

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Ιατρικής  
Π.Σ.Ε. Ιατρικής Βιοχημείας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Ημερομ. .... 31.10.102 .....  
Αριθ. Πρωτ. .... 2397 .....

15

## Διπλωματική Εργασία της Ευφραιμίδου Σμαράγδας

### ΘΕΜΑ

«Προσδιορισμός τιμών αναφοράς γλυκόζης ορού, γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης αίματος και μικροαλβουμίνης ούρων σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και διαβητική νεφροπάθεια στην Περιφέρεια Θεσσαλίας»

Υπό την εποπτεία των:

- Σ. Μπονάνου - Τζεδάκη
- Γ. Κουκούλη
- Ε. Νταμάνη

Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης

- Σ. Μπονάνου - Τζεδάκη
- Γ. Κουκούλης
- Ε. Γεωργάτσου

Ιούλιος 2002



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 1963/1

Ημερ. Εισ.: 3-2-2003

Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΕΥΦ

CP. 810... 15/2002

## Περιεχόμενα

### Σελίδα

#### Περίληψη (Abstract)

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Εισαγωγή – Σκοπός της εργασίας</b>                            | <b>1</b>  |
| <b>2. Θεωρητικό Μέρος</b>   | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Φυσιολογία ομοιοστασίας της γλυκόζης</b>                    | <b>2</b>  |
| <b>2.1.1 Προέλευση της γλυκόζης αίματος</b>                         | <b>2</b>  |
| <b>2.1.2 Ορμονικοί μηχανισμοί ρύθμισης της γλυκόζης του αίματος</b> | <b>4</b>  |
| <b>2.1.3 Ιστική πρόσληψη γλυκόζης</b>                               | <b>7</b>  |
| <b>2.1.4 Ιστικός Μεταβολισμός</b>                                   | <b>8</b>  |
| <b>2.2. Σακχαρώδης Διαβήτης</b>                                     | <b>9</b>  |
| <b>2.2.1 Ταξινόμηση του σακχαρώδη διαβήτη</b>                       | <b>10</b> |
| <b>2.2.2 Αιτιοπαθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1</b>          | <b>11</b> |
| <b>2.2.3 Αιτιοπαθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2</b>          | <b>14</b> |
| <b>2.2.4 Άλλοι ειδικοί τύποι διαβήτη</b>                            | <b>16</b> |
| <b>2.2.5 Διαβήτης της κύησης</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>2.3. Γλυκίωση πρωτεϊνών</b>                                      | <b>18</b> |
| <b>2.3.1 Επιπλοκές του Διαβήτη</b>                                  | <b>21</b> |
| <b>2.3.2 Διαβητική νεφροπάθεια</b>                                  | <b>21</b> |
| <b>2.3.3 Διαβητική αμφιβληστοριεδοπάθεια</b>                        | <b>23</b> |
| <b>2.4. Εργαστηριακή διερεύνηση του διαβήτη</b>                     | <b>25</b> |
| <b>2.4.1 Γλυκόζη ορού</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.4.2 HbA<sub>1c</sub> αίματος</b>                               | <b>28</b> |
| <b>2.4.3 Μικροαλβουμίνη ούρων</b>                                   | <b>31</b> |
| <b>2.5. Καθορισμός και χρήση τιμών αναφοράς</b>                     | <b>33</b> |
| <b>2.5.1 Στρατηγικές για την επιλογή ατόμων αναφοράς</b>            | <b>34</b> |
| <b>2.5.2 Υπολογισμός τιμών αναφοράς</b>                             | <b>35</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>3. Πειραματικό Μέρος</b>   |    |
| 3.1. Σκοπός της έρευνας   |    |
| 3.2. Επιλογή δείγματος  |    |
| 3.3. Προσδιορισμός γλυκόζης   | 38 |
| 3.4. Προσδιορισμός HbA <sub>1c</sub>                                    | 40 |
| 3.4.1 Προσδιορισμός με HPLC   | 40 |
| 3.4.2 Προσδιορισμός με ανοσοθολοσιμετρία                                | 43 |
| 3.5. Προσδιορισμός μικροαλβουμίνης                                      | 45 |
| 3.6. Προσδιορισμός κρεατινίνης  | 47 |
| 3.7. Αξιολόγηση νέων μεθόδων  | 47 |
| 3.7.1 Προσδιορισμός της HbA <sub>1c</sub> με HPLC                       | 47 |
| 3.7.2 Προσδιορισμός της HbA <sub>1c</sub> με ανοσοθολοσιμετρία          | 49 |
| 3.7.3 Προσδιορισμός μικροαλβουμίνης                                     | 52 |
| <br>  |    |
| <b>4. Αποτελέσματα</b>  | 56 |
| 4.1. Στατιστική Ανάλυση   | 56 |
| 4.2. Γλυκόζη ορού αίματος   | 57 |
| 4.2.1 Κατανομή της γλυκόζης ορού αίματος στο φυσιολογικό δείγμα         | 57 |
| 4.2.2 Κατανομή γλυκόζης ορού αίματος στο δείγμα των ασθενών με διαβήτη  | 59 |
| 4.3. HbA <sub>1c</sub> αίματος  | 60 |
| 4.3.1 Στο φυσιολογικό πληθυσμό με δύο μεθόδους                          | 60 |
| 4.3.2 Στους διαβητικούς ασθενείς με δύο μεθόδους                        | 63 |
| 4.3.3 Ανάλυση συσχέτισης των δύο μεθόδων μέτρησης της HbA <sub>1c</sub> | 65 |
| 4.4. Λόγος μικροαλβουμίνης / κρεατινίνη ούρων                           | 65 |
| 4.4.1 Στο φυσιολογικό πληθυσμό  | 65 |
| 4.4.2 Στους διαβητικούς ασθενείς  | 67 |
| 4.5. Συσχετίσεις  | 69 |
| 4.5.1 Συσχέτιση γλυκόζης HbA <sub>1c</sub>                              | 69 |
| 4.5.2 Συσχέτιση γλυκόζης με το λόγο μικροαλβουμίνη / κρέας              | 69 |
| 4.5.3 Συσχέτιση HbA <sub>1c</sub> με το λόγο μικροαλβουμίνη / κρέας     | 70 |
| 4.5.4 Συσχέτιση των τριών αναλυτών μεταξύ ασθενών που                   |    |

|  |    |
|--|----|
| εκδηλώνουν αμφιβληστροειδοπάθεια και αυτών που δεν εκδηλώνουν. | 70 |
| <b>5. Συζήτηση - Συμπεράσματα</b>                              | 72 |
| <b>Βιβλιογραφία</b>  | 74 |

## Ευχαριστήριο Σημείωμα

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τους υπεύθυνους καθηγητές κ. Σ. Μπονάνου και κ. Γ. Κουκούλη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.
- Την κ. Ε. Νταμάνη και το προσωπικό του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Π.Γ.Ν.Α. για την παραχώρηση των μηχανημάτων τους και την πολύτιμη καθοδήγησή τους, όσον αφορά στη χρήση τους.
- Τον κ. Χ. Βαγενά, υπεύθυνο του κέντρου ελέγχου μεσογειακής αναιμίας του Π.Γ.Ν.Α. για την παραχώρηση του μηχανήματος της HPLC και την εκπαίδευση στο χειρισμό του.
- Τον κ. Ζαχίδη, υπεύθυνο του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Γ.Σ.Ν.Α. για τη βοήθειά του στη συλλογή των φυσιολογικών δειγμάτων.
- Τους ιατρούς της οφθαλμολογικής κλινικής Π.Π.Γ.Ν.Α. και της Παν. Παθ. Για τη βοήθειά τους στη συλλογή των Παθολογικών δειγμάτων καθώς και τον κ. Β. Κλεισιάρη, διαβητολόγο του Π.Γ.Ν.Α.
- Τον κ. Ν. Στακιά για την διενέργεια των αιμοληψιών και της παραγγελίας των αντιδραστηρίων.
- Τον κ. Αγραφιώτη για την καθοδήγησή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους έδωσαν εθελοντικά αίμα και ούρα για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.



## **Abstract**

The aim of this study was double. To adapt a competitive immunoturbidimetric assay for the determination of glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1C</sub>) to an automated analyzer and to produce the reference values for serum glucose, HbA<sub>1C</sub> and urine microalbumin, based on a representative sample of the population of Thessaly. We also examined a group of diabetic patients to see the control of their glycemia. Results from this study showed that the adapted method had an excellent agreement in comparison to the HPLC method (reference method) and so it can be used to provide an accurate and rapid tool for the routine determination of HbA<sub>1C</sub>. The reference values we produced were close -yet had some differences- to the ones mentioned in the references, while the group of the diabetics showed that the patients in Thessaly do not share the appropriate glycemic control.



## 1. Εισαγωγή – Σκοπός της Εργασίας

Με την έρευνα αυτή, επιχειρήσαμε να συμπληρώσουμε ένα υπαρκτό κενό που παρατηρείται στον τομέα αυτό στον ελλαδικό χώρο και κυρίως στην περιφέρεια Θεσσαλίας, καθώς όλες οι σχετικές δημοσιεύσεις και οι τιμές αναφοράς που χρησιμοποιούνται σήμερα στα εργαστήρια, προέρχονται από το εξωτερικό.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν τριπλός.

- η εγκατάσταση τεχνικών μετρήσεων για γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη αίματος και μικροαλβουμίνη ούρων στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας και η συγκριτική μελέτη δύο μεθόδων μέτρησης της HbA<sub>1c</sub>, της ανοσοθολομετρίας και της HPLC (High Performance Liquid Chroma to graphy).
- ο προσδιορισμός τιμών αναφοράς για τους αναλύτες: γλυκόζη ορού, γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη αίματος και μικροαλβουμίνη ούρων σε δείγμα φυσιολογικών ατόμων της περιφέρειας Θεσσαλίας.
- ο προσδιορισμός του εύρους τιμών των προαναφερθέντων αναλυτών σε άτομα πάσχοντα από σακχαρώδη διαβήτη, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και διαβητική νεφροπάθεια.

## **2. Θεωρητικό Μέρος**

### **2.1. Φυσιολογία Ομοιοστασίας της Γλυκόζης**

Ο οργανισμός για την επιβίωσή του και τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου του, χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως αναγκαία πηγή ενέργειας. Ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί αποκλειστικά γλυκόζη και καταναλώνει έως 80% της γλυκόζης ηρεμίας μετά από νηστεία 12 ωρών. Η είσοδος της γλυκόζης στον εγκέφαλο δεν εξαρτάται από την παρουσία ινσουλίνης ή από μεταβολές της αιματικής κυκλοφορίας και ως εκ τούτου η εγκεφαλική λειτουργία εξαρτάται μόνο από τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, τα οποία πρέπει να διατηρούνται μέσα σε στενά φυσιολογικά όρια.<sup>(1)</sup>

Τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα εξαρτώνται από το ρυθμό παραγωγής και εισόδου της στο αίμα και από την πρόσληψή της στους ιστούς. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι δύο ρυθμοί εξισώνονται και η συγκέντρωση στο αίμα παραμένει σταθερή.<sup>(2)</sup> Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, κινητοποιούνται μεταβολικοί και ορμονικοί μηχανισμοί ρύθμισης, στους οποίους συμμετέχουν το ήπαρ, το πάγκρεας, εξωηπατικοί ιστοί, ένζυμα και διάφορες ορμόνες.

#### **2.1.1 Προέλευση της γλυκόζης αίματος**

Η γλυκόζη του αίματος προέρχεται εξωγενώς από την τροφή και συγκεκριμένα από τους προσλαμβανόμενους υδατάνθρακες (υδ/ες) και ενδογενώς μέσω μηχανισμών μετατροπής άλλων βιομορίων.

Η συνήθης ισορροπημένη διατροφή του ανθρώπου περιλαμβάνει υδ/ες σε ποσοστό 50 - 70% των συνολικών θερμίδων. Κύρια πηγή τους αποτελούν οι διάφορες μορφές αμύλου που περιέχονται σε όλες σχεδόν τις μη ζωικής προέλευσης τροφές. Η πέψη τους ξεκινά στη στοματική κοιλότητα με τη συνδρομή της αμυλάσης, συνεχίζεται στο σώμα και στον πυθμένα του στομάχου και ολοκληρώνεται στο λεπτό έντερο με τη δράση της παγκρεατικής α-αμυλάσης και ενζύμων όπως η λακτάση, η μαλτάση και η σακχαράση.<sup>(3)</sup>

Όλοι οι υδ/ες απορροφούνται με τη μορφή μονοσακχαριτών με ταχύτατους μηχανισμούς, που είναι διαφορετικοί για κάθε είδος μονοσακχαρίτη. Για τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη, υπάρχει μηχανισμός συνδυασμένης ενεργού μεταφοράς, όπου η μεταφορά της εξόζης συνδυάζεται με τη μεταφορά ιόντων νατρίου ακόμη και ενάντια στη βαθμίδωση συγκέντρωσης, ενώ οι υπόλοιποι μονοσακχαρίτες απορροφούνται με μηχανισμούς διευκολυόμενης διάχυσης μέσω ειδικών φορέων της μεμβράνης του εντερικού επιθηλίου.<sup>(3)</sup>

Ο οργανισμός απορροφά από το έντερο μεγάλες ποσότητες μονοσακχαριτών 2 - 4 φορές την ημέρα. Οι μονοσακχαρίτες αυτοί μεταφέρονται στο ήπαρ δια της πυλαίας κυκλοφορίας όπου με τη συμβολή ενζυμικών μηχανισμών μετατρέπονται σε γλυκόζη.

Έτσι η γλυκόζη είναι το τελικό προϊόν μετατροπής των υδ/ων της τροφής και αποτελεί το κύριο σάκχαρο του αίματος σε ποσοστό > 95%.<sup>(3)</sup>

Στη συνέχεια ο οργανισμός χρησιμοποιεί τη γλυκόζη αυτή για την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών και την περίσσεια αυτής την αποθηκεύει στο ήπαρ και στους μυς σε μορφή γλυκογόνου.

Μόλις η συγκέντρωση του γλυκογόνου φθάσει σε κάποια οριακή τιμή, η συνθάση του γλυκογόνου αναστέλλεται και η περίσσεια της γλυκόζης μετατρέπεται στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό σε ακέτυλο - co A που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων ενώ παράλληλα διεγείρονται και διαδικασίες πρωτεϊνοσύνθεσης.

Μετά την πάροδο 2 - 4 ωρών που διαρκεί η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το έντερο, τα επίπεδα γλυκόζης αίματος αρχίζουν να μειώνονται. Συνεπώς, ο οργανισμός αναγκάζεται να κινητοποιήσει διαδικασίες τέτοιες ώστε να διατηρήσει τα επίπεδα γλυκόζης αίματος στα στενά φυσιολογικά όρια που απαιτεί η ομαλή λειτουργία του.

Το ήπαρ ανταποκρίνεται στη μείωση του λόγου ινσουλίνη / γλυκαγόνη σταματώντας να απομακρύνει τη γλυκόζη από την κυκλοφορία και διασπά γλυκογόνο προκειμένου να απελευθερώσει την αποθηκευμένη γλυκόζη. Η μείωση του λόγου προάγει επίσης και τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό (μέσω της ορμονικά ευαίσθητης λιπάσης), δράση που ενισχύεται και από την αδρεναλίνη. Έτσι

απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ελεύθερα λιπαρά οξέα, που χρησιμοποιούνται από την καρδιά και τους περιφερικούς ιστούς ως πηγή ενέργειας.<sup>(4)</sup>

Οι αποθήκες ηπατικού γλυκογόνου διαρκούν για λίγες ώρες (16 – 24)<sup>(2)</sup>. Εάν δεν προσφερθεί τροφή σ' αυτό το χρονικό διάστημα, τη μοναδική πηγή γλυκόζης αποτελεί η γλυκονεογένεση. Στα θηλαστικά, τα μόνα όργανα ικανά για γλυκονεογένεση είναι το ήπαρ και οι νεφροί, με πιο σημαντικό το ήπαρ.<sup>(4)</sup> Γλυκόζη μπορεί να παραχθεί από 3 κατηγορίες μεταβολικών ουσιών:

1. από προϊόντα μερικού καταβολισμού της γλυκόζης στους ιστούς που μεταφέρονται στο ήπαρ για να την επανασυνθέσουν όπως, το γαλακτικό οξύ και το πυρουβικό οξύ,

2. από γλυκερόλη που προέρχεται από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων.

3. από αμινοξέα, κυρίως αλανίνη που υφίστανται τρανσαμίνωση προς πυρουβικό.

Καθώς η νηστεία συνεχίζεται, η εκτεταμένη λιπόλυση, απελευθερώνει μεγάλα ποσά ελεύθερων λιπαρών οξέων που προσλαμβάνονται από το ήπαρ, όπου υφίστανται β-οξειδωση. Επειδή όμως ο κύκλος του κιτρικού οξέος μπορεί να απορροφήσει μόνο ένα μικρό ποσοστό του ακέτυλο-coA που προέρχεται από τη β-οξειδωση, το μεγαλύτερο μέρος του μετατρέπεται σε κετονοσώματα (β-υδροξυβουτυρικό ακετοξικό). Τα κετονοσώματα χρησιμοποιούνται προς παραγωγή ενέργειας έναντι της γλυκόζης από τους περισσότερους ιστούς, ακόμη και από τον εγκέφαλο αφού είναι μικρά, υδρόφιλα και διέρχονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.<sup>(4)</sup>

Σε παρατεταμένη νηστεία παρατηρείται αυξημένη πρωτεόλυση έτσι ώστε να απελευθερωθούν αμινοξέα για γλυκονεογένεση, ενώ σε πολύ σημαντικό βαθμό συμμετέχουν και οι νεφροί μέσω γλυκονεογένεσης από γλουταμίνη.<sup>(4)</sup>

### **2.1.2 Ορμονικοί μηχανισμοί ρύθμισης της γλυκόζης του αίματος**

Είναι γνωστό ότι η διατήρηση σταθερών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα είναι από τους πλέον καλά ρυθμιζόμενους ομοιοστατικούς μηχανισμούς του σώματος. Φυσιολογικά υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση και σε υγιή άτομα η συγκέντρωσή της σπανίως πέφτει κάτω από 45 mg/dl ή ανεβαίνει πάνω από 144 mg/dl, είτε αυτά είναι νηστικά είτε όχι.

Ο συντονισμός των διαφόρων διεργασιών που στοχεύουν στη ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος επιτυγχάνεται με τη συνεργική δράση διαφόρων ορμονών: της ινσουλίνης και των αντίθετα δρώντων ρυθμιστικών ορμονών, κυρίως της γλυκαγόνης, της κορτιζόλης, των κατεχολαμινών και της αυξητικής ορμόνης (GH). Οι δράσεις τους συνοψίζονται στον πίνακα 1.

**Ινσουλίνη:** Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο 51 αμινοξέων που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος ως απάντηση στην αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αίματος. Διεγείρεται επίσης από διάφορες ορμόνες του εντερικού συστήματος, όπως το γαστρικό ανασταλτικό πεπτίδιο εξαρτώμενο από τη γλυκόζη (GIP).<sup>(1)</sup>

Πίνακας 1<sup>(2)</sup>

| Ορμόνες εμπλεκόμενες στην ομοιοστασία της γλυκόζης |   |                      |
|--|---|----------------------|
| Ορμόνη   | Κύρια δράση   |                      |
| Ινσουλίνη  | Αυξάνει: κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης  | M, A                 |
|  | σύνθεση γλυκογόνου<br>πρωτεϊνική σύνθεση<br>σύνθεση λιπαρών οξέων και<br>τριγλυκεριδίων | L, M<br>L, M<br>L, A |
|  | Ελαττώνει: γλυκονογένεση  | L                    |
|  | κετογένεση  | L                    |
|  | λιπόλυση  | A                    |
|  | πρωτεόλυση  | M                    |
| Γλυκαγόνη  | Αυξάνει: γλυκογενόλυση  | L                    |
|  | γλυκονογένεση   | L                    |
|  | κετογένεση  | L                    |
|  | λιπόλυση  | A                    |
| Αδρεναλίνη   | Αυξάνει: γλυκογενόλυση  | L, M                 |
|  | λιπόλυση  | A                    |
| Αυξητική ορμόνη                                    | Αυξάνει: γλυκογενόλυση  | L                    |
|  | λιπόλυση  | A                    |
| Κορτιζόλη  | Αυξάνει: γλυκονογένεση  | L                    |
|  | σύνθεση γλυκογόνου  | L                    |
|  | πρωτεόλυση  | M                    |
|  | Ελαττώνει την κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης   | M, A                 |

L = ήπαρ, M = μυς, A = λιπώδης ιστός

Και είναι οι εξής:<sup>(1, 2, 6)</sup>

- α) αύξηση μεταφοράς της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου.
- β) αύξηση της γλυκόλυσης.

- γ) αύξηση σύνθεσης γλυκογόνου.
- δ) αναστολή γλυκογονόλυσης.
- ε) αναστολή γλυκονεογένεσης.
- στ) αναστολή λιπόλυσης.
- ζ) αναστολή σύνθεσης κετονικών σωμάτων.
- η) αύξηση σύνθεσης λιπαρών οξέων.
- θ) αύξηση του ρυθμού μεταφοράς αμινοξέων και αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης.
- ι) μείωση του ρυθμού αποδόμησης των πρωτεϊνών.

Οι δράσεις της στοχεύουν στη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος. Η μόνη ενζυμική αντίδραση που περιορίζει τον κατακλυσμό του οργανισμού από γλυκόζη μετά από ένα γεύμα, είναι η φωσφορυλίωσή της στο ήπαρ προς G-6-P – γλυκόζη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται τόσο από την εξοκινάση (ένζυμο που διαθέτουν όλα τα κύτταρα,  $K_m = 0,015 \text{ mM}$ ) όσο και από τη γλυκοκινάση. Η τελευταία βρίσκεται μόνο στο ήπαρ, διαθέτει πολύ υψηλή  $K_M$  ( $K_M = 20 \text{ mM}$ ) και η σύνθεσή της επάγεται από την ινσουλίνη.<sup>(5)</sup>

Η απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα, επιτυγχάνεται επίσης και με την είσοδό της σε άλλους ιστούς, κυρίως στους μυς και στο λιπώδη ιστό. Εκεί η πρόσληψή της γίνεται με μηχανισμούς διευκολυνόμενης διάχυσης των οποίων οι μεμβρανικοί (GLUT<sub>4</sub>) φορείς ενεργοποιούνται και πάλι από την ινσουλίνη.

Η ινσουλίνη ασκεί τη δράση της μόνο στους ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ, στους μυς και στο λιπώδη ιστό. Το μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης που προσλαμβάνεται από τους ιστούς (80%) δεν εξαρτάται ο εγκέφαλος, τα σπλάχνα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.<sup>(6)</sup>

Σε περίπτωση πτώσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης αίματος, αναστέλλεται η έκκριση ινσουλίνης και κινητοποιείται η αποταμιευμένη γλυκόζη.

### **Αντίθετα δρώσες ορμόνες**

**Γλυκαγόνη:** Η γλυκαγόνη είναι ένα πολυπεπίδιο 29 αμινοξέων που εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος και η έκκρισή της ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος. Γενικά οι δράσεις της είναι αντίθετες από αυτές της ινσουλίνης. Διεγείρει τη

γλυκογονόλυση, τη γλυκονεογένεση και την κετογένεση στο ήπαρ ενώ αυξάνει και τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Ουσιαστικά η σχέση της ινσουλίνης προς τη γλυκαγόνη αποτελεί το μοριακό διακόπτη που καθορίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης και άλλων θρεπτικών στοιχείων.<sup>(2)</sup>

**Αυξητική ορμόνη:** Η αυξητική ορμόνη τείνει να αυξήσει τη γλυκόζη αίματος, ελαττώνοντας την πρόσληψή της από τους ιστούς και προάγοντας τη γλυκονεογένεση. Ορισμένες δράσεις της είναι έμμεσες, καθώς κινητοποιεί ελεύθερα λιπαρά οξέα από το λιπώδη ιστό τα οποία αναστέλλουν την κατανάλωση της γλυκόζης.

**Γλυκοκορτικοειδή:** Τα γλυκοκορτικοειδή (και κυρίως η κορτιζόλη) προάγουν τη γλυκονεογένεση, αυξάνοντας τον καταβολισμό των πρωτεϊνών στους περιφερικούς ιστούς, την πρόσληψη αμινοξέων και τη δραστηριότητα των ενζύμων γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Επιπλέον αναστέλλουν τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης στους εξωηπατικούς ιστούς, δρώντας στο σύνολό τους ανταγωνιστικά προς την ινσουλίνη.

**Αδρεναλίνη:** Η αδρεναλίνη προκαλεί διάσπαση του γλυκογόνου στο ήπαρ και στους μυς διεγείροντας τη φωσφορυλάση, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό γλυκόζης και γαλακτικού οξέος στους ιστούς αυτούς αντίστοιχα. Επιπλέον ενισχύει και τη λιπόλυση.

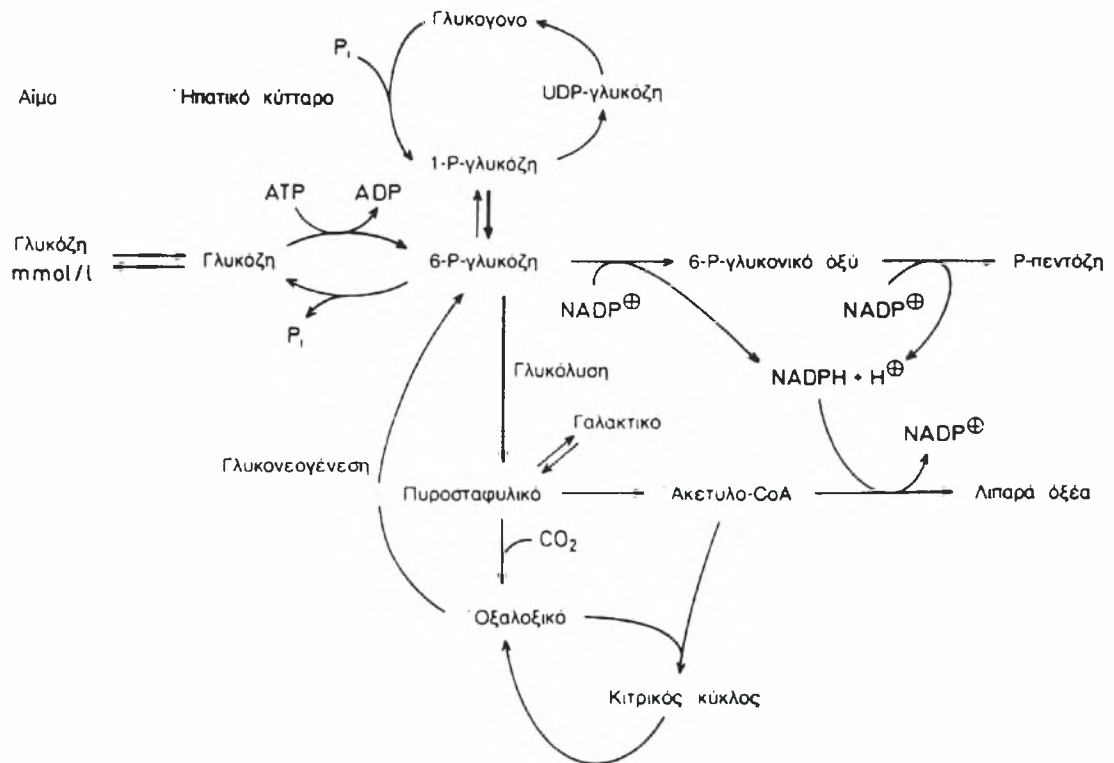
### 2.1.3 Ιστική πρόσληψη γλυκόζης και μεταβολισμός

Η μεταφορά της γλυκόζης διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών είναι περιοριστικός παράγοντας για την κατανάλωσή της. Είναι μόριο υδρόφιλο και δεν μπορεί να διέλθει δια μέσου των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης χωρίς τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών - φορέων. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί δύο οικογένειες κυτταρικών μεταφορέων της γλυκόζης. Η πρώτη εντοπίζεται στο έντερο και στους νεφρούς και μεταφέρει τη γλυκόζη ενεργητικά χρησιμοποιώντας ως συν-μεταφορέα το νάτριο (SGLUT<sub>1</sub>). Η δεύτερη τη μεταφέρει με μηχανισμό διευκολυνόμενης διάχυσης και αποτελείται από 5 ομόλογες διαμεμβρανικές πρωτείνες, GLUT<sub>1,2,3,4,5</sub>, οι οποίες έχουν διαφορετικές ιδιότητες και ιστική κατανομή που υπαγορεύουν και τη λειτουργία τους. Αναλυτικά η κατανομή και τα χαρακτηριστικά των υποδοχέων GLUT παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

| Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά μεταφορέων Γλυκόζης |             |  |   |
|---|-------------|--|---|
| ΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ                                    | Km (mmol/l) | ΚΑΤΑΝΟΜΗ   | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ  |
| GLUT-1  | 20          | Εγκέφαλος, ερυθρά, ενδοθήλιο                           | Ευρεία κατανομή, χωρίς παρεμβολή ινσουλίνης                             |
| GLUT-2  | 42          | Νεφρός, λ. έντερο, ήπαρ, β-κύτταρο επιθήλια            | Μεταφορέας χαμηλής συγγένειας Αισθητήριος συσκευή γλυκόζης σε β-κύτταρα |
| GLUT-3  | 10          | Νευρώνες, πλακούς                                      | Μεταφορέας γλυκόζης υψηλής συγγένειας                                   |
| GLUT-4  | 2-10        | Σκελετικός καρδιακός μυς, λιποκύτταρα                  | Ινσουλινο-ευαίσθητος μεταφορέας γλυκόζης                                |
| GLUT-5  | -           | Λ. έντερο, σπέρμα νεφρός, εγκέφαλος, λιποκύτταρα, μυς. | Μεταφορέας φρουκτόζης χαμηλή συγγένεια με γλυκόζη.                      |

### 2.1.4 Ιστικός Μεταβολισμός

Η γλυκόζη συμμετέχει σε μια σειρά μεταβολικών αντιδράσεων μείζονος σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου που είναι οι εξής: (σχήμα 1)



Σχήμα 1



1. Με το μηχανισμό της γλυκόλυσης μεταβολίζεται μερικώς σε πυρουβικό οξύ (αεροβίως), το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του **κιτρικού** οξέος για πλήρη οξειδωση, απελευθερώνοντας στη συνέχεια ενέργεια στη μορφή του ATP με τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αναεροβίως μεταβολίζεται προς γαλακτικό οξύ. Η γλυκόζη ως εκ τούτου αποτελεί το κύριο μεταβολικό καύσιμο για πολλούς ιστούς.

2. Ακολουθεί την οδό των φωσφορικών πεντοζών, όπου οξειδώνεται με  $\text{NADP}^+$ , παράγοντας φωσφορικές πεντόζες που χρησιμοποιούνται ως δομικοί λίθοι των νουκλεϊνικών οξέων και  $\text{NADPH}$  που χρειάζεται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και χοληστερόλης.

3. Δίνει γένεση στη γλυκερόλη (ενδιάμεσο γλυκόλυσης) που είναι τμήμα του μορίου των τριακυλογλυκερολών.

4. Το πυρουβικό και τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος παρέχουν το σκελετό για τη σύνθεση αμινοξέων, ενώ το ακετυλ - Co - A αποτελεί το δομικό λίθο για τα λιπαρά οξέα μακρών αλύσεων και της χοληστερόλης, πρόδρομης ουσίας των στεροειδών ορμονών.

5. Αποθηκεύεται στο ήπαρ σε μορφή γλυκογόνου.

## 2.2. Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο όρος σακχαρώδης διαβήτης περιγράφει μια μεταβολική διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία, που οφείλεται σε διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών και η οποία είναι αποτέλεσμα ανεπάρκειας στην έκκριση ή στη δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία οδηγεί μακροπρόθεσμα σε μικρο και μακρο-αγγειοπάθεια, οι οποίες δημιουργούν βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων κυρίως των οφθαλμών, των νεφρών, των νεύρων, των αγγείων και της καρδιάς.<sup>(1)</sup>

### 2.2.1 Ταξινόμηση του σακχαρώδη διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Σ.Δ.) είναι ένα σύνδρομο πολλαπλής αιτιολογίας και η κατάταξή του υπήρξε πάντα δύσκολη και αμφιλεγόμενη. Η απόκτηση νέας γνώσης σχετικά με την αιτιολογία του δημιουργεί την ανάγκη διαρκών τροποποιήσεων έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνονται τα καινούργια δεδομένα. Σήμερα η πιο αποδεκτή κατάταξη είναι η προτεινόμενη από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η οποία βασίζεται σε κλινικά κριτήρια και εν μέρη σε αιτιοπαθογενετικά και φαίνεται στον πίνακα 3.<sup>(1)</sup>

**Πίνακας 3: Τύποι Σακχαρώδη Διαβήτη**

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Τύπου 1: α - Αυτοάνοδος<br/>β - Ιδιοπαθής</li><li>- Τύπου 2: α - με υπεροχή αντίστασης στην ινσουλίνη<br/>β - με υπεροχή ανεπάρκειας έκκρισης ινσουλίνης</li><li>- Άλλοι Ειδικοί Τύποι</li><li>- Διαβήτης κύησης</li></ul> |
|--|

### Επιπολασμός της νόσου

Ο Σ.Δ. αποτελεί το πιο σύνηθες ενδοκρινικό σύνδρομο. Ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισής του στο γενικό πληθυσμό είναι δύσκολος καθώς τα κριτήρια διάγνωσής του ποικίλουν, ενώ παράλληλα πολλές περιπτώσεις ιδιαίτερα ΣΔ<sub>2</sub> δεν διαγιγνώσκονται ποτέ. Πάντως, προσεγγιστικά βάσει των στοιχείων που υπάρχουν η συχνότητα του υπολογίζεται ότι βρίσκεται γύρω στο 2% του γενικού πληθυσμού.<sup>(7)</sup> Από αυτό, το 20% των περιπτώσεων αφορά στο ΣΔ<sub>1</sub> ενώ η συντριπτική πλειοψηφία, το 80% περίπου, στο ΣΔ<sub>2</sub>, καθώς οι άλλοι τύποι διαβήτη θεωρούνται ιδιαίτερα σπάνιοι.<sup>(1)</sup>

Τα τελευταία χρόνια, και ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες, παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση των περιπτώσεων ΣΔ<sub>2</sub> ακόμη και σε μικρότερες ηλικίες, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον προληπτικό έλεγχο και την έγκαιρη διάγνωσή του με σκοπό την πρόληψη των μακροχρόνιων επιπλοκών του.<sup>(8)</sup>

### **2.2.2 Αιτιοπαθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1**

Είναι γνωστό ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) ή ινσουλινοεξαρτώμενος (IDDM) είναι μεν μια σαφώς διαχωρισμένη ομάδα σε σχέση με τον τύπο 2 και τις άλλες λιγότερο συχνές μορφές, ο ίδιος όμως παρουσιάζει ανομοιογένεια ως προς τις κλινικο-εργαστηριακές εκδηλώσεις, τις ανοσολογικές διαταραχές και το γενετικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα πολλοί να υποστηρίζουν την ύπαρξη δύο μορφών ΣΔ1. Πάντως σήμερα πιστεύεται ότι για την εμφάνισή του απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γενετική προδιάθεση για να ακολουθήσει μετά από κάποια περιβαλλοντική επίδραση, η ανοσολογική διαταραχή που θα οδηγήσει στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με συνέπεια την απώλεια της δυνατότητας παραγωγής και εκκρίσεως ινσουλίνης, γεγονός που καθιστά υποχρεωτική την εξωγενή χορήγησή της για την επιβίωση του ασθενούς.

#### **Γενετική προδιάθεση**

Από τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα φαίνεται ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση στην εμφάνιση ΣΔ<sub>1</sub>. Συγκεκριμένα, έρευνες που έγιναν και αφορούσαν σε αδέρφια έδειξαν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ΣΔ<sub>1</sub> σε άτομα των οποίων τα αδέρφια πάσχουν από ΣΔ<sub>1</sub> είναι 1 – 6%, ενώ στα μονογενή δίδυμα το ποσοστό ανέρχεται στο 30%.<sup>(25)</sup>

Η παρουσία ορισμένων αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας, HLA, με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα σε άτομα με ΣΔ<sub>1</sub>, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό παρέχει μια σαφή ένδειξη ότι τα αντιγόνα αυτά μπορούν να αποτελέσουν προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη ΣΔ<sub>1</sub>.

Στη βάση δεδομένων του διαδικτύου για τη Μενδελιανή κληρονομικότητα στον άνθρωπο (OMIM) αναφέρονται 19 γενετικοί τόποι που συσχετίζονται με την προδιάθεση εμφάνισης ΣΔ<sub>1</sub>.

Χαρακτηριστικά ο πρώτος τόπος που βρέθηκε (IDDM<sub>1</sub>) βρίσκεται στο χρωμόσωμα Gr21 και αφορά στο γονίδιο HLA-DQ-β, ενώ ο δεύτερος (IDDM<sub>2</sub>) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p15 και προσδιορίζει μια πολυμορφική περιοχή (VNTR) ανοδικά στο 5' άκρο του γονιδίου – της ινσουλίνης.<sup>(1)</sup>

Πολύ καλή συσχέτιση παρουσιάζουν επίσης και τα αντιγόνα της τάξεως II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας και ιδιαίτερα τα DR<sub>3</sub> και DR<sub>4</sub>. Περίπου 95% των λευκών ασθενών με ΣΔ1 έχουν DR<sub>3</sub> ή DR<sub>4</sub> αντιγόνα ενώ ένα 55 - 60% έχουν και τα δύο.<sup>(9)</sup>

Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται ότι η ετερογένεια που παρατηρείται στο ΣΔ1 οφείλεται στην παρουσία διαφορετικού αντιγόνου. Η ομοζυγοτία για DR<sub>3</sub> θεωρείται ότι οδηγεί σε κατεξοχήν αυτοάνοση μορφή ΣΔ1 ενώ η ομοζυγοτία για DR<sub>4</sub> οδηγεί σε ΣΔ1 μετά από περιβαλλοντική επίδραση η οποία δευτερευόντως οδηγεί στην άνοσο αντίδραση. Επίσης ανάλογα με την παρούσα υπομονάδα (DR<sub>3</sub> ή DR<sub>4</sub>) βρέθηκαν διαφορές ως προς την ηλικία εμφάνισης της νόσου, την εξέλιξη και τις επιπλοκές.

### **Αυτοάνοσοι Μηχανισμοί**

Την τελευταία δεκαετία η επικρατούσα άποψη είναι ότι γενετικά προδιατεθειμένα άτομα αναπτύσσουν αυτοάνοσους μηχανισμούς καταστροφής των ινσουλινοπαραγώνων κυττάρων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ΣΔ1. Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί αναπτύξεως της αυτοανοσίας και ο τρόπος της τελικής καταστροφής των β-κυττάρων δεν έχουν ακόμα μετά βεβαιότητας διευκρινισθεί.

Η πρώτη ένδειξη ότι το ανοσολογικό σύστημα συμμετέχει στην ανάπτυξη του ΣΔ1 προήλθε από ιστολογική εξέταση του παγκρέατος ασθενών όπου και ανιχνεύτηκε φλεγμονή.<sup>(1)</sup> Στη συνέχεια άρχισαν να ανακαλύπτονται ειδικά αυτοαντισώματα, ένδειξη ότι το ανοσολογικό σύστημα διεγείρόταν κατά του εαυτού του, τα κυριότερα από τα οποία είναι τα εξής:

- Αντισώματα έναντι των νησιδίων του langerhans (ICA).

Το αντιγόνο που προκαλεί την ανάπτυξη των ICA δεν είναι ακόμη γνωστό, αλλά πιθανότητα πρόκειται για γαγγλιόσιδη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όλων των κυττάρων του νησιδίου. Η καταστροφή όμως επέρχεται μόνο στα β-κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συμμετοχή των ICA στην καταστροφή των β-κυττάρων δε θεωρείται πιθανή<sup>(1)</sup>. Παρόλα αυτά όμως η παρουσία τους κατά τη διάγνωση του ΣΔ1 αλλά και πολύ πριν από αυτή, τα καθιστά δείκτες μελλοντικής εμφάνισης της νόσου.

- Αυτοαντισώματα 64K:

Πρόκειται για αντίσωμα που αντιδρά με μια πρωτεΐνη βάρους 654 kd, η οποία είναι η δεκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD) και η οποία εκτός από το νευρικό σύστημα όπου οδηγεί στην παραγωγή γ-αμινοβουτυρικού οξέος, βρίσκεται αποκλειστικά στη μεμβράνη των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η GAD επίσης διαθέτει περιοχή ομολογίας με μια πρωτεΐνη του ιού Coxsackie (BPZ-C), αντισώματα έναντι της GAD. Εμφανίζονται σχεδόν πάντα στον ορό ατόμων με ΣΔ1 και μάλιστα πολύ πριν από τα ICA. Σήμερα θεωρείται ο πιο ειδικός δείκτης για τον ΣΔ1.

- Αντισώματα έναντι της ινσουλίνης:

Ανιχνεύονται κατά τη διάγνωση του ΣΔ1 και πριν ακόμα αρχίσει η θεραπευτική χορήγηση ινσουλίνης. Η σημασία τους περιορίζεται στην πρώιμη ανακάλυψη ατόμων που πιθανώς θα εμφανίσουν διαβήτη, ενώ δε φαίνεται να συμμετέχουν στην καταστροφή των β-κυττάρων, τουλάχιστον με τα μέχρι σήμερα δεδομένα.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονισθεί ότι τα αυτοαντισώματα δεν φαίνεται να αποτελούν την αιτία του ΣΔ1 αλλά μόνο δείκτες της καταστροφικής διαδικασίας που λαμβάνει χώρα. Χαρακτηριστική είναι η διαπίστωση ότι ένεση αυτοαντισωμάτων σε υγιή ποντίκια δεν προκάλεσε ΣΔ1.<sup>(1)</sup>

## **Περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Η έναρξη του ΣΔ1 συμπίπτει ή ακολουθεί λοιμώξεις από ιούς και κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί οι ιοί παρωτίτιδος, ερυθράς, εγκεφαλίτιδας, πολυομυελίτιδος, Epstein - Barr, Coxsackie κ.ά. Πιστεύεται ότι η αυτοάνοσος αντίδραση μπορεί να προκληθεί από μια διεργασία που ονομάζεται μοριακός μιμητικός. Κατ' αυτή ένα ξένο αντιγόνο όπως συστατικό ενός ιού θα μπορούσε να προκαλέσει μια φυσιολογική ανοσολογική αντίδραση.<sup>(10)</sup> Ανόμως αυτό το αντιγόνο ήταν από χημικής ή μορφολογικής άποψης όμοιο με κάποιο στοιχείο των β-κυττάρων, η ανοσολογική απάντηση θα κατευθυνόταν και εναντίον του παγκρέατος. Τέτοια απομίμηση πιστεύεται ότι αποτελεί η πρωτεΐνη 64K. (GAD)

### 2.2.3 Αιτιοπαθογένεια του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2)

Ο ΣΔ<sub>2</sub> ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος (NIDDM) είναι η πιο συχνή αλλά και πιο ανεμοιογενής από τις κατηγορίες του σακχαρώδη διαβήτη, και εμφανίζει μερικά σαφώς καθορισμένα χαρακτηριστικά όπως:

- μειωμένη δραστικότητα της ινσουλίνης στην περιφέρεια (ινσουλινοαντοχή)
- αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ
- μειωμένη έκκριση ινσουλίνης

Μέχρι στιγμής δεν είναι απόλυτα γνωστό ποιες από τις ανωτέρω ανωμαλίες είναι πρωτοπαθείς και ποιες δευτεροπαθείς, ενώ η πολύ συχνή συνύπαρξη ΣΔ2 με παχυσαρκία, η οποία χαρακτηρίζεται από ινσουλινοαντοχή, περιπλέκει ακόμη περισσότερο την κατανόηση των διαφόρων διαταραχών κατά την πορεία εμφάνισης του ΣΔ2.

### Γενετική προδιάθεση

Η εμφάνιση ΣΔ<sub>2</sub> δεν σχετίζεται με την ύπαρξη HLA. Φαίνεται όμως ότι υπάρχει σημαντική, άλλης φύσεως, γενετική συμβολή καθώς η πιθανότητα εμφάνισης ΣΔ<sub>2</sub> σε άτομα που έχουν πάσχοντα αδέρφια είναι 30% ενώ στα μονοζυγωτικά δίδυμα διάφορες μελέτες παρουσιάζουν ποσοστά από 40% έως και 100%.<sup>(25)</sup>

Οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την εκδήλωση ΣΔ<sub>2</sub> παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και αφορούν σε μεταλλάξεις των κάτωθι γονιδίων:

- ◆ του υποδοχέα της ινσουλίνης: προκαλεί μείωσή του.
- ◆ αριθμού υποδοχέων μειωμένη συγγένεια σύνδεσης της ορμόνης οδηγώντας έτσι σε ινσουλινοαντοχή.
- ◆ του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRSI).
- ◆ του υποδοχέα της γλυκαγόνης: ο υποδοχέας παρουσιάζει μειωμένη σύνδεση, οπότε η συγκέντρωση της γλυκαγόνης παραμένει υψηλή, προκαλώντας αυξημένη ηπατική απόδοση γλυκόζης.

Ο ΣΔ<sub>2</sub> συνδέεται επίσης με τη μητρική κληρονομικότητα είτε με απάλειψη μιτοχονδριακού DNA είτε με μετάλλαξη του tRNA<sup>Leu</sup>.

Επιπλέον στο ΣΔ<sub>2</sub> που εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία (MODDY) έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της γλυκοκινάσης και του μεταγραφικού παράγοντα HNF.

### **Ινσουλινοαντοχή**

Με τον όρο αυτό υπονοείται η μειωμένη ανταπόκριση των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης και αφορά πρακτικά σε όλους τους ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς.<sup>(1)</sup> Από αυτούς, ο μυϊκός ιστός έχει μεγάλη σημασία γιατί αποτελεί το 40% του βάρους του σώματος κι έτσι ευθύνεται για την πρόσληψη του μεγαλύτερου ποσοστού ενός φορτίου γλυκόζης (60 – 70%). Ακολουθούν η σπλαχνική περιοχή (ήπαρ – έντερο) που προσλαμβάνουν το 30% του φορτίου γλυκόζης και ο λιπώδης ιστός μ' ένα ποσοστό που δεν ξεπερνά το 2% του συνόλου.

Το αίτιο της ινσουλινοαντοχής θεωρητικά μπορεί να εμφανίζεται σε διάφορα σημεία κατά τη διαδρομή μεταξύ αναγνώρισης του σήματος (σύνδεση με υποδοχείς) και εκδήλωσης της δράσεως της ινσουλίνης (είσοδος γλυκόζης στο κύτταρο). Η μείωση του αριθμού των υποδοχέων της ινσουλίνης και της συγγενειάς τους ως προς το μόριό της, συζητείται σαν αίτιο της αντοχής. Βλάβη όμως μπορεί να εμφανισθεί και στον καταρράκτη ενδοκυττάρων αντιδράσεων που εκλύεται μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της.<sup>(1)</sup>

Η ινσουλινοαντοχή του ΣΔ<sub>2</sub> βελτιώνεται σημαντικά με δίαιτα, απώλεια βάρους, σωματική άσκηση, ρύθμιση της γλυκόζης αίματος, αλλά ποτέ δεν αναστρέφεται πλήρως. Επομένως δεν εξαρτάται μόνο από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά πιθανότατα προκαθορίζεται σε κάποιο βαθμό γενετικά. Η διαπίστωση μικρού βαθμού ινσουλινοαντοχής σε συγγενείς πρώτου βαθμού ατόμων με ΣΔ<sub>2</sub>, ενισχύει την άποψη αυτή.

Ανεξαρτήτως μηχανισμού προκλήσεως πάντως, η περιφερική ινσουλινοαντοχή αυξάνει σημαντικά τις απαιτήσεις για έκκριση ινσουλίνης από το β-κύτταρο.

## **Απόδοση γλυκόζης από το ήπαρ**

Η απόδοση γλυκόζης από το ήπαρ στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της νηστείας είναι αυξημένη στο ΣΔ2 και δυσανάλογα υψηλή σε σχέση με τα επίπεδα ινσουλίνης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι και το ήπαρ εμφανίζει κάποιο βαθμό ινσουλινοαντοχής, με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία νηστείας που χαρακτηρίζει τον ΣΔ2.

## **Έκκριση Ινσουλίνης**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκκριση ινσουλίνης γίνεται σε δύο φάσεις, την α! που χαρακτηρίζεται από ταχεία, μεγάλη έκκριση ινσουλίνης, μικρής όμως διάρκειας, που συνεπάγεται υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα για λίγα λεπτά και την β! που χαρακτηρίζεται από συνεχή έκκριση ινσουλίνης, διαρκεί όσο και το γλυκαιμικό ερέθισμα και συντηρεί ένα σαφώς χαμηλότερο επίπεδο ινσουλιναιμίας.

Στο ΣΔ2 μειονεκτεί σημαντικά η α! φάση της εκκρίσεως ινσουλίνης ενώ διατηρείται πρακτικά η β! φάση. Το β-κύτταρο δηλαδή έχει χάσει την ικανότητα να αναγνωρίζει γρήγορες μεταβολές των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, ενώ διατηρεί την ικανότητα να αναγνωρίζει τη γλυκόζη σαν ερέθισμα για τη σύνθεση ινσουλίνης.<sup>(1, 6)</sup>

Ο ΣΔ2 επομένως οφείλεται σε ένα συνδυασμό μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας και μειωμένης δραστηριότητάς της στην περιφέρεια. Δεν έχει διευκρινισθεί μέχρι σήμερα ποιο από τα δύο φαινόμενα εμφανίζεται χρονικά πρώτο, αλλά ο συνδυασμός και των δύο είναι απαραίτητος για την κλινική εκδήλωση του ΣΔ2.

### **2.2.4 Άλλοι ειδικοί τύποι διαβήτη**

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μια μεγάλη λίστα σπάνιων περιπτώσεων όπου οι αιτίες του διαβήτη είναι γνωστές και είναι οι εξής:

- 1) γενετικές διαταραχές λειτουργία β-κυττάρου π.χ. MODY. (ΣΔ με χαρακτηριστικά τύπου 2 σε νεαρά άτομα).
- 2) γενετικές διαταραχές δράσης ινσουλίνης.
- 3) νόσοι του εξωκρινούς παγκρέατος.



- 4) ενδοκρινοπάθειες π.χ. μεγαλακρία.
- 5) διαβήτης από φάρμακα ή χημικές τοξίνες π.χ. γλυκοκορτικοειδή.
- 6) λοιμώξεις π.χ. συγγενής ερυθρά.
- 7) ασυνήθεις μορφές αυτοάνοσου διαβήτη π.χ. Stiff Man Syndrom.
- 8) άλλα γενετικά αίτια π.χ. Σύνδρομο Turner.

### 2.2.5 Διαβήτης της κύησης

Η μορφή αυτή του ΣΔ εμφανίζεται όταν η παγκρεατική παραγωγή ινσουλίνης δεν είναι επαρκής για να αντιρροπήσει τις «αντι-ινσουλινικές» ορμόνες της εγκυμοσύνης (οιστρογόνα, προλακτίνη, κορτιζόλη, προγεστερόνη και χοριονική σωματοτροπίνη) καθώς και την αυξημένη πρόσληψη τροφής. Παρατηρείται στο 2% των κυήσεων και συνήθως εμφανίζεται κατά το 2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης, όταν δηλαδή τα επίπεδα των προαναφερθέντων ορμονών είναι υψηλότερα 10% με 40% των γυναικών με διαβήτη κύησης θα αναπτύξουν ΣΔ<sub>2</sub> 5 – 10 χρόνια μετά την εγκυμοσύνη.<sup>(6)</sup>

### Μεταβολισμός γλυκόζης στο διαβήτη

Στο ΣΔ<sub>1</sub>, η έλλειψη ινσουλίνης που παρατηρείται, οδηγεί το ήπαρ σε γλυκόλυση και γλυκονογένεση ανεξάρτητα από την τροφοδοσία του οργανισμού σε γλυκόζη, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζεται και η πρόσληψη της γλυκόζης από τους ιστούς, γεγονός που οδηγεί σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας. Επιπλέον, συμβαίνει λιπόλυση, καθώς απουσιάζει η αναστολή της από την ινσουλίνη, με συνέπεια την παραγωγή κετονικών σωμάτων σε μεγάλα ποσά. Η υπεργλυκαιμία και η κετοξέωση μπορεί να προκαλέσουν αφυδάτωση, κώμα και τελικά εάν δε ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα, μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο.<sup>(4)</sup>

Στο ΣΔ<sub>2</sub> ινσουλίνη παράγεται σε κάποιο ποσοστό, παρατηρείται όμως υπεργλυκαιμία καθώς η παραγόμενη ινσουλίνη δεν επαρκεί η λόγω ανάπτυξης ινσουλινοαντοχής. Η εκτεταμένη λιπόλυση απουσιάζει και συνεπώς δεν παρατηρούνται φαινόμενα κετοξέωσης. Η χρόνια υπεργλυκαιμία όμως μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση επιπλοκών όπως η γλυκίωση πρωτεϊνών, η διαβητική νεφροπάθεια, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια<sup>(4)</sup> κ.ά.

### 2.3. Γλυκίωση Πρωτεϊνών

Ανεξάρτητα από την αιτία εμφάνισης διαβήτη, το αποτέλεσμα είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αίματος.

Καθώς τα επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται, αυξάνει και η μη ενζυμική γλυκίωση των πρωτεϊνών που συμβαίνει μεταμεταφραστικά σε βαθμό ανάλογο με τα επίπεδα της γλυκόζης και τη διάρκεια ζωής της πρωτεΐνης στην κυκλοφορία.

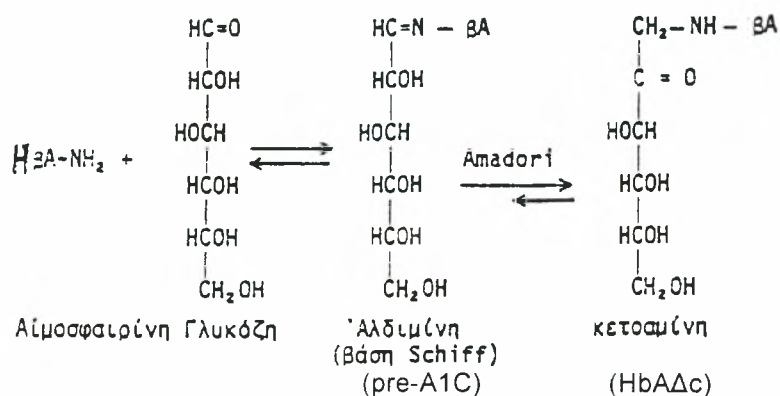
Από όλες τις πρωτεΐνες που γλυκιώνονται, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αιμοσφαιρίνη (Hb) καθώς η διάρκεια ζωής των ερυθρών που την περιέχουν είναι 120 μέρες και συνεπώς παρέχει πληροφορίες για το βαθμό ρύθμισης της συγκέντρωσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια του προ της μέτρησης τριμήνου εν αντιθέσει με τις πρωτεΐνες ορού, των οποίων η διάρκεια ζωής είναι 15 – 30 μέρες.<sup>(11)</sup> (π.χ. για την αλβουμίνη η διάρκεια ζωής είναι 19 ημέρες).

Η αιμοσφαιρίνη ενός ενήλικα, αποτελείται κατά 97% από HbA<sub>H</sub> HbA<sub>A</sub> αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο α και δύο β. Η μη ενζυμική σύνδεση της καρβονυλικής ομάδας ενός μορίου γλυκόζης στην αμινοομάδα της βαλίνης του αμινο-τελικού άκρου κάθε μιας από τις β-αλυσίδες της HbA οδηγεί στο σχηματισμό μιας ασταθούς βάσης Schiff (αλδιμίνη ή προ-A1C, διαδικασία που είναι ταχεία και αντιστρεπτή. Το ποσό της αλδιμίνης που σχηματίζεται εξαρτάται από τα επίπεδα γλυκόζης αίματος.

Καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια κυκλοφορούν, ένα ποσοστό της αλδιμίνης υφίσταται μια ενδομοριακή αναδιάταξη (μετάθεση Amadori) για να σχηματίσει μια σταθερή ένωση κετοαμίνης (HbA<sub>1c</sub>). Η αντίδραση αυτή είναι βραδεία και μη αντιστρεπτή (αντίδραση 1).<sup>(12)</sup>

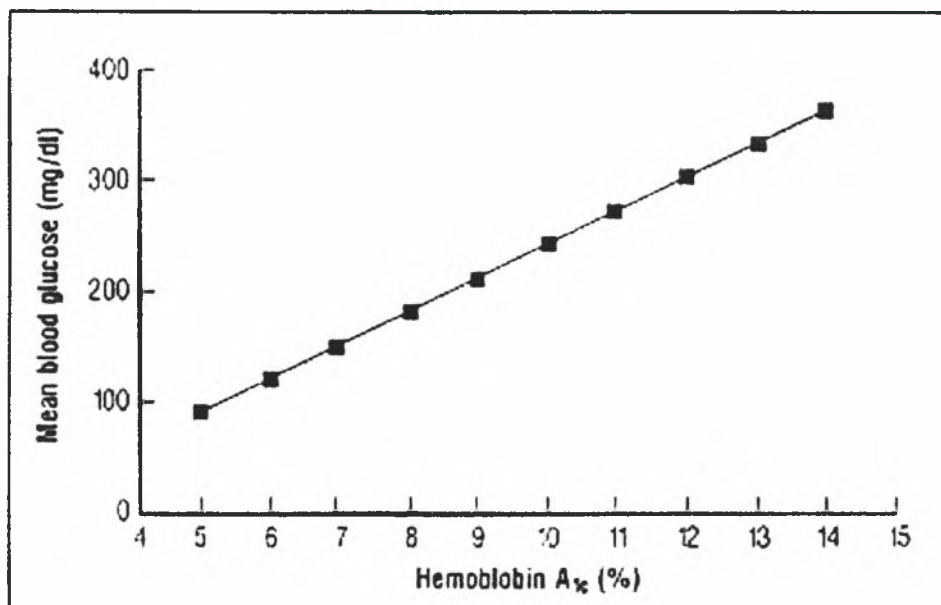
Επειδή η συγκέντρωση της αλδιμίνης μεταβάλλεται αιφνίδια ανάλογα με τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος και επειδή μόνο ένα ποσοστό της ασταθούς αλδιμίνης μετατρέπεται στη σταθερή HbA<sub>1c</sub>, η μέτρηση της τελευταίας έχει μεγαλύτερη αξία για τον έλεγχο της ρύθμισης του διαβήτη.

### Αντίδραση 1



Τα επίπεδα της HbA<sub>1c</sub>, που αποτελεί το 80% της ολικής γλυκιωμένης Hb, (GHb) είναι ανάλογα με τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης του προηγούμενου τριμήνου και με τη διάρκεια ζωής της αιμοσφαιρίνης. Το άλλο 20% προκύπτει από τη γλυκίωση της Hb από παράγωγα της γλυκόζης π.χ. 6-ρ-γλυκόζη ή από άλλες εξόζες π.χ. φρουκτόζη και συνιστά τα ελάσσονα κλάσματα της Hb, HbA<sub>1a</sub> και HbA<sub>1b</sub>. Το γεγονός ότι η HbA<sub>1c</sub> συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων εξηγεί γιατί τα νεαρά ερυθροκύτταρα έχουν μικρότερα ποσά HbA<sub>1c</sub> από τα γηραιότερα και γιατί ασθενείς με ελαττωμένο χρόνο ζωής ερυθροκυττάρων (αιμολυτική αναιμία) έχουν πολύ λιγότερη HbA<sub>1c</sub> συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα.

Σχήμα 2



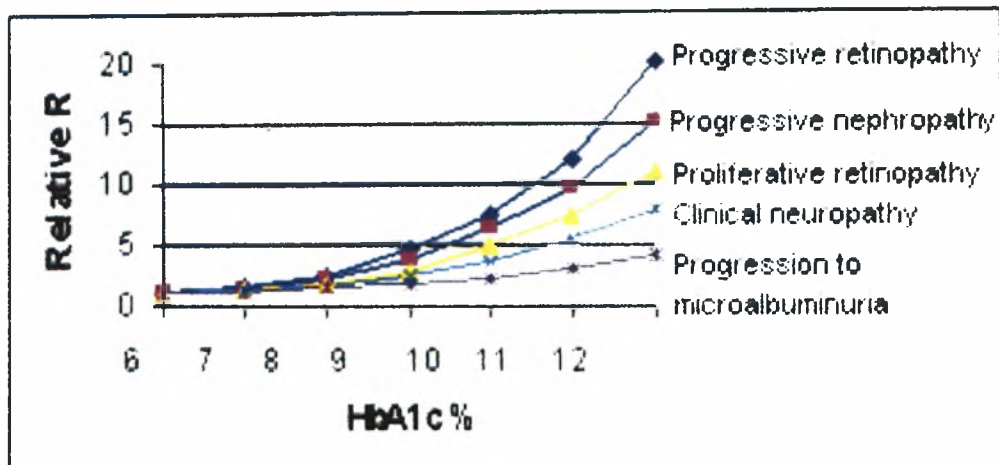
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι γλυκίωση υφίστανται και άλλες πρωτεΐνες, για παράδειγμα το κολλαγόνο, με αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής ή των ιδιοτήτων τους. Η γλυκίωση καθιστά το κολλαγόνο πιο ανθεκτικό σε καταβολισμό, συμβάλλοντας έτσι στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών με άμεσο αποτέλεσμα την εμφάνιση μικροαγγειοπάθειας.

### Προγνωστική Αξία μέτρησης της HbA<sub>1c</sub>

Η μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> παρέχει μια ακριβή και αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου του επιπέδου ρύθμισης του διαβήτη, της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και του κινδύνου ανάπτυξης οξέων ή μακροχρόνιων επιπλοκών.<sup>(11)</sup>

Η κλινική αξία της μέτρησης της HbA<sub>1c</sub> κατανοήθηκε μετά από πολλές κλινικές μελέτες που διενεργήθηκαν στα πλαίσια του DCCT (Diabetes Control & Complications Trial) όπου αποδείχθηκε ότι η μείωση της HbA<sub>1c</sub> συσχετίζεται ισχυρά με την παρεμπόδιση των διαβητικών επιπλοκών.

Σχήμα 3



Relative R = σχετικός κίνδυνος εκδήλωσης νόσου

Η μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> ουσιαστικά αντικατοπτρίζει τα μέσα επίπεδα γλυκόζης του προηγούμενου τριμήνου (MBG).<sup>(13)</sup> Ο τύπος υπολογισμού της MBG βάσει της HbA<sub>1c</sub> είναι ο εξής:

$$\text{HbA}_{1c}\% (x) 33,3 - 86 = \text{MBG mg/dl}$$

Επιπλέον αποδείχθηκε ότι ασθενείς που διατηρούσαν τα επίπεδα της HbA<sub>1c</sub> κοντά στα ανώτερα φυσιολογικά όρια, μείωναν, καθυστερούσαν ή εμπόδιζαν την ανάπτυξη επιπλοκών σε ποσοστό 76% για την αμφιβληστροειδοπάθεια, 60% για τη νευροπάθεια και 35% για τη νεφροπάθεια, ενώ ελάττωναν και τον κίνδυνο πρωτεϊνουρίας σε ποσοστό 65% (σχήμα 3).<sup>(14)</sup>

### **2.3.1 Επιπλοκές του διαβήτη**

Όπως προαναφέρθηκε ο Σ.Δ. προκαλεί βλάβες των μικρών και μεγάλων αγγείων και των νεύρων. Στην παρούσα μελέτη ενδιαφέρει ιδιαίτερα η βλάβη των μικρών αγγείων (μικροαγγειοπάθεια) η οποία αποδίδεται στην βλαπτική επίδραση αρκετών παραγόντων φθοράς, ανάμεσα στις οποίες σημαντικό ρόλο κατέχει η υπεργλυκαιμία μέσω της γλυκίωσης των πρωτεϊνών.

### **2.3.2 Διαβητική Νεφροπάθεια**

Με τον όρο διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) ορίζεται η έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας που οφείλεται άμεσα στο σακχαρώδη διαβήτη και εκδηλώνεται κλινικά ως πρωτεϊνουρία, αρκετά χρόνια μετά την έναρξη της υπεργλυκαιμίας. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΔΝ αφορά και στους δύο βασικούς τύπους διαβήτη αλλά με διαφορετικό ποσοστό, 80% για τους ασθενείς με ΣΔ1 έναντι 20% για τους ασθενείς με ΣΔ2.

Είναι γνωστό ότι το 40% των ασθενών με ΣΔ1 αναπτύσσουν τελικά ΔΝ. Για την εμφάνιση των διαταραχών της ΔΝ απαραίτητη είναι η υπεργλυκαιμία λόγω κακής ρύθμισης, αλλά δεν αρκεί. Απαιτείται τουλάχιστον μια ακόμα διαταραχή που συνήθως είναι η συνύπαρξη υπέρτασης ή καρδιαγγειακής νόσου ή οικογενειακό ιστορικό πρωτεϊνουρίας.

### **Μηχανισμοί παραγωγής πρωτεϊνουρίας**

Ο τριχοειδικός σπειραματικός φραγμός αίματος – ούρων θεωρείται λειτουργικά σαν μια μεμβράνη διάτρητη από πόρους μεγέθους 55 Angstrom η οποία έχει αρνητικό φορτίο. Λόγω του αρνητικού φορτίου οι αρνητικά

φορτισμένες πρωτείνες διέρχονται δύσκολα. Υπεύθυνες για το αρνητικό φορτίο της μεμβράνης είναι οι γλυκάνες γλυκοζάμινο (π.χ. θειϊκή ηπαρίνη) οι πρωτεογλυκάνες και οι σιαλογλυκοπρωτείνες.

Στους διαβητικούς ασθενείς διαπιστώνεται μειωμένη συγκέντρωση αρνητικών φορτίων, η οποία αποδίδεται στην σχετική μείωση των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Η μείωση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην αυξημένη γλυκίωσή τους, γεγονός που συνδέεται άμεσα με το βαθμό και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας. Η γλυκίωση αλλάζει τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, μειώνοντας ταυτόχρονα το αρνητικό τους φορτίο με άμεση συνέπεια τη διαφυγή της αλβουμίνης στα ούρα.<sup>(1, 5)</sup>

## **Η ανάπτυξη της ΔΝ ταξινομείται σε 5 στάδια**

### **1. Της υπερλειτουργίας και υπερτροφίας:**

Οι νεφροί αυξάνονται σε μέγεθος και παρατηρείται αύξηση της σπειραματικής διήθησης (GFR).

### **2. Σιωπηρό:**

Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από απουσία κλινικών συμπτωμάτων αλλά παρατηρείται ανάπτυξη μορφολογικών αλλοιώσεων του σπειράματος.

### **3. Αρχόμενη ΔΝ:**

α) πρώιμη όπου έχουμε έκκριση αλβουμίνης από 30 mg/24h έως 105 mg/24h.

β) όψιμη όπου η έκκριση της αλβουμίνης κυμαίνεται από 105 mg/24h έως 300 mg/24h.

### **4. Έκδηλη η κλινική ΔΝ:**

Εδώ η απέκκριση της αλβουμίνης είναι μεγαλύτερη από 0,5 gr/24h.

### **5. Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ):**

Χαρακτηρίζεται από αύξηση ουρίας και κρεατινίνης ορού, υπέρταση και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας μέχρι σημείου που να είναι αναγκαία η αιμοκάθαρση.

## **Μικροαλβουμινουρία**

Η απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα που κυμαίνεται από 30 mg/24h έως 300 mg/24h, χαρακτηρίζει το στάδιο της αρχόμενης διαβητικής νεφροπάθειας και είναι γνωστή με τον όρο μικροαλβουμινουρία. Ο ορός αυτός υποδηλώνει μικρά ποσά αλβουμίνης στα ούρα και όχι την παρουσία «μικρής αλβουμίνης».

Για να θεωρηθεί ότι υπάρχει μικροαλβουμινουρία θα πρέπει να ανιχνευθεί σε 3 τουλάχιστον διαφορετικά δείγματα ούρων εντός ενός εξαμήνου. Επίσης για την εκτίμηση του αποτελέσματος θα πρέπει να αποκλείονται καταστάσεις που προκαλούν αύξηση της απέκκρισης λευκωματίνης όπως η σωματική άσκηση, η οξεία υπεργλυκαιμία, η υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια και το κάπνισμα.

## **Προγνωστική Αξία μέτρησης μικροαλβουμίνης**

Η μέτρηση της μικροαλβουμίνης έχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία για την εξέλιξη της νεφρικής λειτουργίας στους διαβητικούς ασθενείς καθώς ανιχνεύει την έναρξη νεφρικής βλάβης σε πρώιμο στάδιο. Έγκαιρη ανίχνευσή της, επιτρέπει την έγκαιρη παρέμβαση με αποτέλεσμα την υποστροφή της βλάβης ή την καθυστέρηση εκδήλωσης της ΔΝ.<sup>(15)</sup>

### **2.3.3 Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια**

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) ουσιαστικά αποτελεί επιπλοκή της γενικευμένης μικροαγγειοπάθειας που προκαλεί ο διαβήτης.

Είναι μια μικροαγγειοπάθεια η οποία προσβάλλει τα προτριχοειδή αρτηρίδια, τα τριχοειδή και τα μετατριχοειδή φλεβίδια του αγγειακού δικτύου στον αμφιβληστροειδή και παρουσιάζει χαρακτηριστικά αυξημένης τοιχωματικής τριχοειδικής διαπερατότητας και μικροαγγειακής απόφραξης.

### **Αυξημένη τοιχωματική διαβατότητα**

Η αύξηση της διαπερατότητας του τοιχώματος των μικροαγγείων πιστεύεται ότι οφείλεται στην ελάττωση των περικυττάρων των τριχοειδών, κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε αναλογία 1:1 με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμβάλλουν αποφασιστικά στην ακεραιότητα του τοιχώματος των τριχοειδών.

Ελάττωση του αριθμού των περικυττάρων, συνεπάγεται την διαρροή συστατικών του αίματος μέσα στον αμφιβληστροειδή και την δημιουργία μικροαγγεισμάτων. Ως εκ τούτου εμφανίζονται αιμορραγίες και οιδήματα στον αμφιβληστροειδή.<sup>(16)</sup>

### **Μικροαγγειακές Αποφράξεις**

Οι μικροαγγειακές αποφράξεις οφείλονται σε:

α) πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών.

β) εντοπισμένο πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων.

γ) Μεταβολές στα ερυθρά αιμοσφαίρια που μπορεί να είναι 3 ειδών:

1) σκλήρυνση της μεμβράνης τους, γεγονός που παρεμποδίζει την αλλαγή του σχήματός τους και επιβραδύνει τη ροή αίματος.

2) συσσώρευση γύρω από μεγαλομοριακές ενώσεις (ινωδογόνο, α<sub>2</sub>-σφαιρίνη) οι οποίες παράγονται σε αυξημένες ποσότητες στο ήπαρ επί υπάρξεως διαβήτη.

3) δυσκολία αποδέσμευσης του O<sub>2</sub> στους ιστούς.

δ) Μεταβολές της συγκολλητικής ικανότητας των αιμοπεταλίων:

Στα φυσιολογικά άτομα υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της προστακυκλίνης 12 (PGI<sub>2</sub>) που είναι ενδογενής αναστολέας της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων και της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) που προάγει τη συγκόλληση. Στους διαβητικούς, η ομοιόσταση αυτή διαταράσσεται με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων.

Οι μικροαγγειακές αποφράξεις προκαλούν ισχαιμία, οπότε και υποξία του αμφιβληστροειδούς. Η υποξία διεγείρει την ανάπτυξη νέων αγγείων, ώστε να αυξηθεί η ροή αίματος στις ισχαιμικές περιοχές. Έτσι δημιουργείται νεοαγγείωση, η οποία όμως τελικά αποβαίνει σε βάρος του οφθαλμού καθώς τα νεοαγγεία είναι εύθραυστα και αιμορραγούν εύκολα στην υαλοειδική κοιλότητα, με αποτέλεσμα την απώλεια της όρασης.<sup>(16)</sup>



## 2.4. Εργαστηριακή Διερεύνηση του Διαβήτη

Πολλές εργαστηριακές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται στη διάγνωση και στον έλεγχο ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη. Από αυτές, η μέτρηση της γλυκόζης πλάσματος παραμένει το μόνο διαγνωστικό κριτήριο.<sup>(8)</sup> Οι υπόλοιπες δοκιμασίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρακολούθηση και τον έλεγχο της πορείας της νόσου.

Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για τον εργαστηριακό έλεγχο του διαβήτη είναι οι εξής:

- γλυκόζη νηστείας
- δοκιμασία ανοχής γλυκόζης
- γλυκόζη ούρων
- γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA<sub>1c</sub>)
- κετονοσώματα αίματος και ούρων
- μικροαλβουμίνη ούρων
- κάθαρση κρεατινίνης
- λιπιδαιμικό προφίλ

Σε ερευνητικό επίπεδο για τον προσδιορισμό της αιτίας του διαβήτη ή για έλεγχο προδιάθεσης υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν και οι εξής εξετάσεις:

- γενετικοί δείκτες (HLA DR – DQ)
- δείκτες αυτοανοσίας (ICAS, GAD, 64K)

Μπορούν επίσης να μετρηθούν η προ-ινσουλίνη, η ινσουλίνη και το πεπτίδιο C, αλλά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει σαφής λόγος για να γίνεται αυτό.

### 2.4.1 Γλυκόζη ορού

#### Συλλογή δείγματος, χειρισμός και φύλαξη

Το αίμα θα πρέπει να λαμβάνεται το πρωί μετά από ολονύκτια νηστεία (καμία πρόσληψη θερμίδων για τουλάχιστον 8 ώρες, κατά τη διάρκεια των οποίων το άτομο μπορεί να καταναλώνει νερό σε περιορισμένη ποσότητα).<sup>(17)</sup>

Η γλυκόζη μπορεί να μετρηθεί σε ολικό αίμα, σε ορό ή σε πλάσμα, αλλά το πλάσμα συνίσταται για τη διάγνωση.<sup>(8)</sup> Επειδή η συγκέντρωση της γλυκόζης σε ολικό αίμα εκτός σώματος μειώνεται εξαιτίας της γλυκόλυσης που συμβαίνει στα ερυθρά με ρυθμό 10 mg/dl ανά ώρα<sup>(8)</sup> κατά μέσο όρο το δείγμα θα πρέπει να φυγοκεντρείται αμέσως για διαχωρισμό του ορού ή αν αυτό δεν είναι εφικτό θα πρέπει να προστίθενται αναστολείς της γλυκόλυσης, όπως το φθοριούχο νάτριο.

Παρουσία φθοριούχου νατρίου η συγκέντρωση της γλυκόζης σε ολικό αίμα παραμένει σταθερή για 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>(8)</sup>

Σε διαχωρισμένο, μη αιμολυμένο ορό η συγκέντρωση της γλυκόζης διατηρείται σταθερή για 8 ώρες στους 25°C και για 72 ώρες στους 4°C.<sup>(12)</sup>

Παρά το γεγονός ότι η μέτρηση της γλυκόζης στο πλάσμα θεωρείται πιο αξιόπιστη, επειδή όλοι οι βιοχημικοί προσδιορισμοί πραγματοποιούνται σε ορό, για πρακτικούς λόγους στην καθημερινή πράξη, η γλυκόζη μετράται στον ορό.

## Ανάλυση

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης είναι σχεδόν αποκλειστικά ενζυμικές και είναι οι εξής:<sup>(12)</sup>

- μέθοδος οξειδάσης της γλυκόζης.
- μέθοδος εξοκινάσης (μέθοδος αναφοράς).
- μέθοδος αφυδρογονάσης της γλυκόζης.

## Τιμές αναφοράς

Οι τιμές αναφοράς της γλυκόζης σε διάφορα βιολογικά υγρά και στον ορό συναρτήσει της ηλικίας φαίνονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

**Πίνακας 4: Τιμές Αναφοράς Glu σε διάφορα βιολογικά υγρά<sup>(18)</sup>**

| Δείγμα                | min (mg/dl) | max (mg/dl) |
|-----------------------|-------------|-------------|
| Ορός ή πλάσμα         | 70          | 110         |
| Ολικό αίμα            | 65          | 95          |
| Τριχοειδικό αίμα      | 65          | 95          |
| E.N.Y.                | 50          | 70          |
| Ούρα σε τυχαίο δείγμα |             | 30          |
| Ούρα 24 h             |             | 500 mg/24h  |

**Πίνακας 5: T.A. Glu στον ορό συναρτήσει της ηλικίας**

| <b>Δείγμα</b>  | <b>min</b> | <b>max</b> |
|----------------|------------|------------|
| Νεογέννητα     | 30         | 40         |
| Βρέφη 2 ημερών | 40         | 60         |
| Παιδιά         | 60         | 100        |
| Ενήλικες       | 70         | 110        |
| Υπερήλικες     | 83         | 110        |

Η αύξηση της γλυκόζης > 120 mg/dl m mol καλείται υπεργλυκαιμία, ενώ μείωσή της < 40 mg/dl καλείται υπογλυκαιμία.

### **Συχνότητα Μέτρησης**

Ο πληθυσμιακός έλεγχος για το διαβήτη τύπου 2 θεωρείται πλέον απαραίτητος λόγω του αυξημένου επιπολασμού της νόσου. Η γλυκόζη θα πρέπει να μετράται σε όλα τα ασυμπτωματικά άτομα άνω των 45 ετών. Αν το αποτέλεσμα είναι < 110 mg/dl θα πρέπει να ελέγχονται κάθε 3 χρόνια. Τα άτομα υψηλού κινδύνου (υπέρβαροι, άτομα με οικογενειακό ιστορικό ή με σημεία ανοχής στην ινσουλίνη) θα πρέπει να ελέγχονται από μικρότερη ηλικία και συχνότερα.<sup>(17)</sup>

Για τους ασθενείς η συχνότητα μέτρησης καθορίζεται από το γιατρό, ανάλογα με την κλινική τους κατάσταση:

- ασθενείς με ΣΔ2 που ακολουθούν μόνο διαιτολογικό σχήμα δεν είναι απαραίτητο να ελέγχονται καθημερινά.
- ασθενείς με ΣΔ2 που λαμβάνουν ινσουλίνη ή υπογλυκαιμικά φάρμακα πρέπει να ελέγχονται μια φορά τη μέρα.
- ασθενείς με ΣΔ1 συστήνεται να ελέγχονται 4 φορές την ημέρα.

Οι ασθενείς μπορούν να ελέγχονται μόνοι τους με ειδικούς μετρητές στο σπίτι, κάθε 3 μήνες όμως θα πρέπει να εξετάζονται σε κάποιο πιστοποιημένο εργαστήριο.<sup>(8)</sup>

### **Ερμηνεία Αποτελεσμάτων**

Η διάγνωση του διαβήτη τίθεται αποκλειστικά από την παρουσία υπεργλυκαιμίας.<sup>(8)</sup> Τα κριτήρια είναι:

- ◆ συγκέντρωση γλυκόζης μετά από ολονύκτια νηστεία > 126 mg/dl.
- ◆ συμπτώματα διαβήτη και τιμή γλυκόζης σε τυχαίο δείγμα ανεξάρτητα από την ώρα του προηγούμενου γεύματος > 200 mg/dl.
- ◆ συγκέντρωση γλυκόζης δύο ώρες μετά από δοκιμασία ανοχής > 200 mg/dl.

## 2.4.2 HbA<sub>1c</sub> αίματος

Η μέτρησή της χρησιμοποιείται για τη μακροπρόθεσμη εκτίμηση της γλυκαιμικής κατάστασης ασθενών με διαβήτη ενώ παράλληλα αποτελεί και ένα μέτρο κινδύνου ανάπτυξης επιπλοκών.

### Συλλογή δείγματος, χειρισμός, φύλαξη

Το αίμα μπορεί να συλλεχθεί με φλεβοκέντηση ή με διάτρηση του δακτύλου, ενώ τα σωληνάκια φύλαξης θα πρέπει να περιέχουν αντιπηκτικό, συνήθως EDTA.<sup>(8)</sup> Η σταθερότητα του δείγματος εξαρτάται από τη μέθοδο μέτρησης που θα χρησιμοποιηθεί. Σε γενικές γραμμές όμως το ολικό αίμα διατηρείται στους 4°C για τουλάχιστον μια εβδομάδα και το αιμόλυμα στους -20°C για 6 μήνες.

## Μέθοδοι προσδιορισμού γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης (GHb)

### - Ανάλυση

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της HbA<sub>1c</sub> μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο διαχωρισμού των γλυκιωμένων από τα μη γλυκιωμένα μόρια αιμοσφαιρίνης και είναι οι εξής:<sup>(12)</sup>

1) Μέθοδοι που βασίζονται στη διαφορά φορτίου:

- Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία
- HPLC
- Ηλεκτροφόρηση
- Ισηλεκτρικός εστιασμός

2) Μέθοδοι που βασίζονται σε δομικές διαφορές

- Χρωματογραφία συγγένειας με βορονικό οξύ

### 3) Μέθοδοι που βασίζονται σε χημική ενεργότητα

#### ➤ Φωτομετρία

Επιπλέον χρησιμοποιούνται και οι εξής μέθοδοι:

#### ➤ Ανοσοπροσδιορισμοί

#### ➤ Φασματοφωτομετρία

#### ➤ Φασματοφωτομετρία μαζών

Από τις 20 διαφορετικές και εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους για τη μέτρηση της HbA<sub>1c</sub>, μέθοδος αναφοράς (gold standard) θεωρείται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Και αυτό γιατί είναι η μόνη μέθοδος που πληρεί και τα 5 κριτήρια που συστήνονται από το NIH (National Institute of Health) και είναι τα εξής: <sup>(19)</sup>

1. Ανιχνεύει ειδικά τη HbA<sub>1c</sub>
2. Έχει στενό μη διαβητικό εύρος (4% - 6%)
3. Παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα
4. Απομονώνει ουσίες που παρεμποδίζουν τη μέτρηση
5. Ανιχνεύει αιμοσφαιρινοπάθειες όταν αυτές είναι παρούσες.

### - Τιμές Αναφοράς

Τα εργαστήρια θα πρέπει να καθορίζουν τις δικές τους τιμές αναφοράς, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιούν. Γενικά όμως, όλες οι πιστοποιημένες μέθοδοι δεν θα πρέπει να αποκλίνουν > 0,5% από τα όρια 4% έως 6%. <sup>(19)</sup>

### - Συχνότητα μέτρησης

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει σαφής οδηγία για τη συχνότητα μέτρησης της HbA<sub>1c</sub> και θα πρέπει να καθορίζεται από το γιατρό ανάλογα με την περίπτωση. Προτείνεται πάντως η μέτρηση να γίνεται 2 φορές το χρόνο σε ασθενείς που επιτυγχάνουν το θεραπευτικό τους στόχο και έχουν σταθερό γλυκαιμικό έλεγχο και 4 φορές το χρόνο σε ασθενείς που δεν πετυχαίνουν το στόχο τους ή αλλάζουν θεραπευτικό σχήμα. <sup>(20)</sup>

## Ερμηνεία

Τιμή HbA<sub>1c</sub> < 7% υποδηλώνει καλή ρύθμιση του σακχάρου ενώ αν η τιμή της παραμένει > 8% για πάνω από δύο συνεχόμενες μετρήσεις, η αγωγή θα πρέπει να επανεξετάζεται.<sup>(21)</sup>

Μια ποικιλία παραγόντων που σχετίζονται είτε με τον ασθενή είτε με την αναλυτική διαδικασία μπορεί να οδηγήσουν σε ανακριβείς προσδιορισμούς της HbA<sub>1c</sub>. Οι παράγοντες αυτοί θα πρέπει να διερευνώνται, έτσι ώστε να λαμβάνονται υπ' όψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

## Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή

Καταστάσεις που επηρεάζουν την επιβίωση των ερυθρών επηρεάζουν ανάλογα και τη συγκέντρωση της HbA<sub>1c</sub>. Σε περιπτώσεις παρατεταμένης επιβίωσης (έλλειψη σιδήρου, σπληνεκτομή) οι τιμές της HbA<sub>1c</sub> είναι αυξημένες, καθώς η αιμοσφαιρίνη γλυκιώνεται περισσότερο με την πάροδο του χρόνου.<sup>(8)</sup> Σε περιπτώσεις μειωμένης επιβίωσης ερυθρών (αιμολυτικές αναιμίες, ύπαρξη ασταθών αιμοσφαιρινών π.χ. HbS) και τα επίπεδα της HbA<sub>1c</sub> είναι μειωμένα καθώς τα ερυθρά δε ζουν αρκετά ώστε να γλυκιωθούν.<sup>(8)</sup>

Από τους διατροφικούς παράγοντες η υπερκατανάλωση βιταμινών C<sup>(23)</sup> και E<sup>(24)</sup>, αναφέρεται ότι ελαττώνουν τη συγκέντρωση της HbA<sub>1c</sub>, πιθανώς εμποδίζοντας τη γλυκίωση της Hb.

## Παράγοντες που παρεμβαίνουν στην ανάλυση

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερα από 700 διαφορετικά μόρια Hb η πλειοψηφία των οποίων προκύπτει από σημειακές μεταλλάξεις σε κάποια από τις αλυσίδες της Hb (α, β, γ ή δ). Αυτές οι αλλαγές μπορεί να μιμούνται τη γλυκιωμένη Hb δομικά ή χημικά οδηγώντας σε ανακριβείς προσδιορισμούς ανάλογα με την αρχή της μεθόδου ανάλυσης.

Η HbS οδηγεί σε ψευδώς αυξημένες τιμές HbA<sub>1c</sub> αν χρησιμοποιούνται μέθοδοι χρωματογραφίας ή ανοσοπροσδιορισμού<sup>(26)</sup> ΗHbC επηρεάζει τις μεθόδους που χρησιμοποιούν τη συγγένεια με βορονικό ή κάποιο αντίσωμα για τον προσδιορισμό της HbA<sub>1c</sub> προκαλώντας ψευδώς αυξημένες τιμές.<sup>(26)</sup>

Η HbE εκλούεται σαν ουρά της HbA<sub>1c</sub> εμποδίζοντας τον ακριβή προσδιορισμό της στις μεθόδους χρωματογραφίας. <sup>(27)</sup>

Η HbF σε συγκεντρώσεις 15% της ολικής Hb δεν επηρεάζει σημαντικά καμία μέθοδο. Αν όμως βρίσκεται σε ποσοστό > 30% οδηγεί σε ψευδώς χαμηλές τιμές HbA<sub>1c</sub>, σε μεθόδους που την υπολογίζουν ως ποσοστό της ολικής Hb όπως οι ανοσοπροσδιορισμοί. <sup>(28)</sup>

Από τα χημικώς τροποποιημένα παράγωγα της Hb ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η καρβονυλ-Hb καθώς απαντάται συχνά, ειδικά σε ουραιμικούς ασθενείς. Η καρβονυλ-Hb έχει ισοπλευρικό σημείο παρόμοιο με της HbA<sub>1c</sub>. Έτσι παρεμβαίνει σε μεθόδους που βασίζονται στη διαφορά φορτίου, οδηγώντας σε σημαντικά αυξημένες τιμές HbA<sub>1c</sub>. <sup>(29)</sup>

Τέλος, άλλες καταστάσεις που αναφέρονται να επηρεάζουν τη μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> είναι η υπετριγλυκεριδαίμια, <sup>(30)</sup> η χολερυθριναιμία, ο χρόνος αλκοολισμού και η χρόνια λήψη σαλικυλικών. <sup>(31)</sup>

### **2.4.3 Μικροαλβουμίνη ούρων**

#### **Συλλογή δείγματος, χειρισμός, φύλαξη**

Για τη μέτρηση της μικροαλβουμίνης απαιτείται δείγμα ούρων το οποίο μπορεί να είναι:

- Συλλογή 24 ωρών, που είναι όμως δύσκολη, με υψηλή διακύμανση στο ίδιο άτομο και επηρεάζεται από τη σωματική άσκηση, δίνει όμως τη δυνατότητα παράλληλου προσδιορισμού της κάθαρσης κρεατινίνης.
- δείγμα πρώτης πρωινής ούρησης, που είναι ευκολότερο στη συλλογή του, παρουσιάζει μέτρια διακύμανση στο ίδιο άτομο και δεν επηρεάζεται από τη σωματική άσκηση. <sup>(32)</sup>

Η συγκέντρωση της αλβουμίνης παραμένει σταθερή σε ανεπεξέργαστα ούρα για τουλάχιστον 1 εβδομάδα όταν φυλάσσονται στους 4°C και για 160 μέρες στους -80°C. Η φυγοκέντρηση δεν θεωρείται απαραίτητη πριν από τη φύλαξη, απαιτείται όμως πριν από τον προσδιορισμό. <sup>(33)</sup>

## Ανάλυση

Οι κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού μικροαλβουμίνης είναι ανοσοχημικές και είναι οι εξής: <sup>(5)</sup>

- ◆ ραδιοανοσολογική (RIA)
- ◆ η κυκλοτερής ανοσοδιάχυση (RID)
- ◆ η ανοσοθολοσιμετρική (IT)
- ◆ ανοσοενζυμική (ELISA)

Από τις προαναφερθείσες μεθόδους, οι οποίες παρουσιάζουν καλή συσχέτιση μεταξύ τους, πολύ εύχρηστη, γρήγορη και με δυνατότητα αυτοματοποίησης σε αναλυτή είναι η ανοσοθολοσιμετρική.

## Τιμές Αναφοράς

Για τη μικροαλβουμίνη υπάρχουν μόνο ανώτατα φυσιολογικά όρια. Για 24ωρη συλλογή το όριο είναι στα 30 mg/24h ενώ σε πρωινό δείγμα είναι στα 30 mg/L ή 2 mg/dl ή 30 mg/gr κρεατινίνης αν προτιμηθεί να υπολογισθεί ο λόγος. <sup>(34)</sup>

## Συχνότητα Μέτρησης

Όλοι οι ασθενείς με διαβήτη θα πρέπει να εξετάζονται για μικροαλβουμινουρία 1 φορά το χρόνο. <sup>(34)</sup>

## Ερμηνεία

Αυξημένα επίπεδα μικροαλβουμίνης ούρων (30 – 300 mg/24h) σε 2 ή 3 διαφορετικές συλλογές ούρων σε διάστημα 6 μηνών, αποκλείοντας συνθήκες που καθιστούν άκυρη τη δοκιμασία όπως, άσκηση, υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, λοιμώξεις, αποτελούν χαρακτηριστικό στοιχείο της αρχόμενης διαβητικής νεφροπάθειας, και θα πρέπει να οδηγήσουν στη χορήγηση θεραπείας με σκοπό την καθυστέρηση βαρύτερων κλινικών συμπτωμάτων. <sup>(8)</sup>

## 2.5. Καθορισμός και χρήση τιμών αναφοράς

Η υγεία αποτελεί μια σχετική έννοια. Τα στοιχεία που προκύπτουν από τη λήψη του ιστορικού, την κλινική εξέταση και τις εργαστηριακές εξετάσεις αξιολογούνται και ερμηνεύονται από το γιατρό πάντα σε σύγκριση με στοιχεία αναφοράς, προκειμένου να τεθεί η διάγνωση.



Η ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διάγνωση. Για το λόγο αυτό, χρειάζονται τιμές αναφοράς για όλους τους αναλυτές που προσδιορίζονται σ' ένα εργαστήριο κλινικής χημείας, τόσο από υγιή άτομα όσο και από ασθενείς με τις αντίστοιχες ασθένειες.<sup>(35)</sup> Τα εργαστηριακά αποτελέσματα ενός ασθενούς, δεν έχουν ουσιαστικά καμία χρησιμότητα αν δεν υπάρχουν τιμές αναφοράς.

Συγκεκριμένες συνθήκες είναι αναγκαίες για να είναι δυνατή και έγκυρη η σύγκριση των αποτελεσμάτων του ασθενούς με τις τιμές αναφοράς.

Ο καθορισμός τιμών αναφοράς απαιτεί: <sup>(12)</sup>

- ◆ τη σωστή επιλογή ατόμων αναφοράς: Τα άτομα αναφοράς θα πρέπει να είναι άτομα υγιή, αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού, να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια, σε τέτοιο αριθμό ώστε να θεωρείται στατιστικά σημαντικός.
- ◆ Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η συλλογή και η επεξεργασία των δειγμάτων θα πρέπει να είναι γνωστές και σταθερές.
- ◆ Όλα τα εργαστηριακά αποτελέσματα θα πρέπει να παράγονται με τις ίδιες μεθόδους και στις ίδιες συνθήκες.
- ◆ Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να βρίσκονται διαρκώς σε έλεγχο ποιότητας.
- ◆ Η διαγνωστική ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα καθώς και οι πιθανές παρεμποδίσεις θα πρέπει να είναι γνωστές για όλες τις εργαστηριακές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται.

Με στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των ατόμων αναφοράς, προκύπτουν οι τιμές αναφοράς για κάθε αναλύτη.

### **2.5.1 Στρατηγικές για την επιλογή ατόμων αναφοράς**

Ένας αριθμός κριτηρίων επιλογής καθορίζει το ποια άτομα θα πρέπει να συμπεριληφθούν στην ομάδα των ατόμων αναφοράς.<sup>(36)</sup> Τέτοια κριτήρια είναι συνήθως η σύσταση του πληθυσμού της περιοχής και ειδικά κριτήρια που διαχωρίζουν τους υγιείς από τους ασθενείς για την ασθένεια που ενδιαφέρει.

Συχνά η ομάδα των ατόμων αναφοράς διαχωρίζεται σε περισσότερες ομοιογενείς υποομάδες ανάλογα με το φύλο και την ηλικία, ή και με άλλα κριτήρια αν αυτό χρειαστεί.

Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί κατά καιρούς για την επιλογή των ατόμων αναφοράς. Δεν είναι δυνατό να επιλεγεί ένας τρόπος που να θεωρείται

καλύτερος από τους υπόλοιπους και να είναι εφαρμόσιμος σε όλες τις περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό πρέπει να επιλέγεται κάθε φορά η καλύτερη προσέγγιση για το συγκεκριμένο εγχείρημα και να δηλώνεται με σαφήνεια τι ακριβώς έγινε.

Οι στρατηγικές δυνατότητες επιλογής είναι οι εξής: <sup>(12)</sup>

### **1) Άμεση επιλογή:**

Τα άτομα επιλέγονται από τον πληθυσμό βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων.

Η άμεση επιλογή των ατόμων αναφοράς είναι η μόνη μέθοδος που συμφωνεί με όσα προτείνονται από το IFCC. Το μόνο της μειονέκτημα είναι τα προβλήματα και το κόστος που προκύπτουν για τη σωστή επιλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος του πληθυσμού.

Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην αναζήτηση μιας πιο απλής και οικονομικής προσέγγισης. Έτσι προτάθηκε η έμμεση μέθοδος επιλογής που είναι ιδιαίτερα δημοφιλής.

### **2) Έμμεση επιλογή:**

Εδώ τα ίδια τα άτομα δε λαμβάνονται υπ' όψη, αλλά εφαρμόζονται συγκεκριμένοι κανόνες στη βάση δεδομένων του κλινικού εργαστηρίου έτσι ώστε να προκύψει μια υποομάδα τιμών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Η τακτική αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων ρουτίνας ενός κλινικού εργαστηρίου φαίνεται να είναι «φυσιολογικά» με μια κατανομή που προσεγγίζει αρκετά την κατανομή Gauss. Οι τιμές που βρίσκονται γύρω από την κορυφή μπορούν να αποτελέσουν «φυσιολογικό διάστημα». Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει δύο σοβαρά μειονεκτήματα.

1. Ο υπολογισμός των κατώτερων και ανώτερων «φυσιολογικών ορίων» εξαρτώνται κυρίως από τη μαθηματική μέθοδο που χρησιμοποιείται.

2. Δεν έχουν επιστημονική βάση και επαναληψιμότητα καθώς τα αποτελέσματα του κάθε εργαστηρίου εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των ασθενών που εξετάζει η δεδομένη χρονική στιγμή.

### **3) A priori (επιλογή εκ των προτέρων):**

Μια άμεση μέθοδος επιλογής όπου τα άτομα επιλέγονται μόνο όταν πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια.

### **4) A posteriori (εκ των υστέρων):**

Μια άμεση μέθοδος επιλογής όπου γίνεται χρήση μιας βάσης δεδομένων που περιέχει τα αποτελέσματα των αναλύσεων και πληροφορίες για τα άτομα. Οι τιμές των ατόμων που πληρούν τα επιθυμητά κριτήρια επιλέγονται.

Όταν διεξαχθούν προσεκτικά και οι δύο μέθοδοι μπορεί να οδηγήσουν σε αξιόπιστα αποτελέσματα. Η πρώτη είναι πιο κατάλληλη για μικρής κλίμακας μελέτες ενώ η δεύτερη για μεγαλύτερες.

5) **Τυχαία:** διαδικασία επιλογής που δίνει στο κάθε άτομο την ίδια ευκαιρία να επιλεγεί.

6) **Μη τυχαία:** διαδικασία που δεν δίνει στο κάθε άτομο την ίδια ευκαιρία να επιλεγεί.

Ιδανικά η ομάδα των ατόμων αναφοράς θα πρέπει να είναι τυχαία και να προκύπτει από άμεση επιλογή ατόμων που πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια.

Συμπερασματικά για μια καλή αρχή θα πρέπει να χρησιμοποιούμε το καλύτερο δυνατό δείγμα αναφοράς.

### 2.5.2 Υπολογισμός Τιμών Αναφοράς

Σύμφωνα με τις οδηγίες της IFCC<sup>(36)</sup> (International Federation of Clinical Chemists) για τον υπολογισμό των τιμών αναφοράς για κάποιο αναλύτη, απαιτείται αρχικά ο προσδιορισμός του σε ένα μεγάλο και αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού. Στη συνέχεια διενεργείται στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν προκειμένου να υπολογισθεί η μέση τιμή και να προσδιορισθεί η κατανομή που ακολουθεί η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που εξετάστηκε.

Αν ακολουθεί κανονική κατανομή, οι τιμές αναφοράς (τ.α.) προσδιορίζονται από τον τύπο: τ.α. = μέση τιμή  $\pm$  2SD, όπου το SD αντιπροσωπεύει την τυπική απόκλιση.

Αν δεν ακολουθεί κανονική κατανομή, ο προσδιορισμός των τιμών αναφοράς είναι πιο περίπλοκος. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ταξινομηθούν κατά αύξουσα σειρά και η διασπορά των τιμών να εκφραστεί σε εκατοστημόρια (percentiles). Συνήθως επιλέγεται στάθμη εμπιστοσύνης 95%, οπότε υπολογίζεται η θέση των εκατοστημορίων 2,5 και 97,5 βάσει των τύπων  $n \cdot 0,025$  και  $n \cdot 0,075$  αντίστοιχα, όπου  $n$  είναι ο ολικός αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Οι τιμές αναφοράς για το συγκεκριμένο αναλύτη θα είναι οι τιμές που βρίσκονται στο διάστημα που ορίζουν οι θέσεις των ανωτέρω εκατοστημορίων.

### 3. Πειραματικός Μέρος

#### 3.1. Σκοπός της έρευνας

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίζει τις δικές του τιμές αναφοράς, σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), ακόμη κι αν οι κατασκευαστές των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται τις παρέχουν, καθώς οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων (π.χ. θερμοκρασία, τύπος αναλυτή) μπορεί να διαφέρουν επηρεάζοντας το τελικό αποτέλεσμα. Επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η βιολογική μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Έτσι θα ήταν επιθυμητό να χρησιμοποιούμε στην Ελλάδα τιμές αναφοράς που προκύπτουν από την εξέταση υγιών ατόμων ελληνικής καταγωγής και όχι Γάλλων ή Αμερικανών.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν ο καθορισμός τιμών αναφοράς σε αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού της Θεσσαλίας για τους αναλύτες: γλυκόζη, γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη και μικροαλβουμίνη ούρων.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού έπρεπε πρώτα να γίνει εγκατάσταση μεθόδων προσδιορισμού για τη γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη και τη μικροαλβουμίνη ούρων στο βιοχημικό εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν.Α. καθώς και προτύπωση αυτών ώστε να εκτιμηθεί η αξιοπιστία τους.

Επιπλέον θέλαμε να ελέγξουμε και ένα δείγμα ασθενών και να συσχετίσουμε τις τιμές των ανωτέρω αναλυτών με τη σοβαρότητα των επιπλοκών που παρουσιάζουν.

### 3.2. Επιλογή Δείγματος

Απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση μιας σοβαρής κλινικής μελέτης αποτελεί η επιλογή του καλύτερου δυνατού δείγματος.

Για τη διεξαγωγή της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκε μη τυχαίο δείγμα που προέκυψε όμως από άμεση επιλογή. Συγκεκριμένα η ομάδα των υγιών ατόμων, από τις μετρήσεις των οποίων υπολογίσθηκαν οι τιμές αναφοράς, αποτελείτο από 180 άτομα που είναι ένας αριθμός ικανός και στατιστικά σημαντικός. Το δείγμα χωρίσθηκε σε δεκαετίες ηλικίας με τρόπο ώστε να ανταποκρίνεται στην αντίστοιχη κατανομή του πληθυσμού της περιοχής βάσει στοιχείων που μας παραχώρησε η στατιστική υπηρεσία. Το ιδανικό θα ήταν και η αναλογία των δύο φύλων να είναι 1:1, αυτό όμως δεν στάθηκε εφικτό καθώς ένα μεγάλο μέρος του δείγματος προήλθε από τους ετήσιους προληπτικούς ελέγχους των στρατιωτικών. Αναλυτικά η διάρθρωση του δείγματος φαίνεται στον πίνακα 6.

**Πίνακας 6: Σύσταση δείγματος φυσιολογικών ατόμων**

| Ηλικία  | Αριθμός Ατόμων | Άνδρες | Γυναίκες |
|---------|----------------|--------|----------|
| 20 – 29 | 56             | 41     | 15       |
| 30 – 39 | 52             | 35     | 17       |
| 40 – 49 | 32             | 20     | 12       |
| 50 – 59 | 16             | 10     | 6        |
| > 60    | 24             | 9      | 15       |
| Σύνολο  | 180            | 115    | 65       |



Ως υγιή θεωρήθηκαν άτομα που δεν έπασχαν από κάποια χρόνια νόσο, δεν είχαν περάσει πρόσφατα κάποια λοίμωξη και δεν λάμβαναν συστηματικά φάρμακα που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ή τη νεφρική λειτουργία π.χ. αντυπερτασικά.

Η ομάδα των διαβητικών προήλθε από τις κλινικές και τα εξωτερικά ιατρεία των δύο νοσοκομείων της περιοχής, του Π.Γ.Ν.Α. και του Π.Π.Γ.Ν.Α. Η σύστασή του φαίνεται στον πίνακα 7.

**Πίνακας 7: Σύσταση δείγματος διαβητικών**

| Σύνολο | Άνδρες | Γυναίκες |
|--------|--------|----------|
| 88     | 39     | 49       |

Η ομάδα αυτή δεν διαχωρίστηκε ανά δεκαετίες ηλικίας καθώς τα άτομα που την αποτελούν είναι στην πλειοψηφία τους μεγάλης ηλικίας.

Ας σημειωθεί ότι όλοι οι ασθενείς γνώριζαν ότι έπασχαν από διαβήτη, τους είχε συσταθεί συγκεκριμένη αγωγή και είχαν προσέλθει στα νοσοκομεία για εξετάσεις παρακολούθησης της πορείας της νόσου τους.

### **3.3. Προσδιορισμός Γλυκόζης**

Για τις ανάγκες της εργασίας, η γλυκόζη μετρήθηκε στο βιοχημικό εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν.Α. στο βιοχημικό αναλυτή Olympus AU 600.

#### **Συλλογή δείγματος**

Τα δείγματα συλλέχθηκαν το πρωί, μετά από ολονύκτια νηστεία, σε σωληνάκια κενού (BD Vacutainer Systems) που περιείχαν σιλικόνη για το διαχωρισμό του ορού.

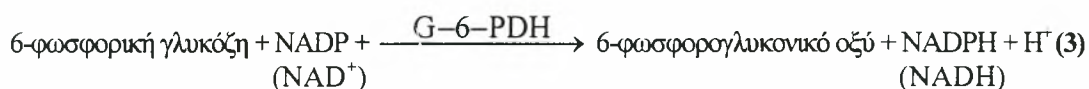
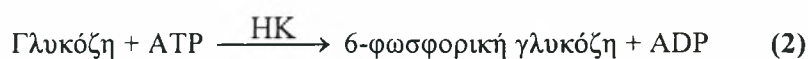
#### **Προετοιμασία δείγματος και φύλαξη**

Τα δείγματα φυγοκεντρώνταν το αργότερο σε μια ώρα από τη λήψη τους και ο ορός φυλάσσονταν στους 4°C μέχρι να αναλυθούν σε εύλογο χρονικό διάστημα ώστε η συγκέντρωση της γλυκόζης να παραμείνει σταθερή.

## Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γλυκόζης ήταν η μέθοδος της εξοκινάσης, που είναι μια ενζυμική μέθοδος κινητικής τελικού σημείου στο υπεριώδες, και χρησιμοποιεί δύο συζευγμένες αντιδράσεις.

Αρχικά η εξοκινάση καταλύει τη φωσφορύλιωση της γλυκόζης από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) σε 6-φωσφορική γλυκόζη και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) (αντίδραση 2). Στη συνέχεια η αφυδρογονάστη της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), καταλύει την οξείδωση της 6 φωσφορικής γλυκόζης από το NADP<sup>+</sup> σε 6-φωσφοργλυκονικό οξύ και NADPH, (αντίδραση 3).



Μετά την ολοκλήρωση των δύο αντιδράσεων μετράται η απορρόφηση του NADPH στα 340 nm με UV ανιχνευτή, η οποία είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης του δείγματος.

Λόγω της μεγάλης ειδικότητας της G6PD για το NADP<sup>+</sup> η μέθοδος είναι η πιο ειδική απ' όλες τις ενζυμικές για τη γλυκόζη. Είναι επίσης πολύ ακριβής και δεν παρεμποδίζεται από το ουρικό και το ασκορβικό οξύ. Επομένως μπορεί να εφαρμοσθεί και στα ούρα. Εξαιτίας αυτών των πλεονεκτημάτων της αποτελεί την επίσημη μέθοδο αναφοράς για τη γλυκόζη.<sup>(12)</sup>

## Παρεμποδίσεις

Από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν για παρεμποδίσεις στη μέθοδο, μόνο η φρουκτόζη βρέθηκε θετική. Η συγκέντρωσή της όμως στον ορό είναι τόσο μικρή που τελικά δεν επηρεάζει.

Ακατάλληλα προς μέτρηση θεωρούνται τα αιμολυμένα δείγματα με συγκέντρωση Hb > 0,5 g/dl καθώς οι φωσφορικοί εστέρες και τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα παρεμποδίζουν τη μέτρηση.<sup>(8)</sup>

## **Γραμμικότητα**

Η μέθοδος είναι γραμμική για εύρος συγκεντρώσεων 10 – 800 mg/dl σε ορό ή πλάσμα και 1 – 700 mg/dl σε ούρα.<sup>(37)</sup>

## **Τιμές αναφοράς**

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή (Olympus Diagnostica, Ireland) οι τιμές αναφοράς της γλυκόζης σε ορό ή πλάσμα είναι 75 – 115 mg/dl ενώ φυσιολογικά στα ούρα δεν πρέπει να ανιχνεύεται.

## **Σταθερότητα δείγματος**

Σε ορό ή πλάσμα η συγκέντρωση της γλυκόζης παραμένει σταθερή για 5 μέρες αν το δείγμα φυλαχτεί στους 2°C – 8°C, ενώ τα ούρα θα πρέπει να αναλύονται το συντομότερο δυνατό.<sup>(37)</sup>

## **3.4. Προσδιορισμός HbA<sub>1c</sub>**

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η υιοθέτηση μιας φθηνής και γρήγορης μεθόδου μέτρησης της HbA<sub>1c</sub> στο βιοχημικό αναλυτή (Olympus AU600 Tokyo Japan) και η σύγκρισή της με μια μέθοδο αναφοράς προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία της. Για το λόγο αυτό η HbA<sub>1c</sub> μετρήθηκε με δύο μεθόδους που είναι οι εξής:

- 1) HPLC (High Performance Liquid Chromatography):
- 2) Ανοσοθολοσιμετρία.

### **3.4.1 Συλλογή δείγματος**

Τα δείγματα συλλέχθηκαν το πρωί μετά από ολονύκτια νηστεία, σε σωληνάκια γενικής αίματος (Vacuette) που περιείχαν K<sub>3</sub> EDTA ως αντιπηκτικό.

## **Φύλαξη και προετοιμασία δείγματος**

Τα δείγματα φυλάσσονταν στους 4°C μέχρι τη στιγμή της μέτρησής τους. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές Biorad HbA<sub>1c</sub> παραμένει σταθερή για 7 μέρες στους 2°C – 8°C. Το γεγονός αυτό ελέγχθηκε και από εμάς πριν τη διαδικασία



συλλογής δειγμάτων και βρέθηκε ότι η HbA<sub>1c</sub> παραμένει σταθερή για τουλάχιστον 10 μέρες.

Λίγο πριν από τη μέτρηση έγινε η αιμόλυση των δειγμάτων, προκειμένου να απελευθερωθεί η αιμοσφαιρίνη από τα ερυθρά και να μπορεί να μετρηθεί. Η αιμόλυση γινόταν ως εξής: 5μl ολικού αίματος που είχε αναδευτεί καλά, προστέθηκαν σε 1 ml λυτικού διαλύματος που περιείχε διάλυμα κιτρικών με pH 5.0. Μετά από καλή ανάδευση το αιμόλυμα επωαζόταν για 10 λεπτά στους 15 – 30°C, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι βάσεις Schiff. Αυτό είναι εφικτό, καθώς στις συγκεκριμένες συνθήκες η αντίδραση σχηματισμού της βάσης Schiff που είναι αντιστρεπτή μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση των αντιδρώντων. Μετά από το χρόνο αυτό, το δείγμα ήταν έτοιμο προς ανάλυση.

### Αρχή μεθόδου

Η HPLC είναι ένα είδος ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, που παρουσιάζει πολύ καλή ακρίβεια και επιτρέπει τον ταχύτερο διαχωρισμό της HbA<sub>1c</sub>.

Το αιμόλυμα διοχετεύεται με υψηλή πίεση σε μια μικρή στήλη που περιέχει κατιονική ρητίνη. Επειδή οι αιμοσφαιρίνες διαθέτουν θετικό φορτίο συνδέονται στη στήλη. Στη συνέχεια διέρχεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου με pH 5,9 γεγονός που οδηγεί στην έκλυση της HbA<sub>1c</sub> η οποία είναι λιγότερο θετικά φορτισμένη από την HbA και συνεπώς εκλύεται πρώτη. Ακολούθως εγχέεται ένα δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου χαμηλότερου pH (pH = 5,6) και υψηλότερης συγκέντρωσης νατρίου, οπότε εκλύεται και η HbA.<sup>(38)</sup>

Η απορρόφηση των εκλουσμάτων της στήλης παρακολουθείται συνεχώς από έναν ανιχνευτή ορατού.

Το ποσοστό της HbA<sub>1c</sub>% υπολογίζεται βάσει του τύπου: 
$$\text{HbA}_{1c}\% = \frac{\text{HbA}_{1c}}{\text{Hb}} \cdot 100.$$

Σήμερα η όλη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη. Για ένα δείγμα, ο χρόνος ανάλυσης είναι 4,5 λεπτά. Η HbA<sub>1c</sub> έχει μέσο χρόνο κατακράτησης 1,63 λεπτά (min) με αποδεκτό παράθυρο 1.48 – 1.78 min.

Το αποτέλεσμα δίνεται σε χρωματογράφημα όπου φαίνονται όλες οι κορυφές, τι αντιπροσωπεύουν, ο χρόνος κατακράτησής τους και το ποσοστό της κάθε αιμοσφαιρίνης %. (σχήμα 4).

Η HbF σε ποσοστό έως 30% δεν παρεμβαίνει στη μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> καθώς διαχωρίζεται καλά (σχήμα 5).

Οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες HbS και HbC όταν βρίσκονται σε ετερόζυγη κατάσταση δεν παρεμβαίνουν στη μέθοδο καθώς εκλύονται μετά την HbA<sub>0</sub> και οι κορυφές τους δεν περιλαμβάνονται στον υπολογισμό της ολικής Hb. Στη σπάνια περίπτωση ομόζυγης κατάστασης (SS ή CC), δεν υπάρχει καθόλου HbA και συνεπώς ούτε HbA<sub>1c</sub>.<sup>(38)</sup>

**Σχήμα 4**

```

***** HbA1c Short *** M023149A ***
DATE:03/07/02      TIME:14:17:12

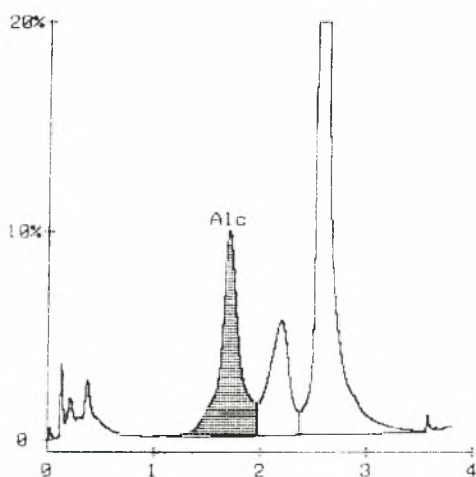
TECH ID#      1
VIAL#         12
SAMPLE ID#    00000000000000000000

ANALYTE ID    %      TIME      AREA

A1c           10.1   1.70     328837
P3            5.7    2.20     204525
A0           84.2   2.56     3027067

TOTAL AREA    3560429

A1c           10.1%   HbA1c     10.1%
    
```



**Σχήμα 5**

```

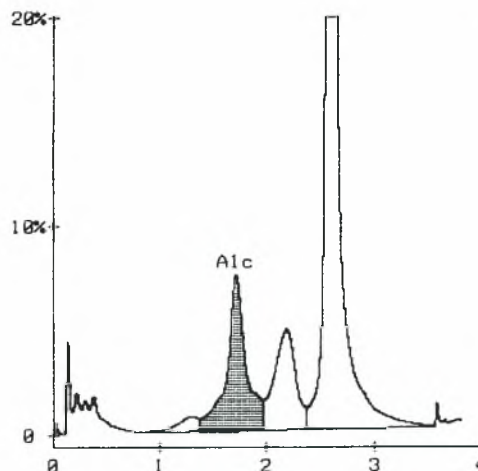
TECH ID#      1
VIAL#         13
SAMPLE ID#    00000000000000000000

ANALYTE ID    %      TIME      AREA

F             0.7    1.28     21628
A1c          7.7    1.70     227369
P3           5.0    2.18     162804
A0          86.6   2.56     2802377

TOTAL AREA    3214178

A1c           7.7%   HbA1c     7.7%
    
```



Η HbE εκλύεται ως ουρά στη HbA<sub>1c</sub> και μπορεί να δώσει ψευδώς αυξημένα αποτελέσματα, αυτό όμως θα φανεί στο χρωματογράφημα.

Από τους άλλους παράγοντες που παρεμποδίζουν τη μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> όπως : υπερτριγλυκεριδαιμία, υπερχολερυθριναιμία, ουραιμία, δίνοντας ψευδώς αυξημένες τιμές, κανείς δεν επηρεάζει την HPLC.<sup>(38)</sup>

### **Όρια Αναφοράς**

Με μέση τιμή 5,5% και για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, τα όρια αναφοράς της HbA<sub>1c</sub> με HPLC είναι 4,7 – 6,4%.<sup>(38)</sup>

### **3.4.2 Ανοσοθολοσιμετρικός Προσδιορισμός της HbA<sub>1c</sub>**

#### **Συλλογή δείγματος**

Τα δείγματα συλλέχθηκαν το πρωί μετά από ολονύκτια νηστεία σε σωληνάκια (Vaccute) που περιείχαν K<sub>3</sub>EDTA (2g/l) ως αντιπηκτικό.

#### **Προετοιμασία και φύλαξη δείγματος**

Την ημέρα της συλλογής παρασκευάστηκαν τα αιμολύματα των δειγμάτων με τον εξής τρόπο: 10 μl ολικού φλεβικού αίματος προστέθηκαν σε 1 ml λυτικού διαλύματος. Ακολούθησε απαλή ανάδευση προς αποφυγή του σχηματισμού αφρού και το αιμόλυμα αφέθηκε να σταθεί για 1 – 2 λεπτά μέχρι να αλλάξει χρώμα από κόκκινο σε πράσινο – καφέ.

Στη συνέχεια τα αιμολύματα καταψύχθηκαν στους – 20°C και παρέμειναν εκεί μέχρι τη στιγμή της μέτρησής τους. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, τα αιμολύματα παραμένουν σταθερά στους – 20°C για τουλάχιστον 6 μήνες.<sup>(39)</sup>

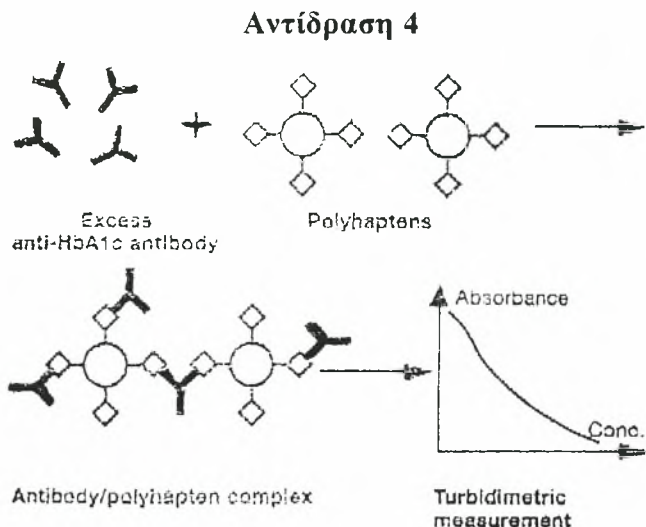
#### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος συνίσταται σε ένα ανταγωνιστικό θολοσιμετρικό προσδιορισμό για τη HbA<sub>1c</sub> που συνοδεύεται από απλό φωτομετρικό προσδιορισμό της ολικής αιμοσφαιρίνης (Hb) στο ίδιο δείγμα.

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό, αποτελεί η προσθήκη αντισώματος ειδικού για την HbA<sub>1c</sub> που είναι συνδεδεμένο σε latex. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μονοκλωνικά και είχαν παραχθεί έναντι ενός συνθετικού πεπτιδίου που περιείχε το αμινοτελικό εξαπεπτίδιο της ανθρώπινης β-αλυσίδας της

αιμοσφαιρίνης, γλυκωμένο στο κατάλοιπο της βαλίνης, σύσταση δομικά ανάλογη με τη HbA<sub>1c</sub>.<sup>(40)</sup>

Στη συνέχεια προστέθηκε δεύτερο αντιδραστήριο (ρυθμιστικό διάλυμα/ πολυαπτένια), το οποίο αντέδρασε με την περίσσεια των anti-HbA<sub>1c</sub> αντισωμάτων για να σχηματίσει αδιάλυτα συμπλέγματα (αντίδραση 4) που μπορούν να ανιχνευθούν θολοσιμετρικά.



Η συγκέντρωση των αδιάλυτων συμπλόκων, που εξαρτάται από την περίσσεια των anti-HbA<sub>1c</sub> αντισωμάτων, ουσιαστικά είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της HbA<sub>1c</sub> του δείγματος. Ο υπολογισμός της HbA<sub>1c</sub> σε g/dl γίνεται βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Η συγκέντρωση της Hb προσδιορίζεται σε ξεχωριστό κανάλι με διαφορετική αντίδραση. Με την προσθήκη αντιδραστήριου (διάλυμα αλκαλικής αιματίνης) μετατρέπεται σε ένα παράγωγο που έχει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στα 410 nm. Είναι μια αντίδραση κινητικής τελικού σημείου.

Το ποσοστό της HbA<sub>1c</sub> υπολογίζεται τελικά βάσει του τύπου:

$$\text{HbA}_{1c}\% = \frac{\text{HbA}_{1c}}{\text{Hb}} \cdot 100$$

## Τιμές Αναφοράς

Σύμφωνα με τους κατασκευαστές των αντιδραστηρίων οι τιμές αναφοράς για το συγκεκριμένο προσδιορισμό κυμαίνονται από 2,9% έως 4,6%.

Η μεγαλύτερη δυσκολία που παρουσιάζεται στον προσδιορισμό της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης είναι ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μη σωστά ρυθμισμένων μεθόδων, οι οποίες συχνά μετρούν διαφορετικά μόρια (ολική γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη, HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1α</sub>, κ.ά.) ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζονται. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι ότι τα αποτελέσματα που παράγουν είναι μη αναπαραγώγιμα και μη συγκρίσιμα.

Προκειμένου να συμβιβάσουν τα αποτελέσματά τους με τη μέθοδο αναφοράς (HPLC), οι κατασκευαστικές της μεθόδου ανοσοθολοσιμετρίας (Roche) προτείνουν έναν τύπο διόρθωσης που είναι ο εξής:

$$\text{HbA}_{1c}\% (\text{HPLC}) = 0,82 \quad \text{HbA}_{1c} (\text{IA}) + 2,76$$

Με εφαρμογή του τύπου αυτού στα αποτελέσματα της ανοσοθολοσιμετρίας προκύπτουν τιμές που προσεγγίζουν πολύ, αυτές που δίνει η HPLC, στο ίδιο δείγμα.

## 3.5. Προσδιορισμός Μικροαλβουμίνης

### Συλλογή και φύλαξη δείγματος

Συλλέχθησαν πρωινά ούρα, τα οποία καταψύχθηκαν ως είχαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη στιγμή της μέτρησής τους.

### Προετοιμασία δείγματος

Μετά την απόψυξή τους τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 στροφές για 10 λεπτά. Ακολούθησε απομόνωση του υπερκείμενου και σε αυτό έγινε η ανάλυση.

### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας ανοσοπροσδιορισμός κινητικής τελικού σημείου. Συγκεκριμένα, στο δείγμα προστέθηκε αντιορός που περιείχε

αντισώματα ειδικά έναντι της ανθρώπινης αλβουμίνης. Αυτό οδήγησε στο σχηματισμό αδιάλυτων συμπλόκων αλβουμίνης – αντισώματος, που ανιχνεύθηκαν θολοσιμετρικά στα 340 nm.<sup>(41)</sup>

Η συγκέντρωση της μικροαλβουμίνης του δείγματος είναι ευθέως ανάλογη της απορρόφησης και υπολογίζεται μέσω πρότυπης καμπύλης.

## **Γραμμικότητα**

Η γραμμικότητα της μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ των 0,5 – 30 mg/dl.<sup>(41)</sup>

## **Τιμές Αναφοράς**

Σύμφωνα με τους κατασκευαστές η μικροαλβουμίνη των φυσιολογικών ενηλίκων θα πρέπει να είναι < 2 mg/dl. Αυτό όμως είναι γενική κατεύθυνση καθώς η τιμή της μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, τη διαίτα, τη σωματική άσκηση και τη γεωγραφική περιοχή.<sup>(41)</sup>

Επειδή η συλλογή ούρων 24ώρου για τον προσδιορισμό της μικροαλβουμίνης δεν ήταν εφικτή στα πλαίσια αυτής της εργασίας, συλλέξαμε πρωινά δείγματα ούρων. Σύμφωνα με τη θεωρία, ο προσδιορισμός του λόγου μικροαλβουμίνη / κρεατινίνη παρουσιάζει μικρότερη βιολογική μεταβλητότητα από τη μικροαλβουμίνη σε πρωινά δείγματα ούρων. Έτσι αποφασίσαμε κι εμείς να προσδιορίσουμε το λόγο μικροαλβουμίνη / κρεατινίνη στα δείγματά μας.

Η κρεατινίνη είναι προϊόν ανακύκλωσης της κρεατίνης και της 6-p-κρεατίνης που βρίσκονται στους μύες. Καθημερινά περίπου 2% της κρεατίνης και της 6-p-κρεατίνης μετατρέπονται σε κρεατινίνη. Η συγκέντρωση της κρεατινίνης είναι ανάλογη του μυϊκού όγκου. Η κρεατινίνη δεν μεταβολίζεται από τον οργανισμό, δεν απορροφάται από τα νεφρικά σωληνάκια κι έτσι αποβάλλεται από τα ούρα με σταθερό ρυθμό, σε φυσιολογικές καταστάσεις.<sup>(12)</sup>

### 3.6. Προσδιορισμός Κρεατινίνης ούρων

#### Συλλογή φύλαξη και προετοιμασία δείγματος

Η κρεατινίνη μετρήθηκε στα ίδια δείγματα ούρων με τη μικροαλβουμίνη και συνεπώς υπέστη την ίδια επεξεργασία.

#### Αρχή μεθόδου

Η κρεατινίνη σχηματίζει ένα κίτρινο – πορτοκαλί σύμπλοκο αν αντιδράσει με πικρικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον. Η συγκέντρωση αυτού του συμπλόκου προσδιορίζεται φωτομετρικά και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της κρεατινίνης του δείγματος.<sup>(42)</sup>

### 3.7 Αξιολόγηση εφαρμοσθείσας μεθοδολογίας

Από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία ελέγχθηκαν ως προς τη βαθμονόμηση και την επαναληψιμότητά τους –ως κριτήρια αξιοπιστίας- οι τρεις νέες μέθοδοι που εισήχθησαν.

#### 3.7.1 Προσδιορισμός της HbA<sub>1c</sub> με HPLC

Για την καθημερινή βαθμονόμηση του συστήματος ανάλυσης που θα επέτρεπε την ακριβή μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> χρησιμοποιήθηκε ειδικός βαθμονομητής (calibrator) προσφερόμενος από την εταιρεία.. Το calibrator (HbA<sub>1c</sub> calibrator, BioRad, lot33600 ) ήταν λυοφιλοποιημένο δείγμα ολικού αίματος με τιμή στόχο 8,8 και κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πέτυχε την τιμή αυτή με cv 0,9%, όπως φαίνεται στον πίνακα 8.

**Πίνακας 8. Διακύμανση calibrator HPLC**

| N  | Mean | Min | Max | SD   | CV   |
|----|------|-----|-----|------|------|
| 10 | 8,8  | 8,6 | 8,9 | 0,08 | 0,9% |

-N= ο αριθμός των δειγμάτων

-Min= η μικρότερη τιμή

-SD= η τυπική απόκλιση

-Mean= η μέση τιμή των μετρήσεων

-Max= η μεγαλύτερη τιμή

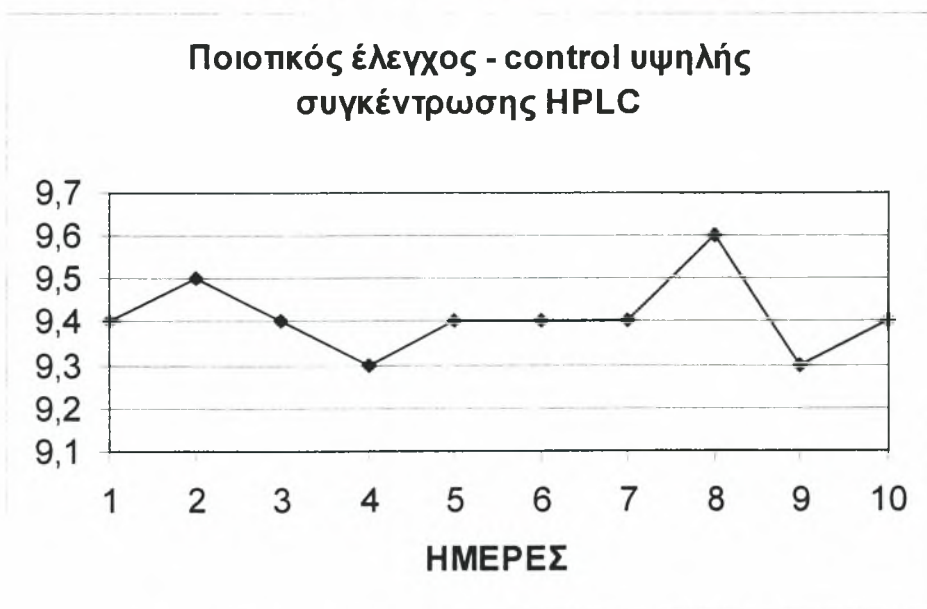
-CV= ο συντελεστής μεταβλητότητας

Για τον καθημερινό ποιοτικό έλεγχο των μετρήσεων και την εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν 2 οροί ελέγχου (control ) χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης. Οι οροί ελέγχου (Lyphochek Diabetis Control 1&2,Biorad,lot33601& 33602 ) χρησιμοποιούνταν σε κάθε πείραμα τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της ανάλυσης, έτσι ώστε να διασφαλισθεί η ακρίβεια της μεθόδου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η διακύμανσή τους κατά τη διάρκεια των αναλύσεων παρουσιάζεται στα διαγράμματα 1&2 (διαγράμματα Levey-Jennings που χρησιμεύουν στον εντοπισμό τυχαίων ή συστηματικών σφαλμάτων). .

**Διάγραμμα 1(n=10,mean=5,4,SD=0,1)**



**Διάγραμμα 2. (n=10,mean=9,4,SD=0,1)**





### Επαναληψιμότητα σειράς

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας σειράς (within run precision) αναλύθηκαν δύο δείγματα, χαμηλής (low) και υψηλής (high) συγκέντρωσης, επί 20 φορές στην ίδια σειρά μετρήσεων. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9. Επαναληψιμότητα σειράς για την HPLC**

|      | N  | Mean | Min | Max | SD    | CV   |
|------|----|------|-----|-----|-------|------|
| Low  | 20 | 4,7  | 4,7 | 4,9 | 0,069 | 1,4% |
| High | 20 | 9,9  | 9,8 | 10  | 0,08  | 1%   |

### Επαναληψιμότητα χρόνου

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας χρόνου (between run precision) χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των ορών ελέγχου καθώς δεν υπήρχε τρόπος διατήρησης των δειγμάτων που να καλύπτει χρονικά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10. Επαναληψιμότητα χρόνου για την HPLC**

|      | N  | Mean | Min | Max | SD  | CV   |
|------|----|------|-----|-----|-----|------|
| Low  | 10 | 5,4  | 5,3 | 5,6 | 0,1 | 1,8% |
| High | 10 | 9,4  | 9,3 | 9,6 | 0,1 | 1%   |

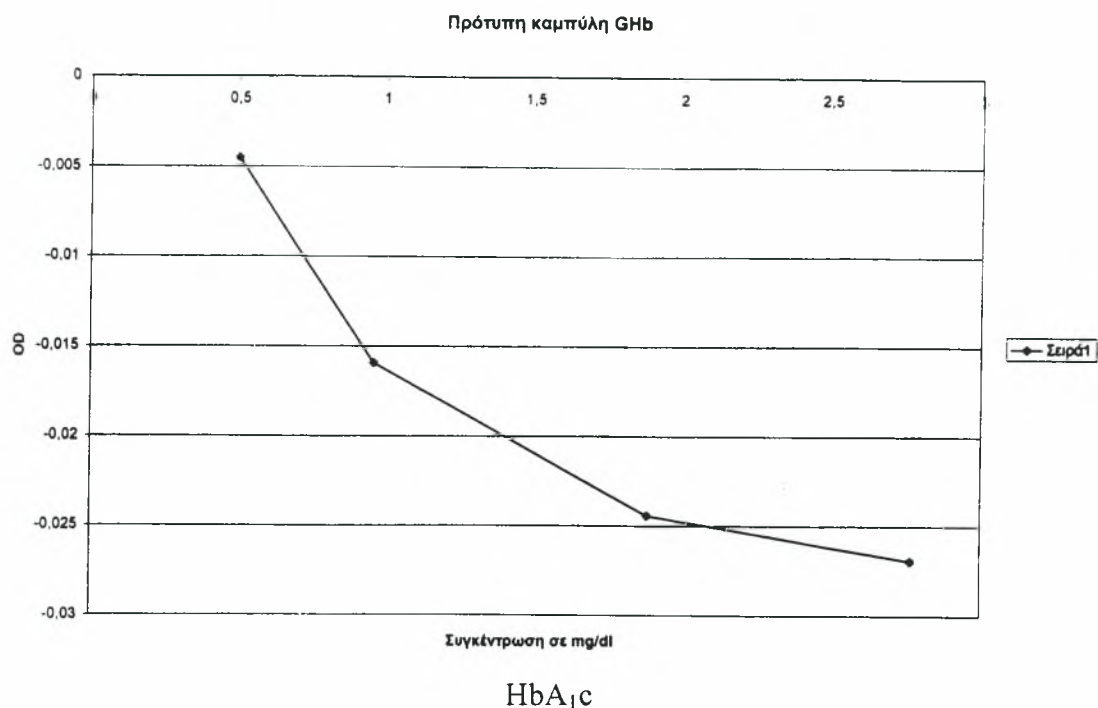
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μέθοδος παρουσιάζει πολύ καλή επαναληψιμότητα (το CV προτείνεται να είναι <5%)<sup>8</sup> τόσο στις χαμηλές όσο και στις υψηλές συγκεντρώσεις στην ίδια σειρά μετρήσεων αλλά και από μέτρηση σε μέτρηση.

### 3.7.2 Προσδιορισμός για τη μέτρηση της HbA<sub>1c</sub> με ανοσοθολοσιμετρία

Πριν από την έναρξη των μετρήσεων, ο βιοχημικός αναλυτής (Olympus AU600) βαθμονομείτο με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (calibrators) προερχόμενα από την εταιρεία Roche. Τα calibrator (Roche Hitachi systems, lot 158402) βρίσκονταν σε συγκεντρώσεις που κυμάνονταν από 0,5g/dl έως 2,77g/dl.

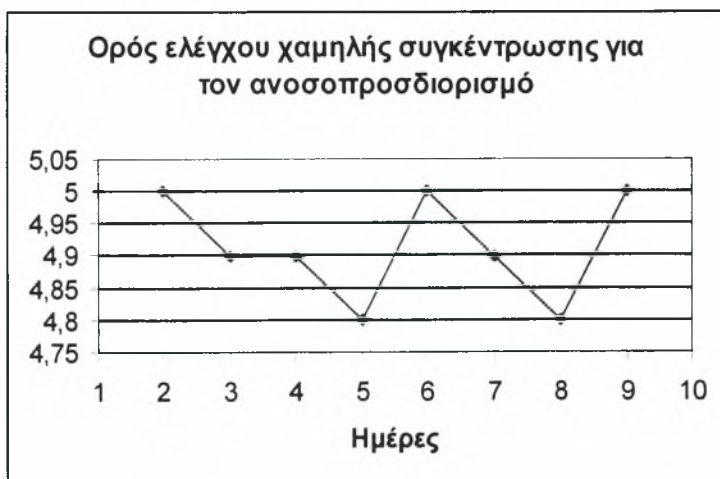
Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός (NaCl 0,9%). Βάσει των ανωτέρω, σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη από την οποία και υπολογίσθηκαν και οι τιμές των δειγμάτων (διάγραμμα 3).

**Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη HbA<sub>1c</sub>**

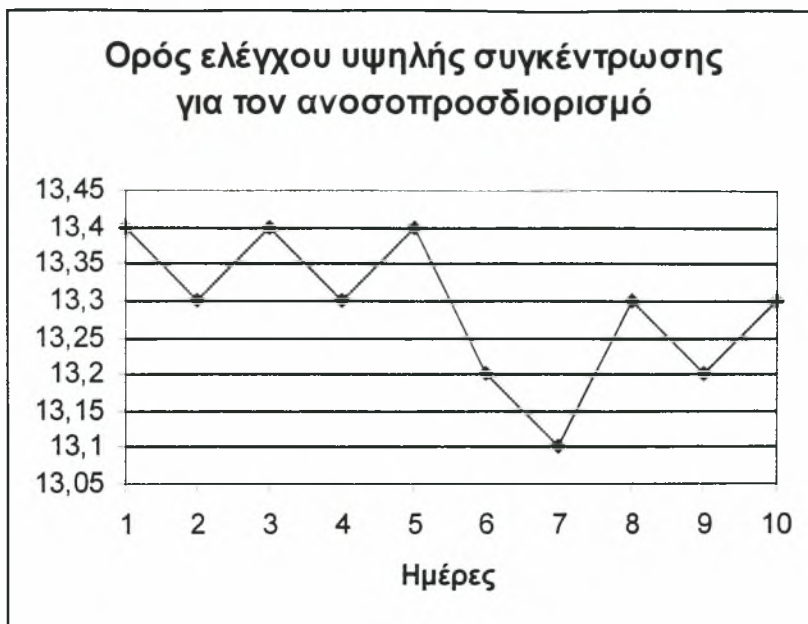


Για τον καθημερινό ποιοτικό έλεγχο των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν δύο οροί ελέγχου χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης (Roche Hitachi Systems, precinorm lot 153223 & precipath lot 153224 ). Η διακύμανσή τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρουσιάζεται στα διαγράμματα 4 & 5.

**Διάγραμμα 4. (n=10,mean=4,9,SD=0,08)**



Διάγραμμα 5. (n=10,mean=13,1,SD=0,1)



### Επαναληψιμότητα σειράς

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας σειράς αναλύθηκαν δύο δείγματα, χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης, επί 20 φορές στην ίδια σειρά μετρήσεων. Τα δείγματα προέκυψαν με τη δημιουργία δεξαμενής (pool) από ανάμιξη αιμολυμάτων. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Επαναληψιμότητα σειράς για τον ανοσοπροσδιορισμό

|      | N  | Mean | Min  | Max  | SD   | CV   |
|------|----|------|------|------|------|------|
| Low  | 20 | 4,6  | 4,4  | 5    | 0,14 | 3%   |
| High | 20 | 13,3 | 10,9 | 13,8 | 0,33 | 2,4% |

### Επαναληψιμότητα χρόνου

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας χρόνου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τη δεξαμενή, τα οποία αναλύονταν σε κάθε πείραμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

**Πίνακας 12. Επαναληψιμότητα χρόνου για τον ανοσοπροσδιορισμό**

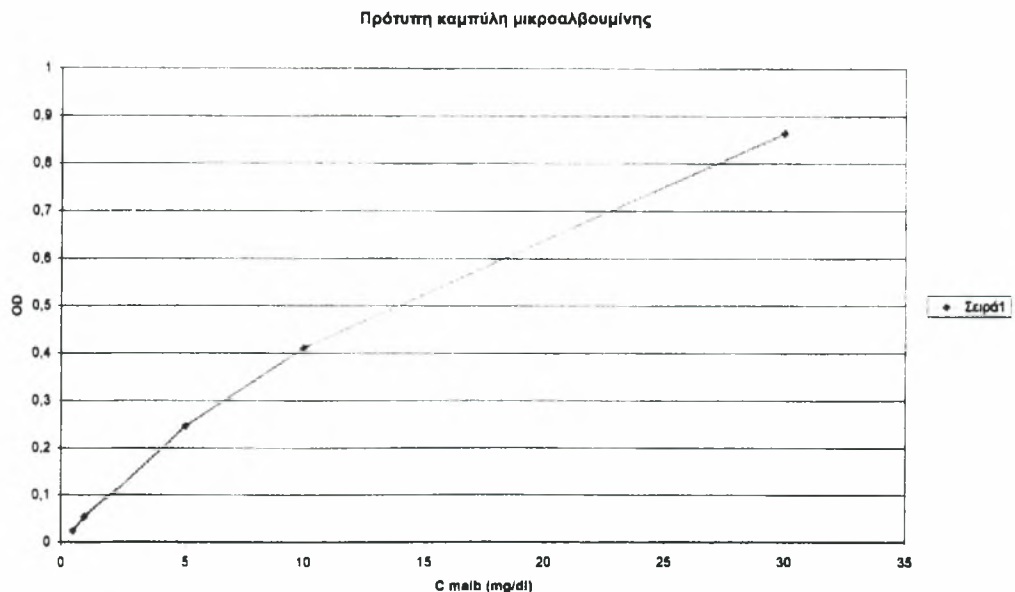
|      | N  | Mean | Min  | Max  | SD   | CV   |
|------|----|------|------|------|------|------|
| Low  | 10 | 4,9  | 4,8  | 5    | 0,08 | 1,6% |
| High | 10 | 13,2 | 13,1 | 13,4 | 0,1  | 0,8% |

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι και η ανοσοθολοσιμετρική μέθοδος παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα. Υπερέχει σε σχέση με την HPLC στην επαναληψιμότητα χρόνου, μειονεκτεί όμως στην επαναληψιμότητα σειράς.

### 3.7.3 Προσδιορισμός για τη μέτρηση της μικροαλβουμίνης με ανοσοθολοσιμετρία

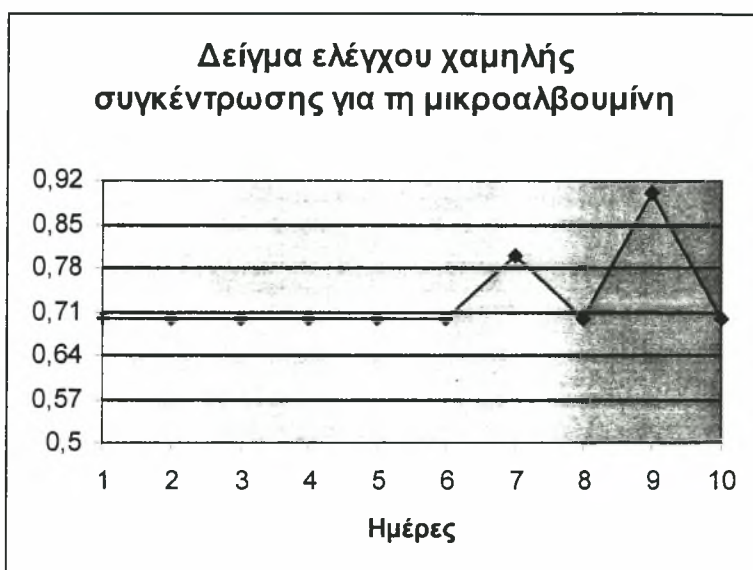
Για την καθημερινή βαθμονόμηση του αναλυτή πριν από κάθε σειρά μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν βαθμονομητές γνωστής συγκέντρωσης (Microalbumin calibrators, Olympus System Reagrnt, lot9586) με τιμές από 0,5 έως 30 mg/dl. Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε από την ανάλυσή τους φαίνεται στο διάγραμμα 6.

**Διάγραμμα 6. Πρότυπη καμπύλη μικροαλβουμίνης**

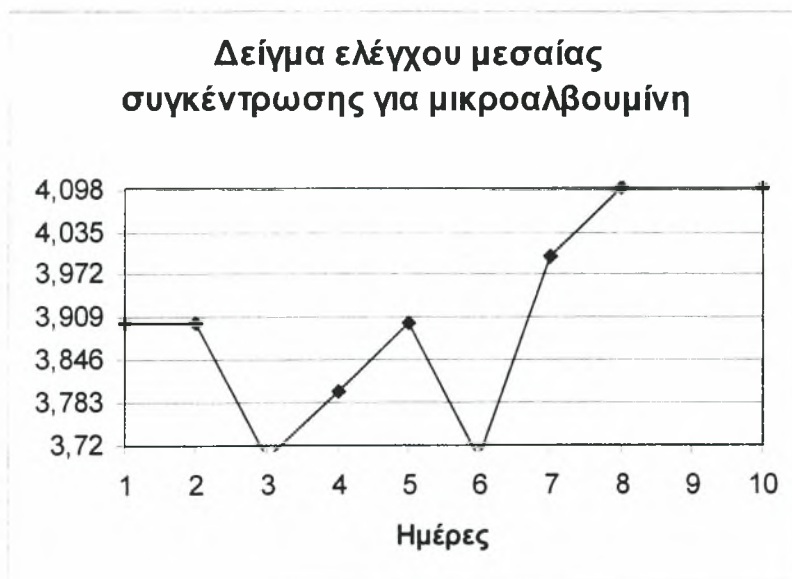


Ελλείψη παροχής ορών ελέγχου από την εταιρεία, ο καθημερινός ποιοτικός έλεγχος και ο έλεγχος της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση δεξαμενής δειγμάτων που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο με τυχαία ανάμειξη δειγμάτων και κάλυπταν 3 επίπεδα συγκεντρώσεων, χαμηλά, μεσαία και υψηλά. Η διακύμανση των δειγμάτων ελέγχου παρουσιάζεται στα διαγράμματα 7,8 και 9.

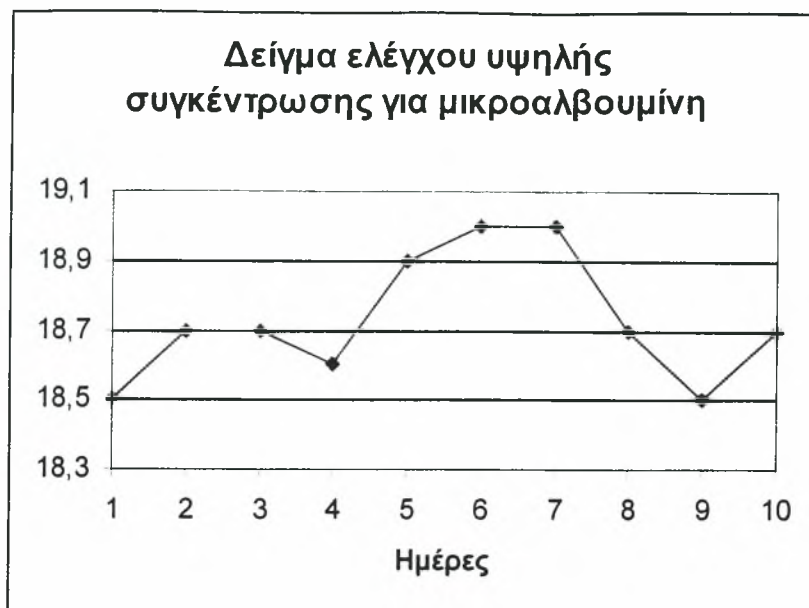
**Διάγραμμα 7 (n=10,mean=0,71,SD=0,07)**



**Διάγραμμα 8. (n=10,mean=3,9,SD=0,063)**



Διάγραμμα 9. (n=10,mean=18.6,SD=0,09)



### Επαναληψιμότητα σειράς

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας σειράς αναλύθηκαν δείγματα τριών επιπέδων συγκεντρώσεων από 20 φορές στην ίδια σειρά μετρήσεων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 13 .

Πίνακας 13. Επαναληψιμότητα σειράς για την μικροαλβουμίνη

|        | N  | Mean | Min  | Max  | SD    | CV   |
|--------|----|------|------|------|-------|------|
| Low    | 20 | 0,7  | 0,6  | 0,9  | 0,063 | 9%   |
| Medium | 20 | 3,9  | 3,9  | 4    | 0,04  | 1%   |
| High   | 20 | 18,6 | 18,5 | 18,7 | 0,09  | 0,4% |

### Επαναληψιμότητα χρόνου

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας χρόνου αναλύονταν δείγματα τριών επιπέδων συγκεντρώσεων σε κάθε σειρά μετρήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 14 .



**Πίνακας 14. Επαναληψιμότητα χρόνου για την μικροαλβουμίνη**

|        | N  | Mean | Min  | Max | SD   | CV   |
|--------|----|------|------|-----|------|------|
| Low    | 10 | 0,71 | 0,7  | 0,8 | 0,07 | 10%  |
| Medium | 10 | 3,9  | 3,7  | 4,4 | 0,16 | 2,1% |
| High   | 10 | 18,6 | 17,6 | 19  | 0,16 | 4,1% |

Παρά το γεγονός ότι η επαναληψιμότητα στις χαμηλές συγκεντρώσεις ήταν άριστη (SD= 0,07), ο συντελεστής διακύμανσης παρουσιάζεται πλασματικά υψηλός λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης του δείγματος καθώς προκύπτει από τον τύπο  $CV=SD*100/\text{μέση τιμή}$ .

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS.

Ο έλεγχος της κατανομής των μελετηθέντων δειγμάτων έγινε με χρήση της δοκιμασίας Kolmogorov-Smirnov Test. Για να θεωρηθεί ότι ένα δείγμα ακολουθεί την κανονική κατανομή θα πρέπει ο αριθμός  $z$  που προκύπτει από το παραπάνω τεστ να βρίσκεται κοντά στο 1, η πιθανότητα ( $p$ ) να είναι  $>0,05$  και η διάμεσος (median) να ταυτίζεται με τη μέση τιμή (mean).

Η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Independent sample T-Test (2-tailed), ενώ η σύγκριση των μέσων τιμών των τριών ουσιών ανά δεκαετία ηλικίας έγινε με ανάλυση διακύμανσης με ένα παράγοντα ( την ηλικία ) με παράλληλο έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων με τη μέθοδο Tukey. Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει για τιμές  $p < 0,05$ . Συγκεκριμένα για  $p < 0,001$  η διαφορά θεωρείται εξαιρετικά σημαντική, για  $p < 0,01$  πολύ σημαντική και για  $p < 0,05$  σημαντική.

Η συσχέτιση των 2 μεθόδων μέτρησης της HbA<sub>1c</sub> όπως επίσης και η συσχέτιση των μεταβολών των επιπέδων της γλυκόζης ορού αίματος με τα επίπεδα της HbA<sub>1c</sub> ή με την αποβολή της μικροαλβουμίνης εξετάστηκε με τη μέθοδο Pearson. Επιπλέον, η μελέτη εξάρτησης των μεταβολών των ανωτέρω παραμέτρων έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (regression analysis). Σε γενικές γραμμές μια συσχέτιση θεωρείται ισχυρή όταν ο συντελεστής συσχέτισης ( $R$ ) πλησιάζει στο 1, η τιμή του  $p$  βρίσκεται κοντά στο 0 και η τιμή της παραμέτρου  $F$  που υπολογίζεται από το πρόγραμμα είναι μεγάλη.

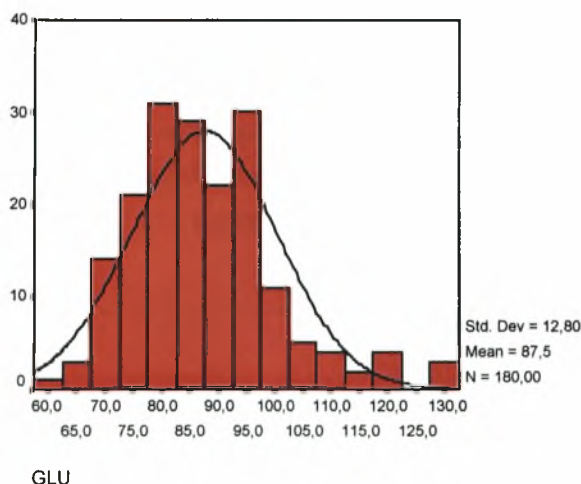


## 4.2. Γλυκόζη ορού αίματος

### 4.2.1 Κατανομή της γλυκόζης ορού αίματος στο φυσιολογικό δείγμα

Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Kolmogorov-Smirnov ( $z=1,06$ ,  $p=0,2$ ,  $mean=87,4$ ,  $median=85,5$ ) η γλυκόζη ορού αίματος στο φυσιολογικό δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 10. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το δείγμα που επιλέχθηκε ήταν αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού.

**Διάγραμμα 10 Κατανομή γλυκόζης ορού αίματος στο φυσιολογικό δείγμα**



Τα 3 άτομα που είχαν τιμή γλυκόζης ορού (130) δηλαδή αποκλίνουσα προς τα άνω μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκουν στο 5% του πληθυσμού που βρίσκεται εκτός κατανομής.

Με δεδομένο ότι η γλυκόζη ορού αίματος ακολουθεί στο δείγμα φυσιολογική κατανομή οι τιμές αναφοράς υπολογίζονται με βάση τη μέση τιμή και δύο σταθερές αποκλίσεις εκατέρωθεν. Με τον τρόπο αυτό οι τιμές αναφοράς που προκύπτουν για τη γλυκόζη ορού είναι 62-112mg/dl.

Αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων (N), η μέση τιμή (mean), η χαμηλότερη (min) και η υψηλότερη (max) τιμή, το εύρος τιμών (range) και το σταθερό λάθος μέτρηση (SD) ανά δεκαετία ηλικίας παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

**Πίνακας 15 Τιμές γλυκόζης ορού αίματος ανά δεκαετία στο φυσιολογικό δείγμα**

| Ηλικία        | N          | Mean        | Min       | Max        | Range     | SD          |
|---------------|------------|-------------|-----------|------------|-----------|-------------|
| 20-29         | 56         | 85,8        | 66        | 131        | 65        | 12,4        |
| 30-39         | 52         | 85,9        | 65        | 103        | 38        | 9,1         |
| 40-49         | 32         | 84,5        | 61        | 109        | 48        | 10,1        |
| 50-59         | 16         | 92,5        | 71        | 132        | 61        | 15,8        |
| >60           | 24         | 94,9        | 70        | 131        | 61        | 17,7        |
| <b>Σύνολο</b> | <b>180</b> | <b>87,4</b> | <b>61</b> | <b>132</b> | <b>71</b> | <b>12,7</b> |

Η γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών γλυκόζης ορού αίματος ανά δεκαετία ηλικίας παρουσιάζεται στο διάγραμμα 11.

**Διάγραμμα 11 Μέση συγκέντρωση γλυκόζης ορού αίματος ανά δεκαετία ηλικίας.**



Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι η μέση συγκέντρωση γλυκόζης ορού αίματος αυξάνεται μετά την ηλικία των 50.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι διαφορές στα επίπεδα της γλυκόζης ορού αίματος ανά δεκαετία ηλικίας πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης με ένα παράγοντα με παράλληλο έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων με τη μέθοδο Tukey. Από την ανάλυση προέκυψε ότι σε ηλικίες άνω των 50 η μέση συγκέντρωση

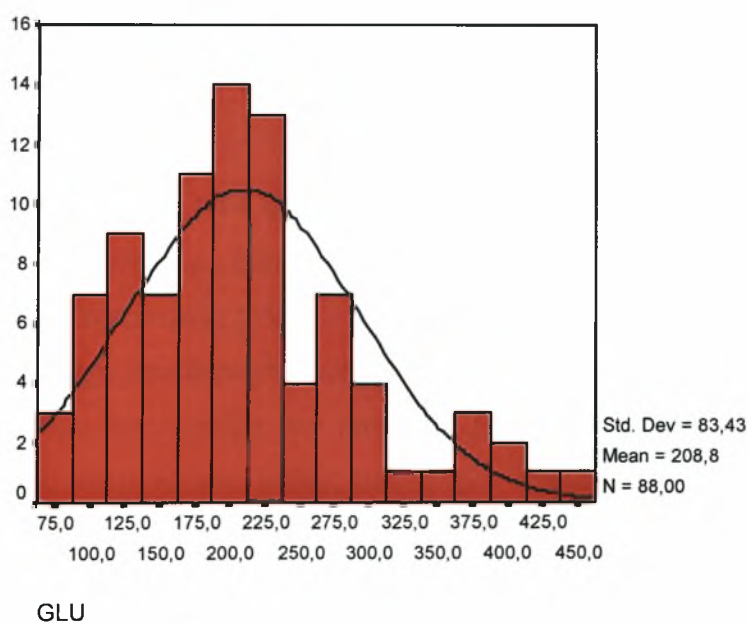
γλυκόζης ορού αίματος διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ) από τις μικρότερες ηλικίες.

#### 4.2.2 Κατανομή γλυκόζης ορού αίματος στο δείγμα των ασθενών με διαβήτη

Παρόμοια με την ομάδα των φυσιολογικών ατόμων, το δείγμα των διαβητικών ασθενών παρουσίασε για τη γλυκόζη ορού αίματος κανονική κατανομή ( $z=0,998$ ,  $p=0,272$ ,  $mean=208$ ,  $median=197$ ). Γραφικά η κατανομή γλυκόζης ορού στο δείγμα των ασθενών με διαβήτη παρουσιάζεται στο διάγραμμα 12.

Αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων (N), η μέση τιμή (mean), η χαμηλότερη (min) και η υψηλότερη (max) τιμή, το εύρος τιμών (range) και το σταθερό λάθος μέτρησης (SD) βρίσκονται στον πίνακα 16.

**Διάγραμμα 12 Κατανομή γλυκόζης ορού αίματος στο δείγμα των ασθενών**

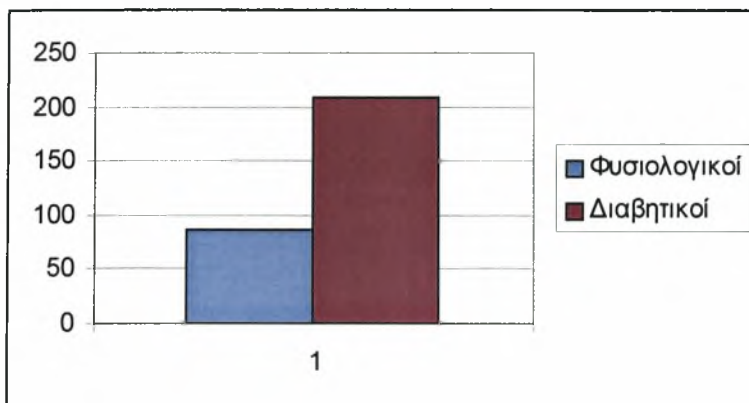


**Πίνακας 16 Τιμές γλυκόζης ορού αίματος στο δείγμα των ασθενών**

|         | N  | Mean  | Min | Max | Range | SD   |
|---------|----|-------|-----|-----|-------|------|
| Γλυκόζη | 88 | 208,7 | 82  | 445 | 363   | 83,4 |

Από το στατιστικό έλεγχο που διενεργήθηκε μεταξύ των μέσων τιμών για τη γλυκόζη ορού ανάμεσα στα δείγματα των φυσιολογικών και των διαβητικών (Independent sample T-Test) βρέθηκε ότι διαφέρουν στατιστικά πολύ σημαντικά ( $p < 0,001$ ). Η σύγκριση αυτή παρίσταται γραφικά στο διάγραμμα 13.

**Διάγραμμα 13 Σύγκριση μέσων τιμών γλυκόζης φυσιολογικών-ασθενών**



### 4.3. Γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA<sub>1C</sub>)

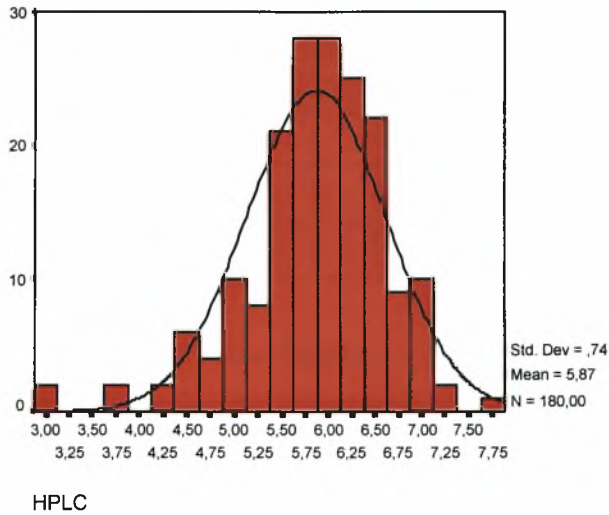
#### 4.3.1 Κατανομή HbA<sub>1C</sub> στο φυσιολογικό δείγμα

Η HbA<sub>1C</sub> μετρήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Με την HPLC και με τη μέθοδο ανοσοθολοσιμετρίας (IA).

Από τον έλεγχο που διενεργήθηκε βρέθηκε ότι η κατανομή της HbA<sub>1C</sub> στο συγκεκριμένο δείγμα προσεγγίζει την κανονική ( $z = 1,3$ ,  $p = 0,05$ ) και με τις δύο μεθόδους, γεγονός αναμενόμενο καθώς μετρήθηκε η ίδια ουσία στο ίδιο δείγμα. Στο διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η κατανομή της HbA<sub>1C</sub> με τη μέθοδο της HPLC.

Αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων (N), η μέση τιμή (mean), η χαμηλότερη (min) και η υψηλότερη (max) τιμή, το εύρος τιμών (range) και το σταθερό λάθος μέτρηση (SD) ανά δεκαετία ηλικίας παρουσιάζονται για τις 2 μεθόδους HPLC και IA στους πίνακες 17 και 18 αντίστοιχα.

**Διάγραμμα 14 Κατανομή της HbA<sub>1c</sub> με τη μέθοδο της HPLC στους φυσιολογικούς**



**Πίνακας 17. Τιμές HbA<sub>1c</sub> με την HPLC στο φυσιολογικό πληθυσμό**

| Ηλικία        | N          | Mean       | Min      | Max        | Range      | SD         |
|---------------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| 20-29         | 56         | 5,7        | 4,3      | 7,3        | 3          | 0,7        |
| 30-39         | 52         | 5,9        | 3        | 7,2        | 4,2        | 0,6        |
| 40-49         | 32         | 5,7        | 3,7      | 6,8        | 3,1        | 0,6        |
| 50-59         | 16         | 6,1        | 3,1      | 7,8        | 4,7        | 0,9        |
| >60           | 24         | 5,9        | 3,7      | 7          | 3,3        | 0,9        |
| <b>Σύνολο</b> | <b>180</b> | <b>5,8</b> | <b>3</b> | <b>7,8</b> | <b>4,8</b> | <b>0,7</b> |

Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι οι τιμές της IA είναι συστηματικά χαμηλότερες από αυτές της HPLC. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου συστηματικού σφάλματος στη μεθοδολογία της IA (ενδεχομένως μικρή συγγένεια του αντισώματος για τη HbA<sub>1c</sub>). Το γεγονός αυτό είναι γνωστό στους κατασκευαστές των αντιδραστηρίων, οι οποίοι και προτείνουν συγκεκριμένο τύπο διόρθωσης των αποτελεσμάτων.

**Πίνακας 18. Τιμές HbA<sub>1c</sub> με την IA στο φυσιολογικό πληθυσμό**

| Ηλικία        | N          | Mean     | Min        | Max      | Range      | SD         |
|---------------|------------|----------|------------|----------|------------|------------|
| 20-29         | 56         | 3,8      | 1,9        | 5,1      | 3,2        | 0,6        |
| 30-39         | 52         | 4        | 2,6        | 5,1      | 2,5        | 0,5        |
| 40-49         | 32         | 3,7      | 1,4        | 4,7      | 3,3        | 0,5        |
| 50-59         | 16         | 4,3      | 2,2        | 6        | 3,8        | 0,9        |
| >60           | 24         | 4,4      | 1,9        | 5,7      | 3,8        | 0,9        |
| <b>Σύνολο</b> | <b>180</b> | <b>4</b> | <b>1,4</b> | <b>6</b> | <b>4,6</b> | <b>0,7</b> |

Με εφαρμογή του τύπου διόρθωσης που προτείνει η Roche οι τιμές της μεθόδου ανοσοθολοσιμετρίας διαμορφώνονται όπως φαίνεται στον πίνακα 19.

**Πίνακας 19 Τιμές HbA<sub>1c</sub> με την IA (διορθωμένες ) στο φυσιολογικό πληθυσμό**

| Ηλικία        | N          | Mean     | Min        | Max        | Range      | SD          |
|---------------|------------|----------|------------|------------|------------|-------------|
| 20-29         | 56         | 5,8      | 4,31       | 7,50       | 3,19       | 0,6         |
| 30-39         | 52         | 5,97     | 4,8        | 7          | 2,2        | 0,5         |
| 40-49         | 32         | 5,8      | 3,9        | 6,4        | 2,5        | 0,54        |
| 50-59         | 16         | 6,2      | 4,5        | 7,7        | 3,2        | 0,75        |
| >60           | 24         | 6,36     | 4,3        | 7,4        | 3,1        | 0,76        |
| <b>Σύνολο</b> | <b>180</b> | <b>6</b> | <b>3,9</b> | <b>7,7</b> | <b>3,8</b> | <b>0,64</b> |

Όπως φαίνεται και από τους πίνακες, μετά τη διόρθωση οι τιμές της IA προσεγγίζουν πολύ αυτές της HPLC.

Με δεδομένο ότι η κατανομή της HbA<sub>1c</sub> στο φυσιολογικό δείγμα είναι κανονική, οι τιμές αναφοράς διαμορφώνονται ως εξής :

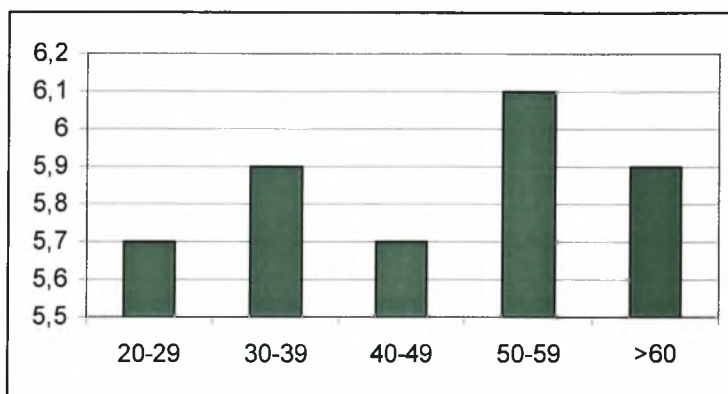
-για την HPLC είναι 4,7-7,2%

-για την IA είναι 2,6-5,4%

-για την IA (διορθωμένη) είναι 4,7-7,2%

Η κατανομή της HbA<sub>1c</sub> ανά δεκαετία ηλικίας στο φυσιολογικό δείγμα παρουσιάζεται στο διάγραμμα 15.

**Διάγραμμα 15 Η κατανομή της HbA<sub>1C</sub> ανά δεκαετία ηλικίας στο φυσιολογικό δείγμα**



Παρατηρούμε ότι η HbA<sub>1C</sub> παρουσιάζει διακυμάνσεις από δεκαετία σε δεκαετία. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο Tukey βρέθηκε ότι μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική διαφορά για τη μέση τιμή παρουσιάζει η δεκαετία 50-59 σε σχέση με τις υπόλοιπες με  $p=0,04$

#### 4.3.2 Κατανομή HbA<sub>1C</sub> στους διαβητικούς ασθενείς

Η κατανομή των επιπέδων της HbA<sub>1C</sub> στο δείγμα των ασθενών με βάση τα αποτελέσματα της HPLC βρέθηκε κανονική ( $z=0,587$ ,  $p=0,881$ ,  $mean=9,2$ ,  $median=9,3$ ) και παρουσιάζεται γραφικά στο διάγραμμα 16.

Αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων (N), η μέση τιμή (mean), η χαμηλότερη (min) και η υψηλότερη (max) τιμή, το εύρος τιμών (range) και το σταθερό λάθος μέτρησης (SD) παρουσιάζονται για τις 2 μεθόδους HPLC και IA στον πίνακα 20.

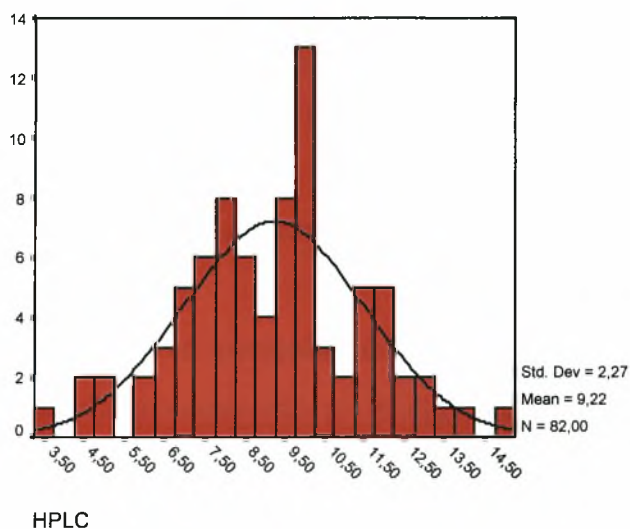
**Πίνακας 20. Τιμές HbA<sub>1C</sub> σε ασθενείς**

|                | N  | Mean | Min | Max  | Range | SD  |
|----------------|----|------|-----|------|-------|-----|
| HPLC           | 88 | 9,2  | 3,6 | 15   | 11,4  | 2,2 |
| IA             | 88 | 8,9  | 1,6 | 16,2 | 14,6  | 3,5 |
| IA(διορθωμένη) | 88 | 10   | 4   | 16   | 12    | 2,9 |

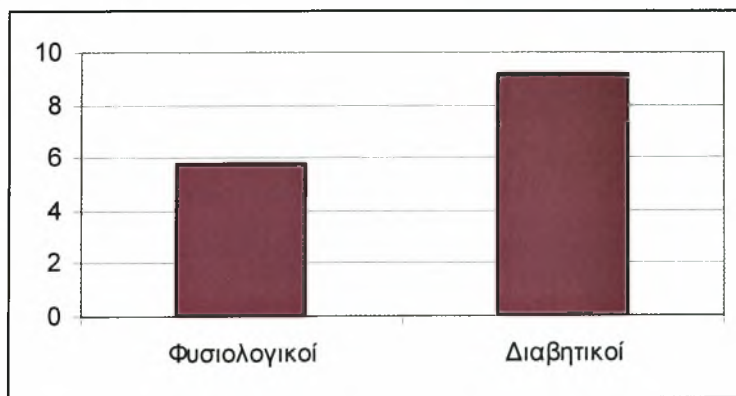
Η σύγκριση της διαφοράς των μέσων τιμών της HbA<sub>1c</sub> μεταξύ φυσιολογικού δείγματος και δείγματος ασθενών πραγματοποιήθηκε με Independent sample T-Test το οποίο έδειξε ότι η διαφορά είναι στατιστικώς πολύ σημαντική ( $p < 0,001$ ).

Η διαφορά των μέσων τιμών παρίσταται στο διάγραμμα 17.

**Διάγραμμα 16 Κατανομή της HbA<sub>1c</sub> στο δείγμα των ασθενών με HPLC**



**Διάγραμμα 17 Σύγκριση μέσων τιμών της HbA<sub>1c</sub> μεταξύ φυσιολογικών και διαβητικών**





### 4.3.3 Ανάλυση συσχέτισης των 2 μεθόδων μέτρησης της HbA<sub>1c</sub>(HPLC-IA)

Προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση των 2 μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson. Τα αποτελέσματα που πήραμε από την ανάλυση ( $R=0,942$ ,  $p<0,001$ ) μας επιτρέπουν να ισχυριστούμε με ασφάλεια ότι μεταξύ των μεθόδων υπάρχει εξαιρετικά ισχυρή θετική συσχέτιση. Η γραφική αναπαράσταση της συσχέτισης παρουσιάζεται στο διάγραμμα 18.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι οι δύο μέθοδοι συσχετίζονται καλά, σε υψηλές συγκεντρώσεις HbA<sub>1c</sub> όμως (>8) η απόκλιση είναι μεγαλύτερη.

## 4.4. Λόγος μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη

### 4.4.1 Κατανομή λόγου στο φυσιολογικό δείγμα

Τα στοιχεία που προέκυψαν από τον έλεγχο κανονικότητας (Kolmogorov-Smirnov) για την κατανομή του λόγου μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη στο φυσιολογικό δείγμα ( $z=3,1$ ,  $p=0,004$ ,  $mean=6,3$ ,  $median=4,3$ ) και η μορφή της κατανομής (διάγραμμα 19) αποδεικνύουν ότι στην περίπτωση αυτή δεν ακολουθείται κανονική κατανομή. Η μια τιμή που βρέθηκε αποκλίνουσα προς τα άνω (80) μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελεί λάθος στη δειγματοληψία, γεγονός όμως που δικαιολογείται καθώς η έκκριση της μικροαλβουμίνης στα ούρα όπως έχει ήδη αναφερθεί μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς αστάθμητους παράγοντες, π.χ. έντονη σωματική άσκηση, λοιμώξεις κ.ά.

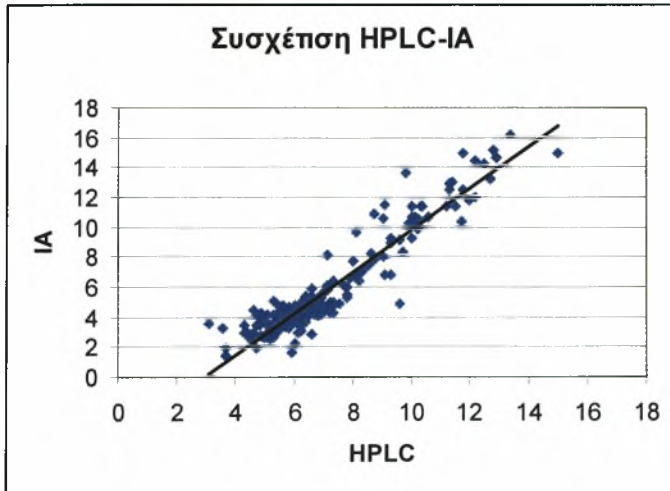
Αναλυτικά οι τιμές του λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη στο φυσιολογικό πληθυσμό ανά δεκαετία ηλικίας παρουσιάζονται στον πίνακα 21.

**Πίνακας 21 Τιμές λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη στο φυσιολογικό δείγμα**

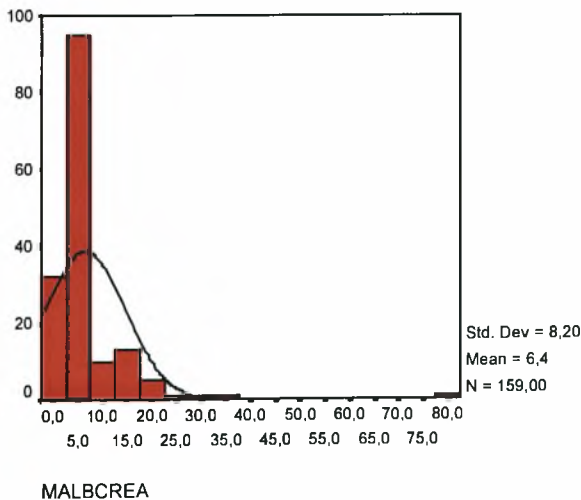
| Ηλικία        | N          | Mean       | Min      | Max       | Range     | SD         |
|---------------|------------|------------|----------|-----------|-----------|------------|
| 20-29         | 48         | 5,2        | 0        | 17,8      | 17,8      | 3,7        |
| 30-39         | 47         | 6,9        | 0        | 82        | 82        | 11,9       |
| 40-49         | 28         | 5,1        | 0        | 24,2      | 24,2      | 5          |
| 50-59         | 14         | 6,5        | 0        | 27,6      | 27,6      | 7          |
| >60           | 22         | 9,1        | 0        | 82        | 82        | 8,7        |
| <b>Σύνολο</b> | <b>159</b> | <b>6,3</b> | <b>0</b> | <b>82</b> | <b>82</b> | <b>8,2</b> |

Από τη στιγμή που ο πληθυσμός δεν ακολουθεί κανονική κατανομή όσον αφορά στο λόγο μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη, για τον προσδιορισμό των τιμών αναφοράς θα πρέπει να υπολογισθούν τα εκατοστημόρια. Συγκεκριμένα για διάστημα εμπιστοσύνης 95% οι τιμές αναφοράς βρίσκονται μεταξύ των θέσεων που ορίζουν τα εκατοστημόρια 2,5 και 97,5. Για συνολικό αριθμό δειγμάτων 159, τα ανωτέρω εκατοστημόρια βρίσκονται στις θέσεις 4 και 154 στη διάταξη των αποτελεσμάτων κατά αύξουσα σειρά. Συνεπώς τα όρια αναφοράς του λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη είναι **0-21,8** , καθώς οι τιμές αυτές βρίσκονται στις θέσει 4 και 154 αντίστοιχα.

**Διάγραμμα 18 Συσχέτιση HPLC-IA**

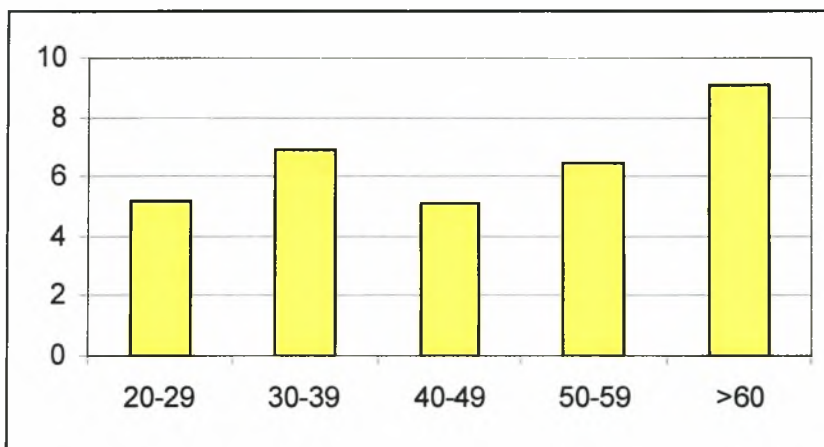


**Διάγραμμα 19 Κατανομή λόγου μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη στο φυσιολογικό δείγμα**



Η γραφική αναπαράσταση της κατανομής των μέσων τιμών του λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη παρουσιάζεται στο διάγραμμα 20. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, οι μέσες τιμές του λόγου παρουσιάζουν μια μικρή διακύμανση στις διάφορες δεκαετίες, με την κατηγορία >60 να διαφέρει ελάχιστα αλλά στατιστικώς σημαντικά ( $p=0,04$ ) σύμφωνα με τον έλεγχο που διενεργήθηκε.

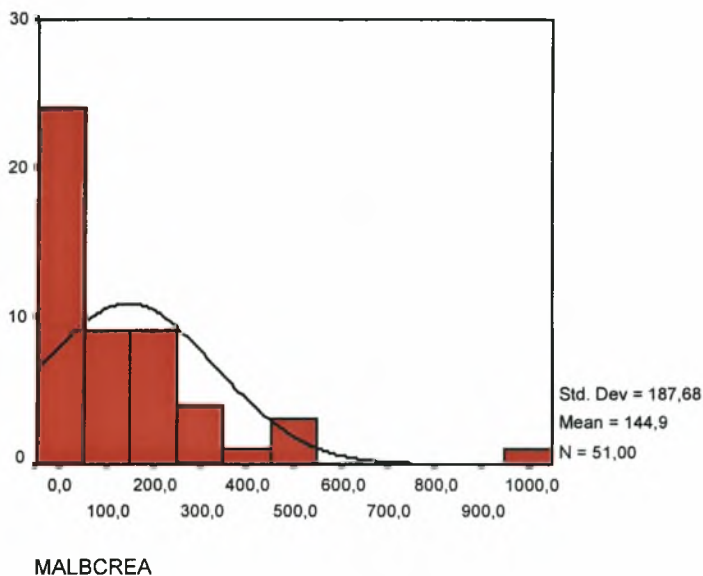
**Διάγραμμα 20 Μέσες τιμές λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη ανά δεκαετία ηλικίας στο φυσιολογικό δείγμα.**



#### 4.4.2 Κατανομή λόγου στους ασθενείς με διαβήτη

Ο λόγος μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη στους ασθενείς με διαβήτη παρουσιάζει μια πιο ευρεία κατανομή σε σχέση με τους φυσιολογικούς, η οποία όμως και πάλι δεν μπορεί να θεωρηθεί κανονική ( $z=1,5$ ,  $p=0,014$ ,  $mean=144$ ,  $median=72$ ), όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 21.

### Διάγραμμα 21 Κατανομή λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη στους διαβητικούς



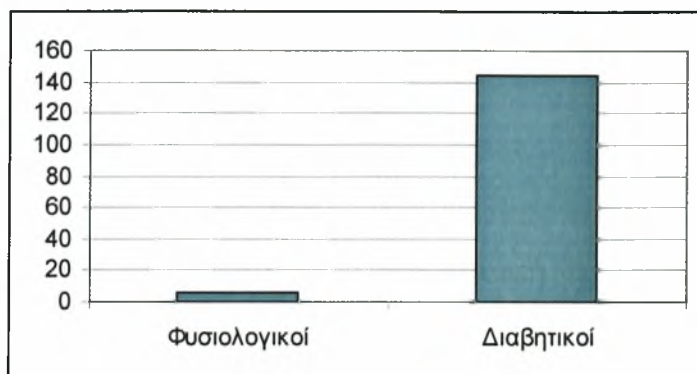
Πιο αναλυτικά οι τιμές του λόγου για το δείγμα των ασθενών με διαβήτη παρουσιάζονται στον πίνακα 22.

**Πίνακας 22 Τιμές λόγου μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη στο δείγμα των ασθενών**

| N  | Mean  | Min | Max | Range | SD  |
|----|-------|-----|-----|-------|-----|
| 88 | 144,8 | 0   | 996 | 996   | 187 |

Η σύγκριση των μέσων τιμών του λόγου μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη μεταξύ φυσιολογικών και ασθενών με διαβήτη παρουσιάζεται γραφικά στο διάγραμμα 22. Από τη στατιστική ανάλυση που διενεργήθηκε προέκυψε ότι μεταξύ των δύο δειγμάτων υπάρχει εξαιρετικά σημαντική διαφορά ως προς τις μέσες τιμές του λόγου ( $p < 0,001$ ).

**Διάγραμμα22 Σύγκριση μέσων τιμών λόγου μικροαλβουμίνη /κρεατινίνη μεταξύ φυσιολογικών και ασθενών με διαβήτη**



#### 4.5. Συσχετίσεις

Για να μελετηθεί η πιθανή σχέση των 3 αναλυτών που μετρήθηκαν και στα δύο δείγματα (φυσιολογικών και ασθενών) πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης (Pearson Correlation ) μεταξύ τους ανά δύο την οποία ακολούθησε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

##### 4.5.1 Συσχέτιση γλυκόζης με HbA<sub>1c</sub>

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 23.

**Πίνακας 23 Συσχέτιση γλυκόζης με HbA<sub>1c</sub>**

| N   | R     | R <sup>2</sup> | F   | p    |
|-----|-------|----------------|-----|------|
| 262 | 0,715 | 0,512          | 272 | 0,00 |

##### 4.5.2 Συσχέτιση γλυκόζης με το λόγο μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 24.

**Πίνακας 24 Συσχέτιση γλυκόζης με το λόγο μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη**

| N   | R     | R <sup>2</sup> | F  | p    |
|-----|-------|----------------|----|------|
| 210 | 0,523 | 0,273          | 78 | 0,00 |

### 4.5.3 Συσχέτιση HbA<sub>1c</sub> με το λόγο μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 25.

**Πίνακας 25 Συσχέτιση HbA<sub>1c</sub> με το λόγο μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη**

| N   | R     | R <sup>2</sup> | F  | p    |
|-----|-------|----------------|----|------|
| 204 | 0,559 | 0,313          | 92 | 0,00 |

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι μεταξύ των τριών αναλυτών υπάρχει σαφώς θετική συσχέτιση, με σημαντικότερη αυτή μεταξύ της γλυκόζης και της HbA<sub>1c</sub>.

Επειδή οι ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια ήταν λίγοι και όσοι προσήλθαν ήταν σε τέτοια κατάσταση (αιμοκάθαρση) που δεν επέτρεπε τη λήψη δείγματος, συσχέτιση των τριών αναλυτών με τις επιπλοκές του διαβήτη πραγματοποιήθηκε μόνο για την αμφιβληστροειδοπάθεια.

### 4.5.4 Συσχέτιση των τριών αναλυτών μεταξύ των ασθενών που εκδηλώνουν διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (A/a) ως επιπλοκή και αυτών που δεν την εκδηλώνουν

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 26

**Πίνακας 26**

|                   |        | N  | Mean | Min | Max  | Range | SD  |
|-------------------|--------|----|------|-----|------|-------|-----|
| Γλυκόζη           | Με A/a | 39 | 201  | 82  | 420  | 338   | 86  |
|                   | Χωρίς  | 37 | 220  | 86  | 445  | 359   | 87  |
| HbA <sub>1c</sub> | Με A/a | 39 | 9,2  | 4,5 | 15   | 10,5  | 2,6 |
|                   | Χωρίς  | 37 | 9,3  | 5,1 | 12,8 | 7,7   | 1,7 |
| Μα/κρε            | Με A/a | 30 | 153  | 3,5 | 719  | 715   | 169 |
|                   | Χωρίς  | 18 | 140  | 0   | 520  | 520   | 160 |

Ακολούθησε ανάλυση για τον έλεγχο της διαφοράς των μέσων τιμών (Independent sample T-Test) αλλά δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική για καμία από τις 3 ουσίες που μετρήθηκαν ( $p > 0,05$ ).

Επιπλέον διενεργήθηκαν έλεγχοι μεταξύ των δύο φύλων τόσο στο φυσιολογικό δείγμα όσο και στο δείγμα των ασθενών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι μέσες τιμές των 3 αναλυτών που μετρήθηκαν διέφεραν Τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται, αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p>0,05$ ).

## 5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Οι κατανομές γλυκόζης ορού αίματος και γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης αίματος ήταν κανονικές τόσο στο δείγμα των φυσιολογικών ατόμων όσο και στο δείγμα των ασθενών με διαβήτη. Από τη θεωρία είναι γνωστό ότι οι ουσίες αυτές ακολουθούν την κανονική κατανομή στον πληθυσμό. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το δείγμα μας ήταν τελικά αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού.

Η κατανομή του λόγου μικροαλβουμίνη/κρεατινίνη δεν ήταν κανονική. Το γεγονός αυτό είναι λογικό για το δείγμα των φυσιολογικών, καθώς η μικροαλβουμίνη είναι μια ουσία που εκκρίνεται σε παθολογικές καταστάσεις. Σε φυσιολογικά άτομα είναι συνήθως μη ανιχνεύσιμη ή βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Στο δείγμα των ασθενών θα αναμέναμε μια κατανομή που προσεγγίζει την κανονική. Αντί αυτού, παρατηρήθηκε συνάθροιση προς τα αριστερά, δηλαδή στις χαμηλότερες τιμές. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αντικατοπτρίζει το ότι τα άτομα που αποτελούσαν το δείγμα των ασθενών στην πλειοψηφία τους δεν νοσούσαν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να εκδηλώσουν μικροαλβουμινουρία.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τιμές αναφοράς για τη γλυκόζη ορού αίματος είναι 70-105mg/dl (Tietz), 75-115 mg/dl (Medikon) ή 74-106 mg/dl (S.C.Anderson). Βάσει του δείγματος που μελετήσαμε οι τιμές αναφοράς για τη γλυκόζη ορού είναι 62-112mg/dl. Οι δικές μας τιμές παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος που εκτείνεται κυρίως στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα δείγματα όπου έγιναν οι αναλύσεις ανήκαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Όλα τα δεδομένα της βιβλιογραφίας προέκυψαν από μελέτες σε πληθυσμό της Αμερικής όπου οι συνθήκες ζωής και διατροφής (υψηλά επίπεδα παχυσαρκίας ) είναι πολύ διαφορετικές από τις δικές μας.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης ορού αίματος στους ενήλικες αυξάνεται από την τρίτη έως την έκτη δεκαετία ζωής με μέσο ρυθμό τα 2mg/dl ανά δεκαετία , ενώ μετά τα 60 δεν φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά (Tietz). Τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική διαφορά στα μέσα επίπεδα γλυκόζης από την ηλικία των 50, γεγονός που ταυτίζεται απόλυτα με τη βιβλιογραφία.



Σχετικά με τις τιμές αναφοράς για τη γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη, υπάρχουν στη βιβλιογραφία αρκετές διαφοροποιήσεις, με τις αμερικάνικες πηγές να δίνουν κατά κανόνα υψηλότερες τιμές. Συγκεκριμένα οι τιμές που προτείνονται είναι οι εξής : 3-6% (S.C.Andersen), 4,7-6,4% (Biorad), 5,3-7,5% (Tietz), 2,9-4,6% (Roche), 4,8-6 % (Roche με διόρθωση). Οι δικές μας τιμές είναι 4,7-7,2% για την HPLC και 2,6-5,4% για τη μέθοδο της Roche (4,7-7,2% με τη διόρθωση). Οι διαφορές αυτές οφείλονται όχι μόνο στη διαφορετική σύσταση του πληθυσμού όπου έγιναν οι μελέτες (Biorad-Αμερική, Roche-Ελβετία) αλλά και στη διαφορετική αρχή μεθόδου που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε για τους προσδιορισμούς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, διαφορετικές μέθοδοι μετρούν διαφορετικές χημικές ενώσεις πχ ολική γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη A1c, ασταθή μόρια αλδιμίνης κ.α. Για το λόγο αυτό συστήνεται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τις δικές του τιμές αναφοράς, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί και τον πληθυσμό της περιοχής του, τιμές πάντως που δεν πρέπει να παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις από το εύρος 4-6% με SD~0,5%.

Η συσχέτιση των δύο μεθόδων προσδιορισμού για τη γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη που χρησιμοποιήσαμε (HPLC-IA) αποδείχθηκε στατιστικώς πολύ σημαντική. Επομένως η IA θα μπορούσε να υιοθετηθεί από το εργαστήριο ως ταχύτερη και φθηνότερη με τις δικές τη βέβαια τιμές αναφοράς.

Για το λόγο μικροαλβουμίνης/κρεατινίνη, όλη η βιβλιογραφία αναφέρει ότι φυσιολογικά θα πρέπει να είναι <30, γεγονός που συμβαδίζει και με τα δικά μας ευρήματα.

Θα πρέπει ακόμη να τονίσουμε λαμβάνοντας υπόψη τις ασυνήθιστα υψηλές τιμές γλυκόζης ορού, γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης αίματος και μικροαλβουμίνης ούρων στο δείγμα των διαβητικών ασθενών που εξετάστηκε ότι είναι πολύ σημαντικό να γίνουν συντονισμένες προσπάθειες πρόληψης και πληροφόρησης από τους γιατρούς, έγκαιρης και έγκυρης διάγνωσης από τα εργαστήρια και διαιτητικής συμμόρφωσης από τους ίδιους τους ασθενείς έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά ο διαβήτης και οι σοβαρές επιπλοκές του στην περιοχή.

## Βιβλιογραφία

1. Σακχαρώδης διαβήτης. Εντατική εκπαίδευση στην ενδοκρινολογία. Ενδοκρινολογική Εταιρεία. Φεβρουάριος 2000.
2. William Marshal :.Κλινική Βιοχημεία, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας ,1998
3. Guyton: Ιατρική Φυσιολογία
4. Moran Scrimgeour: Biochemistry,Neil Patterson Publishers,second edition, 1994
5. Ελληνική εταιρεία κλινικής χημείας: Διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων και εργαστηριακή διερεύνηση του διαβήτη,1993
6. Γ. Ν. Κουκούλης: Ενδοκρινολογία 2000
7. Harrison's principles of internal medicine 13thedition
8. David.B.Sacks etal:Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus, Clin Chem48 :3,436-472,2002
9. Thomas. D. Gelehrter-Francis S. Collins ; Αρχές ιατρικής γενετικής, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλιδης, 1996
10. Janeway-Travers : Κλινική Ανοσοβιολογία, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2<sup>η</sup> έκδοση,1996
11. American Diabetes Association: Tests for glycemia.Diabetes Care 2000;23
12. N.W.Tietz:Textbook of clinical chemistry (Saunders 1994)
13. David.A.Rezendes:The role of the clinical laboratory in the new approach to diabetes.Clin Lab News 1997
14. Anne.L.Peters etal:Clinical approach for the diagnosis for diabetes mellitus.JAMA, October1996-vol 276 No15
15. P.Bachman etal : Does microalbuminouria predict diabetic nephropathy?Diabetes Care24:1560-1566,2001
16. Κων/νος .Γ.Ψύλλας :Εισαγωγή στην οφθαλμολογία.University Studio Press, 1994
17. American Diabetes Association:Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.Diabetes Care 1997;20:1183-201

18. Όθων Παναγιωτάκης :Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά.Επιστημονική Ημερίδα εταιρείας κλινικής χημείας,1993
19. American Diabetes Association Research Network: Diabetes Forecast, April 1996
20. Golstein D.E.The national glycohemoglobin standardisation programm(NGSP): a five year progress report.Clin.Chem 2001 47:1985-92
21. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus.Diabetes Care 2000;23:32-42
22. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes.Diabetes Care 2001;24:80-2
23. Davie SJ, Gould BJ. Effects of vit C on glycosylation of proteins. Diabetes care 2000;23: 339-44
24. Ceriello A. et al.Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes . New prospect for prevention of diabetic complications?Diabetes Care1991;14:68-72
25. Tom Stracan, Andrew P.Read. Human molecular genetics
26. FrankEL, Moulton L etal.Effects of hemoglobin S and C traits on seven glycohemoglobin methods. Clin Chem 2000;46:864-7
27. Gibb I, Parnham A, etal. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. Clin Chem 1999;45:1833-41
28. Puukka R, Puukka M.Effect of hemoglobin F on measurements of HbA<sub>1c</sub>.Clin Chem 1994;40:342-3
29. Weykamp CW, Miedema K etal: Carbamylated hemoglobin interference in HbA<sub>1c</sub> assays. Clin Chem 1999;45:438-40
30. Anne.H.Harbing etal.Fat consumption and HbA<sub>1c</sub> levels.Diabetes Care2001;24:1911-1916
31. Nathan DM etal. Effect of aspirin on determinations of GHb. Clin Chem1983;29:466-9
32. Howey IE, Browning MC, Fraser CG. Biologic variation of urinary albumin:consequenses for analysis,specimen collection,interpretation of results and screeningprograms. J Kidney Dis 1989;13 :35-7



33. Collins AC, Sethi M, MacDonald et.al. Storage temperature and differing methods of sample preparation in the measurement of urinary albumin. Clin Chem 1991;37:2120-3
34. American Diabetes Association. Diabetes nephropathy. Diabetes Care 1999;22:66-9
35. N.W. Tietz. Establishment and use of reference values
36. IFCC. Expert panel on theory of reference values
37. Olympus System Reagent Prospectus for glucose (OSR 6121)
38. BioRad HbA<sub>1c</sub> Testing System, Instruction manual
39. Roche Hitachi Systems Prospectus for HbA<sub>1c</sub>
40. M.Vucic, S.Petrovic, Rmesic. An automated immunoturbidimetric assay for HbA<sub>1c</sub> determination. Diabetologia Croatica, 1998;27-2
41. Olympus System Reagent Prospectus for microalbumin (OSR 6167)
42. Olympus System Reagent Prospectus for creatinin (OSR 6118)

| ΛΗΞΗ | ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ |
|------|----------------------------|
|      |                            |
|      |                            |
|      |                            |
|      |                            |
|      |                            |

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

~~Τηλ.: 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077  
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057244