) και του κέντρου αναφοράς πρόληψης θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής νόσου (κέντρο 2) παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

	Κέντρο 1	Κέντρο 2	Σύνολο
Αριθμός ατόμων	99	101	200
εβΜΑ (Ναι/Όχι)	51/48	49/52	100/100
Ηλικία (Έτη)	32.2±9.7	32.3±5.4	32.3±7.8
Φύλο (Α/Θ)	34/65	58/43	92/108

Πίνακας 10: Σχετική συμβολή των 2 κέντρων της μελέτης επί του συνολικού πληθυσμού της

Δε διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ των 2 κέντρων στον αριθμό των αποκλεισμένων ατόμων (18 vs. 15, $p=0.752$).

Οι δύο ομάδες ήταν συγκρίσιμες αναφορικά με τα δημογραφικά και κλινικά τους χαρακτηριστικά:

	Ομάδα Α (n=100)	Ομάδα Β (n=100)	P
Ηλικία (έτη)	32.5±8.0	32.0±7.6	0.640
Φύλο (Άρρενες, n[%])	45 (45.0)	47(47.0)	0.777
ΔΜΣ (kg/m ²)	25.1±4.0	24.5±3.9	0.290
Κάπνισμα [#] (Ναί, %)	22 (22)	22 (22)	1.000
Οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (Ναί, %)	24 (24)	23 (23)	0.868

Πίνακας 11: Σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 2 ομάδων

[#]Τρέχουσα καπνιστική συνήθεια ή διακοπή εντός του τελευταίου 3μήνου

Ομάδα Α: εβΜΑ, ομάδα Β: ομάδα ελέγχου, ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

3.1.2. HbA1c, φρουκτοζαμίνη και λοιπές εργαστηριακές παράμετροι

Οι μέσες τιμές της HbA1c ήταν σχεδόν πανομοιότυπες στις 2 ομάδες (5.23±0.30% vs. 5.22±0.25%, p=0.857). Οι τιμές της γλυκόζης νηστείας, φρουκτοζαμίνης, φερριτίνης και hsCRP δε διέφεραν μεταξύ των ομάδων ενώ η συγκέντρωση κρεατινίνης ορού και το eGFR ευρέθησαν μειωμένα στην ομάδα της εβΜΑ. Αναμενόμενα, η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ευρέθη σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα της εβΜΑ. Ομοίως, οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες (μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης-MCH και μέσος όγκος ερυθρών-MCV), και τα ποσοστά των αιμοσφαιρινών HbA2 και HbF διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Οι σημαντικότερες εργαστηριακές παράμετροι παρουσιάζονται συγκριτικά στον παρακάτω πίνακα.

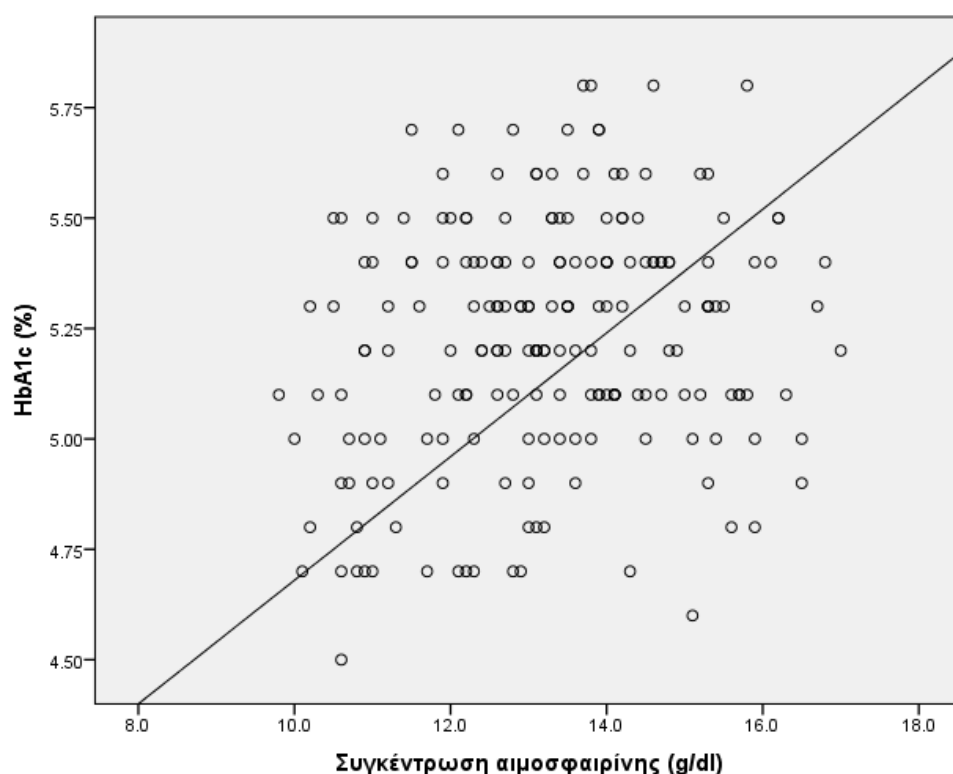
	Ομάδα Α (n=100)	Ομάδα Β (n=100)	P
HbA1c (%)	5.23±0.30	5.22±0.25	0.857
Γλυκόζη Νηστείας (mg/dl)	86.8±9.3	87.8±7.6	0.375
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	221.2±17.2	221.8±17.4	0.798
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	12.3±1.3	14.2±1.3	<0.001
MCV (fl)	63.8±4.9	86.3±3.3	<0.001
MCH (pg)	20.6±1.6	29.3±1.2	<0.001
MCHC (g/dl)	32.3±0.7	33.9±1.0	<0.001
HbA2 (%)	5.0 (4.6-5.4)	2.7 (2.6-2.8)	<0.001
HbF (%)	1.0 (0.5-1.2)	0.3 (0.2-0.65)	<0.001
Creatinine	0.73±0.15	0.79±0.16	0.005

(mg/dl)			
eGFR (ml/min)	104.7±27.2	95.2±23.1	0.009
hsCRP# (mg/l)	0.95 (0.43-1.78)	0.8 (0.3-1.7)	0.345
Ferritin (pmol/L)	72.0 (35.5-137.8)	55 (29.5-126.3)	0.183

Πίνακας 12: Συγκριτική παρουσίαση των εργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος μεταξύ των 2 ομάδων. eGFR: Εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης, MCV: Μέσος όγκος ερυθρών, MCH Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης, MCHC: Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης

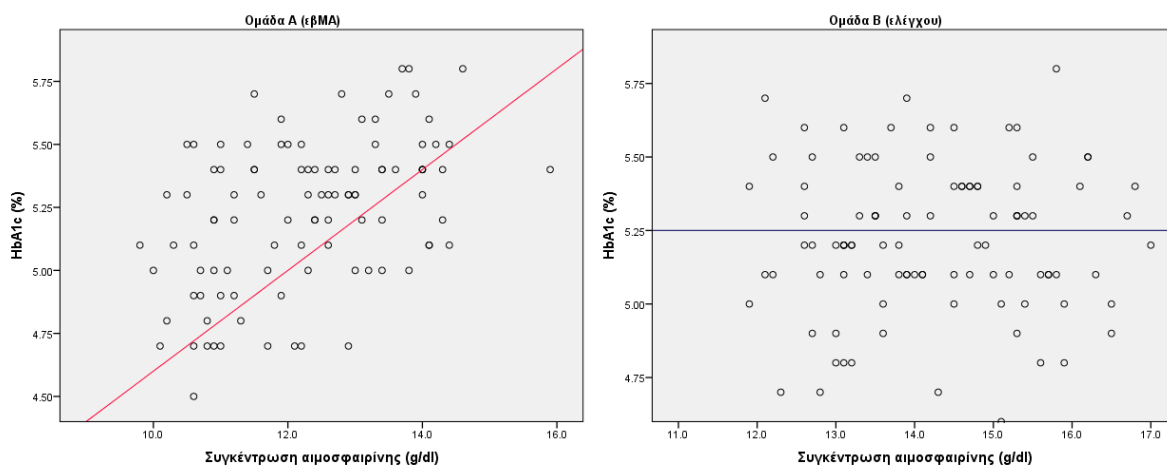
3.1.3. Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αναιμία και HbA1c

Εφόσον ο ρυθμός ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων, όπως αντικατοπτρίζεται στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στα επίπεδα της HbA1c¹⁸¹, διερευνήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης. Στο σύνολο του δείγματος διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της HbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ($r= 0.200$, $p=0.004$) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Διάγραμμα διασποράς (απλή γραμμική παλινδρόμηση) μεταξύ της HbA1c και της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης

Σε ανάλυση παλινδρόμησης εντός έκαστης ομάδας ξεχωριστά, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της HbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στην ομάδα της εβΜΑ ($r = 0.455$, $p < 0.001$). Αντίστοιχη συσχέτιση δε διαπιστώθηκε στην ομάδα ελέγχου ($r = 0.024$, $p = 0.815$) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διάγραμμα διασποράς (απλή γραμμική παλινδρόμηση) μεταξύ της HbA1c και της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης στην ομάδα Α ($r = 0.455$, $p < 0.001$) και στην ομάδα Β ($r = 0.815$, $p = 0.815$).

Μετά από τη διαπίστωση της θετικής συσχέτισης μεταξύ αιμοσφαιρίνης και HbA1c, η ομάδα Α χωρίστηκε σε δύο υποομάδες με βάση την παρουσία ή όχι αναιμίας (Ομάδα Α1, άτομα χωρίς αναιμία, $n=47$ και ομάδα Α2, άτομα με αναιμία, $n=53$). Για το χαρακτηρισμό της αναιμίας χρησιμοποιήθηκε ο ορισμός του ΠΟΥ (συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης < 12 g/dl για τα θήλεα και < 13 g/dl για τα άρρενα άτομα¹⁸²). Αναιμία δε διαπιστώθηκε σε κανέναν από τους συμμετέχοντες στην ομάδα Β. Η HbA1c διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων Α1, Α2 και Β (p για την τάση < 0.001) (πίνακας 13, εικόνα 4). Σε ανάλυση post-hoc η HbA1c βρέθηκε υψηλότερη στην ομάδα Α2 σε σχέση με την Α1 (5.34 ± 0.24 vs. 5.12 ± 0.20 , $p < 0.001$), όπως επίσης και τη Β (5.34 ± 0.24 vs. 5.22 ± 0.25 , $p = 0.022$), ενώ υπήρχε τάση προς σημαντική διαφορά μεταξύ των Α1 και Β (5.12 ± 0.20 vs. 5.22 ± 0.25 , $p = 0.087$). Υπήρχαν σημαντικά περισσότεροι άρρενες στην ομάδα Α1 και θήλεις στην ομάδα Α2. Οι τιμές κρεατινίνης και HbF επίσης διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Μολαταύτα, η διαφορά στην HbA1c μεταξύ των ομάδων παρέμεινε σημαντική ακόμα και μετά από διόρθωση ως προς φύλο,

ΔΜΣ, γλυκόζη νηστείας, κρεατινίνη και HbF (πίνακας 13). Δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα λοιπά κλινικά κι εργαστηριακά χαρακτηριστικά μεταξύ των ομάδων.

	Ομάδα A1	Ομάδα A2	Ομάδα B	P (τάση)
n	53	47	100	
HbA1c (%)	5.12±0.20*	5.34±0.24* [‡]	5.22±0.25 [‡]	<0.001
Διορθωμένη HbA1c (%) ^a	5.15±0.24*	5.34±0.25* [‡]	5.18±0.29 [‡]	0.001
Φύλο (άρρηνες/θήλειες)	14/39* [#]	31/16* [‡]	47/53 ^{#‡}	<0.001
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	11.3±0.8* [#]	13.4±0.8* [‡]	14.2±1.3 ^{#‡}	<0.001
Age (years)	32.9±7.9	32.1±8.3	32.0±7.6	0.778
ΔΜΣ (kg/m ²)	24.4±3.8	25.9±4.3	24.5±2.9	0.116
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	84.6±10.6	88.0±11.1	87.8±7.6	0.087
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.68±0.12* [#]	0.78±0.16*	0.79±0.16 [#]	<0.001
HbF (%)	1.52±1.54 [#]	1.03±1.00 [‡]	0.51±0.36 ^{#‡}	<0.001
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	220.2±19.1	222.5±15.0	221.9±17.4	0.775

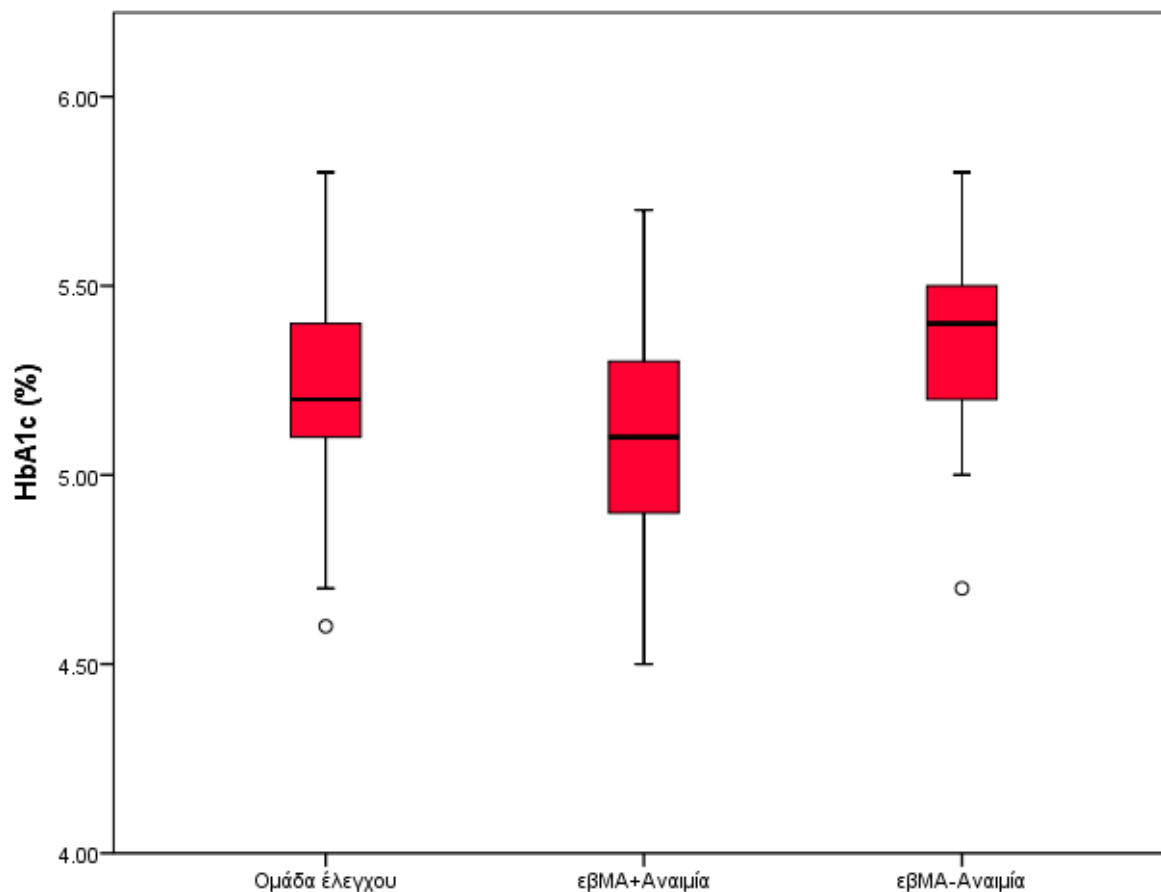
Πίνακας 13: Σύγκριση της HbA1c και πιθανών συγχυτικών παραγόντων μεταξύ των ατόμων με εβΜΑ με και χωρίς αναιμία (ομάδες A1 και A2, αντίστοιχα) και της ομάδας ελέγχου (ομάδα B).

^aΜέση HbA1c διορθωμένη ως προς φύλο, ΔΜΣ, Γλυκόζη νηστείας, Κρεατινίνη ορού και HbF(%)

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ A1 και A2 (p<0.001 για HbA_{1c}, p<0.001 για Αιμοσφαιρίνη, p=0.002 για κρεατινίνη, p<0.001 για συσταση ως προς φύλο)

[#]Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ A1 και B (p<0.001 για Αιμοσφαιρίνη, p=0.001 για κρεατινίνη, p=0.010 για συσταση ως προς φύλο, p<0.001 για HbF)

[‡]Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ A2 και B (p=0.022 για HbA_{1c}, p<0.001 για αιμοσφαιρίνη, p=0.036 για HbF, p=0.024 για σύσταση ως προς φύλο)



Εικόνα 4: Θηκόγραμμα (boxplot) των τιμών της HbA1c μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδα με εβΜΑ και αναιμία και της ομάδας με εβΜΑ χωρίς αναιμία.

Για την αξιολόγηση του μεγέθους της επίδρασης (effect size) υπολογίστηκαν οι δείκτες Cohen's d (μεταξύ A1 και A2) και Hedge's g (μεταξύ A1 και B και A2 και B), λόγω της ανομοιότητας του μεγέθους των δειγμάτων. Μεταξύ A1 και A2 διαπιστώθηκε μεγάλο (0.84, >0.8), μεταξύ A2 και B μέτριο (0.6056 >0.5) και μεταξύ A1 και B μικρό (0.253681 >0.2) μέγεθος επίδρασης.

3.1.4. Συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με την παρουσία εβΜΑ και άλλες παραμέτρους

Διενεργήθη μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης στο σύνολο του δείγματος με την τιμή της HbA1c ως εξαρτημένη μεταβλητή και μία ποικιλία κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος ως ανεξάρτητες. Οι εκάστοτε κατά Pearson συντελεστές συσχέτισης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Μεταβλητή	r (Pearson correlation coefficient)	P
Ηλικία (έτη)	0.253	<0.001*
Φύλο (θήλυ)	-0.182	0.010*
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.387	<0.001*
Κάπνισμα (ναί)	0.036	0.609
1 ^{ου} βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.223	0.002*
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.196	0.006*
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.273	<0.001
eGFR (ml/min)	-0.326	<0.001*
Φερριτίνη (ng/dl)	0.047	0.512
Σιδηροπενία (ναί) [#]	-0.032	0.657
hsCRP (mg/L)	0.023	0.749
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	-0.124	0.081
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.030	0.670
HbA2 (%)	0.022	0.785
HbF (%)	-0.223	0.005*
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.200	0.004*
εβΜΑ (ναι)	0.013	0.857*

Πίνακας 14: Μονοπαραγοντική ανάλυση (απλή γραμμική παλινδρόμηση) μεταξύ της HbA1c και κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος. Με αστερίσκο (*) επισημαίνονται οι παράμετροι που συμπεριλήφθηκαν σε μετέπειτα πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης. Ο εκτιμώμενος eGFR προτιμήθηκε της φερριτίνης λόγω μεγαλύτερου συντελεστή συσχέτισης.

[#]Ορίστηκε κατά ΠΟΥ ως τιμή φερριτίνης <12 ng/ml

Ακολούθως, για όσες μεταβλητές ανεδείχθη σημαντική συσχέτιση εισήχθησαν σε πολυπαραγοντικό μοντέλο παλινδρόμησης, όπου επιπροσθέτως εισήχθη η παρουσία της εβΜΑ ως διχοτομούμενη ψευδομεταβλητή, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ανεξαρτησία των επιμέρους συσχετίσεων. Δημιουργήθηκαν 3 μοντέλα, ένα χωρίς την εισαγωγή της αιμοσφαιρίνης και της HbF έτσι ώστε να εκτιμηθεί συνολικά η επίδραση της εβΜΑ, ένα με την παρουσία της αιμοσφαιρίνης έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της εβΜΑ ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα της αναιμίας και ένα με την παρουσία τόσο της αιμοσφαιρίνης όσο και

της HbF για να ελεγχθεί η επίδραση των λοιπών διαφοροποιημένων χαρακτηριστικών της εβΜΑ (ιδε σχετικό πίνακα στην εισαγωγή).

Πιν. 15^A: Μοντέλο 1 (R=0.506)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.051	0.463
Φύλο (θήλυ)	0.120	0.167
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.303	<0.001
1ου βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.201	0.002
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.079	0.225
eGFR (ml/min)	-0.265	0.003
εβΜΑ (ναί)	0.038	0.561

Πιν. 15^B: Μοντέλο 2 (R=0.522)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.057	0.406
Φύλο (θήλυ)	0.237	0.022
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.302	<0.001
1ου βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.195	0.002
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.067	0.299
eGFR (ml/min)	-0.239	0.008
εβΜΑ (ναί)	0.171	0.061
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.235	0.039

Πιν 15^f: Μοντέλο 3 (R=0.606)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.054	0.456
Φύλο (θήλυ)	0.320	0.008
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.284	<0.001
1ου βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.204	0.003
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.053	0.449
eGFR (ml/min)	-0.309	0.002
εβΜΑ (ναι)	0.346	<0.001
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.343	0.008
HbF (%)	-0.183	0.012

Πίνακας 15(A, B, Γ): Πολυπαραγοντική ανάλυση με τις παραμέτρους που προβλέπουν τα επίπεδα της HbA1 χωρίς τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και HbF% (A), με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (B), με αμφότερες (Γ).

Σε όλα τα μοντέλα, ο ΔΜΣ, το θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 και ο eGFR προέβλεπαν σημαντικά και ανεξάρτητα το επίπεδο της HbA1c. Η παρουσία της εβΜΑ αφ' εαυτής δεν εμφάνιζε σημαντική συσχέτιση με την HbA1c (μοντέλο 1). Λαμβάνοντας υπ' όψη την επίδραση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης η εβΜΑ παρουσίαζε ροπή προς τη θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της HbA1c (μοντέλο 2) ενώ με την επιπρόσθετη εισαγωγή της HbF ως προβλεπτικής παραμέτρου, η παρουσία της εβΜΑ παρουσίαζε θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της HbA1c (μοντέλο 3).

3.1.5. HbA1c, ερυθροκυτταρικοί δείκτες και λοιπές παράμετροι

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης των ερυθροκυτταρικών δεικτών (MCV, MCH) και του δείκτη κατανομής των ερυθροκυττάρων (Red Cell Distribution Width – RDW), διενεργήθη πολυπαραγοντική ανάλυση εντός κάθε ομάδας ξεχωριστά, με στόχο τη δημιουργία 4 μοντέλων (όλα διορθωμένα ως προς ηλικία, φύλο και κρεατινίνη ορού) με παραμέτρους που αφορούν: 1) τη γλυκαιμία (γλυκόζη νηστείας, φρουκτοζαμίνη, ΔΜΣ, οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2, 2) τη φλεγμονή (hsCRP, αλβουμίνη, φερριτίνη), 3) την αιμοποίηση

(αιμοσφαιρίνη, MCV, MCH, RDW, φερριτίνη) και 4) όλα τα παραπάνω. Τα ευρήματα παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες

Πιν. 16^Α: Μοντέλο 1 (παράμετροι σχετιζόμενες με τη γλυκαιμία)

Μεταβλητή	Beta	P	Beta	P
	εβΜΑ		Ομάδα ελέγχου	
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	-0.007	0.940	0.150	0.115
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	-0.070	0.441	-0.067	0.552
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.299	0.007	0.258	0.038
1ου βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.271	0.004	0.128	0.185

Πιν. 16^Β: Μοντέλο 2 (παράμετροι σχετιζόμενες με τη φλεγμονή)

Μεταβλητή	Beta	P	Beta	P
	εβΜΑ		Ομάδα ελέγχου	
hsCRP (mg/L)	-0.011	0.910	0.090	0.362
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.140	0.197	0.084	0.424
Φερριτίνη (ng/ml)	-0.041	0.726	-0.292	0.016

Πιν. 16^Γ: Μοντέλο 3 (αιματολογικές παράμετροι)

Μεταβλητή	Beta	P	Beta	P
	εβΜΑ		Ομάδα ελέγχου	
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.566	0.001	0.108	0.491
Φερριτίνη (ng/ml)	0.001	0.995	-0.170	0.151
MCV (fl)	0.949	0.006	0.089	0.547
MCH (pg)	-1.008	0.004	-0.215	0.186
RDW (%)	0.012	0.909	0.198	0.102

Πιν. 16^Δ: Μοντέλο 4 (όλες οι παράμετροι, μέθοδος προοδευτικού αποκλεισμού μεταβλητών)

Μεταβλητή	Beta	P	Μεταβλητή	Beta	P
	εβΜΑ		Ομάδα ελέγχου		
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.499	0.001	Γλυκόζη (mg/dl)	0.230	0.013
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.304	0.003	ΔΜΣ (kg/m ²)	0.217	0.026
MCH	-0.657	0.045	Φερριτίνη (ng/ml)	-0.177	0.095
MCV	0.616	0.048	RDW (%)	0.301	0.002
1ου βαθμού οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2 (ναί)	0.253	0.003			

Πίνακας 16 (Α, Β, Γ, Δ): Πολυπαραγοντική ανάλυση μεταξύ της HbA1c εντός έκαστης ομάδας. Λόγω του πλήθους των μεταβλητών στο 4ο μοντέλο η παλινδρόμηση έγινε με τη μέθοδο του προοδευτικού αποκλεισμού μεταβλητών (backwards regression).

3.2. Αποτελέσματα Μελέτης 2 – Άτομα με ΣΔ

3.2.1. Πληθυσμός της μελέτης

Εξετάστηκαν συνολικά 165 άτομα με ΣΔ. Μετά από τον αποκλεισμό 18 ατόμων λόγω της παρουσίας κριτηρίων αποκλεισμού (11 λόγω ετεροζύγου α-μεσογειακής αναιμίας, 1 λόγω οξείας νόσησης, 1 λόγω πρόσφατης αλλαγής του αντιυπεργλυκαιμικού θεραπευτικού σχήματος, 2 λόγω αναιμίας ασαφούς αιτιολογίας, 1 λόγω βαρείας σιδηροπενικής αναιμίας και 2 λόγω αιμοσφαιρινοπάθειας *Lepore*), τα δεδομένα από 148 συμμετέχοντες (77 με εΒΜΑ και 71 στην ομάδα ελέγχου) συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση.

Οι δύο ομάδες ήταν συγκρίσιμες ως προς τα βασικά κλινικά και δημογραφικά τους χαρακτηριστικά (Πίνακας 17):

	Ομάδα Α (n=77)	Ομάδα Β (n=71)	P
Ηλικία (έτη)	57.8±15.5	55.5±16.3	0.393
Φύλο (Άρρενες, n[%])	43 (55.8)	32 (45.0)	0.190
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ2, %)	50 (64.9)	45 (64.3)	0.934
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	15.0 [6.0, 25.75]	15.5 [8.0, 20.25]	0.409
ΔΜΣ (kg/m ²)	30.6±6.9	29.1±5.4	0.164
Κάπνισμα [#] (Ναί, %)	15 (19.5)	20 (28.2)	0.217
Μίκροαγγειοπάθεια (ναι, %)	36 (46.8)	32 (45.1)	0.699
Μάκροαγγειοπάθεια (ναι, %)	16 (20.8)	13 (18.3)	0.401

Πίνακας 17: Σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 2 ομάδων

[#]Τρέχουσα καπνιστική συνήθεια ή διακοπή εντός του τελευταίου 3μήνου

Ομάδα Α: εΒΜΑ, ομάδα Β: ομάδα ελέγχου, ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

Επιπλέον, οι υποπληθυσμοί των συμμετεχόντων με ΣΔτ1 και ΣΔτ2 μεταξύ των ομάδων ήταν συγκρίσιμοι ως προς τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά τους, όπως επίσης ως προς την παρουσία χρόνιων επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη και τον τύπου της λαμβανόμενης θεραπείας (Πίνακας 18):

	ΣΔτ1 (v= 52)		P	ΣΔτ2 (v= 96)		P
	Ομάδα Α (v=27)	Ομάδα Β (v=25)		Ομάδα Α (v=50)	Ομάδα Β (v=46)	
Ηλικία (έτη)	44.2±13.7	41.1±15	0.454	65.0±11.0	63.7±10.4	0.548
Φύλο (Άρρενες, ν[%])	16	10	0.165	27	21	0.475
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	22.5 [6.5, 30.8]	18.0 [13.0, 24.0]	0.798	14.5 [6.0, 22.0]	11.0 [2.0, 19]	0.249
ΔΜΣ (kg/m ²)	25.5±5.3	26.2±3.4	0.565	31.1±4.6	33.3±7.2	0.091
Νεφροπαθεια (ναι, %)	9 (33.3)	10 (40.0)	0.739	15 (30.0)	14 (31.1)	0.958
Μικροαλβουμινουρία	5 (18.5)	6 (24.0)	0.977	10 (20.0)	9 (19.6)	0.595
Μάκροαλβουμινουρία	4 (14.8)	4 (16.0)		5 (10.0)	5 (11.5)	
Κάθε μικροαγγειοπάθεια (ναι, %)	11 (40.7)	11 (44.0)	0.861	25 (50.0)	21 (45.7)	0.735
Κάθε μακροαγγειοπάθεια (ναι, %)	3 (11.1)	1 (4.0)	0.295	13 (26.0)	11 (23.9)	0.809
Ημερήσια δόση ινσουλίνης (μονάδες/24h)	40.0 [32.0, 57.0]	43.5 [31.0, 48.0]	0.679	50 [36.0, 85.0]	48 [35.0, 97.8]	0.983
Μετφορμίνη (ναι, %)	0 (0.0)	2 (8.0)	0.133	38 (76.0)	40 (87.0)	0.187
Αναστολέας DPP4 (ναι, %)				11 (22.4)	15 (32.6)	0.208
Σουλφονουλουρία (ναι, %)				6 (12.5)	5 (10.9)	0.931
GLP1RA (ναι, %)				10 (20.0)	9 (19.6)	0.790
SGLT2i (ναι, %)				13 (26.0)	9 (19.6)	0.432
Πιογλιταζόνη (ναι, %)				2 (4)	3 (6.5)	0.353
Ινσουλίνη (ναι, %)				17 (34.0)	17 (36.9)	0.699

Πίνακας 18: Σύγκριση των δημογραφικών, κλινικών και θεραπευτικών χαρακτηριστικών των υποπληθυσμών με ΣΔτ1 και ΣΔτ2 μεταξύ των 2 ομάδων

Ομάδα α: εβΜΑ, ομάδα β: ομάδα ελέγχου, ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

3.2.2. Σύγκριση εργαστηριακών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων

Στον παρακάτω πίνακα γίνεται συγκριτική παράθεση των εργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος μεταξύ των 2 ομάδων.

	Ομάδα Α (n=77)	Ομάδα Β (n=71)	P
HbA1c TINIA (%)	7.11±1.2	7.44±1.2	0.098
HbA1c HPLC (%)	7.28±1.2	7.57±1.2	0.160
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	275.6±64.8	290.5±61.3	0.192
Διορθωμένη φρουκτοζαμίνη (μmol/g) [#]	6.04±1.42	6.49±1.48	0.085
La1c (%)	1.90 (1.70, 2.28)	2.00 (1.80, 2.40)	0.085
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	138.1±55.5	153.0±60.6	0.129
Λόγος Γλυκόζης νηστείας/HbA1c	19.3±6.0	20.5±6.9	0.373
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	11.8±1.2	13.6±1.3	<0.001
MCV (fl)	64.0±4.2	86.3±4.0	<0.001
MCH (pg)	20.5±1.5	28.6±1.7	<0.001
ΔΕΚ (n*10 ³ /μl)	72.4±28.4	60.3±20.3	0.003
ΔΕΚ (%)	1.26±4.9	1.28±4.3	0.825
Χολερυθρίνη (mg/dl)	0.57±0.28	0.48±0.26	0.040
Αλβουμίνη (mg/dl)	4.57±0.27	4.49±0.29	0.102
ACR (mg/g)	10.0 (5.1, 52.5)	12.1 (5.0, 63.6)	0.789
HbA2 (%)	4.8 (4.4, 5.1)	2.5 (2.3, 2.7)	<0.001
HbF (%)	1.1 (0.9-1.8)	0.8 (0.7-1.0)	<0.001
Creatinine (mg/dl)	0.83 (0.71, 1.1)	0.78 (0.67, 0.93)	0.092
eGFR (ml/min)	90.7 (68.0, 106.8)	95.5 (77.3, 110.6)	0.251
hsCRP (mg/l)	1.2 (0.37, 2.7)	1.7 (0.73, 3.7)	0.026
Ferritin (ng/ml)	72.0 (30.7, 132.3)	60.1 (34.5, 134.1)	0.612

Πίνακας 19: Συγκριτική παρουσίαση των εργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος μεταξύ των 2 ομάδων. ACR: λόγος αλβουμίνης/κρεατινίνης σε δείγμα ούρων, eGFR; Εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης, TINIA: ανοσοθολοσομετρική μέθοδος, HPLC: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, MCV: Μέσος όγκος ερυθρών, MCH Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης, MCHC: Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης
[#]Υπολογίστηκε ως ο λόγος συγκεντρώσεων φρουκτοζαμίνης προς αλβουμίνης ορού

Δε διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων αναφορικά με τις μέσες τιμές της HbA1c μετρημένης είτε μέσω TINIA ή HPLC, της φρουκτοζαμίνης, της γλυκόζης νηστείας, τη La1c και το λόγο Γλυκόζης νηστείας/HbA1c. Όπως αναμένετο, οι αιματολογικές παράμετροι που κατά γνωστό τρόπο επηρεάζονται από την παρουσία εβΜΑ (συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, MCV, MCH, απόλυτος αριθμός ΔΕΚ, ποσοστό HbA2 και HbF) ανευρέθησαν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των ομάδων. Επιπλέον, η συγκέντρωση αλβουμίνης και κρεατινίνης καθώς και ο eGFR ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των δύο ομάδων ενώ η τιμή της hsCRP ανευρέθη ελαφρά αλλά στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με αυτή της εβΜΑ (διάμεσες τιμές 1.2 vs 1.7 mg/L, $p=0.026$).

Αναφορικά με τους δείκτες του ρυθμού ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων, ο σχετικός αριθμός ΔΕΚ ήταν όμοιος μεταξύ των ομάδων ενώ η συγκέντρωση χολερυθρίνης ευρέθη σημαντικά υψηλότερη μεταξύ των ατόμων με εβΜΑ (0.57 ± 0.28 vs. 0.48 ± 0.26 , $p=0.040$).

3.2.3. Συσχέτιση μεταξύ των μέτρων εκτίμησης της γλυκαιμίας

Υπολογίστηκαν οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης κατά Pearson μεταξύ των διαθέσιμων δεικτών γλυκαιμίας (γλυκόζη νηστείας, Φρουκτοζαμίνη, διορθωμένη φρουκτοζαμίνη (υπολογίστηκε ως ο λόγος συγκεντρώσεων φρουκτοζαμίνης προς αλβουμίνης ορού), HbA1c-TINIA, HbA1c-HPLC, La1c) στο σύνολο του δείγματος και εντός έκαστης ομάδας.

A	HbA1c (TINIA)	HbA1c (HPLC)	Γλυκόζη νηστείας	La1c	Φρουκτοζαμίνη	Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη
HbA1c (TINIA)	1	0.958**	0.427**	0.512**	0.728**	0.785**
HbA1c (HPLC)	0.958**	1	0.358**	0.480**	0.646**	0.722**
Γλυκόζη νηστείας	0.427**	0.358**	1	0.750**	0.421**	0.455**
La1c	0.512**	0.480**	0.750**	1	0.418**	0.425**
Φρουκτοζαμίνη	0.728**	0.646**	0.421**	0.418**	1	0.959**
Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη	0.785**	0.722**	0.405**	0.425**	0.959**	1
B	HbA1c (TINIA)	HbA1c (HPLC)	Γλυκόζη νηστείας	La1c	Φρουκτοζαμίνη	Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη
HbA1c (TINIA)	1	0.931**	0.490**	0.554**	0.719**	0.752**

HbA1c (HPLC)	0.931**	1	0.358**	0.455**	0.591**	0.645**
Γλυκόζη νηστείας	0.490**	0.358**	1	0.788**	0.437**	0.420**
La1c	0.554**	0.455**	0.788**	1	0.418**	0.425**
Φρουκτοζαμίνη	0.719**	0.591**	0.437**	0.418**	1	0.969**
Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη	0.752**	0.722**	0.420**	0.425**	0.969**	1
Γ	HbA1c (TINIA)	HbA1c (HPLC)	Γλυκόζη νηστείας	La1c	Φρουκτοζαμίνη	Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη
HbA1c (TINIA)	1	0.980**	0.354*	0.464*	0.722**	0.805**
HbA1c (HPLC)	0.980**	1	0.358**	0.370**	0.688**	0.778**
Γλυκόζη νηστείας	0.354*	0.358**	1	0.728**	0.391*	0.371*
La1c	0.464**	0.370*	0.728**	1	0.418**	0.425**
Φρουκτοζαμίνη	0.722**	0.688**	0.391*	0.418**	1	0.951**
Διορθωμένη Φρουκτοζαμίνη	0.805**	0.778**	0.371*	0.425**	0.951**	1

Πίνακας 20 (Α, Β, Γ): Συντελεστές συσχέτισης R κατά Pearson μεταξύ των παραμέτρων γλυκαιμίας στο σύνολο του δείγματος (Α), εντός της ομάδας της εβΜΑ (Β), εντός της ομάδας ελέγχου (Γ)

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

Τόσο στο σύνολο του δείγματος όσο και εντός εκάστης των ομάδων, όλα τα επιμέρους μεγέθη εκτίμησης της γλυκαιμίας παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Υπήρχε μεγάλου βαθμού συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων με τις διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού της HbA1c στο σύνολο του δείγματος, εντός της ομάδας της εβΜΑ και ομάδας ελέγχου ($r=0.959$, 0.931 και 0.980 , αντίστοιχα). Ικανοποιητική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ φρουκτοζαμίνης/διορθωμένης φρουκτοζαμίνης και HbA1c με αμφότερες τις μεθόδους. Μολονότι οι συσχετίσεις αυτές υπήρξαν αριθμητικά ισχυρότερες μεταξύ φρουκτοζαμίνης/διορθωμένης φρουκτοζαμίνης και της HbA1c (TINIA) σε σύγκριση με την HbA1c (HPLC), το Fischer's r-to-z transformation test δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανευρεθεισών συσχετίσεων. Μολαταύτα, επειδή υπήρξε στατιστικά σημαντικό για τη συσχέτιση των 2 μεθόδων μέτρησης μεταξύ των 2 ομάδων ($z=-3.51$, $p=0.0004$), εύρημα δηλωτικό πιθανού αναλυτικού bias της μεθόδου μεταξύ των ατόμων με εβΜΑ, αποφασίστηκε η περαιτέρω ανάλυση να γίνει επί τη βάση των τιμών της HbA1c (TINIA).

Επιπλέον εύρημα άξιο αναφοράς αποτέλεσε η αξιοσημείωτα υψηλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών γλυκόζης νηστείας και La1c τόσο στο σύνολο του δείγματος όσο εντός έκαστης ομάδας ($r=0.750$, 788 και 728, αντίστοιχα).

3.2.4. Συσχέτιση των επιπέδων της HbA1c με την παρουσία εβΜΑ και άλλες παραμέτρους

Διενεργήθη μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης στο σύνολο του δείγματος με την τιμή της HbA1c ως εξαρτημένη μεταβλητή και μία ποικιλία κλινικών κι εργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος ως ανεξάρτητες. Οι εκάστοτε κατά Pearson συντελεστές συσχέτισης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Μεταβλητή	r (Pearson correlation coefficient)	P
Ηλικία (έτη)	0.253	-0.183
Φύλο (θήλυ)	0.315	0.126
ΔΜΣ (kg/m ²)	-0.015	0.366
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναι)	0.267	0.001
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	0.239	0.006
Κάπνισμα (ναί)	0.116	0.179
ΔΕΚ (ν*10 ³ /μl)	-0.103	0.243
ΔΕΚ (%)	-0.043	0.628
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.450	<0.001*
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.000	0.997
eGFR (ml/min)	0.000	0.920
Φερριτίνη (ng/dl)	-0.001	0.212
Σιδηροπενία (ναί)#	-0.143	0.817
hsCRP (mg/L)	-0.025	0.202
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	0.728	<0.001*
Χολερυθρίνη (mg/dl)	-0.170	0.054*
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.238	0.006*
ACR (mg/g)	0.172	0.069
HbA2 (%)	-0.183	0.033*

HbF (%)	0.067	0.445
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0.056	0.429
εβΜΑ (ναί)	-0.335	0.097

Πίνακας 21: Μονοπαραγοντική ανάλυση (απλή γραμμική παλινδρόμηση) μεταξύ της HbA1c και κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων ενδιαφέροντος. Με αστερίσκο (*) επισημαίνονται οι παράμετροι που συμπεριλήφθηκαν σε μετέπειτα πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης. Ο εκτιμώμενος eGFR προτιμήθηκε της φερριτίνης λόγω μεγαλύτερου συντελεστή συσχέτισης.

#Ορίστηκε κατά ΠΟΥ ως τιμή φερριτίνης <12 ng/ml

Εξαιτίας της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του τύπου ΣΔ με την HbA1c και του γεγονότος ότι αυτό το χαρακτηριστικό θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αρνητικός συγχυτικός παράγοντας (negative confounder) για μια σειρά από άλλες παραμέτρους, στην πολυπαραγοντική ανάλυση εισήχθησαν όλες οι υπό εξέταση και όχι μόνο οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές.

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση δημιουργήθηκαν 3 μοντέλα στα οποία συμπεριλήφθη ως ανεξάρτητη μεταβλητή η παρουσία εβΜΑ: ένα χωρίς την παρουσία των αιματολογικών δεικτών/δεικτών αιμόλυσης (αιμοσφαιρίνη, ΔΕΚ%, χολερυθρίνη) και των ηλεκτροφορητικών δεικτών (HbF, HbA2), ένα με την παρουσία των αιματολογικών δεικτών/δεικτών αιμόλυσης χωρίς τους ηλεκτροφορητικούς δείκτες και ένα με αμφότερες τις παραμέτρους. Στα εν λόγω μοντέλα, ο eGFR προτιμήθηκε της κρεατινίνης και η συγκέντρωση της φερριτίνης της σιδηροπενικής κατάστασης.

Η παρουσία της εβΜΑ δε συσχετίστηκε με την HbA1c σε καμία από τις 3 προσεγγίσεις πολυπαραγοντικής ανάλυσης ($p \gg 0.05$).

Πιν. 22^A: Μοντέλο 1 ($R=0.897$)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.179	0.031
ACR (mg/g)	0.104	0.060
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναί)	-0.241	0.012
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.119	0.036
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	1.046	<0.001
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.251	<0.001
eGFR (ml/min)	0.234	<0.001
BMI (kg/m ²)	0.191	0.007

εβΜΑ (ναί)	0.002	0.966
------------	-------	-------

Σταθμισμένο ως προς φύλο, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, hsCRP, φερριτίνη

Πιν. 22^B: Μοντέλο 2 (R=0.904)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.197	0.020
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναί)	-0.191	0.054
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.147	0.011
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	0.983	<0.001
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.238	<0.001
eGFR (ml/min)	0.207	0.001
BMI (kg/m ²)	0.167	0.016
εβΜΑ (ναί)	0.002	0.761
Χολερυθρίνη (mg/dl)	-0.135	0.020

Σταθμισμένο ως προς φύλο, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, hsCRP, φερριτίνη, ACR, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ΔΕΚ (%)

Πιν. 22^F: Μοντέλο 3 (R=907)

Μεταβλητή	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.221	0.015
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναί)	-0.183	0.082
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0.125	0.044
Φρουκτοζαμίνη (μmol/L)	0.976	<0.001
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.224	0.002
eGFR (ml/min)	0.199	0.002
BMI (kg/m ²)	0.171	0.054
εβΜΑ (ναί)	0.022	0.789
Χολερυθρίνη (mg/dl)	-0.139	0.025

Σταθμισμένο ως προς φύλο, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, hsCRP, φερριτίνη, ACR, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ΔΕΚ (%), HbA2(%), HbF(%)

3.2.5. Υπολογισμός του χάσματος γλυκοζυλίωσης (Glycation Gap - GG) και σχετιζόμενες παράμετροι

Η αναμενόμενη από την τιμή της φρουκτοζαμίνης HbA1c υπολογίστηκε με τη μέθοδο των McDonald και συν¹²⁰ ως ακολούθως:

$$SND(f) = (\text{Φρουκτοζαμίνη} - \text{Μέση Φρουκτοζαμίνη}) / SD(\text{Φρουκτοζαμίνης})$$

$$HbA1c(\text{αναμενόμενη}) = SND(f) \times SD(HbA1c) + \text{Μέση}(HbA1c)$$

Ακολούθως το GG υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ υπολογισμένης και αναμενόμενης τιμής της HbA1c μέσω TINIA και HPLC. Το GG ανευρέθη όμοιο μεταξύ των 2 ομάδων:

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	P
GG-TINIA (%)	-0.054±1.02	0.060±0.89	0.456
GG-HPLC (%)	-0.019±0.92	0.009±0.91	0.869

Πίνακας 23: Σύγκριση των μέσων τιμών του χάσματος γλυκοζυλίωσης μεταξύ των 2 ομάδων

Διενεργήθη πολυπαραγοντική ανάλυση στο σύνολο του δείγματος για τον προσδιορισμό των παραμέτρων που σχετίζονται με το GG σε 2 βήματα. Στο πρώτο συμπεριλήφθη η εβΜΑ ως ανεξάρτητη μεταβλητή χωρίς τις παραμέτρους που σχετίζονται με την αιμόλυση (αιμοσφαιρίνη, ΔΕΚ%, χολερυθρίνη) και την ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης (HbF, HbA2). Στο δεύτερο συμπεριλήφθησαν επιπλέον και αυτές οι παράμετροι.

Βήμα 1 ^ο	GG-TINIA [#] (R=0.809)		GG-HPLC* (R=0.808)	
	Beta	P	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.258	0.017	0.228	0.044
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναί)	-0.315	0.008	-0.394	0.002
Γλυκόζη (mg/dl)	0.173	0.014		

Διάρκεια ΣΔ (έτη)			0.206	0.024
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.307	<0.001	-0.289	0.002
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.255	0.006		
hsCRP (mg/L)			0.299	0.001
eGFR (ml/min)	0.288	<0.001	0.299	0.003
εβΜΑ (ναί)	0.080	0.843	0.056	0.443

Πίνακας 24: Πολυπαραγοντική ανάλυση μεταξύ των παραμέτρων που σχετίζονται με τη διαμόρφωση του χάσματος γλυκόζυλωσης (GG), χωρίς τις σχετιζόμενες με την αιμόλυση και τα ηλεκτροφορητικά ευρήματα.

#Σταθμισμένο ως προς φύλο, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, φερριτίνη, hsCRP, ACR

*Σταθμισμένο ως προς φύλο, Γλυκόζη νηστείας, κάπνισμα, φερριτίνη, ηλικία, ΔΜΣ, ACR, (%)

Βήμα 2 ^ο	GG-TINIA [#] (R=0.852)		GG-HPLC* (R=0.861)	
	Beta	P	Beta	P
Ηλικία (έτη)	0.272	0.016		
Τύπος ΣΔ (ΣΔτ1, ναί)	-0.237	0.059	-0.318	0.010
Αλβουμίνη (g/dl)	-0.213	0.017	-0.322	<0.001
Χολερυθρίνη (mg/dl)	-0.204	0.010	-0.162	0.038
ΔΕΚ (%)	-0.157	0.064	-0.183	0.027
ΔΜΣ (kg/m ²)	0.307	0.014	0.231	0.057
eGFR (ml/min)	0.221	0.005	0.174	0.022
HbF (%)			0.186	0.037
εβΜΑ (ναί)	0.080	0.408	-0.021	0.721

Πίνακας 25: Πολυπαραγοντική ανάλυση μεταξύ των παραμέτρων που σχετίζονται με τη διαμόρφωση του χάσματος γλυκόζυλωσης (GG), συμπεριλαμβανομένων των σχετιζόμενων με την αιμόλυση και τα ηλεκτροφορητικά ευρήματα.

#Σταθμισμένο ως προς φύλο, Γλυκόζη νηστείας, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, φερριτίνη, hsCRP, ACR, HbF(%), HbA2(%)

* Σταθμισμένο ως προς φύλο, Γλυκόζη νηστείας, κάπνισμα, διάρκεια ΣΔ, φερριτίνη, ηλικία, hsCRP, ACR, HbA2(%)

Η εβΜΑ δε φάνηκε να σχετίζεται με το GG όπως υπολογίζεται με αμφότερες τις μεθόδους. Μεταξύ άλλων σημαντικών καθοριστών του GG, τόσο η συγκέντρωση χολερυθρίνης όσο και τα ΔΕΚ% αλλά όχι η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης φάνηκαν να σχετίζονται σημαντικά με το GG αμφοτέρων των μεθόδων, ανεξάρτητα από την παρουσία εβΜΑ ή άλλων εν δυνάμει συγχυτικών παραγόντων. Επιπλέον, το GG-HPLC φάνηκε να σχετίζεται σημαντικά και ανεξάρτητα με το ποσοστό της HbF, εύρημα που δε διαπιστώθηκε για το GG-TINIA.

4. Συζήτηση

4.1. Σύνοψη των ευρημάτων

Συνοπτικά παρατίθενται τα ευρήματα από τις μελέτες της παρούσας διατριβής ως ακολούθως:

- Μεταξύ ατόμων χωρίς ΣΔ, η επίδραση της παρουσίας εβΜΑ εξαρτάται από το βαθμό της αναιμίας με την οποία συνοδεύεται, με τα άτομα με αληθή αναιμία να εμφανίζουν στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα HbA1c από τα άτομα χωρίς αναιμία (-0.19%). Το ηπίως αυξημένο ποσοστό HbF που παρατηρείται μεταξύ ατόμων με εβΜΑ έχει πιθανώς αρνητική επίδραση στις τιμές της HbA1c. Ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης και του ποσοστού HbF, η παρουσία εβΜΑ φαίνεται να έχει θετική επίδραση στις τιμές της HbA1c, γεγονός που αντανακλάται στη σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή HbA1c στα άτομα με εβΜΑ χωρίς αναιμία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (+0.16%). Περαιτέρω, οι τιμές της HbA1c φαίνονται να σχετίζονται σε σημαντικό βαθμό με την αιμοποιητική λειτουργία των ατόμων χωρίς ΣΔ, όπως φαίνεται από την ανεξάρτητη της γλυκαιμίας σημαντική συσχέτιση της HbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, το MCV και το MCH στα άτομα με εβΜΑ και με το RDW στα αιματολογικώς φυσιολογικά άτομα.

- Μεταξύ των ατόμων με ΣΔ η παρουσία εβΜΑ δε φαίνεται να έχει οιαδήποτε επίδραση στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c. Ομοίως η εβΜΑ δεν αποτελεί καθοριστή των τιμών του χάσματος γλυκοζυλίωσης (GG). Μεταξύ των ατόμων με ΣΔ, οι τιμές της HbA1c προβλέπονται κυρίως από τις σχετιζόμενες με τη γλυκαιμία παραμέτρους (γλυκόζη νηστείας, φρουκτοζαμίνη). Τη σχέση μεταξύ των παραμέτρων αυτών φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των ατόμων (ΔΜΣ) και, ανεξάρτητα από την παρουσία εβΜΑ, παράμετροι που σχετίζονται με το ρυθμό ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων όπως το ποσοστό των ΔΕΚ επί των συνολικών ερυθροκυττάρων και η συγκέντρωση χολερυθρίνης. Τα τελευταία σχετίζονται σημαντικά και μεταξύ τους ανεξάρτητα, αρνητικά με την τιμή του GG.

4.2. Συζήτηση των ευρημάτων της 1^{ης} μελέτης

4.2.1. Χαρακτηριστικά των υπό εξέταση πληθυσμών χωρίς ΣΔ

Τα άτομα χωρίς διεγνωσθέντα ΣΔ αποτελούν τον πληθυσμό στον οποίο η HbA1c χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς. Πρωταρχικός στόχος της διερεύνησης της επίδρασης της εβΜΑ στα επίπεδα της HbA1c στα άτομα χωρίς ΣΔ υπήρξε η απόκτηση στοιχείων για την καταλληλότητα της χρησιμοποίησης της μεθόδου αυτής για διαγνωστικούς σκοπούς στα άτομα με εβΜΑ. Οι δύο υπό μελέτη πληθυσμοί ήταν αξιοσημείωτα σταθμισμένοι ως προς σημαντικά χαρακτηριστικά τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν ως συγχυτικοί παράγοντες όπως η σύνθεση κατά φύλο, ο ΔΜΣ, το ποσοστό των σιδηροπενικών ατόμων και η παρουσία 1^{ου} βαθμού συγγενών με ΣΔτ2. Επιπλέον, η συγκέντρωση φρουκτοζαμίνης και γλυκόζης νηστείας ευρέθη πανομοιότυπη μεταξύ των ομάδων, στοιχείο που δηλοί την ομοιότητά τους αναφορικά με τη μέση γλυκαιμία εντός έकाστης. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν το συγκεντρωθέν δείγμα κατάλληλο για εξαγωγή συμπερασμάτων για την επίδραση της εβΜΑ στα επίπεδα της HbA1c, ανεξάρτητα από τις λοιπές παραμέτρους που συμβάλουν στη διαμόρφωση των τιμών της.

4.2.2. εβΜΑ, Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και ΗbA1c

Η μέση ΗbA1c ανευρέθη πανομοιότυπη μεταξύ των 2 ομάδων, ωστόσο η διασπορά των τιμών εκατέρωθεν της μέσης τιμής ήταν ευρύτερη στην ομάδα της εβΜΑ (SD 0.29 vs. 0.25). Το εύρημα αυτό διαπιστώθηκε ότι οφείλεται στη στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της ΗbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ($r=0.455$, $p<0.001$), η οποία δε διαπιστώθηκε στην ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό έρχεται προς επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης της μελέτης, ότι ο ηπίως μειωμένος χρόνος ζωής (αιμόλυση) και ο αυξημένος ρυθμός ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων δύνανται να έχουν έναν απόλυτο αρνητικό αντίκτυπο στις τιμές της ΗbA1c μεταξύ των ατόμων με εβΜΑ. Μολονότι στη μελέτη αυτή στοιχεία δηλωτικά της αιμόλυσης ή/και του ρυθμού ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων (όπως ΔΕΚ%, συγκέντρωση χολερυθρίνης) δεν είναι διαθέσιμα, τα φαινόμενα αυτά αναμένεται να αντανακλούν στη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και, δια μέσου αυτής, στα επίπεδα της ΗbA1c. Το στοιχείο αυτό αντικατοπτρίζει τη συμβολή της εβΜα στη βιολογική μεταβλητότητα της ΗbA1c. Το ενδεχόμενο θετικό σφάλμα της TINIA λόγω της παρουσίας αναιμίας όπως συζητήθηκε στο γενικό μέρος της διατριβής δε μπορεί αυτή τη στιγμή να αποκλειστεί, ωστόσο δε φαίνεται να έχει επηρεάσει τα προαναφερθέντα ευρήματα.

Τα άτομα με εβΜΑ και αληθή αναιμία (κατα τον ορισμό του ΠΟΥ, Hb <12 και <13 g/dl για τα θήλεα και άρρενα άτομα, αντίστοιχα¹⁸²) ευρέθησαν να έχουν χαμηλότερες τιμές ΗbA1c σε σχέση με τα άτομα με εβΜΑ χωρίς αναιμία (-0.19%). Για την τελευταία υποομάδα διεπιστώθη επιπλέον στατιστικά σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (+0.16%), ενώ μεταξύ των ατόμων με εβΜΑ και της ομάδας ελέγχου δε διαπιστώθησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιθανές ερμηνείες του ευρήματος αυτού επιχειρούνται στην ακόλουθη παράγραφο. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι καιτοι στατιστικά σημαντικές, οι διαφορές αυτές είναι μικρές κατ' απόλυτη τιμή και σε κάθε περίπτωση μικρότερες τόσο της SD της ΗbA1c στους υπό μελέτη πληθυσμούς, όσο και από το κατα σύμβαση θεωρούμενο σημαντικό από κλινική κι εργαστηριακή άποψη μέγεθος παρεμβολής στη μέτρηση της ΗbA1c ($\pm 0.3\%$, όπως ανεπτύχθη στο γενικό μέρος της παρούσας διατριβής).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης με την ΗbA1c στη θέση της εξαρτημένης μεταβλητής. Στο σύνολο του συγκεντρωθέντος δείγματος

διαπιστώθηκε σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση της HbA1c με τη γλυκόζη νηστείας όπως επίσης και με το ΔΜΣ και το θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, παραμέτρους που επιδρούν καθοριστικά στη μεταγευματική γλυκαιμία¹⁸³⁻¹⁸⁵. Η εισαγωγή της εβΜΑ στο πολυπαραγοντικό μοντέλο δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της HbA1c με το χαρακτηριστικό, ωστόσο η εισαγωγή της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης και του ποσοστού της HbF αποκάλυψε τη σημαντική συσχέτιση της HbA1c με τις 3 παραμέτρους, στοιχείο που καταδεικνύει ότι δρουν μεταξύ τους ως αρνητικοί συγχυτικοί παράγοντες. Η HbA1c στο πλήρως σταθμισμένο αυτό μοντέλο φάνηκε να σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και την εβΜΑ και αρνητικά με την HbF(%).

Το εύρημα της θετικής απόλυτης επίδρασης του χαρακτηριστικού της εβΜΑ επί των τιμών της HbA1c δύναται να οφείλεται σε μία σειρά από παραμέτρους. Αφενός, μετά από τη διόρθωση για τη βιολογική επίδραση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης και της HbF, θα μπορούσε να αποδοθεί στο ενδεχόμενο θετικό αναλυτικό bias της TINIA στις χαμηλές συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης⁴⁹, ωστόσο αυτό το εύρημα δεν έχει βιβλιογραφικά περιγραφεί για τη μέθοδο TINIA Quant® 2nd generation που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Μία επιπλέον εξήγηση αφορά στο διαφοροποιημένο μεταβολισμό θαλασσαιμικών ερυθροκυττάρων, αναφορικά με το διαφοροποιημένο ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον που παρουσιάζουν, το οποίο επιδρά άμεσα στην κινητική της Maillard¹⁶⁷. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα 2,3 DPG που απαντώνται στα ερυθροκύτταρα των ατόμων με εβΜΑ¹⁶⁸ θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν την αντίδραση γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης. Το φυσικό αυτό παραπροϊόν της γλυκόλυσης μπορεί να λειτουργήσει ως καταλύτης της αντίδρασης σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες¹⁶⁹, ενώ τα επίπεδά του ανευρίσκονται σημαντικά υψηλότερα μεταξύ ατόμων που γλυκοζυλιώνουν ταχέως (“high glycaters”) σε σχέση με αυτά που γλυκοζυλιώνουν βραδέως (“low glycaters”)⁵⁶. Τέλος, η πιθανότητα επίδρασης μη προφανών συγχυτικών παραγόντων δε δύναται να αποκλειστεί.

4.2.3. Συσχέτιση της HbA1c με παραμέτρους της γενικής εξέτασης αίματος

Με την εξαίρεση της εβΜΑ και της σιδηροπενίας αποθηκών (10.5% των συμμετεχόντων), ο πληθυσμός της μελέτης αφορά σε κλινικώς κι αιματολογικώς υγιή άτομα. Σε αυτό το

πλαίσιο, η HbA1c ευρέθη να σχετίζεται σημαντικά και ανεξάρτητα από γλυκαιμικές παραμέτρους και δείκτες οξείας φάσης: (Α) από τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, το MCV και MCH στην ομάδα της εβΜΑ και (Β) από το εύρος κατανομής ερυθρών (RDW-CV) στην ομάδα ελέγχου.

Αναφορικά με την παρατήρηση (Α), τα δεδομένα για τη σχέση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης με την HbA1c συζητήθηκαν ανωτέρω. Αναφορικά με την ανεξαρτητη σχέση των ερυθροκυτταρικών δεικτών (θετική με το MCV, αρνητική με το MCH) με την HbA1c, τα περισσότερα στοιχεία στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία προέρχονται από πληθυσμούς στους οποίους κατά πάσα πιθανότητα η αντιπροσώπευση των ατόμων με εβΜΑ ήταν ασήμαντη. Τα ευρήματα για τη σχέση των ερυθροκυτταρικών δεικτών με την HbA1c είναι αρκετά ετερογενή με την αρνητική συσχέτιση αμφοτέρων να αναφέρεται συχνά¹⁸⁶, πιθανά ως απότοκος της παρουσίας σιδηροπενίας η οποία επιδρά σε αμφοτέρους τους δείκτες αρνητικά και τις τιμές της HbA1c θετικά¹⁸⁶. Η διαφορική σχέση των 2 δεικτών με την HbA1c ανεξάρτητα από τις τιμές της αιμοσφαιρίνης και της φερριτίνης μπορεί να αντικατοπτρίζει είτε την επίδραση της κατάστασης επάρκειας σιδήρου στο αιμοποιητικό σύστημα, είτε την επίδραση άλλων λιγότερο προφανών διαφοροποιήσεων της αιμοποιητικής λειτουργίας.

Σχετικά με την παρατήρηση (Β), η συσχέτιση της HbA1c με το RDW δεν αποτελεί πρωτοφανές εύρημα. Το RDW αποτελεί μέτρο της ετερογένειας του μεγέθους των ερυθροκυττάρων και ως εκ τούτου αποτελεί έναν εξαιρετικά ευαίσθητο καίτοι μη ειδικό δείκτη για την παρουσία ποικιλίας αιματολογικών διαταραχών¹⁸⁷. Το RDW ανευρίσκεται αυξημένο σε σιδηροπενικές καταστάσεις, συχνά προ της εμφάνισης αναιμίας ή διαταραχών στους λοιπούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες¹⁸⁷. Το εύρημα της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του RDW με την HbA1c δεν είναι νέο. Οι Lippi και συν αναλύοντας αναδρομικά δεδομένα από έναν ετερογενή πληθυσμό 2515 ηλικιωμένων (>65 ετών) εξωτερικών ασθενών με και χωρίς ΣΔ διαπίστωσαν μια στατιστικά σημαντική, ασθενή θετική συσχέτιση του RDW με την HbA1c ($r=0.11$, $p<0.001$)¹⁸⁸. Επιπροσθέτως, σε μια προοπτική μελέτη παρατήρησης οι Bao και συν ανέφεραν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της αρχικής τιμής του RDW με τη μελλοντική αύξηση των τιμών της HbA1c αλλά όχι της γλυκόζης νηστείας σε μέσο βάθος χρόνου 2.9 ετών. Ο πληθυσμός της εν λόγω μελέτης ($n=7.795$) περιλάμβανε αποκλειστικά άτομα χωρίς ΣΔ ή προδιαβήτη γεγονός που επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων αναφορικά με την επίδραση μη-γλυκαιμικών

παραμέτρων στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c¹⁸⁹. Η επιβεβαίωση της θετικής συσχέτισης του RDW με τις τιμές της HbA1c ανεξαρτήτως λοιπών γλυκαιμικών ή αιματολογικών παραμέτρων (συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης φερριτίνης) στον επιλεγμένο (νεαρό και αιματολογικώς υγιή) πληθυσμό της ομάδας ελέγχου υποδηλοί ότι κλινικώς ανεπαίσθητες παραλλαγές στη φυσιολογική αιμοποιητική λειτουργία μεταξύ υγιών ατόμων μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c.

4.3. Συζήτηση των ευρημάτων της 2^{ης} μελέτης

4.3.1. Χαρακτηριστικά των υπό εξέταση πληθυσμών με ΣΔ

Η HbA1c και η σχέση της με τη συγκέντρωση φρουκτοζαμίνης ορού συνεκρίθη μεταξύ 2 ομάδων με και χωρίς εβΜΑ. Οι δύο ομάδες ήταν όμοιες ως προς σημαντικά βασικά χαρακτηριστικά όπως η μέση ηλικία, διάρκεια ΣΔ και ΔΜΣ, η ποσοστιαία σύνθεση ως προς φύλο, τρέχουσα καπνιστική συνήθεια, καθώς και την παρουσία εγκατεστημένων μικροαγγειοπαθητικών και μακροαγγειοπαθητικών επιπλοκών. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά αυτά ανευρέθησαν όμοια και μεταξύ των υποομάδων των 2 τύπων ΣΔ. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν το εν λόγω δείγμα κατάλληλο για τη μελέτη της επίδρασης της εβΜΑ στην HbA1c και στο GG μεταξύ ατόμων με ΣΔ καθώς οι προαναφερθείσες παράμετροι δύνανται να μεταβάλλουν τη σχέση HbA1c-φρουκτοζαμίνης και να αποτελέσουν καθοριστές του GG.

4.3.2. Συσχέτιση μεταξύ των εξετασθεισών γλυκαιμικών παραμέτρων

Μεταξύ όλων των υπό εξέταση γλυκαιμικών παραμέτρων που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση τόσο στο σύνολο του δείγματος όσο και σε κάθε ομάδα ξεχωριστά. Αναμενόμενα, οι τιμές της HbA1c υπολογισμένες με HPLC και TINIA εμφάνιζαν τη μέγιστη συσχέτιση, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ HbA1c και φρουκτοζαμίνης ($r=0.728$) βρίσκεται σε συμφωνία με τα απαντώμενα στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία δεδομένα ($0.66 \leq r \leq 0.78$ ^{117,190,191}). Ο λόγος φρουκτοζαμίνης προς αλβουμίνη παρουσίαζε σημαντικά βελτιωμένα χαρακτηριστικά ως προς τη συσχέτιση με την HbA1c,

γεγονός που αποδίδεται στη διόρθωση της διακύμανσης των τιμών της φρουκτοζαμίνης που αποδίδονται σε άσχετους με τη γλυκαιμία παράγοντες, όπως είναι η κατάσταση ενυδάτωσης και εν δυνάμει ο ρυθμός ανακύκλωσης των πρωτεϊνών του ορού. Επιπλέον, ισχυρή ανευρέθη η συσχέτιση μεταξύ της γλυκόζης νηστείας και της La1c ($r=0.750$), εύρημα σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα¹⁹².

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν ανήκουν στα προκαθορισμένα σημεία μελέτης της παρούσας διατριβής, ενισχύουν την πιστότητα των συλλεγμένων δεδομένων και επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων για τα προαναφερθέντα.

4.3.3. Επίδραση της εβΜΑ και λοιπών παραμέτρων επί του χάσματος γλυκοζυλίωσης

Το χάσμα γλυκοζυλίωσης (GG) υπολογίστηκε ξεχωριστά για τις τιμές HbA1c που προέκυψαν τόσο μέσω της TINIA όσο και της HPLC. Η σημασία της χρησιμοποίησης των 2 συνηθέστερων μεθόδων προσδιορισμού είναι διττή. Αφενός επιτρέπει την ταυτοποίηση πιθανών μεταβλητών που σχετίζονται με παρεμβολή σε κάθε μία μέθοδο ως παράγοντες που συμβάλλουν στην αναλυτική μεταβλητότητα της HbA1c. Αντιστρόφως, η διαπίστωση παρεμβολής σε αμφότερες τις μεθόδους καθιστά εξαιρετικά πιθανή τη συμβολή της εκάστοτε παραμέτρου στη βιολογική (προ-αναλυτική) μεταβλητότητα της HbA1c.

Από τα δεδομένα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης στο σύνολο του δείγματος, η εβΜΑ δε φαίνεται να ανήκει στις παραμέτρους που ανεξάρτητα επηρεάζουν τη σχέση γλυκόζης-φρουκτοζαμίνης καθώς και την τιμή του GG. Η διαπιστωθείσα ανεξάρτητη συσχέτιση του GG με την ηλικία έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{122,193}. Επιπλέον η σημαντική θετική επίδραση του ΔΜΣ στο GG αποδίδεται στην αρνητική συσχέτιση του ΔΜΣ με τη συγκέντρωση φρουκτοζαμίνης (δείγμα 1^{ης} μελέτης: $r = -0.324$, $p < 0.001$, δείγμα 2^{ης} μελέτης: $r = 0.451$, $p < 0.001$). Το εύρημα αυτό έχει διαπιστωθεί σε μελέτη των Argdawi και συν, από τους οποίους αποδόθηκε σε επαγόμενες από την υπέρβαρη και παχύσαρκη κατάσταση μεταβολές στην αντίδραση Maillard στο πλάσμα¹⁹⁴. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος όπως διαπιστωμένα συνοδεύει την παχυσαρκία¹⁹⁵ πιθανώς να συμβάλει σε αυτό το φαινόμενο. Επιπλέον, η σχέση του GG με τον τύπο του ΣΔ, ανεξάρτητα από την ηλικία, το ΔΜΣ και τη διάρκεια του ΣΔ, παραμέτρους που θα μπορούσαν να αποτελούν προφανείς συγχυτικούς παράγοντες υποδηλοί την πιθανή επίδραση της αντιδιαβητικής αγωγής του ΣΔτ2 (μετφορμίνη, GLP1 αγωνιστές κ.ο.κ.).

Η παρουσία της εβΜΑ δε φάνηκε να έχει αντίκτυπο ούτε στη σχέση HbA1c-φρουκτοζαμίνης ούτε στη διαμόρφωση του GG όπως υπολογίστηκε τόσο με τη μέθοδο HPLC όσο και την TINIA. Η διαπίστωση αυτή παρέμεινε σταθερή και κατά την εισαγωγή στο μοντέλο της παλινδρόμησης του συνόλου των παραμέτρων που αποτελούν ίδια χαρακτηριστικά της εβΜΑ (συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και χολερυθρίνης, ποσοστό ΔΕΚ, ποσοστό HbF). Το εύρημα της ανεξάρτητης συσχέτισης τόσο της συγκέντρωσης χολερυθρίνης όσο και του ποσοστού των ΔΕΚ, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες του βαθμού της αιμόλυσης, με το GG υποδηλώνει τη σημαντική συμβολή του ρυθμού ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων μεταξύ των ατόμων με ΣΔ στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c. Το ποσοστό των ΔΕΚ ευρέθη όμοιο μεταξύ των δύο υπό σύγκριση ομάδων ενώ στην ομάδα της εβΜΑ παρατηρήθηκαν, όχι αναπάντεχα, ελαφρώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χολερυθρίνης.

Αναφορές στη βιβλιογραφία αναφορικά με το ρόλο των ΔΕΚ ως βιοδείκτη αιμόλυσης με κλινικά σημαντικό αντίκτυπο στις τιμές της HbA1c σπανίζουν. Στη μοναδική διαθέσιμη, ο απόλυτος αριθμός των ΔΕΚ δε φάνηκε να σχετίζεται με τις τιμές της HbA1c, ωστόσο ακόμα και η παρατηρούμενη συσχέτισή του με το χρόνο επιβίωσης των ερυθροκυττάρων ήταν αδύναμη¹⁹⁶.

Αναφορές για την αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης της ολικής χολερυθρίνης με την HbA1c απαντώνται στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία^{47,197} ως πιθανός απότοκος της αντιοξειδωτικής παρεμβολής της χολερυθρίνης στην κινητική της αντίδρασης Maillard. Ωστόσο, ισχυρός αντίλογος στην ανωτέρω ερμηνεία αποτελεί το γεγονός ότι ουδεμία συσχέτιση διαπιστώνεται μεταξύ της συγκέντρωσης χολερυθρίνης με τη φρουκτοζαμίνη, ακόμα και κατόπιν διόρθωσης ως προς την αλβουμίνη του ορού ($r=0.114/p=0.196$, $r=0.059/p=0.516$) ενώ η μοναδική (προ τριακονταετίας) αναφορά στη βιβλιογραφία διαπιστώνει θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών¹⁹⁸. Αν υποθεθεί ίση συγκέντρωση της χολερυθρίνης στο ενδοκυττάριο κι εξωκυττάριο διαμέρισμα, η ισχύς της ανωτέρω υπόθεσης θα προϋπέθετε τη συμμετρική ροπή της συσχέτισης της χολερυθρίνης με τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος. Επιπλέον, η διαπίστωση της συσχέτισης της χολερυθρίνης με το GG αμφοτέρων των μεθόδων καθιστά το ενδεχόμενο της αναλυτικής παρεμβολής της στη μέτρηση HbA1c εξαιρετικώς απίθανη (όπως θα μπορούσε να υποθεθεί για μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιείται η χρωματομετρία, όπως είναι η TINIA). Η υπόθεση που προτείνεται για την ερμηνεία των ανωτέρω ευρημάτων είναι ότι η

χολερυθρίνη αποτελεί βιοδείκτη της συνολικής αιμόλυσης και ως τέτοιος σχετίζεται έμμεσα, μέσω του αυξημένου ρυθμού ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων, με την τιμή της HbA1c όπως προσδιορίζεται με οποιαδήποτε αξιόπιστη μέθοδο. Συμπερασματικά, φαίνεται πως το ποσοστό των ΔΕΚ και η ολική χολερυθρίνη αντικατοπτρίζουν αλληλοσυμπληρούμενες πτυχές του φαινομένου της ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων κι ως τέτοιες σχετίζονται ανεξάρτητα με τη διαμόρφωση του GG.

Η μη διαπίστωση σημαντικής επίδρασης της αιμόλυσης που συνοδεύει την εβΜΑ στα επίπεδα της HbA1c μεταξύ των ατόμων με ΣΔ, σε αντιδιαστολή με τα ευρήματα της μελέτης 1, πιθανώς σχετίζεται με την ενδεχόμενη επίδραση του ΣΔ στο ρυθμό ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων. Μεταξύ ατόμων με ΣΔ έχει αναφερθεί επίταση του φαινομένου της αιμόλυσης σε σχέση αύξουσα με το βαθμό της υπεργλυκαιμίας¹⁹⁹. Είναι ως εκ τούτου πιθανό το ενδεχόμενο, οι παρατηρημένες και στη μελέτη 1 της τρέχουσας διατριβής διαφορές μεταξύ των ατόμων με και χωρίς εβΜΑ να αμβλύνονται στο νοσολογικό υπόβαθρο του ΣΔ εξαιτίας αυτής καθαυτής της υπεργλυκαιμίας.

Η ανεξάρτητη συσχέτιση του ποσοστού HbF αποκλειστικά με το GG-HPLC και όχι με το GG-TINIA, δηλοί παρεμβολή της αυξημένης τιμής της HbF στη μέτρηση της HbA1c με τη (συγκεκριμένη) μέθοδο HPLC. Σε απόλυτο βαθμό, το μέγεθος της παρεμβολής είναι πιθανώς μικρό από κλινικής σκοπιάς (απόλυτη αύξηση της HbA1c κατά 0.15% για κάθε 1% απόλυτη αύξηση της HbF). Ωστόσο το εύρημα αυτό υπαγορεύει την προτεραιότητα της χρήσης της TINIA έναντι της HPLC σε καταστάσεις που αναμένεται αύξηση της HbF όπως είναι η εβΜΑ.

5. Συμπεράσματα

Μεταξύ των ατόμων χωρίς ΣΔ, η επίδραση της εβΜΑ στη διαμόρφωση των τιμών της HbA1c είναι μικρής σημασίας από κλινικής άποψης. Μεταξύ ατόμων με ΣΔ ουδεμία επίδραση παρατηρείται. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της χρήσης της HbA1c για σκοπούς διάγνωσης και παρακολούθησης της θεραπείας του ΣΔ στον πληθυσμό των ατόμων με εβΜΑ, αν και συνιστάται προσοχή κι ενδεχομένως χρήση εναλλακτικών μέσων διάγνωσης

(καμπύλη γλυκόζης) μεταξύ αυτών με σημαντική αναιμία. Στον εν λόγω πληθυσμό συνιστάται η χρήση TINIA υπέρ της HPLC κατά την εργαστηριακή μέτρηση της HbA1c.

6. Περίληψη

Στόχοι: Η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στη διερεύνηση της επίδρασης της ετεροζύγου β-θαλασσαιμίας (εβΜΑ) στα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) μεταξύ ατόμων με και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη.

Υλικά και Μέθοδοι: Η HbA1c μελετήθηκε συγχρονικά σε δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς ως ακολούθως: (α) μεταξύ δύο υποομάδων χωρίς ΣΔ (100 άτομα με εβΜΑ και 100 αιματολογικώς υγιή άτομα-ομάδα ελέγχου), σταθμισμένων ως προς ηλικία, φύλο και δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), λαμβάνοντας υπ' όψη τις τιμές γλυκόζης νηστείας και φρουκτοζαμίνης ορού. Εξετάστηκε επιπλέον η επίδραση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης και του ποσοστού HbF. (β) μεταξύ δύο υποομάδων ατόμων με ΣΔ (77 άτομα με εβΜΑ και 71 αιματολογικώς υγιή άτομα-ομάδα ελέγχου) σταθμισμένων ως προς ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, τύπο και διάρκεια ΣΔ, και παρουσία επιπλοκών, λαμβάνοντας υπ' όψη τις τιμές γλυκόζης νηστείας και φρουκτοζαμίνης ορού. Συνεκρίθη επιπλέον το χάσμα γλυκοζυλίωσης (GG) μεταξύ των δύο υποομάδων. Εξετάστηκε επιπλέον η επίδραση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης και χολερυθρίνης, του ποσοστού δικτυοερυθροκυττάρων και του ποσοστού HbF.

Αποτελέσματα: Στον πληθυσμό (α) η μέση τιμή της HbA1c ήταν πανομιότυπη μεταξύ των δύο υποομάδων. Μεταξύ των συμμετεχόντων με εβΜΑ και μόνον, διαπιστώθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της HbA1c με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ($r=0.455$, $p<0.001$). Υψηλότερες τιμές HbA1c διαπιστώθηκαν μεταξύ ατόμων με εβΜΑ χωρίς αναιμία σε σχέση με αυτά με αναιμία (5.35% vs. 5.12% $p<0.001$, απόλυτη διαφορά 0.23%). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση η HbA1c φάνηκε να σχετίζεται με το θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, το ΔΜΣ και τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης. Η συσχέτιση με την εβΜΑ ήταν μη σημαντική ($p=0.07$), όμως μετά από διόρθωση ως προς το ποσοστό της HbF, αποκαλύφθηκε μια ανεξάρτητη σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ εβΜΑ και HbA1c. Στον πληθυσμό (β), ουδεμία σημαντική επίδραση της εβΜΑ στα επίπεδα της HbA1c ή στο GG

διαπιστώθηκε, παρά την υπολογίσιμη επίδραση των παραμέτρων που σχετίζονται με το ρυθμό ανακύκλωσης των ερυθροκυττάρων.

Συμπέρασμα: Η εβΜΑ και η σχετιζόμενη με αυτήν αναιμία έχουν μικρή από κλινικής σκοπιάς επίδραση στις τιμές της HbA1c ενώ μεταξύ ατόμων με ΣΔ ουδεμία επίδραση στα επίπεδα της HbA1c παρατηρείται. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της χρήσης της HbA1c για τη διάγνωση και θεραπευτική παρακολούθηση του ΣΔ.

7. Abstract

Background and Aims: To investigate the effect of heterozygous β -thalassemia on glycosylated hemoglobin (HbA1c) among individuals with and without diabetes mellitus (DM).

Materials and Methods: Using a cross-sectional design, HbA1c levels were studied in two populations as follows: (a) between two subgroups of individuals without DM (100 consecutive carriers of β -thalassemia trait and 100 healthy controls) matched for age, gender and BMI, taking into account fasting serum glucose and fructosamine levels. The effect of hemoglobin concentration and HbF% on HbA1c was also examined. (b) between two subgroups of individuals with DM (77 consecutive carriers of β -thalassemia trait and 71 healthy controls) matched for age, gender, BMI, diabetes type and duration, and presence of complications, considering fasting serum glucose and fructosamine levels. The glycation gap (GG) was calculated. The effect of hemoglobin and bilirubin concentration, HbF(%) and relative reticulocyte count was examined.

Results: In population (a), mean HbA1c level was almost identical in the two groups. Within the group of β -thalassemia, there was a positive correlation between HbA1c and hemoglobin concentration ($r=0.455$, $p<0.001$), which was not observed in controls. β -thalassemia carriers without anemia had slightly higher HbA1c levels compared to those with anemia (5.35% vs. 5.12% $p<0.001$, absolute difference (0.23%). In multivariable analysis, hemoglobin concentration, BMI and 1st degree family history of T2DM were significant predictors of HbA1c, while β -thalassemia carrier state was non-significant ($p=0.07$) but a positive correlation became significant after adjustment for HbF(%). In

population (b) no significant effects of β -thalassemia carrier state was ascertained on either HbA1c level or GG despite the considerable effects of erythrocyte turnover-related parameters.

Conclusions: The effect of heterozygous β -thalassemia and β -thalassemia trait-associated anemia on HbA1c among individuals without DM is of negligible clinical significance while no effect of heterozygous β -thalassemia on HbA1c values is observed among individuals with DM. These findings advocate for the clinical use of HbA1c as a diagnostic criterion for diabetes mellitus and for long-term therapeutic monitoring among β -thalassemia carriers.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes care*. Jan 2019;42(Suppl 1):S13-S28.
2. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. Mar 2019;92:6-10.
3. WHO. Global Report on Diabetes. 2016.
4. Group DP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Aug 2006;23(8):857-866.
5. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. Jun 13 2009;373(9680):2027-2033.
6. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Medicine*. Dec 2014;42(12):698-702.
7. Tentolouris N, Andrianakos A, Karanikolas G, et al. Prevalence of diabetes mellitus and obesity in the general adult population of Greece: a door-to-door epidemiological study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Apr 2009;26(4):451-452.
8. Liatis S, Dafoulas GE, Kani C, et al. The prevalence and treatment patterns of diabetes in the Greek population based on real-world data from the nation-wide prescription database. *Diabetes research and clinical practice*. Aug 2016;118:162-167.
9. Thomas MC, Walker MK, Emberson JR, et al. Prevalence of undiagnosed Type 2 diabetes and impaired fasting glucose in older British men and women. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Jun 2005;22(6):789-793.
10. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes care*. Jan 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
11. Mirahmadizadeh A, Fathalipour M, Mokhtari AM, Zeighami S, Hassanipour S, Heiran A. The prevalence of undiagnosed type 2 diabetes and prediabetes in Eastern Mediterranean region (EMRO): A systematic review and meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice*. Feb 2020;160:107931.
12. Asmelash D, Asmelash Y. The Burden of Undiagnosed Diabetes Mellitus in Adult African Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of diabetes research*. 2019;2019:4134937.
13. Mehmood K, Junaid N. Prevalence of undiagnosed type 2 diabetes mellitus in Pakistan: Results of screen-diabetes disease registry. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*. Aug 2018;68(8):1171-1178.

14. Zimmet P. The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes & metabolism*. Sep 2003;29(4 Pt 2):6S9-18.
15. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. Jul 1997;20(7):1183-1197.
16. Tapp RJ, Tikellis G, Wong TY, et al. Longitudinal association of glucose metabolism with retinopathy: results from the Australian Diabetes Obesity and Lifestyle (AusDiab) study. *Diabetes care*. Jul 2008;31(7):1349-1354.
17. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. Aug 1995;44(8):968-983.
18. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*. Aug 12 2000;321(7258):405-412.
19. International Expert C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes care*. Jul 2009;32(7):1327-1334.
20. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes care*. Jan 2010;33 Suppl 1:S11-61.
21. *Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation*. Geneva 2011.
22. UK D. Diagnostic criteria for diabetes.
23. Bansal N. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. *World journal of diabetes*. Mar 15 2015;6(2):296-303.
24. Knaebel J, Irvin BR, Xie CZ. Accuracy and clinical utility of a point-of-care HbA1c testing device. *Postgraduate medicine*. May 2013;125(3):91-98.
25. Sanchez-Mora C, M SR-O, Fernandez-Riejos P, et al. Evaluation of two HbA1c point-of-care analyzers. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Apr 2011;49(4):653-657.
26. Grant DA, Dunseath GJ, Churm R, Luzio SD. Comparison of a point-of-care analyser for the determination of HbA1c with HPLC method. *Practical laboratory medicine*. Aug 2017;8:26-29.
27. Rohlfing CL, Hanson S, Tennill AL, Little RR. Effects of whole blood storage on hemoglobin a1c measurements with five current assay methods. *Diabetes technology & therapeutics*. Mar 2012;14(3):271-275.
28. Sharma B, Sarmah D, Sonker P. Effect of Different Anticoagulants on HbA1C Estimation and its Stability. *Journal of laboratory physicians*. Jul 2013;5(2):143-144.

29. Camargo JL, Felisberto M, Gross JL. Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care. *Clinical biochemistry*. Sep 2004;37(9):836-839.
30. Murphy JM, Browne RW, Hill L, et al. Effects of transportation and delay in processing on the stability of nutritional and metabolic biomarkers. *Nutrition and cancer*. 2000;37(2):155-160.
31. Bruns DE, Knowler WC. Stabilization of glucose in blood samples: why it matters. *Clinical chemistry*. May 2009;55(5):850-852.
32. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glycohemoglobin. *Clinical chemistry*. Jul 2002;48(7):1116-1118.
33. Petersen PH, Jorgensen LG, Brandslund I, De Fine Olivarius N, Stahl M. Consequences of bias and imprecision in measurements of glucose and hba1c for the diagnosis and prognosis of diabetes mellitus. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*. 2005;240:51-60.
34. Ollerton RL, Playle R, Ahmed K, Dunstan FD, Luzio SD, Owens DR. Day-to-day variability of fasting plasma glucose in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care*. Mar 1999;22(3):394-398.
35. d'Emden MC, Shaw JE, Colman PG, et al. The role of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in Australia. *The Medical journal of Australia*. Aug 20 2012;197(4):220-221.
36. American Diabetes A. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes care*. Jan 2019;42(Suppl 1):S90-S102.
37. Garber AJ, Handelsman Y, Grunberger G, et al. Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm - 2020 Executive Summary. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. Jan 2020;26(1):107-139.
38. Εταιρία ΕΔ. Κατευθυντήριες Οδηγιές για τη Διαχείριση του Διαβητικού Ασθενούς. 2019.
39. Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, et al. Measurement of Hba(1C) in patients with chronic renal failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Mar 15 2013;418:73-76.
40. Shipman KE, Jawad M, Sullivan KM, Ford C, Gama R. Effect of chronic kidney disease on A1C in individuals being screened for diabetes. *Primary care diabetes*. Apr 2015;9(2):142-146.
41. Karsegard J, Wicky J, Mensi N, Caulfield A, Philippe J. Spurious glycohemoglobin values associated with hydroxyurea treatment. *Diabetes care*. Jul 1997;20(7):1211-1212.
42. Sillanaukee P, Seppa K, Koivula T. Effect of acetaldehyde on hemoglobin: HbA1ach as a potential marker of heavy drinking. *Alcohol*. Sep-Oct 1991;8(5):377-381.

43. Unnikrishnan R, Anjana RM, Mohan V. Drugs affecting HbA1c levels. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. Jul 2012;16(4):528-531.
44. Unnikrishnan R, Anjana RM, Jayashri R, Mohan V. Unexpectedly low HbA1c levels in two diabetes patients following dapsone use. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. Jul 2012;16(4):658-659.
45. Falko JM, O'Dorisio TM, Cataland S. Spurious elevations in glycosylated hemoglobin (HbA1) secondary to hypertriglyceridemia. *Archives of internal medicine*. Jul 1982;142(7):1370-1371.
46. Garrib A, Griffiths W, Eldridge P, Hatton R, Worsley A, Crook M. Artificially low glycosylated haemoglobin in a patient with severe hypertriglyceridaemia. *Journal of clinical pathology*. May 2003;56(5):394-395.
47. Choi SW, Lee YH, Kweon SS, et al. Association between total bilirubin and hemoglobin A1c in Korean type 2 diabetic patients. *Journal of Korean medical science*. Oct 2012;27(10):1196-1201.
48. Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. Increased glycosylated haemoglobin A1 in opiate addicts: evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia*. May 1982;22(5):379.
49. Nowatzke WL, Parvin CA, Scott MG, Hock K, Cole TG. Correction of positive bias of the Roche Tina-quant II hemoglobin A1c (HbA1c) assay at low HbA1c percentages. *Clinical chemistry*. May 2001;47(5):976-978.
50. Gallagher EJ, Le Roith D, Bloomgarden Z. Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. *Journal of diabetes*. Mar 2009;1(1):9-17.
51. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes*. Feb 1992;41(2):167-173.
52. Qian P, Cheng S, Guo J, Niu Y. [Effects of vitamin E and vitamin C on nonenzymatic glycation and peroxidation in experimental diabetic rats]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. Jul 2000;29(4):226-228.
53. Camargo JL, Stiff J, Gross JL. The effect of aspirin and vitamins C and E on HbA1c assays. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Oct 2006;372(1-2):206-209.
54. Babker AM, Eltom A, Osman A. Correlation of oxidative stress markers malondialdehyde (Mda), antioxidant vitamins A, E, and C with glycosylated hemoglobin (HBA1C) levels in type 2 diabetes mellitus. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 05/01 2018;11.
55. Cavagnoli G, Pimentel AL, Freitas PA, Gross JL, Camargo JL. Effect of ethnicity on HbA1c levels in individuals without diabetes: Systematic review and meta-analysis. *PLoS one*. 2017;12(2):e0171315.

56. Gould BJ, Davie SJ, Yudkin JS. Investigation of the mechanism underlying the variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Apr 4 1997;260(1):49-64.
57. L. C. Maillard. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1912.
58. Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Jun 2005;1043:9-19.
59. Garlick RL, Mazer JS, Higgins PJ, Bunn HF. Characterization of glycosylated hemoglobins. Relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins. *The Journal of clinical investigation*. May 1983;71(5):1062-1072.
60. McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, Solway J, Bunn HF. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. Purification, identification, and partial structural analysis. *The Journal of biological chemistry*. Apr 10 1978;253(7):2327-2332.
61. 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. *European journal of biochemistry*. May 1980;106(2):353-359.
62. Prome D, Blouquit Y, Ponthus C, Prome JC, 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. *The Journal of biological chemistry*. Jul 15 1991;266(20):13050-13054.
63. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. *Diabetes care*. Aug 2016;39(8):1299-1306.
64. John WG, Little R, Sacks DB, et al. Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Feb 2015;53(2):319-327.
65. Singh K, Mahajan B, Singh S, Mahdi AA. Labile hemoglobin A1c: A factor affecting the estimation of glycated hemoglobin. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 12/29 2017;8:124-126.
66. Jeffcoate SL. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Jul 2004;21(7):657-665.
67. Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*. Apr 7 1978;200(4337):21-27.

68. Fitzgibbons JF, Koler RD, Jones RT. Red cell age-related changes of hemoglobins Ala+b and Alc in normal and diabetic subjects. *The Journal of clinical investigation*. Oct 1976;58(4):820-824.
69. Fonseca LL, Alezi HS, Moreno A, Barnwell JW, Galinski MR, Voit EO. Quantifying the removal of red blood cells in *Macaca mulatta* during a *Plasmodium coatneyi* infection. *Malaria journal*. Aug 12 2016;15(1):410.
70. 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*. Feb 2002;25(2):275-278.
71. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes care*. Aug 2008;31(8):1473-1478.
72. Diabetes C, Complications Trial Research G, Nathan DM, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. Sep 30 1993;329(14):977-986.
73. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. Dec 22 2005;353(25):2643-2653.
74. Stettler C, Allemann S, Juni P, et al. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *American heart journal*. Jul 2006;152(1):27-38.
75. Hasan R, Firwana B, Elraiyah T, et al. A systematic review and meta-analysis of glycemic control for the prevention of diabetic foot syndrome. *Journal of vascular surgery*. Feb 2016;63(2 Suppl):22S-28S e21-22.
76. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *The Cochrane database of systematic reviews*. Jun 13 2012(6):CD007543.
77. A. G. Schnek WAS. The Relation between the Minor Components of Whole Normal Human Adult Hemoglobin as Isolated by Chromatography and Starch Block Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.* 1961;83(6):1472-1478.
78. Marguerite Davis Clegg WAS. A Chromatographic Study of the Minor Components of Normal Adult Human Hemoglobin Including a Comparison of Hemoglobin from Normal and Phenylketonuric Individuals. *J. Am. Chem. Soc.* 1959;81(22):6065-6069.

79. Holmquist WR, Schroeder WA. A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry*. Aug 1966;5(8):2489-2503.
80. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and biophysical research communications*. Aug 22 1969;36(5):838-843.
81. Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *The Journal of clinical investigation*. Jun 1976;57(6):1652-1659.
82. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. Aug 19 1976;295(8):417-420.
83. Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *The Journal of biological chemistry*. May 25 1981;256(10):5204-5208.
84. 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*. Sep 12 1998;352(9131):837-853.
85. Program NGS. Harmonizing Hemoglobin A_{1c} testing.
86. John WG, Mosca A, Weykamp C, Goodall I. HbA_{1c} standardisation: history, science and politics. *The Clinical biochemist. Reviews*. Nov 2007;28(4):163-168.
87. Goodall I. HbA_{1c} standardisation destination--global IFCC Standardisation. How, why, where and when--a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *The Clinical biochemist. Reviews*. Feb 2005;26(1):5-19.
88. Gillery P. A history of HbA_{1c} through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Jan 2013;51(1):65-74.
89. Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A_{1c}. *Journal of diabetes science and technology*. May 1 2009;3(3):439-445.
90. Jaisson S, Leroy N, Meurice J, Guillard E, Gillery P. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing(R) (Sebia) as a new analyzer for HbA_{1c} assay by capillary electrophoresis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Oct 1 2012;50(10):1769-1775.
91. Wang X, Xia N, Liu L. Boronic Acid-based approach for separation and immobilization of glycoproteins and its application in sensing. *International journal of molecular sciences*. Oct 17 2013;14(10):20890-20912.

92. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham JL. Enzyme immunoassay--a new technique for estimating hemoglobin A1c. *Clinical chemistry*. Apr 1993;39(4):663-666.
93. Liu L, Hood S, Wang Y, et al. Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples. *Clinical biochemistry*. May 2008;41(7-8):576-583.
94. Molinaro RJ. Targeting HbA1c: standardization and clinical laboratory measurement. *MLO: medical laboratory observer*. Jan 2008;40(1):10-14, 16-19.
95. Eur AcTG. 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. *Clinical chemistry*. Aug 2018;64(8):1183-1192.
96. Nasir NM, Thevarajah M, Yean CY. Hemoglobin variants detected by hemoglobin A1c (HbA1c) analysis and the effects on HbA1c measurements. *International journal of diabetes in developing countries*. Apr 2010;30(2):86-90.
97. Weykamp C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Annals of laboratory medicine*. Nov 2013;33(6):393-400.
98. Research NifH. Point-of-care HbA1c tests - diagnosis of diabetes. 2016.
99. Krhac M, Lovrencic MV. Update on biomarkers of glycemic control. *World journal of diabetes*. Jan 15 2019;10(1):1-15.
100. Campbell L, Pepper T, Shipman K. HbA1c: a review of non-glycaemic variables. *Journal of clinical pathology*. Jan 2019;72(1):12-19.
101. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Mar 15 2013;418:63-71.
102. Goodall I, Colman PG, Schneider HG, McLean M, Barker G. Desirable performance standards for HbA(1c) analysis - precision, accuracy and standardisation: consensus statement of the Australasian Association of Clinical Biochemists (AACB), the Australian Diabetes Society (ADS), the Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), Endocrine Society of Australia (ESA), and the Australian Diabetes Educators Association (ADEA). *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2007;45(8):1083-1097.
103. Funtanilla VD, Candidate P, Caliendo T, Hilas O. Continuous Glucose Monitoring: A Review of Available Systems. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. Sep 2019;44(9):550-553.
104. Yamanouchi T, Akanuma Y. Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control. *Diabetes research and clinical practice*. Oct 1994;24 Suppl:S261-268.

105. Dungan KM, Buse JB, Largay J, et al. 1,5-anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by continuous glucose monitoring system in moderately controlled patients with diabetes. *Diabetes care*. Jun 2006;29(6):1214-1219.
106. Stettler C, Stahl M, Allemann S, et al. Association of 1,5-anhydroglucitol and 2-h postprandial blood glucose in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. Aug 2008;31(8):1534-1535.
107. Nowatzke W, Sarno MJ, Birch NC, Stickle DF, Eden T, Cole TG. Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Dec 2004;350(1-2):201-209.
108. Peters T, Jr. Serum albumin. *Advances in protein chemistry*. 1985;37:161-245.
109. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes care*. Apr 1995;18(4):440-447.
110. Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *Journal of diabetes science and technology*. Mar 2015;9(2):169-176.
111. Selvin E, Sacks DB. Monitoring Glycemic Control in End-Stage Renal Disease: What Should Be Measured? *Clinical chemistry*. Feb 2017;63(2):447-449.
112. Garman E, Chadburn AJ, Abbas R, et al. Fructosamine: A Negative Acute Phase Reactant. *Journal of diabetes science and technology*. Jan 2018;12(1):234-235.
113. Selvin E, Warren B, He X, Sacks DB, Saenger AK. Establishment of Community-Based Reference Intervals for Fructosamine, Glycated Albumin, and 1,5-Anhydroglucitol. *Clinical chemistry*. May 2018;64(5):843-850.
114. Koga M, Otsuki M, Matsumoto S, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Negative association of obesity and its related chronic inflammation with serum glycated albumin but not glycated hemoglobin levels. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Mar 2007;378(1-2):48-52.
115. Zafon C, Ciudin A, Valladares S, Mesa J, Simo R. Variables involved in the discordance between HbA1c and fructosamine: the glycation gap revisited. *PloS one*. 2013;8(6):e66696.
116. Rodriguez-Segade S, Rodriguez J, Garcia Lopez JM, Casanueva FF, Camina F. Estimation of the glycation gap in diabetic patients with stable glycemic control. *Diabetes care*. Dec 2012;35(12):2447-2450.

117. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH. Discordance between HbA1c and fructosamine: evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes care*. Jan 2003;26(1):163-167.
118. Paleari R, Strollo M, Guerra E, Ceriotti F, Mosca A. Glycation gap: An additional tool for glycometabolic monitoring. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Dec 1 2016;463:27-31.
119. Sacks DB, Nathan DM, Lachin JM. Gaps in the glycation gap hypothesis. *Clinical chemistry*. Feb 2011;57(2):150-152.
120. Macdonald DR, Hanson AM, Holland MR, Singh BM. Clinical impact of variability in HbA1c as assessed by simultaneously measuring fructosamine and use of error grid analysis. *Annals of clinical biochemistry*. Jul 2008;45(Pt 4):421-425.
121. Cosson E, Banu I, Cussac-Pillegand C, et al. Glycation gap is associated with macroproteinuria but not with other complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. Jul 2013;36(7):2070-2076.
122. Nayak AU, Nevill AM, Bassett P, Singh BM. Association of glycation gap with mortality and vascular complications in diabetes. *Diabetes care*. Oct 2013;36(10):3247-3253.
123. Rodriguez-Segade S, Rodriguez J, Cabezas-Agricola JM, Casanueva FF, Camina F. Progression of nephropathy in type 2 diabetes: the glycation gap is a significant predictor after adjustment for glycohemoglobin (Hb A1c). *Clinical chemistry*. Feb 2011;57(2):264-271.
124. Soros AA, Chalew SA, McCarter RJ, Shepard R, Hempe JM. Hemoglobin glycation index: a robust measure of hemoglobin A1c bias in pediatric type 1 diabetes patients. *Pediatric diabetes*. Nov 2010;11(7):455-461.
125. Hempe JM, Liu S, Myers L, McCarter RJ, Buse JB, Fonseca V. The hemoglobin glycation index identifies subpopulations with harms or benefits from intensive treatment in the ACCORD trial. *Diabetes care*. Jun 2015;38(6):1067-1074.
126. van Steen SC, Schrieke IC, Hoekstra JB, et al. The haemoglobin glycation index as predictor of diabetes-related complications in the AleCardio trial. *European journal of preventive cardiology*. May 2017;24(8):858-866.
127. Kim MK, Jeong JS, Yun JS, et al. Hemoglobin glycation index predicts cardiovascular disease in people with type 2 diabetes mellitus: A 10-year longitudinal cohort study. *Journal of diabetes and its complications*. Oct 2018;32(10):906-910.
128. van Steen SC, Woodward M, Chalmers J, et al. Haemoglobin glycation index and risk for diabetes-related complications in the Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and

- Diamicron Modified Release Controlled Evaluation (ADVANCE) trial. *Diabetologia*. Apr 2018;61(4):780-789.
129. Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Van Schaftingen E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *The Biochemical journal*. Aug 1 2002;365(Pt 3):801-808.
 130. Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes*. Sep 2001;50(9):2139-2147.
 131. Dunmore SJ, Al-Derawi AS, Nayak AU, et al. Evidence That Differences in Fructosamine-3-Kinase Activity May Be Associated With the Glycation Gap in Human Diabetes. *Diabetes*. Jan 2018;67(1):131-136.
 132. Delpierre G, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Buysschaert M, Van Schaftingen E. Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. *Diabetes & metabolism*. Feb 2006;32(1):31-39.
 133. Nienhuis AW, Nathan DG. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the beta-Thalasseмии. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Dec 1 2012;2(12):a011726.
 134. Marengo-Rowe AJ. The thalasseмии and related disorders. *Proceedings*. Jan 2007;20(1):27-31.
 135. Yu X, Mollan TL, Butler A, Gow AJ, Olson JS, Weiss MJ. Analysis of human alpha globin gene mutations that impair binding to the alpha hemoglobin stabilizing protein. *Blood*. Jun 4 2009;113(23):5961-5969.
 136. Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *British journal of haematology*. Jun 2006;133(6):675-682.
 137. Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Experimental hematology*. Dec 2000;28(12):1343-1353.
 138. Origa R. beta-Thalassaemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. Jun 2017;19(6):609-619.
 139. Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassaemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*. Sep 15 2002;100(6):2040-2045.

140. Viprakasit V, Gibbons RJ, Broughton BC, et al. Mutations in the general transcription factor TFIID result in beta-thalassaemia in individuals with trichothiodystrophy. *Human molecular genetics*. Nov 15 2001;10(24):2797-2802.
141. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, et al. Distribution and frequency of beta-thalassaemia mutations in northwestern and central Greece. *European journal of haematology*. Feb 2003;70(2):75-78.
142. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Bailliere's clinical haematology*. Mar 1998;11(1):1-51.
143. Li CK. New trend in the epidemiology of thalassaemia. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. Feb 2017;39:16-26.
144. Vichinsky EP. Changing patterns of thalassaemia worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1054:18-24.
145. Kyrri AR, Kalogerou E, Loizidou D, et al. The changing epidemiology of beta-thalassaemia in the Greek-Cypriot population. *Hemoglobin*. 2013;37(5):435-443.
146. Ashiotis T, Zachariadis Z, Sofroniadou K, Loukopoulos D, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia in Cyprus. *British medical journal*. Apr 7 1973;2(5857):38-42.
147. Cao A, Galanello R, Furbetta M, et al. Thalassaemia types and their incidence in Sardinia. *Journal of medical genetics*. Dec 1978;15(6):443-447.
148. Malamos B, Fessas P, Stamatoyannopoulos G. Types of thalassaemia-trait carriers as revealed by a study of their incidence in Greece. *British journal of haematology*. Jan 1962;8:5-14.
149. Nemeth E. Hepcidin in beta-thalassaemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Aug 2010;1202:31-35.
150. Musallam KM, Taher AT, Rachmilewitz EA. beta-thalassaemia intermedia: a clinical perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Jul 2012;2(7):a013482.
151. Miller WP. Anomalous origin of the right coronary artery from the ascending aorta. *Catheterization and cardiovascular diagnosis*. Dec 1990;21(4):294.
152. Cao A, Galanello R. Beta-thalassaemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. Feb 2010;12(2):61-76.
153. Malamos B, Belcher EH, Gyftaki E, Binopoulos D. Simultaneous radioactive tracer studies of erythropoiesis and red-cell destruction in thalassaemia. *British journal of haematology*. Oct 1961;7:411-429.

154. Huang YY, Huang MJ, Wang HL, Chan CC, Huang CS. Bilirubin concentrations in thalassemia heterozygotes in university students. *European journal of haematology*. Apr 2011;86(4):317-323.
155. Borgna-Pignatti C, Rigon F, Merlo L, et al. Thalassemia minor, the Gilbert mutation, and the risk of gallstones. *Haematologica*. Oct 2003;88(10):1106-1109.
156. Triantafyllou AI, Vyssoulis GP, Karpanou EA, et al. Impact of beta-thalassemia trait carrier state on cardiovascular risk factors and metabolic profile in patients with newly diagnosed hypertension. *Journal of human hypertension*. May 2014;28(5):328-332.
157. Vyssoulis G, Karpanou E, Kyvelou SM, et al. Ambulatory blood pressure profile in hypertensive patients with beta-thalassemia minor. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. Feb 2011;34(2):253-256.
158. Hashemi M, Shirzadi E, Talaei Z, et al. Effect of heterozygous beta-thalassaemia trait on coronary atherosclerosis via coronary artery disease risk factors: a preliminary study. *Cardiovascular journal of Africa*. May-Jun 2007;18(3):165-168.
159. Bozdar M, Ahmed S, Anwar J. Relative protection from ischaemic heart disease in beta-thalassaemia carriers. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. Oct 2010;20(10):653-656.
160. Jameel T, Baig M, Ahmed I, Hussain MB, Alkhamaly MBD. Differentiation of beta thalassemia trait from iron deficiency anemia by hematological indices. *Pakistan journal of medical sciences*. May-Jun 2017;33(3):665-669.
161. Lee YK, Kim HJ, Lee K, et al. Recent progress in laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathy: a study by the Korean Red Blood Cell Disorder Working Party of the Korean Society of Hematology. *Blood research*. Mar 2019;54(1):17-22.
162. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clinical biochemistry*. Dec 2009;42(18):1786-1796.
163. Cohen RM, Franco RS, Khera PK, et al. Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*. Nov 15 2008;112(10):4284-4291.
164. Mosca A, Paleari R, Leone D, Ivaldi G. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clinical biochemistry*. Dec 2009;42(18):1797-1801.
165. Rohlfing CL, Connolly SM, England JD, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method. *American journal of clinical pathology*. May 2008;129(5):811-814.

166. Nathan DG, Stossel TB, Gunn RB, Zarkowsky HS, Laforet MT. Influence of hemoglobin precipitation on erythrocyte metabolism in alpha and beta thalassemia. *The Journal of clinical investigation*. Jan 1969;48(1):33-41.
167. Gerli GC, Beretta L, Bianchi M, Pellegatta A, Agostoni A. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in beta-thalassaemia (major and minor). *Scandinavian journal of haematology*. Jul 1980;25(1):87-92.
168. Ricci G, Castaldi G, Zavagli G, Lupi G, Turati A, Bezzi T. Red cell 2,3-diphosphoglycerate contents and oxygen affinity in heterozygous beta-thalassaemia. *Acta haematologica*. 1982;68(1):63-64.
169. Lowrey CH, Lyness SJ, Soeldner JS. The effect of hemoglobin ligands on the kinetics of human hemoglobin A1c formation. *The Journal of biological chemistry*. Sep 25 1985;260(21):11611-11618.
170. Gomber S, Bagaria A, Madhu SV, Dewan P. Glucose Homeostasis Markers in Beta-Thalassemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*. Oct 2018;40(7):508-510.
171. Danescu LG, Levy S, Levy J. Markedly low hemoglobin A1c in a patient with an unusual presentation of beta-thalassemia minor. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. Jan-Feb 2010;16(1):89-92.
172. Polage C, Little RR, Rohlfing CL, Cole TG, Roberts WL. Effects of beta thalassemia minor on results of six glycosylated hemoglobin methods. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Dec 2004;350(1-2):123-128.
173. Al-Fadhli SM, Ahmad AA, Al-Jafar HA. Effect of sickle cell trait and B-Thalassemia minor on determinations of HbA1c by an immunoassay method. *Saudi medical journal*. Aug 2001;22(8):686-689.
174. Ji L, Yu J, Zhou Y, et al. Erroneous HbA1c measurements in the presence of beta-thalassemia and common Chinese hemoglobin variants. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Aug 2015;53(9):1451-1458.
175. Lacy ME, Wellenius GA, Sumner AE, et al. Association of Sickle Cell Trait With Hemoglobin A1c in African Americans. *Jama*. Feb 7 2017;317(5):507-515.
176. Xu A, Ji L, Chen W, Xia Y, Zhou Y. Effects of alpha-Thalassemia on HbA1c Measurement. *Journal of clinical laboratory analysis*. Nov 2016;30(6):1078-1080.
177. Εταιρία ΕΔ. Κατευθυντήριες Οδηγιές για τη Διαχείριση του Διαβητικού Ασθενούς. 2013.

178. Riou J, Godart C, Mathis M, et al. Evaluation of the Bio-Rad VARIANT II HbA2/HbA1C Dual Program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2005;43(2):237-243.
179. Fleming JK. Evaluation of HbA1c on the Roche COBAS Integra 800 closed tube system. *Clinical biochemistry*. Jul 2007;40(11):822-827.
180. Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine*. Aug 15 2006;145(4):247-254.
181. Radin MS. Pitfalls in hemoglobin A1c measurement: when results may be misleading. *Journal of general internal medicine*. Feb 2014;29(2):388-394.
182. Nutritional anaemias : report of a WHO scientific group. 1967.
183. Raczkowska E, Bronkowska M. The Effect of the Body Mass Indexes of Young Healthy Individuals on the Glycemic Indexes of Traditional and Modified Vegetarian Meals. *Nutrients*. Oct 22 2019;11(10).
184. Wang J, Yan R, Wen J, et al. Association of lower body mass index with increased glycemic variability in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a cross-sectional study in China. *Oncotarget*. Sep 22 2017;8(42):73133-73143.
185. Zhang J, Yang Z, Xiao J, et al. Association between family history risk categories and prevalence of diabetes in Chinese population. *PloS one*. 2015;10(2):e0117044.
186. English E, Idris I, Smith G, Dhatariya K, Kilpatrick ES, John WG. The effect of anaemia and abnormalities of erythrocyte indices on HbA1c analysis: a systematic review. *Diabetologia*. Jul 2015;58(7):1409-1421.
187. Evans TC, Jehle D. The red blood cell distribution width. *The Journal of emergency medicine*. 1991;9 Suppl 1:71-74.
188. Lippi G, Targher G, Salvagno GL, Guidi GC. Increased red blood cell distribution width (RDW) is associated with higher glycosylated hemoglobin (HbA1c) in the elderly. *Clinical laboratory*. 2014;60(12):2095-2098.
189. Bao X, Wan M, Gu Y, et al. Red cell distribution width is associated with hemoglobin A1C elevation, but not glucose elevation. *Journal of diabetes and its complications*. Oct 2017;31(10):1544-1548.
190. Negro H, Morley JE, Rosenthal MJ. Utility of serum fructosamine as a measure of glycemia in young and old diabetic and non-diabetic subjects. *The American journal of medicine*. Sep 1988;85(3):360-364.

191. Mittman N, Desiraju B, Fazil I, et al. Serum fructosamine versus glycosylated hemoglobin as an index of glycemic control, hospitalization, and infection in diabetic hemodialysis patients. *Kidney international. Supplement*. Aug 2010(117):S41-45.
192. Kawahara R, Amemiya T, Komori T, Hirata Y. The effect of blood glucose concentration on labile A1c in diabetic patients. *Diabetes care*. Jul-Aug 1985;8(4):375-379.
193. Dziedzic M, Petkowicz B, Michalak M, Solski J. Level of glycation gap in a healthy subject. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2012;19(4):842-845.
194. Ardawi MS, Nasrat HA, Bahnassy AA. Fructosamine in obese normal subjects and type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Jan-Feb 1994;11(1):50-56.
195. Balagopal P, Bayne E, Sager B, Russell L, Patton N, George D. Effect of lifestyle changes on whole-body protein turnover in obese adolescents. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. Oct 2003;27(10):1250-1257.
196. Nuttall FQ, Gannon MC, Swaim WR, Adams MJ. Stability over time of glycohemoglobin, glucose, and red blood cell survival in hematologically stable people without diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*. Nov 2004;53(11):1399-1404.
197. Kawamoto R, Ninomiya D, Senzaki K, Kumagi T. Mildly elevated serum total bilirubin is negatively associated with hemoglobin A1c independently of confounding factors among community-dwelling middle-aged and elderly persons. *Journal of circulating biomarkers*. Jan-Dec 2017;6:1849454417726609.
198. Desjarlais F, Comtois R, Beauregard H, Nguyen M, Letellier G. Technical and clinical evaluation of fructosamine determination in serum. *Clinical biochemistry*. Aug 1989;22(4):329-335.
199. Virtue MA, Furne JK, Nuttall FQ, Levitt MD. Relationship between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. *Diabetes care*. Apr 2004;27(4):931-935.