

MEANING OF HbA1c IN THE DIAGNOSIS AND SCREENING OF DIABETES MELLITUS

Mire Spasov

Faculty of Medical Science, University „Goce Delcev“ - Stip, Republic of North Macedonia,
mire.spasov@ugd.edu.mk

Hristijan Spasov

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University „St. Cyril and Methodius“ - Skopje, Republic of
North Macedonia, spasov.hristijan@gmail.com

Abstract: The main functional protein of erythrocytes is hemoglobin, which is not normally found in plasma, but during hemolysis, erythrocytes break down, it comes out of them and binds to the haptoglobin protein. Hemoglobin is a chromoprotein found in erythrocytes and carries out the transport of oxygen from the lungs to the tissues and the transport of carbon dioxide from the tissues to the lungs. These gases are loosely bound to the iron in the composition of heme as the non-protein component of hemoglobin, which also contains the protein component globin. In erythrocytes, there is also hemoglobin A1c in a certain amount, which is formed through non-enzymatic glycolysis of valine residues from the N-terminal end of the β -chain of hemoglobin A. It is created in pathological cases when the glucose in the blood has high concentrations, that is, the excess of glucose binds to the hemoglobin. Glycosylated HbA1c is of great importance for monitoring treatment and therapy in patients with diabetes mellitus, because its concentration is proportional to the concentration of glucose and in the long term, within three months, because HbA1c does not break down and remains present in the blood until erythrocytes are destroyed. The purpose of the research is to prove the significance of determining the concentration of HbA1c in monitoring diabetes mellitus and keeping it under control. This is the most reliable method for detecting poor metabolic regulation of diabetes, especially in cases where it remains undetected for a long time, and blood glucose is tested once every 2–3 months. The trials were conducted in young female patients aged 25 to 35 years with previously confirmed hyperglycemia. The patients were divided into three groups, a control group of patients with a normal level of glycemia in the circulation (n=30), a group of patients with diagnosed hyperglycemia (n=30), a group of patients treated with therapy to reduce the level of glycemia in the blood with Glucophage, which acts on the basis of dopamine (n=30). HbA1c is determined by an immunochemical inhibitory method that uses two reagents, one of which contains mouse antibodies to HbA1c applied to latex particles. The second reagent contains parts of HbA1c as antigens applied to agglutinators. The measurements were performed on an automated biochemical analyzer ARCHITECT 4000. The obtained results showed that patients diagnosed with diabetes mellitus have significantly increased results for the concentration of glycemia compared to patients from the control group whose results are within normal glucose values. The group of patients treated with therapy to reduce the level of glucose in the blood, that is, with Glucophage, have evidently reduced values for the level of glucose to a level close to the control group. There is a visible effect of Glucophage therapy in reducing the concentration of glucose in the blood. The drug reduces the concentration of glucose in the blood to normal values, that is, it regulates the level of sugar in the blood in such a way that it reduces the breakdown of glycogen from the liver to glucose, and increases the use of glucose in muscle cells. With the application of antidiabetic therapy with Glucophage, the negative effect of hyperglycemia is removed. In conditions of hyperglycemia, the concentration of glucose significantly increases compared to the control group, and in the treated group of patients, the level of glucose significantly decreases to values close to the control group of patients.

Keywords: hemoglobin A1c, insulin, glycolysis, Diabetes mellitus, Glucophage.

ЗНАЧЕЊЕТО НА HbA1c ПРИ ДИЈАГНОЗА И СКРИНИНГ НА DIABETES MELLITUS

Мире Спасов

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Северна
Македонија, mire.spasov@ugd.edu.mk

Христијан Спасов

Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, Република
Северна Македонија, spasov.hristijan@gmail.com

Резиме: Главен функционален протеин на еритроцитите е хемоглобинот кој нормално не се наоѓа во плазмата, но при хемолиза се распаѓаат еритроцитите, тој излегува од нив и се врзува за протеинот хаптаглобин. Хемоглобинот е хромопротеид кој се наоѓа во еритроцитите и врши транспорт на кислород од белите дробови до ткивата и транспорт на јаглерод диоксид од ткивата до белите дробови. Овие гасови лабаво се врзуваат за железото во состав на хемот како непротеинска компонента на хемоглобинот, кој содржи и протеинска компонента глобин. Во еритроцитите во извесна количина има и хемоглобин А1с кој настанува преку неензимско гликолизирање на валинските остатоци од N-терминалниот крај на β -синцирот на хемоглобинот А. Тој се создава во патолошки случаи кога глукозата во крвта е со високи концентрации, односно вишокот на глукоза се врзува за хемоглобинот. Гликолизираниот HbA1c има големо значење за следење на третманот и терапијата кај пациентите со Diabetes melitus, бидејќи концентрацијата му е пропорционална со концентрацијата на глукозата и тоа долгорочно, во рок од три месеци, затоа што HbA1c не се разложува и останува присутен во крвта се додека не се разорат еритроцитите. Целта на истражувањето е да се докаже значењето на одредувањето на концентрацијата на HbA1c во следење на Diabetes melitus и држење под контрола. Ова е најдоверливата метода за откривање на лоша метаболичка регулација на шеќерната болест, особено во случаите кога таа останува долго време неоткриена, а гликемијата во крвта се испитува еднаш во 2–3 месеци. Испитувањата беа спроведени кај млади пациентки на возраст од 25 до 35 години со предходно потврдена хипергликемија. Пациентите беа поделени во три групи, контролна група на пациентки со нормално ниво на гликемија во циркулацијата ($n=30$), група на пациентки со дијагностицирана хипергликемија ($n=30$), група на пациентки третирани со терапија за намалување на нивото на гликемијата во крвта со Glukophage, кои дејствува на база на допамин ($n=30$). HbA1c се одредува со имунохемика инхибиторна метода која користи два реагенси од кој едниот содржи глумчешки антитела на HbA1c нанесени на партикли од латекс. Вториот реагенс содржи делови од HbA1c како антигени нанесени на аглутинатори. Мерењата се вршени на автоматизиран биохемиски анализатор ARCHITECT 4000. Добиените резултати покажаа дека пациентите со дијагностициран Diabetes melitus имаат сигнификантно зголемени резултати за концентрацијата на глукоза во однос на пациентите од контролната група чии резултати се движат во нормалните вредности. Групата на пациенти третирани со терапија за намалување на нивото на глукоза во крвта, односно со Glukophage, имаат евидентно намалени вредности за нивото на глукоза на ниво блиску до контролната група. Постои видлив ефект од терапијата со Glukophage во намалувањето на концентрацијата на глукоза во крвта. Лекот ја намалува концентрацијата на глукозата во крвта до нормални вредности односно го регулира нивото на шеќер во крвта на тој начин што ја намалува разградбата на гликогенот од хепарот до глукоза, и го зголемува искористувањето на глукозата во клетките на мускулите. Со примената на антидијабетската терапија со Glukofage се отстранува негативниот ефект од хипергликемијата. Во услови на хипергликемија концентрацијата на глукоза сигнификантно се зголемува во однос на контролната група, а кај третираната група на пациенти нивото на глукоза сигнификантно се намалува до вредности блиски на контролната група на пациенти.

Клучни зборови: хемоглобин А1с, инсулин, гликолизирање, Diabetes melitus, Glukophage.

1. ВОВЕД

Хемоглобинот преставува главен функционален протеин во состав на еритроцитите кои се главен составен дел од крвта. Крвната плазма нормално не содржи хемоглобин, но при хемолиза и распаѓање на еритроцитите тој преминува во истата и се врзува за протеинот хаптаглобин. Одредување на концентрацијата на хаптаглобин се користи за дијагностицирање на хемолитичка анемија. Во состав на еритроцитите хемоглобинот врши транспорт на кислород од белите дробови до ткивата, транспорт на CO_2 од ткивата до белите дробови, одржување на РН на крвта и др. Според хемиската структура хемоглобинот е хромопротеид изграден од протеинска компонента-глобин и непротеинска компонента-хем. За железото во состав на хемот лабаво се врзува O_2 и CO_2 , а глобинските ланци може да бидат α и β и според нивната застапеност има неколку вида хемоглобин, како хемоглобин А со 2 α и 2 β полипептидни ланци присутен во 95-98% кај возрасни здрави лица, хемоглобин А₂ со 2 α и 2 δ полипептидни ланци присутен со 2,0-3,5% кај возрасни здрави лица, фетален хемоглобин со 2 α и 2 γ полипептидни ланци присутен со околу 2%. Синтезата на овие типови на хемоглобин е генетски контролирана.

Еден од видовите хемоглобин кој во извесна количина се среќава во еритроцитите е хемоглобин А1с кој содржи 2 α и 2 β глобински синцири поврзани со глукоза, присутен со околу 3-9% и се формира по пат на неензимско врзување на глукозата односно гликолизирање со валинските остатоци од N-терминалниот крај на β -синцирот на хемоглобинот А. Карактеристиките на HbA1c се погодни за долгорочно следење на концентрацијата на глукоза во крвта во период околу 3 месеци, па затоа се нарекува и тромесечен шеќер. Концентрацијата на HbA1c е пропорционална со концентрацијата на глукоза во крвта, при што не се

разложува и останува присутен во крвта се додека не се разорат еритроцитите. Поради оваа карактеристика HbA1c има големо значење за следење на третманот кај пациенти со Diabetes melitus, ако се претпостави дека животниот век на еритроцитите е нормален. Исто така HbA1c е значаен и во случај кога пациентот долго време немал класични симптоми на Diabetes melitus, но концентрацијата на гликемија покажува високи вредности. Концентрација на HbA1c се анализира за да се види каква била концентрацијата на глукозата во крвта во предходните 3 месеци. Гликолизирањето на HbA1c односно врзувањето на хемоглобинот со глукозата настанува во патолошки случаи кога во крвта во подолг временски период има хипергликемија. Колку е повисока концентрацијата на глукоза во крвта толку е повисока и вредноста на HbA1c, бидејќи повеќе глукоза се врзува за хемоглобинот, тогаш кога таа била вишок во крвта. Затоа концентрацијата на HbA1c во серумот е добар показател на циркадијалниот ритам на глукозата и квалитетот на метаболичката регулација на шеќерната болест за подолг временски период од околу 3 месеци. Поради тоа HbA1c уште се нарекува и тримесечен шеќер бидејќи ја отсликува средната вредност на концентрацијата на глукоза во крвта во текот од 3 месеци. Добиените резултати за HbA1c треба внимателно да се интерпретираат односно ниски концентрации се добиваат кај пациентите со хемолитичка анемија и пациентите кои предходните 2-3 месеци имале значајна загуба на крв (крварење) односно при ниски вредности на хемоглобин. Високи вредности на HbA1c се мерат кај пациенти со анемија предизвикана од дефицит на железо веројатно поради висок процент на стари еритроцити. Целта на ова истражување беше да се докаже значењето на одредувањето на концентрацијата на HbA1c во следењето на Diabetes melitus и нејзино држење под контрола. Одредувањето на концентрацијата на HbA1c е нај доверливата метода за откривање на лоша метаболичка регулација на шеќерната болест, посебно во случаевите кога таа останува долго време неоткриена, а гликемијата во крвта се испитува еднаш во 2-3 месеци или ретко се прави дневен профил со земање на крв 2-3 пати дневно за испитување на флукуацијата на нивото на гликемијата.

2. МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ

За да се докаже значењето на концентрацијата на HbA1c за следење и ординирање на правилна терапија кај женски пациенти со Diabetes melitus испитувањата со одредување на HbA1c беа спроведени кај млади пациентки на возраст од 25 до 35 години со предходно утврдена хипергликемија и истите беа поделени во три групи:

- контролна група на пациентки со нормално ниво на гликемија во циркулацијата (n=30).
- група на пациентки со дијагностицирана хипергликемија (n=30).
- група на пациентки третирани со Glukophage, терапија за намалување на нивото на гликемија во крвта кои дејствува на база на допамин (n=30).

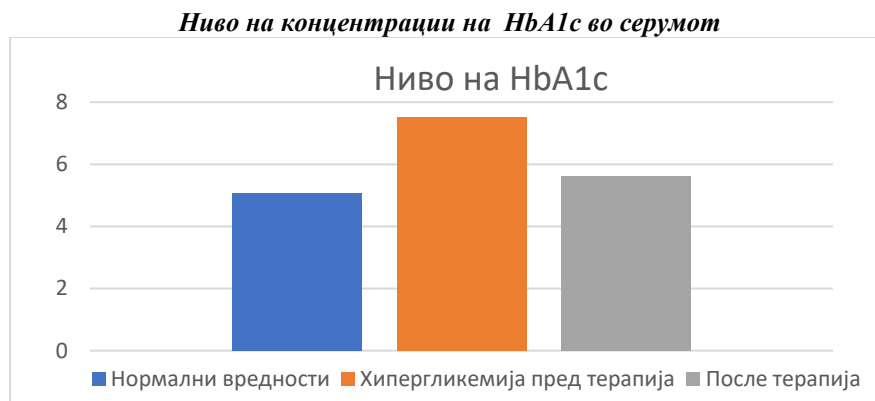
Постапката и принципот на методата за одредување на концентрацијата на HbA1c е следна; прво во епрувета со антикоагуланс EDTA се зема венска крв и благо се промешува. Од оваа крв потоа се зема 0,01ml и 0,22 ml реагенс за хемолиза кој ги лизира еритроцитите и со помош на ензимот протеаза ги денатурира веригите на хемоглобинот, а потоа колориметриски се одредува хемоглобинот, кога истиот се конвертира во хематин, во средина со алкален раствор. Интензитетот на зеленото обојување е пропорционален со концентрацијата на хемоглобинот HbA1c и се одредува со имунохемиска инхибиторна метода која користи два реагенси од кој едниот содржи глувчешки антитела на HbA1c нанесени на партикли од латекс, а вториот реагенс содржи делови од HbA1c како антигени нанесени на носачи, односно аглутинатори. Кога има пониски концентрации за HbA1c во смесата има поинтензивна аглутинација и се мерат високи вредности на апсорбацијата. При повисоки концентрации за HbA1c има помал степен на аглутинација во смесата и се мери пониска апсорбација. Апаратот мерејќи ги апсорбациите на смесата и стандардите, го пресметува процентот на хемоглобин A1c во однос на вкупниот хемоглобин. Мерењата се вршени на автоматизиран биохемиски анализатор ARCHITECT 4000. Референтните вредности за HbA1c се од 4,0 до 6,0 % кај возрасни лица. Процентот на HbA1c претставува сооднос помеѓу гликолизираниот и вкупниот хемоглобин.

$$\text{HbA1c \%} = \text{HbAc(g/L)} / \text{THb(g/L)} \times 100$$

Вредностите за концентрацијата на HbA1c < 6,5% е добро контролирана гликемија, 6,5-7,5% се гранични вредности за гликемија, а > 7,5% е лошо контролирана гликемија. Употребата на оваа метода во дијагностиката на дијабетесот не го исклучува мерењето и контролата на концентрацијата на гликемијата во крвта во одреден ритам од страна на пациентите. Тоа е од посебна важност бидејќи лекарот при посета на пациентот врши споредба на вредноста на утринската гликемија на гладно и концентрацијата на HbA1c. Од резултатите на овие две анализи тој проценува дали лекувањето на дијабетот е добро и прави план за понатамошна терапија. Вредностите на концентрацијата на HbA1c поголеми од 7% значи дека треба да се промени типот на терапијата за дијабетот.

3. РЕЗУЛТАТИ

Добиените резултати од испитувањето на нивото на концентрацијата на HbA1c кај пациентките од контролната група, групата пациентки со хипергликемија и третираната група на пациентки со Glukophage се прикажани на следниот график.



Првата група пациентки е со нормално ниво на глюкоза во серумот и ја означуваме и како контролна група. Втората група пациентки е со дијагностицирана хипергликемија, односно зголемено ниво на глюкоза во серумот и третата група пациентки е третирани со терапија за намалување на нивото на глюкоза во серумот, односно со Glukophage.

Од добиените резултати се гледа дека пациентите со дијагностициран Diabetes melitus имаат сигнификантно зголемени резултати за концентрацијата на глюкоза во однос на пациентите од контролната група чии резултати се движат во нормалните референтни вредности за нивото на глюкоза во крвта. Групата на пациентки третирани со Glukophage, терапија за намалување на нивото на глюкоза во крвта имаат евидентно намалени вредности за глюкоза на ниво кое е блиску до контролната група. Приказот од графикот го покажува видливиот ефект од третманот со Glukophage, кој е терапија во намалувањето на концентрацијата на глюкоза во крвта и лекувањето на Diabetes melitus.

4. ДИСКУСИЈА

Инсулинот е хормон кој се излучува од β клетките на Лангерхансовите островца на панкреасот. Тој му овозможува на организмот да ја преземе глюкозата од крвта во клетките во вид на глюкозо-6 фосфат, каде истата се користи за создавање на енергија која им е потребна на клетките за нивните физиолошки функции а вишокот се складира во хепарот во вид на гликоген. Антагонист на инсулинот е глукагонот кој се излучува од α -клетките на Лангерхансовите островца од панкреасот. Кога на пациентот му е дијагностициран дијабет панкреасот не создава доволно хормон инсулин поради оштетената функција на истиот, или поради неможност глюкозо-6 фосфатот да се искористи во клетките поради нарушен метаболизам на глюкозата, при што се создаваат високи концентрации на гликемија во крвта, односно има хипергликемија. Лекот Glukophage (metformin) е лек кој се користи во лекување на дијабетес тип 2. Делува на тој начин што ја намалува концентрацијата на глюкоза во крвта на нормални вредности односно го регулира нивото на шеќер во крвта. Метформинот ја намалува разградбата на гликогенот од хепарот до глюкоза, и го зголемува искористувањето на глюкозата во клетките на мускулите каде се користи за изведување на мускулните движења. Ова помага во одржувањето на стабилни нивоа на глюкоза во крвта и контрола на дијабетесот кај пациентите со што го смалува ризикот од компликации.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Од направените истражувања за ефектот на третманот со антидијабетска терапија со Glukofage може да се заклучи дека:

- кај пациентите со дијабет има намален квалитет на животот,
- во услови на хипергликемија концентрацијата на глюкоза сигнификантно се зголемува во однос на контролната група,
- со примена на антидијабетска терапија со Glukofage кај третираната група на пациенти се отстрануваат негативните ефекти од хипергликемијата и нивото на глюкоза сигнификантно се намалува до вредности кои се блиску на контролната група пациенти.

Важно е да се нагласи дека откако ќе се констатира проблемот се пристапува кон употреба на соодветна терапија за намалување на концентрацијата на глукоза во крвта со депонирање на вишокот на глукоза во хепарот или зголемено искористување на истата во мускулите.

ЛИТЕРАТУРА

- American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: *Standards of Medical Care in Diabetes-2021*. Diabetes Care. 2021 Jan;44(Suppl 1):S73-S84.
- Bunn, H.F., Haney, D.N., Kamin, S., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. (1976). The biosynthesis of human hemoglobin A1c. *J Clin Invest.* 57:1652-9.
- Gilstrap, L.G., Chernew, M.E., Nguyen, C.A., Alam, S., Bai, B., McWilliams, J.M., Landon, B.E., Landrum, M.B. (2019). Association Between Clinical Practice Group Adherence to Quality Measures and Adverse Outcomes Among Adult Patients With Diabetes. *JAMA Netw Open.* Aug 02;2(8):e199139.
- Gibb, I., Parnham, A., FonfrÖde, M., Lecock, F. (1999). *Multicenterevaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer.* Clin. Chem. 45: 1833' 41.
- Geistanger, A., et all. (2008). *Statistical methods for monitoring the relationship between the designated comparasion methods in the United States, Japan and Sweden.* Clin. Chem. 54(8):1379-85.
- Guo, W., Zhou, Q., Jia, Y., Xu, J. (2019). Increased Levels of Glycated Hemoglobin A1c and Iron Deficiency Anemia: A Review. *Med Sci Monit.* 25:8371-8378.
- HbA1c in a new way Arhivirano na sajtu Wayback Machine (13. jul 2022) By the Swedish Diabetes Association. Retrieved mart 2011.
- John, W.G. (2022). *UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation of World Health Organization guidance 2011.* Diabet Med 2012;29(11):1350-7
- Kahn, R., Fonseca, V. (2019). Translating the A1c Assay. *Diabetes Care.* 31(8):1704-7.
- Miedema, K. (2005). *"Standardization of HbA1c and Optimal Range of Monitoring"*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 240: 61–72.
- Mortensen, H.B. (1983). Christophersen C. Glucosylation of human haemoglobin A in red blood cells studied in vivo: kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A1c. *Clin Chem Acta.* 134:317-26
- Nathan, D.M., Kuenen, J., Borg, R., Zheng, H., Schoenfeld, D. (2008). A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* 31:1473–1478
- Nathan, D.M. (2021). Realising the long-term promise of insulin therapy: the DCCT/EDIC study. *Diabetologia.* 64(5):1049-1058.
- Niederrau, C.M., Reinauer, H. (1998). *Glycohemoglobins. In Thomas L ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: THBooks Verlagsgesellschaft mbH, 142-148.
- Pilla, R., Palleti, S.K., Rayana, R., Skss, S.R., Abdul Razzack, A., Kalla, S. (2020). Glycated Haemoglobin (HbA1c) Variations in Nondiabetics With Nutritional Anemia. *Cureus.* 12(11):e11479.
- Saboo, B., Kesavadev, J., Shankar, A., Krishna, M.B., Sheth, S., Patel, V., Krishnan, G. (2021). Time-in-range as a target in type 2 diabetes: An urgent need. *Heliyon.* 7(1):e05967.
- Sacks, D.B. (1994). Glycated proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER ed. *Tietz textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: W.B. Saunders Company. 980'8.
- Sidorenkov, Grigory., Haaijer-Ruskamp, Flora, M., De Zeeuw, Dick., Denig, Petra. (2011). „A Longitudinal Study Examining Adherence to Guidelines in Diabetes Care According to Different Definitions of Adequacy and Timeliness”. *PLOS ONE.* 6 (9):e24278. Bibcode:2011PLoSO...624278S. PMC 3169586 . PMID 21931669. doi:10.1371/journal.pone.0024278
- Talwar, D., Barr, B.B., Kesson, C.M., Robb, D.A. (1983). *Determination of glycosylated adult and foetal haemoglobins by affinity chromatography.* Clin Chim Acta 128: 61' 67.
- Trivelli, L.A., Ranney, H.M., Lai, H.T. (1971). *Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus.* N Engl J Med. 284: 353 '7.