

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marta Koščak

Dijagnostička uloga glikoziliranog hemoglobina – HbA_{1c}

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić, dipl. ing.

Osijek, 2017.

SAŽETAK:

Hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) naziva se „zlatnim standardom“ uredne glikemije, izražene u postotcima, $HbA_{1c} \leq 7\%$. HbA_{1c} nastaje procesom glikacije koja obuhvaća reakciju glukoze nakupljene u krvi i eritrocita, te se koristi kao sredstvo praćenja dijagnoze i terapijske ispravnosti kod osoba oboljelih od dijabetesa. Iako se određivanje HbA_{1c} primjenjuje više od 40 godina, dugo je vremena trebalo da se provede analitička i klinička standardizacija, nađe odgovarajuća referentna metoda i proizvede primarni referentni materijal.

Prvotno korištena metodologija bila je precizna ali joj je nedostajala specifičnost. Dugogodišnjim istraživanjima proizveden je referentni materijal, definiran analit te kao referentna metoda postavljen IFCC referentni sustav. Unatoč tomu, referentna metoda imala je previše odstupanja. IFCC-ov referentni sustav snizio bi apsolutne koncentracije HbA_{1c}, u odnosu na do tada korištene vrijednosti, što bi rezultiralo pomutnjom, kako među zdravstvenim djelatnicima tako i među osobama oboljelim od dijabetesa i njihovim obiteljima. Inzistiranje zdravstvenih stručnjaka za zadržavanjem postojećih metoda potaknulo je projekt „prosječna glikemija“. Krajnji cilj projekta bio je ponovno definiranje HbA_{1c} u smislu podudaranja vrijednosti HbA_{1c} s koncentracijom glukoze u krvi.

Globalna harmonizacija određivanja HbA_{1c} je izrazito važna za postavljanje HbA_{1c} pod primarnu zdravstvenu zaštitu, te je upravo taj proces i njegova dijagnostička uloga, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj, tema ovoga rada.

KLJUČNE RIJEČI: hemoglobin A_{1c}, dijabetes, dijagnoza, standardizacija

ABSTRACT:

Haemoglobin A1c (HbA1c) is called „golden standard“ of a good glycaemic control expressed in percentage as HbA1c value $\leq 7\%$. HbA_{1c} is formed by the glycation process which includes reaction between glucose and red blood cells and it has been used as a clinical standard of diagnosis and therapeutic suitability for people with diabetes. Although HbA_{1c} is being used for more than 40 years, it took a long time until analytical and clinical standardization found an appropriate reference method and the primary reference material.

The first used methods were precise but it was lacking specificity. Long-term studies produced a reference material, defined analyte and as a specific reference method called IFCC reference system. Despite that, reference method had too many deviations. IFCC's reference system would reduce the absolute HbA_{1c} levels, compared to a previously used method. It was considered that could cause confusion among professionals along with patients and their families. Medical experts wanted to retain existing methods and it started a project "mean blood glucose". The ultimate project's goal was to redefine HbA_{1c} in terms of matching the value of the HbA_{1c} concentration of glucose in the blood.

Global harmonization of determining HbA_{1c} is extremely important for setting HbA_{1c} under primary health care and its process and diagnostic role, both worldwide and in Croatia, are the subject of this paper.

KEY WORDS: haemoglobin A_{1c}, diabetes mellitus, diagnosis, standardization

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. HEMOGLOBIN	3
2.1. RAZLIKA GLIKOHEMOGLOBINA (GHb) I HbA _{1c}	4
3. OPĆENITO O ŠEĆERNOJ BOLESTI.....	7
4. OTKRIĆE I POVIJEST HbA _{1c}	8
5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA HbA _{1c}	10
6. STANDARDIZACIJA „ZLATNOG STANDARDA“	12
6.1.ANALITIKA	HbA _{1c} 14
6.2.KLINIČKA SLIKA; PRETRAGA HbA _{1c} I INTERPRETACIJA REZULTATA	15
7. PRIMJENA HbA _{1c} U HRVATSKOJ	20
8. ZAKLJUČAK	21
9. LITERATURA	22

1. UVOD

Šećerna bolest predstavlja jednu od najraširenijih bolesti modernog društva. Rezultat je djelomičnog ili potpunog nedostatka inzulina, a neprilagođena zdravstvena skrb vodi ka narušavanju kvalitete života oboljelih, u vidu razvitka kronične hiperglikemije. Danas u svijetu postoji približno 400 milijuna ljudi oboljelih od dijabetesa, a Međunarodna federacija za dijabetes predviđa čak oko 600 milijuna oboljelih do 2035. godine. Većina oboljeva u zrelijoj dobi od dijabetesa tipa 2, a kasno otkrivanje bolesti i neliječenje donosi razvoj komplikacija i štetne posljedice [1]. Stanje u Hrvatskoj nije značajno bolje. Istraživanja pokazuju da čak približno 9 % Hrvata boluje od nekog tipa dijabetesa, te postoji veliki udio nedijagnosticirane bolesti, većinom u zrelijoj populaciji [2]. Godišnje oboli 1 % odrasle populacije Hrvatske te se, po statističkim podacima oboljelih i umrlih od šećerne bolesti, Hrvatska podudara s razvijenim zemljama [1].

Rastući broj oboljelih, kompleksna patologija, smanjenje radno sposobne snage, povećanje invalidnosti i porast smrtnosti uzrokovan šećernom bolesti, predstavljaju veliki teret kako nacionalnoj tako i globalnoj zdravstvenoj skrbi i društvu općenito [2]. Važno je staviti naglasak na pravovremeno otkrivanje dijabetesa, njegovo pravilno liječenje i optimalnu regulaciju glikemije kako bi se izbjegle štetne posljedice za organizam. Također, potrebno je uspostaviti stabilnu, učinkovitu i dostupnu dijagnostiku koja će biti široko primjenjiva, unaprijediti zdravstvenu skrb i smanjiti troškove liječenja [1].

U okviru programa pod nazivom „Globalna kampanja IFCC-a o šećernoj bolesti“, pokrenutom od Međunarodne federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (eng. International Federation of Clinical Chemistry, IFCC), pokrenute su aktivnosti praćenja šećerne bolesti [3]. Dugogodišnjim laboratorijskim istraživanjima kontrole glikemije te traženjem odgovarajućeg biokemijskog pokazatelja prosječne glikemije, kao zlatni standard određen je hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}). Taj zaključak je donešen u okviru dva istraživanja. Istraživanje DCCT (eng. Diabetes Control and Complications Trial) bavilo se oboljelima od dijabetesa tipa 1, a UKPDS (eng. United Kingdom Prospective Diabetes Study) je proučavalo bolesnike s tipom 2 [1]. Oba istraživanja potvrdila su izuzetnu povezanost prosječne razine glikemije, HbA_{1c} i štetnih komplikacija bolesti te su uvelike koristila za postavljanje temelja globalno prihvaćenih terapijskih uputa u kojima središnju ulogu uspješne regulacije glikemije predstavlja vrijednost $HbA_{1c} \leq 7\%$. Jedina poteškoća, koja nije do kraja razjašnjena unatoč godinama korištenja HbA_{1c}

kao „zlatnog standarda“ praćenja prosječne glikemije i rizika od nastanka štetnih komplikacija, je analitička standardizacija, što za posljedicu ima ograničenu interpretaciju rezultata [2].

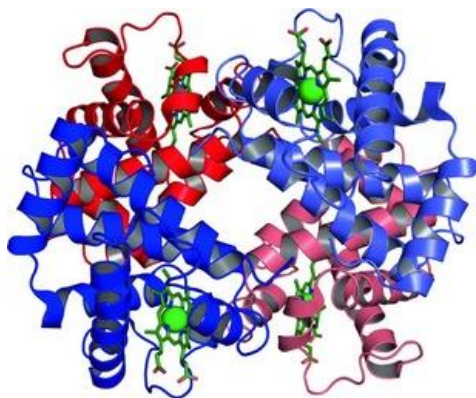
Hrvatska se također bori s problemom ujedinjenja analitičke metodologije te također s dostupnošću i kliničkom uporabom pretraga. Stoga je nužno provesti harmonizaciju određivanja vrijednosti HbA_{1c} u smislu uspostave kontrole kvalitete primjene i praćenja globalno prihvaćenih normi te poticanjem edukacije osoba odgovornih za provođenje programa, kao i samih bolesnika [2].

2. HEMOGLOBIN

Hemoglobin predstavlja važan čimbenik aktivnog prijenosa i skladištenja kisika iz pluća u stanice te pomaže pri prijenosu ugljikova(IV) oksida i vodikovih iona nazad u pluća. On je, uz mioglobin, prvi protein kojemu je pomoću kristalografije s X-zrakama određena trodimenzionalna struktura. Sadržan je u eritrocitima i smatra se djelotvornim prenositeljem kisika uz veliku iskoristivost sposobnosti vezanja kisika (90%). Izgrađen je od četiri polipeptidna, globinska lanca i prostetičke skupine-hema. Taj tetramer, odnosno hemoglobin A (HbA) sadrži dva para istovjetnih α i β lanaca, odnosno dva $\alpha\beta$ dimera ($\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_2\beta_2$). Pojedinačni α i β lanci su izgrađeni od α uzvojnica međusobno povezanih okretima u krajnju strukturu. Hem je zaslužan za crvenu boju krvi i mišića jer u svojoj strukturi osim protoporfirina IX sadrži i atom željeza. Protoporfirin IX je organska komponenta hemoglobina načinjena od porfirina i tetrapiralnog prstena na kojeg su dodane dvije vinilne skupine, dva propionatna bočna ogranka i četiri metilne skupine. Sredina protoporfirina predstavlja mjesto vezanja atoma željeza, koje je preko dušikovih atoma povezano s četiri pirolna prstena. U deoksihemoglobinu atom željeza je u fero obliku, Fe^{2+} , te leži 0,4 Å ispod ravnine protoporfirina u hemu, stvarajući dva dodatna vezna mjesta; peto i šesto koordinacijsko mjesto. Molekula kisika se veže na 6. koordinacijsko mjesto zbog čega dolazi do premještanja elektrona u željezu, ono postaje manje i može stati u središte ravnine porfirina [4].

Adultni hemoglobin ima relativnu molekulsku masu 68000. Odrasla osoba koja teži 70 kg sadrži 630 g hemoglobina, odnosno 2,2 g željeza. U uvjetima normalnog funkcioniranja organizma, hemoglobin se dnevno obnavlja 1%, odnosno 6,3 g u navedenom primjeru. To je pokazatelj kako je čovjeku dnevno potrebno 22 mg željeza. Većina se nadoknadi razgradnjom eritrocita a samo mali dio, 1-2 mg, nadoknađuje se hranom.

Konstrukcijom krivulje ovisnosti zasićenja hemoglobina kisikom o koncentraciji kisika, izraženoj parcijalnim tlakom, pO_2 , dobio bi se sigmoidalni oblik krivulje. U eritrocitima se kisik veže za hemoglobin pomoću alosteričkog efektor, 2,3-bisfosfoglicerata. Ta molekula smanjuje afinitet hemoglobina za kisik, te se na taj način vezanjem kisika na jedan globinski lanac povećava vjerojatnost vezanja ostalih molekula kisika na preostala tri lanca. Takav princip vezanja naziva se kooperativno vezanje a omogućuje prijenos 10 puta veće količine kisika, te vrijedi i za otpuštanje kisika s veznih mjesta pojedinog lanca [4].



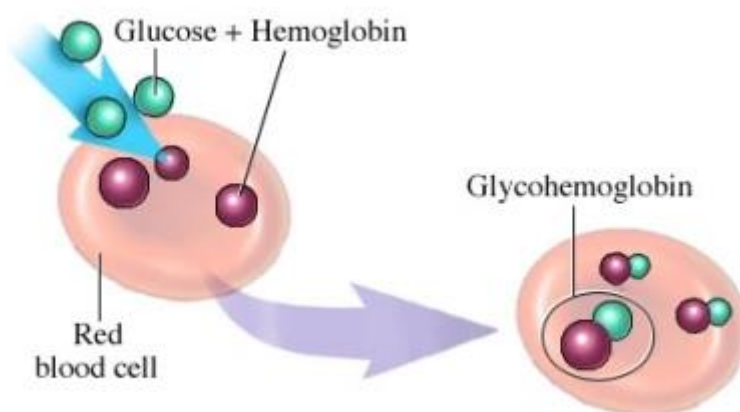
Slika 1. Prikaz kvaterne strukture hemoglobina. Zelene molekule predstavljaju hem, plavi lanci su β globinski lanci a crveni lanci predstavljaju α globinske lance [5].

2.1. RAZLIKA GLIKOHEMOGLOBINA (GHb) I HbA_{1c}

Postupak nastanka glikohemoglobina, GHb, i HbA_{1c} je glikacija, odnosno kovalentno neenzimsko vezanje glukoze na slobodne amino skupine globinskih lanaca hemoglobina. Glikacija hemoglobina odvija se na N-terminalnim skupinama valina, te na ϵ -amino skupinama lizina α i β lanca. U početku dolazi do kondenzacije karbonilne skupine glukoze i slobodne, primarne aminokiseline proteinskog lanca, čime nastaje nestabilni međuprodukt Schiffova baza, koja se lako pregrađuje u stabilniji ketoaminski oblik ili disocira, ovisno o koncentraciji glukoze.

Zdrave osobe, koje ne boluju od dijabetesa, imaju mali postotak, otprilike 4,5%-6%, kovalentno vezane glukoze za eritrocite u hemoglobinu. Ta vrijednost se odnosi na glikohemoglobin, odnosno HbA_{1c} [6].

Termin glikohemoglobina, GHb, označava hemoglobin s kovalentno vezanom glukozom na svim spomenutim amino skupinama α i β globinskog lanca. Nastala količina GHb izravni je pokazatelj koncentracije glukoze kojoj su bili izloženi eritrociti kroz duži period tijekom cirkulacije [2].



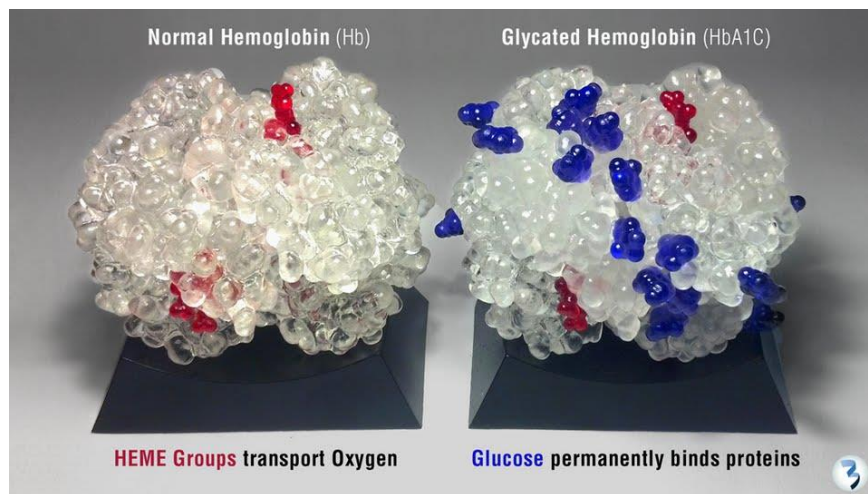
Slika 2. Kovalentnim vezanjem glukoze na globinske lance hemoglobina nastaje glikohemoglobin (GHb) [7].

Glikohemoglobin se sastoji od 4 vrste hemoglobina: HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} i HbA_{1c}. Nabrojane komponente se međusobno razlikuju po tipu amino skupine koja sudjeluje u reakciji ili vrsti ugljikohidrata vezanih za hemoglobin. Od ukupne koncentracije GHb, koja izražena u postotcima kod osoba normalne, uredne glikemije, iznosi 5%-7,5 %, 0,4%-0,8% zauzimaju HbA_{1a1}, HbA_{1a2} i HbA_{1b}, dok većina, 4%-5% otpada na HbA_{1c} [8].

Količina hemoglobina A_{1c} u krvi povezana je s akumulacijom glukoze i njenom interakcijom s eritrocitima kroz njihov životni period od 90 do 120 dana [8]. Odnosno, neenzimskim vezanjem glukoze na N-terminalne krajeve valina β-lanaca, tj. posttranslacijskom modifikacijom adultnog hemoglobina nastaje HbA_{1c} [1]. On sadrži 60% vezane glukoze, te iako je samo jedna komponenta GHb, koristi se kao „zlatni standard“ dijabetološke skrbi jer svojim objektivnim uvidom pomaže u kontroli šećerne bolesti, pokazuje valjanost terapije i predviđa rizik nastanka komplikacija [2].

Trenutne i kratke promjene razine glukoze u krvi ne utječu značajno na ukupnu vrijednost hemoglobina A_{1c}, a smatra se da je glavni razlog tome sporo povezivanje HbA_{1c} i glukoze. Međutim, povišena koncentracija šećera u krvi dovodi do učestale glikozilacije ne samo hemoglobina nego i drugih proteina narušavajući pravilan rad stanice i dovodeći do stanične neravnoteže [6]. Potrebno je naglasiti razliku glikozilacije i glikacije. Glikozilacija je enzimska faza sinteze membranskih proteina i drugih glikoproteina, dok su glikaciji podložni svi proteini [2].

Zanimljivo je što ovo stanje pogađa inzulin neovisne organe pri apsorpciji glukoze. Hiperglikemija najviše pogađa bubrege, periferne živce, krvne žile i očnu leću jer u svojoj strukturi sadrže enzim aldozu reduktazu koja je odgovorna za pretvorbu glukoze u alkohol sorbitol. Dijabetičari imaju povišenu koncentraciju glukoze u krvnoj plazmi te su im stanice organa, koje sadrže aldozu reduktazu, podložnije nakupljanju veće količine sorbitola. Stručnjaci tragaju za inhibitorom ovog enzima jer je dokazano da kod dijabetičara uzrokuje destabilizaciju stanice uklanjajući potrebne elektrolite i minerale. Provedenim istraživanjima nije se još otkrio adekvatan, siguran i učinkovit lijek [6].



Slika 3. Prikaz razlike u građi normalnog i glikoziliranog hemoglobina [9].

3. OPĆENITO O ŠEĆERNOJ BOLESTI

Šećerna bolest (lat. Dijabetes melitus) je endokrini metabolički poremećaj uzrokovan smanjenim lučenjem hormona inzulina, potpunim prestankom lučenja inzulina ili stvaranjem nedjelotvornog inzulina. Karakteriziran je povišenom koncentracijom glukoze u krvi što je primarni pokazatelj oboljenja od dijabetesa. Danas su najraširenija dva tipa dijabetesa; tip 1 i tip 2. Dijabetes melitus tipa 1 karakteriziran je smanjenim ili potpunim prestankom lučenja inzulina. Osobe oboljele od ovog tipa moraju unositi inzulin injekcijama. S druge strane, dijabetes melitus tip 2 stvara se u kasnijoj životnoj dobi, često izazvan pretilošću osobe. Gušterača oboljele osobe od tipa 2, ne može stvoriti dovoljnu količinu inzulina koju zahtjevaju metabolički procesi u tijelu. Ovaj poremećaj se lako može kontrolirati tabletama, pravilnom prehranom i tjelovježbom. Većina oboljelih od dijabetesa ima upravo tip 2.

Važno je istaknuti pravilno liječenje ove kronične bolesti jer slaba kontrola bolesti vodi ka komplikacijama u rastu i razvoju oboljele osobe, posebice u pubertetu. U zrelijoj životnoj dobi može dovesti do, po životnoj opasnih, mikrovaskularnih komplikacija kao što su: neuropatija, nefropatija i retinopatija. Naime, šećerna bolest također predstavlja i okidač za nastanak makrovaskularnih bolesti, posebice cerebrovaskularne bolesti [10].

Epidemija šećernom bolesti globalno je raširena te predstavlja sve veći teret zdravstvenoj skrbi i društvu. Najveću zabrinutost društvu predstavlja pojavnost sve većeg broja oboljelih, od dijabetesa tipa 2, u mlađoj populaciji. U razdoblju puberteta i adolescencije stavljen je naglasak na pojačano praćenje šećerne bolesti jer je poznato kako dijabetes može negativno utjecati na rast i razvoj osobe u pubertetu. Optimalna kontrola dijabetesa u adolescentskoj dobi je otežana, čiji je pokazatelj mjerenje koncentracije glikoziliranog hemoglobina, HbA_{1c} [11]. Bolesnici u adolescentskoj dobi, koji su se pridržavali dijetetskih preporuka te poštivali optimalnu kontrolu bolesti, nisu imali puno bolje rezultate od pacijenata koji se nisu pridržavali režima kontrole dijabetesa, a nisu u pubertetu.

Negativan utjecaj na metaboličku kontrolu, za vrijeme puberteta, ima mehanizam povišenje razine hormona rasta i posljedična inzulinska otpornost. Endokrinološki sustav se bitno mijenja u pubertetu i samim time utječe na kontrolu glikemije. Kao i u zrelijoj dobi, adolescentima oboljelima od dijabetesa se povisuje koncentracija inzulina u organizmu uz istovremeno smanjenje HbA_{1c}, no s druge strane dolazi do velikog rizika povećanja tjelesne mase i razvoja hipoglikemije [12].

4. OTKRIĆE I POVIJEST HbA_{1c}

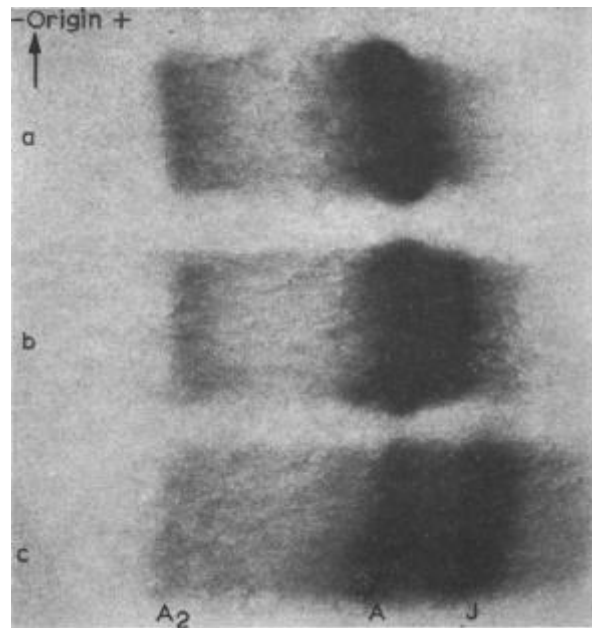
Početak šezdesetih godina prošloga stoljeća znanstvenici su otkrili strukturu prvog proteina, hemoglobina, koji je u to vrijeme bio jedna od molekula s najvećim potencijalom za istraživanje. Glavna metoda proučavanja različitih vrsta hemoglobina bila je elektroforeza. Za rješavanje zagonetke povezanosti HbA_{1c} s dijabetesom zaslužan je Samuel Rahbar, čiju je pažnju privukla tada nova, brža elektroforetska metoda koju su osmislili Graham i Grunbaum, a temeljila se na celuloznoj acetatnoj membrani [12].

Želeći povećati propusnost i brzinu pregledavanja uzorka krvi Rahbar i suradnici konstruirali su elektroforetsku ćeliju koja je odjednom razdvajala osam uzoraka, u 20 minuta, s membranom debljine 5 cm. Na dan je pregledavano oko 300 uzoraka krvi. Toj brzini je doprinosila sama metoda pripreme uzoraka za analizu. Naime, tanke trake Whatmanovog 3M filter papira uranjane su u uzorke krvi, te su potom ostavljene da se osuše oko 30 min kako bi plazmatski proteini migrirali iz krvnih stanica koje bi zaostajale na vrhu papira. Vrh bi se zatim uranjao u posebne reagense pri čemu bi došlo do oslobađanja hemoglobina koji se nanosio na celulozne acetatne membrane elektroforetskog uređaja. Brojne vrste hemoglobina snimljene su mijenjajući različite varijable, uvjete i pH. Pri pH=8,6 vidljiv je već dobro poznati Hb A, te manji i sporiji Hb A₂ [12].

Proučavajući hemoglobin osoba oboljelih od dijabetesa pojavljivala bi se treća vrpca, koju je Rahbar povezo s dijabetesom dajući joj naziv „dijabetska komponenta hemoglobina“, što je vidljivo na slici 4. Snižanjem pH na 6,2 te koristeći agarov gel, preciznije je odredio nepoznatu vrpcu [13].

Njegovo istraživanje je potvrdila američka znanstvenica Helen Ranney te su ubrzo Rahbar i Ranney udružili snage u otkrivanju nepoznate vrpce hemoglobina povezane s dijabetesom. Tražili su poveznicu s Holmquist i Schroederom koji su otkrili pet vrsta hemoglobina A. Hemoglobinske komponente određene su kromatografijom s kationskim izmjenjivačem te imaju negativniji naboj od hemoglobina A. Novootkrivene frakcije, prema redoslijedu ispiranja s kolone nazvane su: HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}, HbA_{1d}, i HbA_{1e}. Pokretljivost nepoznate vrpce, koju su Rahbar i Ranney proučavali, odgovarala je upravo HbA_{1c}. Znanstvenici su uzorke krvi dijabetičara podvrgnuli Holmquist i Schroederovom kromatografskom razdvajanju te je ustanovljen postotak od 7,5 do 10,6% HbA_{1c} u odnosu na ukupan hemoglobin. Kod osoba koje nisu bolovala od dijabetesa postotak HbA_{1c} je varirao između 4-6%. Daljnja istraživanja dovela su do saznanja da je koncentracija HbA_{1c} izravno povezana s prosječnom koncentracijom

glukoze u krvi u razdoblju od tri mjeseca, koliki je prosječni životni vijek eritrocita. Struktura HbA_{1c} sačinjena je od hemoglobina na kojeg je heksoza, odnosno glukoza posttranslacijski vezana. Time je omogućena bolja kontrola praćenja prosječne koncentracije glukoze u krvi tijekom duljeg perioda [12].



Slika 4. Prikaz netipičnih frakcija hemoglobina kod osoba s dijabetesom, koristeći elektroforetsko razdvajanje s škrobnim gelom u tris-EDTA-borat puferu pri pH=8,1. Oznaka **a** prikazuje normalan hemoglobin, oznaka **b** je hemoglobin A, a na oznaci **c** je prikazana smjesa HbA i Hb J. Nepoznata komponenta, uočena kod dijabetičara, bila je razdvojena između Hb A i Hb J prema katodi [14].

5. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA HbA_{1c}

Temeljene na fizikalno-kemijskim svojstvima, analitičke metode određivanja HbA_{1c} su mnogobrojne te se uvelike međusobno razlikuju. S obzirom na fizikalno-kemijske razlike HbA_{1c}/GHb i nemodificiranog hemoglobina, dijele se na 2 skupine. Kromatografijom s ionskom izmjenom i elektroforetskim tehnikama omogućuje se razdvajanje HbA_{1c}, od drugih frakcija hemoglobina, s obzirom na njihovu razliku u naboju. Druge metode temelje se na principu izravnog mjerenja koncentracije HbA_{1c}, pomoću strukturno specifičnih razlika, te se dijele na boronatnu afinitetnu kromatografiju i imunokemiju. Afinitetnim metodama se određuje ukupni GHb, a metodama prve skupine i imunokemijom određujemo koncentraciju HbA_{1c} [2]. Poznavanjem prednosti i nedostataka metode, procjenom djelotvornosti i financijske isplativosti te uzimajući u obzir ispitivanu osobu, lako se dolazi do idealne metode [1]. Korištenjem svake metode moraju se poštovati analitički i klinički kriteriji kvalitete, a također i mogućnosti laboratorija koji provodi analizu te individualne potrebe određuju korištenje pojedine metode [2].

Tablica 1. Prikaz analitičkih i kliničkih kriterija kvalitete koje svaka analitička metoda određivanja koncentracije HbA_{1c} mora ispunjavati [2].

Analitički zahtjevi	Klinički zahtjevi
1. Ukupni koeficijent varijacije mora biti veći od 3% (<3%).	1. Točnost i preciznost rezultata na kojima se može donijeti klinička odluka na razini apsolutne razlike HbA _{1c} od 0,3% do 0,5%.
2. Metodologija određivanja koncentracije HbA _{1c} mora biti precizna i provjerena.	2. Individualna varijabilnost svedena je na vrlo nisku razinu.
3. Zahtjeva ujednačenu interpretaciju referentnih vrijednost neovisno o mjestu određivanja, primijenjenoj metodi i vremenu.	3. Liječnici i bolesnici moraju imati mogućnosti jasno, nedvosmisleno i precizno interpretirati rezultate prema DCCT i UKPDS kriterijima.

Iako većina metoda ispunjava zadane analitičke i kliničke zahtjeve, potrebno je harmonizirati referentne vrijednost koje su nužne za točnu i preciznu interpretaciju sukladno sa stručnim preporukama. Brojni čimbenici utječu na dvosmislenu interpretaciju rezultata. Analitičke i

biološke smetnje, kao i sve češća praksa određivanja koncentracije HbA_{1c} izvan laboratorija, mogu utjecati na pouzdanost dobivenih rezultata. Također, metode temeljene na razlikama u naboju imaju nedovoljnu analitičku specifičnost. Značajno odstupanje podudarnosti rezultata dobivenih iz istog uzorka koristeći različite metode primijećeno je određivanjem različitog analita različitim metodama.

Sve nabrojene poteškoće dokaz su velike potrebe za standardizacijom i osiguravanjem kvalitetne, kontinuirane i doživotne kontrole glikemije [2].

6. STANDARDIZACIJA „ZLATNOG STANDARDA“

Različiti fizikalno-kemijski principi i izostanak standardizacije za posljedicu je imalo neusporedivost nalaza dobivenih različitim metodama a glavni problem predstavljalo je tumačenje dobivenih podataka u odnosu na klinički ciljane, referentne vrijednosti dobivene DCCT i UKPDS istraživanjima.

Klinička standardizacija dijelom je postignuta provođenjem NGSP (eng. National Glycohaemoglobin Standardization Program), programom čiji je cilj bila harmonizacija određivanja HbA_{1c} te postizanje istovjetnosti rezultata nalaza bez obzira na metodu kojom je HbA_{1c} određivan [3].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na koloni BioRex dogovorena je kao usporedna metoda NGSP programa. Nacionalni referentni laboratorij postavio je standardne vrijednosti prema DCCT-u u odnosu na koje su kalibrirani brojni laboratoriji u SAD-u i Europi koji koriste različite metode: kapilarna elektroforeza, kromatografija, imunokemija i afinitetno vezanje.

NGSP programu pridružen je dodatak kojim se željela provesti nacionalna kontrola kvalitete, pod nazivom CAP Survey (eng. College of American Pathologists). Dodatak se temeljio na laboratorijskoj razmjeni uzoraka svježe krvi s određenim vrijednostima HbA_{1c} prema NGSP kriterijima.

Provođenje NGSP programa i njegovog dodatka CAP Survey pokazala se uvelike korisnim u smislu povećanja kvalitete dijabetološke skrbi. Ojačana je međulaboratorijska harmonizacija rezultata i omogućena preciznija reproducibilnost. Nedostatak programa ogledao se u slaboj specifičnosti usporedne metode, koja iz tog razloga nije mogla postati referentna metoda određivanja HbA_{1c} [2].

Iako se program NGSP pokazao kao uspješnim i zadovoljio klinički standard, ostalo je neriješeno pitanje analitičke standardizacije. Referentni analitički sustav je nužan za kalibraciju svih ostalih analitičkih metoda, a njegov razvitak zahtjeva pronalaženje analita, odgovarajuće referentne metode i primarnog referentnog materijala [1]. Upravo je to bio zadatak radne grupe pokrenute od Međunarodne federacije za kliničku kemiju (eng. International Federation of Clinical Chemistry, IFCC).

Primarni referentni materijal sastojao se od smjese HbA_{1c} i HbA₁₀ u liofiliziranom obliku koja je kromatografski pročišćena. Osim što su definirali analit razvili su i referentnu metodu

zasnovanu na kromatografskom razdvajanju i identifikaciji HbA_{1c} i HbA₁₀, odnosno β-N-terminalnih heksapeptida izoliranih djelovanjem enzima endoproteinaze Glu-C na intaktni hemoglobin.

Nije razvijena samo jedna, nego dvije potencijalne referentne metode: masena spektrometrija i kapilarna elektroforeza. Obje metode su podjednako osjetljive na prisutnost HbA_{1c}, te ne daju odziv na smetnje abnormalnog hemoglobina, poput HbS ili HbC, niti na acetilirane karbamilirane hemoglobine.

Referentne metode pokazale su se vrlo djelotvornim metodama za identifikaciju peptidnih fragmenata, no IFCC program nije stao samo na otkrivanju spomenutih metoda. Dva puta godišnje provode se usporedna istraživanja kojima se osigurava praćenje kvalitete u odnosu na određene kriterije. Prati se stabilnost i reproducibilnost rezultata novih serija kalibratora i kontrola, a u istraživanjima sudjeluju sedam europskih, dva japanska i jedan američki referentni laboratorij.

Osim spomenute kontrole, također je napravljen nadzorni program za proizvođače a jednom godišnje se, u spomenutim referentnim laboratorijima, analizira 8 uzoraka pune krvi pomoću kojih se komercijalne metode kalibriraju [2].

Referentna metoda nije ušla u široku kliničku primjenu jer je zbog svoje visoke specifičnosti dala puno niže rezultate od DCCT-ove metode. Ustanovljene su brojne mane novonastale metode. Zaključeno je da bi prijelaz na novi IFCC-ov sustav standardizacije negativno utjecao uzrokujući zbunjenost bolesnika, čime bi se neposredno utjecalo na kvalitetu kontrole glikemije te također uzrokovalo kliničke i financijske komplikacije [1].

Odlučujući odabir referentne metode proveden je kroz globalni projekt harmonizacije HbA_{1c} [1]. Dogovoren je konsenzus na kojem su sudjelovale stručno-znanstvene udruge, koje su formirale radnu grupu za HbA_{1c} (eng. Working Group of the HbA_{1c} Assay) predvođenu međunarodnom dijabetološkom federacijom (eng. International Diabetes Federation, IDF) [2]. Dugogodišnji proces priveden je kraju 2010. godine. Rezultirao je globalnom harmonizacijom izdavanja nalaza HbA_{1c} i analitičkom standardizacijom [3].

Provedenim konsenzusom utvrđen je IFCC-ov sustav kao referentni te je postavljen za osnovu svake standardizacije određivanja HbA_{1c}. Za izvještavanje nalaza definiran je dvojni sustav u IFCC-ekvivalentima, izraženim u mmol/mol, te DCCT/NGSP-ekvivalentima, izraženim u postocima (%) [3]. Kako bi se proizvođačima olakšala standardizacija metoda prema IFCC-

ovom sustavu utemeljena je „master-jednadžba“. Pomoću „master-jednadžbe“ IFCC-ovi rezultati se s lakoćom pretvaraju u klinički ispravne vrijednosti usporedive s DCCT-ovim i NGSP-ovim podacima. „Master jednadžba“ glasi:

$$[\text{NGSP} = (0,915 \times \text{IFCC}) + 2,15] [2].$$

Jedan od zanemarenih ali svakako postojećih problema, bilo je podizanje osjetljivosti testa kako bi se povećala svijest oboljelih od dijabetesa. Bolesnici su olako shvaćali malu promjenu rezultata u nalazima krvi (npr. sa 6% na 8%) te se time izlagali velikom riziku u vidu životno opasnih komplikacija šećerne bolesti. Prelaskom na IFCC-ov referentni sustav taj problem bi svakako još više došao do izražaja budući da već 5% HbA_{1c} označava lošu regulaciju glikemije. Također nedavno uvedena „master-jednadžba“ otvara mogućnost pogrešnog klasificiranja bolesnika. U svrhu rješenja problema pokrenut je projekt uspostave novog parametra, odnosno redefiniranja HbA_{1c} pod radnim naslovom „prosječna glikemija“ (eng. mean blood glucose, MBG). Veza HbA_{1c} i prosječne glikemije predstavljena je u jednadžbi:

$$(\text{PG}) = 1,84 \times \text{IFCC HbA}_{1c}.$$

Potvrda ove korelacije vodit će ka redefiniranju mjere prosječne glikemije, pretvaranjem vrijednost HbA_{1c} u vrijednosti koje se podudaraju s koncentracijom glukoze. Smatra se da bi se ostvarenjem ovog cilja isključila mogućnost pogrešne interpretacije rezultata testa, a povećalo shvaćanje bolesnika pri idućim primjenama testa.

Prvotno je bilo važno provesti detaljno istraživanje ove koncepcije, povezanosti prosječne glikemije i HbA_{1c}, u svim relevantnim skupinama; zdrave osobe, dijabetičari u svim etničkim skupinama, trudnice, radi otklanjanja neočekivanih komplikacija, kako bi se mogla provesti kvalitetna edukacija bolesnika i zdravstvenih djelatnika o novonastalom parametru [2].

6.1. ANALITIKA HbA_{1c}

Raznovrsne analitičke metode određivanja HbA_{1c} temeljene su na fizikalno-kemijskim svojstvima elektroforetskih ili kromatografskih metoda te na imunokemijskoj ili enzimskoj reakciji koje obuhvaćaju izravno određivanje koncentracije HbA_{1c}. Analizu izvan laboratorija, u rukama bolesnika, omogućuje uređaj POC (eng. Point of care), koji unatoč svojim prednostima i dalje nije u širokoj primjeni zbog neprovjerene analitičke pouzdanosti.

Osiguranje kvalitete laboratorijskih pretraga provodi se sustavom unutrašnje i vanjske kontrole te akreditacijom prema međunarodnoj normi ISO15189 „Medical laboratories-Particular

requirements for quality and competence“. Kvaliteta i usporedivost laboratorija postiže se kontinuiranom analitičkom kontrolom kvalitete, što potvrđuje akreditacija. Laboratorijski proces se tako sastoji od preanalitičke, analitičke i postanalitičke faze. Preanalitička faza obuhvaća uzorkovanje venske ili kapilarne krvi s antikoagulansom K₃-EDTA. Tako pripremljeni uzorak može stajati do 7 dana u hladnjaku, na sobnoj temperaturi vrijeme ovisi o korištenoj metodi, a dulje očuvanje uzoraka provodi se zamrzavanjem pune krvi na oko -70 °C. Postanalitička faza uvedena je radi osiguranja točnosti nalaza. Svi nalazi koji su viši od 140 mmol/mol ili niži od donje granice referentnog intervala moraju se ponoviti koristeći drugu metodu, kako bi se isključila mogućnost smetnji prouzročenih kvalitativnim mutacijama na hemoglobinu [1].

6.2. KLINIČKA SLIKA; PRETRAGA HbA_{1c} I INTERPRETACIJA REZULTATA

Osoba koja ima dobro kontroliran dijabetes, kvalitetnu i odgovarajuću terapiju, dužna je dva puta godišnje izmjeriti koncentraciju HbA_{1c} u krvi. U slučaju promjene terapije ili loše regulacije šećerne bolesti potrebno je češće određivati HbA_{1c}. Iznenađne komplikacije, odnosno hospitalizacija, uzorkovane šećernom bolesti, svakako zahtijevaju određivanje koncentracija HbA_{1c}, ako ne postoji nalaz pretrage učinjene u zadnja 3 mjeseca prije pojave komplikacija.

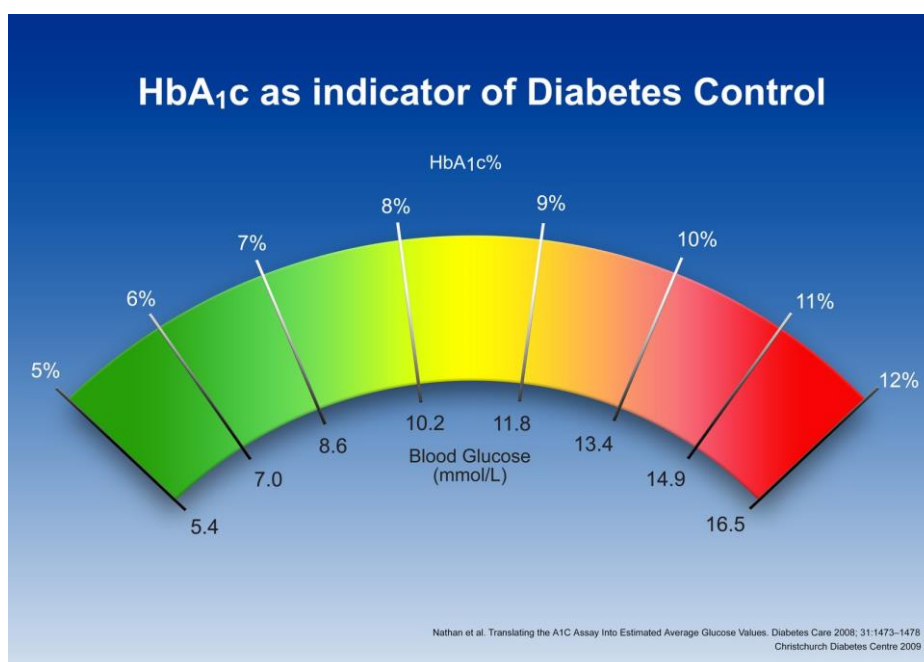
Dijagnoza šećerne bolesti uspostavlja se standardnim pretragama kao što su test određivanja glukoze u plazmi i oralni test opterećenja glukozom (OGTT). Međutim, brojne prednosti određivanja HbA_{1c} potaknule su Svjetsku zdravstvenu organizaciju (eng. World Health Organization, WHO) da preporuči svrstavanje upotrebe HbA_{1c} u dijagnostički važne pretrage. Pod spomenute prednosti prvenstveno se misli na analitičku i kliničku standardizaciju, stabilnost HbA_{1c} u krvi te kontinuirano poboljšanje kvalitete. U svrhu preporuke, provedena su klinička i epidemiološka istraživanja te je mala vjerojatnost da HbA_{1c} dobije značajniju dijagnostičku ulogu u skorije vrijeme. Tu činjenicu podupire nedovoljno istražena dijagnostička primjena HbA_{1c} u etničkom smislu, visoka cijena provođenja pretrage, još uvijek slaba dostupnost i različiti čimbenici koji neposredno utječu na nalaze pretrage poput: akutne pojave dijabetesa i trudnoće [10].

Nalazi pretrage HbA_{1c} interpretiraju se uspoređujući dobivene vrijednosti s određenim standardnima.

Tablica 2. Interpretacija nalaza u praćenju dijabetesa [1].

Interpretacija	HbA _{1c} / %	HbA _{1c} / mmol/mol	Prosječna glikemija / mmol/L
Dobra regulacija	≤ 7,0	≤ 53	8,6
Pojačani nadzor	7,1 – 8,0	54 – 64	8,7 – 10,1
Loša regulacija	> 8,0	> 65	> 10,2

U tabličnom prikazu vidljivo je kako dobra regulacija glikemije obuhvaća 7,0 %, odnosno 53 mmol/mol HbA_{1c}. Porastom te vrijednost na 8,0 %, 64 mmol/mol, preporučeno je nadzirati osobu i provesti dodatne testove, a vrijednosti veće od 8,0 % upućuju na potrebu za promjenom terapije i povećanu kontrolu. Svaka promjena razine HbA_{1c} od 0,5 %, 5 mmol/mol, je značajna. Naravno da postoje izuzetci kada se razina HbA_{1c} u krvi mijenja s obzirom na individualno stanje pojedinca. Kod starijih osoba oboljelih od hipoglikemije povisuju se standardne vrijednosti HbA_{1c}, dok se kod osoba u pubertetu i općenito mlađe populacije preporučuju niže ciljane vrijednosti.



Slika 5. Optimalnu kontrolu dijabetesa omogućuje određivanje koncentracije HbA_{1c} u krvi [15].

Kao i praćenje kontrole dijabetesa, tako se i dijagnoza šećerne bolesti uspostavlja na temelju preporučenih, referentnih podataka.

Tablica 3. Dijagnostička uloga HbA_{1c} i procjena rizika obolijevanja od šećerne bolesti interpretirajući rezultate pretrage [1].

Interpretacija	HbA _{1c} / %	HbA _{1c} / mmol/mol
Referentni intervali	4,0 – 6,0	20 – 42
Mali rizik	< 5,8	< 40
Povećani rizik	5,8 – 6,4	40 – 46
Šećerna bolest	> 6,4	> 46

Dijagnoza šećerne bolesti se uspostavlja pri 6,5 %, 48 mmol/mol, no čak i niže vrijednosti ne isključuju mogućnost prisustva bolesti. Stoga se razina HbA_{1c} ne koristi kao relevantni pokazatelj oboljenja zdravih osoba od šećerne bolesti. No, stručnjaci smatraju da postoji potencijal primjenjivanja razine HbA_{1c}, kao dijagnostičkog alata, pri otkrivanju dijabetesa tipa 2 u zrelijoj populaciji.

Osim analitičkih ograničenja, različiti biološki, patofiziološki i farmakološki čimbenici doprinose lažnim rezultatima nalaza. Osim toga, dob, spol, rasa i podneblje u kojem populacija živi također utječu na ispravnost nalaza. Postoje poremećaji koji, zbog visokog udjela starih eritrocita u krvi, pokazuju lažno povišene rezultate pretraga HbA_{1c}, a najčešći su: deficitarna anemija i splenektomija. No češći su oni vezani za prividno smanjene koncentracije HbA_{1c} zbog ubrzanog propadanja eritrocita: hemolitička anemija, akutna krvarenja, eritropoieza, skraćeni životni vijek eritrocita, transfuzija i malarija. Trudnoća i hemoglobinopatije, ovisno u pojedincu, uzrokuju lažno povećane ili lažno snižene razine HbA_{1c} [10].

Upućen: DOK ZDRAVLJA
Liječnik: Dumančić Nada
Uzorkovano: 1.4.2009.
Uzorkovac/ica:

Primljen: 01.04.2009. 09:23
Prmio: Rančić Katarina
Protokol:

KOŠČAK DARJO, rođen/a: 1959.

BIOKEMIJSKE PRETRAGE	Rezultat	Jedinica	Ref. interval	Opaska
GLIKOSILIRANI HEMOGLOBIN (HbA _{1c})	6.2	%	4.0 - 6.4	



V
mr. sc. Vatroslav Šerić, dipl. inž.
412074

Vrijeme validacije: 01.04.2009. 12:46
Nalaz validirao-la: mr.sc. Šerić Vatroslav

Str.: 1/1

Slika 6. Prikaz pretrage određivanja HbA_{1c} napravljene 2009. godine u laboratoriju KBC-a Osijek. Tada se u Hrvatskoj izražavala koncentracija HbA_{1c} u DCCT/NGSP-ekvivalentima, odnosno postotcima. Osoba koja je ustupila nalaz boluje od dijabetesa tipa 2. Po nalazima je vidljivo kako joj rezultat pretraga 6,2 %, što ulazi u referentni interval dobro kontrolirane glikemije, 4,0-6,4 % [16].

MEDICINSKO BIOKEMIJSKI LABORATORIJ Silva Deriš, mag. med. biochem. Donji Miholjac, Trg A. Starčevića 23 Telefon : 031 / 630 - 503	Pacijent : KOŠČAK DARKO	ID 66
	Datum rođenja : 19.03.1959 Spol M Datum : 27.10.2014 Vrijeme : 11:48 Uzorkovanje :	

Ordinacija opće medicine Nada Dumančić, dr.med.

S	Pretraga	NALAZ	Jed.mj.	Ref. intervali	S	Pretraga	NALAZ	Jed.mj.	Ref. intervali
---	----------	-------	---------	----------------	---	----------	-------	---------	----------------

BIOKEMIJA			
K HbA1c	6,6 H	%	P.vr.<6,0
K HbA1c	49 H	mmol/mol	P.vr.<42

Pripremila pacijenta i uzorkovala :
 Cvetković Mirjana, medicinska sestra
 Nalaz izradio :
 Deriš Silva, mag. med. biochem

Validirao / la :
 Deriš Silva, mag. med. biochem



MEDICINSKO BIOKEMIJSKI LABORATORIJ
 SILVA DERIŠ, mag. med. biochem.
 opće medicinske biohemije i laboratorijske medicine
 DONJI MIHOLJAC, Trg A. Starčevića 23
 0407555

Slika 7. Prikaz pretrage određivanja HbA_{1c} iz 2014. godine napravljene u medicinsko biokemijskom laboratoriju Donji Miholjac, što je dokaz povećanja broja laboratorija u kojima se provodi određivanje HbA_{1c}. Vidljivo je kako je koncentracija izražena u dvojnem sustavu; IFCC-ekvivalentima, mmol/mol, te DCCT/NGSP-ekvivalentima, %. Oba podatka upućuju na lošu regulaciju glikemije, što je vidljivo iz dobivenih koncentracija većih od referentnih vrijednost dobro regulirane šećerne bolesti: 6,6%, referentni interval: < 6,0%, te 49 mmol/mol, referentni interval: < 42 mmol/mol [17].

7. PRIMJENA HbA_{1c} U HRVATSKOJ

Laboratorijsko određivanje HbA_{1c} u Hrvatskoj je prisutno više od 40 godina. Međutim slaba dostupnost pretrage, te nedovoljna zainteresiranost struke za osiguranje uvjeta međunarodne standardizacije i praćenja kvalitete razlog su slabog razvitka određivanja HbA_{1c} u Hrvatskoj. Referentni centar za šećernu bolest Republike Hrvatske na osnovi istraživanja iz 1999. godine proveo je niz aktivnosti za poboljšanje kvalitete, dostupnosti i standardizacije laboratorijskog određivanja HbA_{1c}, no nacionalni program standardizacije pokrenut je tek 2004. godine [1]. Njime se nastojalo razviti znanje i praksa o određivanju HbA_{1c} kroz neke osnovne ciljeve. Uvedeni su međunarodno prihvaćeni standardi koji su strogo primjenjivani za određivanje HbA_{1c}, kroz dokumente Hrvatske komore medicinskih biokemičara kao standarde laboratorijske prakse u Hrvatskoj [2]. Organizirane su brojne edukacije stručnjaka kako bi se izmjenjivale informacije i produbilo znanje o području HbA_{1c}. Svako provedeno istraživanje o određivanju HbA_{1c} u smislu analitičke i kliničke iskoristivosti upotrebljeno je ne samo za svrhu edukacije stručnjaka nego i za pokušaj svrstavanja određivanja HbA_{1c} u primarnu zdravstvenu zaštitu. Godinu kasnije, 2005. godine, uveden je nadzor laboratorijskog određivanja HbA_{1c} na nacionalnoj razini, iako je i tada bilo dostupno samo 27 laboratorija na području Republike Hrvatske, koja su obavljala određivanje HbA_{1c} [2]. Svi laboratoriji u kojima se provodilo određivanje HbA_{1c} morali su pratiti poseban modul za HbA_{1c} utemeljen od Hrvatskog društva medicinskih biokemičara (HDMB), kao dijela programa za vanjsku kontrolu kvalitete laboratorijskog rada. Provođenje modula unaprijedilo je kvalitetu analitičke metodologije, primjenu međunarodno propisanih standarda te omogućilo bolju edukaciju laboratorijskih djelatnika [1].

Današnja situacija je daleko bolja. Određivanje HbA_{1c} uvršteno je među osnovne medicinsko-biokemijske pretrage što je bio korak ka krajnjem cilju uvrštavanja HbA_{1c} među primarnu zdravstvenu zaštitu. Iako postoji još nerazriješenih problema, poput toga da se u 15% hrvatskih laboratorija rezultati pretrage iskazuju u IFCC ekvivalentima i da postoji rasap u referentnim intervalima koji se kreću od < 5,7% do < 7%, može se reći da je metodologija pretrage ujednačena u svim Hrvatskih laboratorijima. Na snazi je i program trajnog usavršavanja koji laboratorijskim stručnjacima omogućuje nadogradnju, protok znanja i izmjenu informacija o HbA_{1c}. Tek je 2013. godine formalno svrstana pod primarnu zdravstvenu zaštitu. Dodatno otežava činjenica da od 8 akreditiranih laboratorija samo jedan pokriva sustav primarne zdravstvene zaštite (PZZ), što je jasni pokazatelj potrebe za povećanjem broja akreditacija laboratorija čime bi se dokazala vjerodostojnost programa [1].

8. ZAKLJUČAK

Određivanje hemoglobina A1c klinički i terapijski ima vrlo značajnu dijagnostičku ulogu. Pravilna dijagnoza uključuje dobro poznavanje referentnih intervala, ograničenja i mogućnosti koje pruža pretraga. Proces harmonizacije određivanja HbA_{1c}, klinička i analitička standardizacija je bila otežana jer pojam HbA_{1c} ne koriste samo laboratorijski i zdravstveni stručnjaci nego i sami bolesnici. Teži se usklađenosti kliničkih standarda koji su temeljeni na preciznoj ali nedovoljno usklađenoj analitičkoj metodologiji, s analitičkom harmonizacijom u smislu ujednačavanja rezultata pretrage različitih metodologija i referentnog materijala. Nakon provedene analitičke standardizacije i dalje je upitna pravilna interpretacija rezultata HbA_{1c} što pokazuje nužnu suradnju laboratorijskih stručnjaka i kliničke medicine kako bi se osigurala ujednačena kvaliteta zdravstvene skrbi za ljude oboljele od šećerne bolesti, čiji je postotak sve veći kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Iako je zaostajala za razvijenijim zemljama, Hrvatska medicinsko-biokemijska struka kao svakodnevni izazov ima usvajanje, pravilnu primjenu i interpretaciju ciljeva međunarodnih standarda harmonizacije određivanja HbA_{1c}.

Određivanje HbA_{1c} je tako vrlo važno u pravilnoj, kontinuiranoj dijagnozi dijabetesa i kao sredstvo uspješnog provođenja propisane terapije u dužem periodu a također je područje pogodno za daljnja istraživanja i širenje do sada stečenih saznanja.

9. LITERATURA

- [1] Vučić Lovrenčić, Marijana, Lea Smirčić Duvnjak, i Dario Rahelić. "HEMOGLOBIN A1c I KVALITETA SKRBI ZA OBOLJELE OD ŠEĆERNE BOLESTI." *Liječnički vjesnik* 137.9-10 (2015): 0-0.
- [2] Vučić Lovrenčić, Marijana, i Elizabeta Topić. "Hemoglobin A1c: Standardizacija "zlatnog standarda", *Biochemia Medica* 16.1 (2006): 25-36.
- [3] Hoelzel, Wieland, et al. "IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study." *Clinical chemistry* 50.1 (2004): 166-174.
- [4] Berg, J. M., J. L. Tymoczko i L. Stryer. „Biokemija“, 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), *Prevoditelji s engleskog: Weygand Đurašević I., Jernej B. i Kućan Ž.*, Zagreb: *Školska knjiga* (2013): 183-199.
- [5] <http://humanbetaglobin.weebly.com/beta-globin-protein-structure.html>, preuzeto 24.8.2017.
- [6] Dr. Brian P. Jakes, Jr., N.D., C.N.C., (2004.), "Diabetes: The Essence Of A Cure", „Glycosylation: What is it, how it affects patients with diabetes“, ulomak iz knjige, <<http://www.diabetesincontrol.com/glycosylation/>>, pristupljeno 8.8.2017.
- [7] <http://memyselfandiaskyou.blogspot.hr/2011/07/hba1c-you-later-diabetes-and-me-in.html>, preuzeto 20.9.2017.
- [8] „1.-OGTT-i-HbA1c---zlatni-standardi-za-otkrivanje-i-kontrolu-Diabetes-mellitusa“, <<https://www.medicinskaedukacija-timkme.com/wp-content/uploads/2015/09/1.-OGTT-i-HbA1c-%E2%80%93-zlatni-standardi-za-otkrivanje-i-kontrolu-Diabetes-mellitusa-Copy.pdf>>, pristupljeno 28.7. 2017.
- [9] <http://hansonmed.com/a1c-poc-testing-for-yourself-your-employees-and-your-community/>, preuzeto 20.9.2017.
- [10] Sacks, David B. "Measurement of hemoglobin A1c." *Diabetes Care* 35.12 (2012): 2674-2680.

- [11] ZDRAVLJA, ZAŠTITA. "Šećerna bolest u adolescenata Diabetes Mellitus in Adolescents." *Medicus* 19.1 (2010): 27-34.
- [12] Gebel, Erika. "The Start of Something Good: The Discovery of HbA1c and the American Diabetes Association Samuel Rahbar Outstanding Discovery Award." *Diabetes Care* 35.12 (2012): 2429-2431., < <http://care.diabetesjournals.org/content/35/12/2429.full> >, pristupljeno 9.8.2017.
- [13] Rahbar, Samuel. "An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics." *Clinica chimica acta* 22.2 (1968): 296-298., < <http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-0009898168903720/first-page-pdf> >, pristupljeno 9.8.2017.
- [14] <http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-0009898168903720/first-page-pdf>, preuzeto 16.8.2017.
- [15] <http://memyselfandiaskyou.blogspot.hr/2011/07/hba1c-you-later-diabetes-and-me-in.html>, preuzeto 20.9.2017.
- [16] Nalaz ustupljen od Darka Koščaka, izrađen 1.4.2009. u 12:46 u KBC-u Osijek, nalaz izradio mr.sc. Vatroslav Šerić, dipl. ing. specijalist medicinske biokemije
- [17] Nalaz ustupljen od Darka Koščaka, izrađen 27.10.2014. u 11:48 u medicinsko biokemijskom laboratoriju Donji Miholjac, nalaz izradila Silva Deriš, mag.med.biochem.