

Robert J. McCarter<sup>1-3</sup>, James M. Hempe<sup>4, 5</sup>, Ricardo Gomez<sup>4</sup>, Stuart A. Chalew<sup>4, 5</sup>

<sup>1</sup>Biostatistics and Informatics Unit, Children's Research Institute, The Children's National Medical Center, Washington, DC, Stany Zjednoczone,

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, George Washington University School of Medicine, Washington, DC, Stany Zjednoczone

<sup>3</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, George Washington University School of Medicine, Washington, DC, Stany Zjednoczone

<sup>4</sup>Department of Pediatrics, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana

<sup>5</sup>Research Institute for Children, Children's Hospital of New Orleans, Louisiana

# Biologiczna osobnicza zmienność hemoglobiny glikowanej jako czynnik ryzyka retinopatii i nefropatii w cukrzycy typu 1

Biological variation in HbA<sub>1c</sub> predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes Care* 2004; 27, 6: 1259-1264

## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Autorzy niniejszej pracy założyli, że ryzyko powikłań mikronaczyniowych w badaniu *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) jest uwarunkowane zarówno zmiennością hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>), zależną od średniego stężenia glukozy we krwi (MBG, *mean blood glucose*), jak i biologiczną zmiennością osobniczą HbA<sub>1c</sub>.

**MATERIAŁ I METODY.** Wartości MBG i HbA<sub>1c</sub> oznaczone u uczestników badania DCCT (n = 1441) podczas wizyt odbywających się co 3 miesiące, poddano analizie według modelu liniowej regresji wieloczynnikowej. W celu oceny zmienności biologicznej podczas każdej wizyty obliczono indeks glikacji hemoglobiny (HGI, *hemoglobin glycation index* = wartość zmierzona HbA<sub>1c</sub> - wartość przewidywana HbA<sub>1c</sub>), aby ocenić biologiczną zmienność, opierając się na kierunkowych odchyleniach zmierzonej HbA<sub>1c</sub> od wartości

przewidywanej na podstawie MBG. Populację podzielono w zależności od średnich wartości HGI podczas trwania badania na 3 części: o wysokim, średnim i niskim HGI. Dla poszczególnych grup przeprowadzono analizę z zastosowaniem modelu proporcjonalnego hazardu Coxa w celu porównania ryzyka wystąpienia oraz rozwoju retinopatii i nefropatii w zależności od MBG, wieku, sposobu leczenia, grupy prewencji pierwotnej lub interwencji i czasu trwania cukrzycy.

**WYNIKI.** Współczynnik prawdopodobieństwa oraz analizy HGI w testach t podważają twierdzenie, że wartość HbA<sub>1c</sub> zależy jedynie od MBG. Podczas 7-letniej obserwacji u pacjentów z wysokimi wartościami HbA<sub>1c</sub> (wyższymi niż oczekiwane) było 3-krotnie wyższe ryzyko retinopatii (30 vs. 9%; p < 0,001) i 6-krotnie wyższe ryzyko nefropatii (6 vs. 1%, p < 0,001) w porównaniu z grupą o niskim HGI.

**WNIOSKI.** Osobnicza biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub>, odmienna i niezależna od zmienności HbA<sub>1c</sub> warunkowanej średnią glikemią, występuje niewątpliwie u chorych na cukrzycę typu 1 biorących udział w badaniu DCCT. Ponadto jest silnym czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy. Określenie procesów odpowiedzialnych za biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub> mogłoby prowadzić do stworzenia nowych kierunków leczenia hipoglikemizującego oraz opóźniającego powikłania i postępowanie choroby.

**Słowa kluczowe:** biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub>, hemoglobina glikowana, cukrzyca typu 1, retinopatia, nefropatia

Adres do korespondencji: Dr. Stuart Chalew  
Endocrinology/Diabetes, Children's Hospital of New Orleans  
200 Henry Clay Ave.  
New Orleans, LA 70118  
e-mail: schale@lsuhsc.edu.

Copyright © 2004 by American Diabetes Association, Inc.  
*American Diabetes Association* nie odpowiada  
za poprawność tłumaczenia

Diabetologia Praktyczna 2004, tom 5, 4, 201-208  
Tłumaczenie: lek. Monika Łukaszczyk  
Wydanie polskie: Via Medica

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION.** We hypothesized that biological variation in HbA<sub>1c</sub>, distinct from variation attributable to mean blood glucose (MBG), would predict risk for microvascular complications in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).

**MATERIAL AND METHODS.** A longitudinal multiple regression model was developed from MBG and HbA<sub>1c</sub> measured in the 1,441 DCCT participants at quarterly visits. A hemoglobin glycation index (HGI = observed HbA<sub>1c</sub> - predicted HbA<sub>1c</sub>) was calculated for each visit to assess biological variation based on the directional deviation of observed HbA<sub>1c</sub> from that predicted by MBG in the model. The population was subdivided by thirds into high-, moderate-, and low-HGI groups based on mean participant HGI during the study. Cox proportional hazard analysis compared risk for development or progression of retinopathy and nephropathy between HGI groups controlled for MBG, age, treatment group, strata, and duration of diabetes.

**RESULTS.** Likelihood ratio and *t* tests on HGI rejected the assumption that HbA<sub>1c</sub> levels were determined by MBG alone. At 7 years' follow-up, patients in the high-HGI group (higher than-predicted HbA<sub>1c</sub>) had three times greater risk of retinopathy (30 vs. 9%; *P* < 0.001) and six times greater risk of nephropathy (6 vs. 1%; *P* < 0.001) compared with the low-HGI group.

**CONCLUSIONS.** Between-individual biological variation in HbA<sub>1c</sub>, which is distinct from that attributable to MBG, was evident among type 1 diabetic patients in the DCCT and was a strong predictor of risk for diabetes complications. Identification of the processes responsible for biological variation in HbA<sub>1c</sub> could lead to novel therapies to augment treatments directed at lowering blood glucose levels and preventing diabetes complications.

**Key words:** biological variation in HbA<sub>1c</sub>, glycated hemoglobin, type 1 diabetes, retinopathy, nephropathy

**Wstęp**

Obecnie istnieje wiele dowodów na to, że przewlekła hiperglikemia mierzona średnim stężeniem glukozy we krwi (MBG, *mean blood glucose*) lub stężeniem hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) wiąże się z powstawaniem i rozwojem mikronaczyniowych powikłań cukrzycy [1, 2].

Stężenia glukozy we krwi są główną determinantą stężenia HbA<sub>1c</sub>. Badania populacyjne przeprowadzone wśród chorych na cukrzycę wykazują, że

HbA<sub>1c</sub> ściśle zależy od MBG [3–5]. Jednak dalsze analizy tych współzależności wykazują istotną zmienność wartości HbA<sub>1c</sub> względem populacyjnej krzywej regresji liniowej dla każdej zadanej wartości MBG [6]. Zmienność tę zwykle uznaje się za przypadkową, okazuje się, że przybiera ona określoną postać uwarunkowaną biologicznie. Przy określonej wartości MBG u niektórych osób stwierdza się stale wyższe, a u innych niższe stężenia HbA<sub>1c</sub> niż przewidywane wyłącznie na podstawie średniej wartości glikemii.

Opisaną zmienność biologiczną stwierdza się dla wielu mierzonych parametrów klinicznych. Jej występowanie wynika z różnic międzysobniczych, dotyczących procesów fizjologicznych i biochemicznych [7]. Istnienie zmienności biologicznej oznacza, że każdy ma odmienny poziom nastawczy (*set point*) homeostazy, określający właściwy dla niej szczególnie poziom średni danego parametru w jednostce czasu. Zmienność biologiczną można wykryć metodami statystycznymi, wykazując większą zmienność międzysobniczą danego parametru, w porównaniu ze zmiennością wewnątrzsobniczą. Wykazano to dla HbA<sub>1c</sub> w populacjach osób niechorujących na cukrzycę [8, 9]. W opublikowanej ostatnio pracy dotyczącej badań u bliźniąt [10] wykazano, że biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> jest uwarunkowana genetycznie. Ocenia się, że wpływy genetyczne odpowiadają za 62% zmienności populacyjnej HbA<sub>1c</sub>.

U osób z prawidłową tolerancją glukozy biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub> można wykazać w bardzo prosty sposób: powtarzane przez jakiś czas pomiary HbA<sub>1c</sub> należy poddać ocenie pod kątem ich zmienności wewnątrz- i międzysobniczej [8, 9]. W badaniu u pacjentów bez cukrzycy [11–13] dowiedziono, że międzysobnicza zmienność HbA<sub>1c</sub> nie zależy od glikemii i że tendencja do niższych lub wyższych wartości HbA<sub>1c</sub> jest trwała.

Aby wykluczyć wpływ MBG u pacjentów z zaburzeniami tolerancji glukozy należy stosować inne metody oceny zmienności biologicznej HbA<sub>1c</sub>. Madsen i wsp. [14] oraz Hudson i wsp. [15] wprowadzili pojęcie „indeksu glikozylacji”, który określili jako stosunek HbA<sub>1c</sub> do stężenia glukozy we krwi. Zastosowanie tego nowego wskaźnika umożliwiło dokumentację istotnej zmienności międzysobniczej glikacji hemoglobiny u chorych na cukrzycę typu 1. W poprzednio opublikowanym badaniu [16] autorzy zaproponowali zastosowanie indeksu glikacji hemoglobiny (HGI, *hemoglobin glycation index*). Dzięki temu wskaźnikowi można określić związek między mierzoną a przewidywaną wartością HbA<sub>1c</sub>. Przewidywaną wartość HbA<sub>1c</sub> oblicza się na podstawie obserwowanego MBG. Należy zastosować równanie

regresji wieloczynnikowej, porównującej HbA<sub>1c</sub> i MBG dla badanej populacji. Indeks glikacji hemoglobiny obliczony w ten sposób wyznacza wielkość i kierunek indywidualnych różnic wartości zmierzonej HbA<sub>1c</sub> od tych przewidywanych w populacyjnym równaniu regresji, gdzie bierze się pod uwagę jedynie wpływ MBG. W trakcie 2-letnich badań prowadzonych u chorych na cukrzycę typu 1 autorzy niniejszych badań [16] stwierdzili, że HGI wykazywało statystycznie istotne różnice międzysobnicze. Ich kierunek i wielkość miały trwały charakter. Nie zaobserwowano związku tych zmian z okresem życia erytrocytów. Wyniki te są dowodem na istnienie biologicznej zmienności HbA<sub>1c</sub>, która jest niezależna od zmienności uwarunkowanej MBG. Przedstawione argumenty wyraźnie sugerują, że indywidualne stężenia HbA<sub>1c</sub> zależą od 2 składowych: MBG i innych czynników indywidualnych warunkujących biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub>.

Biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub> powiązano zarówno z powikłaniami makro-, jak i mikronaczyniowymi. Na przykład w populacji pacjentów bez cukrzycy wykazano związek stężenia HbA<sub>1c</sub> z występowaniem powikłań sercowo-naczyniowych [17] oraz pogrubieniem kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej [18]. Podobnie, dane z badania *European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition* (EPIC)-Norfolk wskazują, że HbA<sub>1c</sub> jest stałym czynnikiem ryzyka zgonu w całej populacji, nawet u osób bez cukrzycy. Biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> w małej populacji chorych na cukrzycę typu 1 z przewlekłą hiperglikemią wiąże się także z występowaniem nefropatii [20]. Autorzy postawili hipotezę, że biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> może być wykładnikiem ryzyka powikłań mikronaczyniowych cukrzycy w badaniu DCCT. W badaniu tym zebrano dane zawierające wieloletnie obserwacje MBG, HbA<sub>1c</sub> oraz rozwój powikłań u 1441 chorych na cukrzycę typu 1 [2]. W niniejszej pracy dla każdej wartości klinicznej wszystkich uczestników DCCT obliczono HGI jako miarę biologicznej zmienności HbA<sub>1c</sub>. Kolejnym etapem było ustalenie związku między biologiczną zmiennością HbA<sub>1c</sub> a wystąpieniem i rozwojem retinopatii i nefropatii cukrzycowej.

## Materiał i metody

Autorzy wykorzystali ogólnodostępne wyniki badania DCCT, umieszczone w zestawach SAS na taśmie magnetycznej (*National Technical Information Service*, Washington DC). Badanie DCCT to 9-letni projekt, w którym wzięło udział 1441 chorych na cukrzycę typu 1. Zaprojektowano je w celu porównania wpływu intensywnego leczenia hip-

glikemizującego, w porównaniu z leczeniem konwencjonalnym, na powstawanie i rozwój powikłań cukrzycy [2]. Przy randomizacji żaden z uczestników badania nie miał cech zaawansowanych powikłań mikro- i makronaczyniowych. Chorych podzielono na 2 grupy. Grupa prewencji pierwotnej (726 osób) nie miała cech retinopatii w fotografii dna oka, a wydalanie albumin z moczem (UAER, *urinary albumin excretion rate*) nie przekraczała 40 mg na dobę [21]. W grupie prewencji wtórnej (715 osób) stwierdzano minimalną lub średniozaawansowaną retinopatię i UAER poniżej 200 mg na dobę. Uczestników badania przydzielono drogą randomizacji do 2 grup leczenia — sposobem konwencjonalnym lub intensywnym. (Szczegółowy opis i wyniki badania DCCT — patrz [2, 21, 22]).

## Obliczanie średniego stężenia glukozy

U każdego uczestnika badania DCCT co 3 miesiące oznaczano 1-dniowy, 7-punktowy profil glikemii oraz wartość HbA<sub>1c</sub> [5, 23]. Każdy profil glikemii składał się z 7 próbek krwi włośniczkowej pobranych przed i 90 minut po głównych posiłkach (śniadanie, obiad, kolacja) oraz przed snem. Uzyskano 95% pomiarów przed- i poposiłkowych oraz 92% pomiarów przed snem. Protokół badania zakładał również wykonanie pomiarów o godzinie 3.00 w nocy, ale odsetek profili, w przypadku których uzyskano takie dane, wynosił mniej niż 1%. Oznaczenia HbA<sub>1c</sub> i glikemii w profilach wykonywano w laboratorium centralnym [23]. W niniejszym badaniu MBG obliczono jako średnią arytmetyczną stężeń glukozy w profilach danego pacjenta, w każdym kwartale, wykluczając pomiary o godzinie 3.00.

## Obliczanie indeksu glikacji hemoglobiny i określenie biologicznej zmienności HbA<sub>1c</sub>

W poprzednio opublikowanej pracy [16] autorzy opracowali model statystyczny, służący określeniu międzysobniczej zmienności HbA<sub>1c</sub> u chorych na cukrzycę. Podobną metodę zastosowano do opracowania danych pochodzących z badania DCCT. Analizie poddano wszystkie zmierzone wartości HbA<sub>1c</sub> i odpowiadające im MBG, dla wszystkich uczestników badania i wszystkich wizyt kontrolnych w ramach badania DCCT. Zastosowanie modelu linearnego potwierdzono algorytmem *spline-fitting*, którego wyniki nie zmieniły kształtu zależności. Zgodnie z Kryterium Akaike (*Akaike's Information Criterion*) [24], w przypadkowych odcięciach uzyskano najlepsze dopasowanie danych. Aby wyjaśnić współzależności między danymi poszczególnych pacjentów, zastosowano odpowiednią wariancję modelu

analizy. Dodatkowe zmienne uwzględnione w tym modelu obejmowały: wiek, czas trwania cukrzycy, płeć, sposób leczenia (intensywne vs. konwencjonalne), zakres działań (1° prewencję i 2° interwencję) i rasę. Na wartości HbA<sub>1c</sub> i HGI nie wpływały odchylenia standardowe wyników pomiarów glikemii użytych w poszczególnych profilach do obliczenia MBG. Nie włączono ich również jako dodatkowych zmiennych w ostatecznym modelu, który służył do określania przewidywanych wartości HbA<sub>1c</sub> na podstawie MBG we wszystkich profilach glikemii uzyskanych w badaniu DCCT.

Przewidywane HbA<sub>1c</sub> użyto do obliczenia HGI dla każdej wizyty kontrolnej w następujący sposób:  $HGI = \text{mierzone HbA}_{1c} - \text{przewidywane HbA}_{1c}$ . Obecność międzyosobniczej zmienności HbA<sub>1c</sub> uzyskano przez analizę HGI w sposób szczegółowo opisany wcześniej [16]. Początkowo, w celu oceny, czy średni HGI jest statystycznie istotnie różny u pacjentów z badania DCCT, określono współczynnik prawdopodobieństwa, następnie za pomocą testów *t* dokonano analizy poszczególnych wartości HGI dla każdego pacjenta, aby ustalić, czy różnią się one istotnie od wartości przewidywanych na podstawie równania regresji. Podstawą takiego podejścia było przypuszczenie, że jeżeli mierzone i przewidywane indywidualne wartości HbA<sub>1c</sub> nie różnią się istotnie, to 99-procentowy przedział ufności dla średniego indywidualnego HGI powinien zawierać 0.

### Biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> a ryzyko powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy

Dane zebrane podczas 7-letniego badania DCCT użyto w celu określenia związku między HGI a ryzykiem pojawienia się i rozwoju retinopatii i nefropatii. Stopień zaawansowania retinopatii mierzono 25-stopniową skalą *Early Diabetic Retinopathy Treatment Study* (EDRTS) [2, 22]. Pojawienie się lub rozwój retinopatii zdefiniowano jako trwałą zmianę względem obrazu wyjściowego o co najmniej 3 stopnie skali, stwierdzoną podczas w okresie badania DCCT. Pojawienie się lub rozwój nefropatii zdefiniowano jako wystąpienie wzrostu mikroalbuminurii, na przykład UAER  $\geq 100$  mg na dobę u osób z UAER  $< 100$  mg na dobę na początku badania lub UAER  $\geq 300$  mg na dobę u osób w grupie interwencji z mikroalbuminurią na początku badania [21].

W celu oceny związku między biologiczną zmiennością HbA<sub>1c</sub> a powikłaniami mikronaczyniowymi dane uczestników badania podzielono na 3 grupy (33%) z niskim, średnim i wysokim HGI na podstawie średnich wartości HGI podczas badania. Po potwierdzeniu trafności założenia proporcjonal-

nych hazardów do porównania ryzyka powstania i rozwoju retinopatii i nefropatii w zależności od HGI w przedziale czasu zastosowano model regresji Coxa. Za jego pomocą sprawdzono wpływ: wieku, czasu trwania cukrzycy, płci, sposobu leczenia i zakresu działań medycznych. Średnie stężenie glukozy we krwi włączono do modelu jako kowariancję zależną od czasu. W ten sposób oszacowane ryzyko skorygowano względem różnic MBG między poszczególnymi pacjentami w grupach HGI. Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem procedur „stcox” i „sts graph” programu STATA-6 [25].

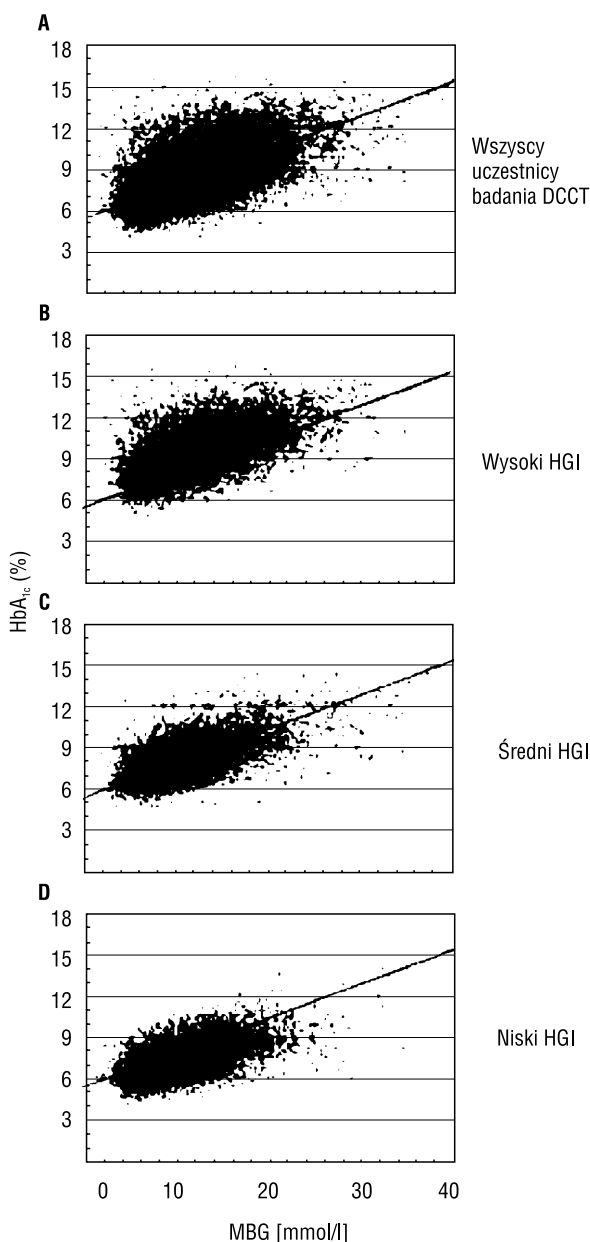
Aby ocenić wpływ HGI na występowanie powikłań cukrzycy u osób z wysokimi lub niskimi glikemiami, dane uczestników DCCT podzielono ponownie na grupy o niskiej, średniej i wysokiej MBG ( $n = 480$ ), na podstawie średniej MBG w czasie trwania badania. Analizę regresji Coxa użyto ponownie do porównania ryzyka retinopatii względem grupy HGI dla poszczególnych pacjentów w grupach niskiej i wysokiej MBG. Z uwagi na rzadsze występowanie nefropatii liczba danych do analizy była niewystarczająca, aby przeprowadzić ją porównywalnie do retinopatii.

## Wyniki

### Indeks glikacji hemoglobiny i zmienność biologiczna HbA<sub>1c</sub>

Średnie stężenie glukozy we krwi okazało się ściśle skorelowane z HbA<sub>1c</sub> ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,0001$ ), u 1439 spośród 1441 pacjentów uzyskano dane wystarczające do przeprowadzenia analizy według wybranego modelu. Średnie HGI uczestników badania obliczone na podstawie danych z wszystkich wizyt (przed i po włączeniu do badania) cechowały się normalnym rozkładem, ze średnią 0,00 i odchyleniem standardowym wynoszącym 1,65. Za punkty odcięcia dla poszczególnych grup (niskiego, średniego i wysokiego HGI) przyjęto: niskie — poniżej  $-0,38$ , średnie — w przedziale  $-0,38-0,42$  i wysokie — powyżej  $0,42$ . W analizie nie potwierdzono założenia, że HbA<sub>1c</sub> jest uwarunkowane jedynie MBG. W teście prawdopodobieństwa odrzucono także hipotezę przyjmującą brak międzyosobniczej zmienności HGI ( $p < 0,0001$ ). Analiza statystyczna HGI z użyciem testów *t* wykazała, że u 816 z 1439 uczestników DCCT (57%) średni HGI istotnie różnił się ( $p < 0,01$ ) od zera, wartości oczekiwanej gdyby HGI zależało jedynie od MBG i błędu przypadkowego.

Celem dalszych analiz było ustalenie związku między MBG a HbA<sub>1c</sub> u wszystkich uczestników DCCT i osobno dla każdej grupy HGI (ryc. 1). Przyjęto zało-



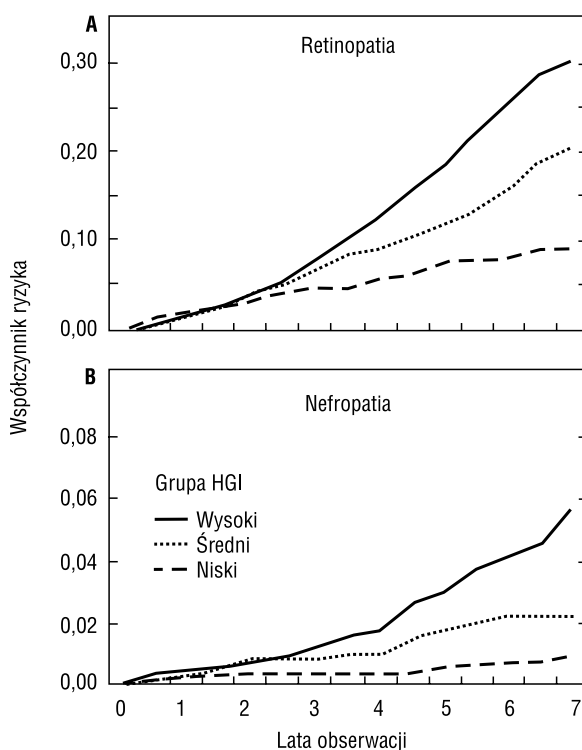
**Rycina 1.** Wartości MBG i HbA<sub>1c</sub> w badaniu DCCT. **A.** Wartości MBG i HbA<sub>1c</sub> zmierzone w całej populacji pacjentów podczas wszystkich wizyt 7-letniego okresu badania. **B–D.** Wyniki uczestników badania przydzielonych odpowiednio do grup o wysokim, średnim i niskim HGI. Krzywa regresji przedstawiona na każdym wykresie jest pochodną krzywej regresji HbA<sub>1c</sub> i MBG populacji przedstawionej na wykresie A; linia regresji rozdzieliła grupy danych; kontrast podziału powstał przez lokalizację większości oznaczeń pacjentów o wysokim HGI (74%) nad linią regresji oraz większości oznaczeń pacjentów o niskim HGI (79%) pod tą linią; HGI (*hemoglobin glycation index*) — indeks glikacji hemoglobiny

żenie, że jeśli zmienność obserwowana w zależności między MBG a HbA<sub>1c</sub> w obrębie badanej populacji jest jedynie przypadkowa, to dystrybucja punktów (przedstawiających dane) ponad i poniżej krzywej regresji powinna być podobna dla każdej grupy. Tego

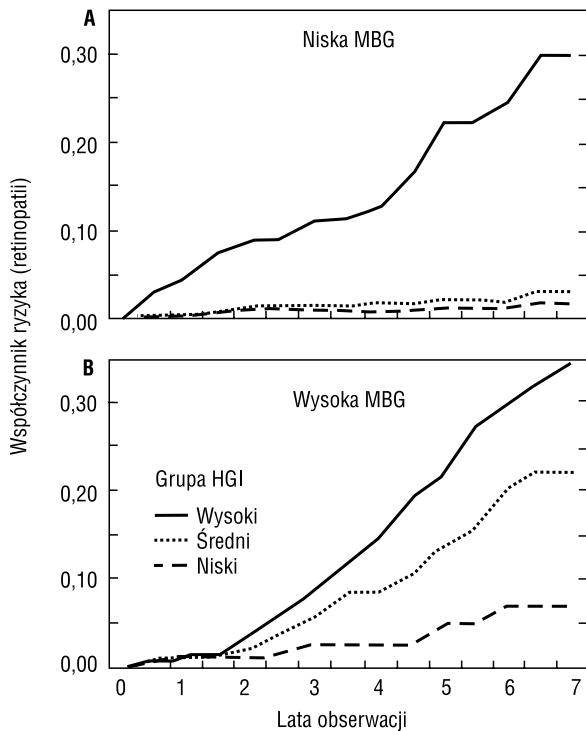
jednak nie potwierdzono. Okazało się, że 3/4 pomiarów u pacjentów z grup niskiego lub wysokiego HGI znalazło się odpowiednio poniżej lub powyżej populacyjnej linii regresji. Nieproporcjonalny rozkład danych wokół krzywej regresji w różnych grupach HGI nie jest przypadkowy i potwierdził przypuszczenie, że zmienność zależności HbA<sub>1c</sub> — MBG w populacji badania DCCT jest zależna od HGI.

### Biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> a powikłania mikronaczyniowe cukrzycy

Ustalenie związku między HGI a ryzykiem retinopatii i nefropatii opierało się na danych zebranych podczas trwającego 7 lat badania DCCT. Ryzyko powstania i rozwoju retinopatii u pacjentów z porównywalnym MBG było statystycznie istotnie różnie ( $p < 0,0001$ ) między grupami chorych o niskim, średnim i wysokim HGI (ryc. 2A). Po 7 latach pacjenci



**Rycina 2.** Biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> a ryzyko retinopatii i nefropatii. Analiza regresji Coxa została skorygowana względem wpływu MBG i użyto do porównania ryzyka retinopatii i nefropatii u uczestników badania DCCT podzielonych na grupy o niskim, średnim i wysokim HGI. Powstawanie i rozwój retinopatii (**A**), ocenianej za pomocą 25-punktowej skali EDRTS (objaśnienie w tekście), ściśle wiąże się z HGI i jest istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów z wysokim HGI ( $p < 0,0001$ ). Powstawanie i rozwój nefropatii (**B**) ocenianej na podstawie obecności zaawansowanej mikroalbuminurii, także ściśle zależy od HGI i jest istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych z wysokim HGI ( $p < 0,0001$ ); HGI (*hemoglobin glycation index*) — indeks glikacji hemoglobiny



**Rycina 3.** Biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> a ryzyko retinopatii u pacjentów z dobrą i złą kontrolą glikemii. Za pomocą analizy regresji Coxa porównano ryzyko retinopatii u uczestników badania DCCT o niskiej i wysokiej średniej glikemii (MBG), podzielonych na grupy o niskim, średnim i wysokim HGI. Mimo niskich glikemii w czasie trwania badania chorzy o niskim MBG i wysokim HGI cechowali się znacząco wyższym ryzykiem rozwoju retinopatii w porównaniu z grupami o średnim i niskim HGI (A). Ryzyko retinopatii u pacjentów z wysokimi glikemiami w badaniu DCCT były także statystycznie istotnie różne w grupach o niskim, średnim i wysokim HGI (B); HGI (*hemoglobin glycation index*) — indeks glikacji hemoglobiny

z grupy o wysokim HGI charakteryzowali się 3-krotnie wyższym ryzykiem retinopatii (30%) w porównaniu z osobami z grupy o niskim HGI (9%). Ryzyko powstania i rozwoju nefropatii było także statystycznie istotnie różne ( $p < 0,0001$ ) w grupach o niskim, średnim i wysokim HGI (ryc. 2B). Po 7 latach trwania badania ryzyko nefropatii u chorych z grupy o wysokim HGI było 6-krotnie wyższe (6%) niż w grupie o niskim HGI (1%).

Wpływ HGI na ryzyko powstania i rozwoju retinopatii poddano analizie także u pacjentów ze skrajnymi wartościami glikemii. Populację podzielono na podgrupy o niskiej, średniej i wysokiej średniej glikemii. Mimo względnie dobrego wyrównania glikemii mierzonego wartością MBG w badaniu DCCT (podgrupa o niskiej MBG) (ryc. 3A), chorzy w tej dobrze kontrolowanej podgrupie z wysokim HGI nadal charakteryzowali się 30-procentowym ryzykiem rozwoju retinopatii. W grupach średniego i niskiego HGI

ryzyko retinopatii wynosiło jedynie 2–4% (było istotnie statystycznie niższe niż w grupie wysokiego HGI,  $p < 0,006$ ). Podobny wpływ HGI na ryzyko retinopatii stwierdzono w grupie o względnie złym wyrównaniu metabolicznym (o wysokiej MBG) (ryc. 3B). U pacjentów z wysokim HGI ryzyko retinopatii wynosiło 35%, natomiast u badanych ze średnim i niskim HGI — było istotnie niższe ( $p < 0,001$ ) i wynosiło odpowiednio: 23% i 7%.

## Wnioski

Prezentowana analiza wyników badania DCCT dostarcza dowodów na istnienie międzyosobniczej biologicznej zmienności HbA<sub>1c</sub>, odmiennej od tej uwarunkowanej MBG. U wielu pacjentów biorących udział w DCCT oznaczone wartości HbA<sub>1c</sub> okazały się istotnie wyższe lub niższe od przewidywanych na podstawie populacyjnego równania regresji. Osobnicza tendencja w kierunku niższych lub wyższych wartości HbA<sub>1c</sub> była niezależna od MBG i utrzymywała się trwale podczas wszystkich wizyt klinicznych w czasie 9 lat. Dla wielu pacjentów wszystkie wykonywane przez okres 9 lat co 3 miesiące pomiary HbA<sub>1c</sub> po umieszczeniu na wspólnym wykresie znalazły się powyżej lub poniżej krzywej wyznaczonej populacyjnym równaniem regresji. Ten wykładnik międzyosobniczej zmienności HbA<sub>1c</sub> wśród pacjentów w badaniu DCCT jest zbieżny z wynikami kilku innych badań, w których oceniano zarówno populacje chorych na cukrzycę, jak i bez cukrzycy [8, 9, 11–16, 20]. Wymienione badania różniły się znacząco od badania DCCT, ponieważ obejmowały mniejszą liczbę pacjentów, zaplanowane były na krótszy okres oraz miały inną metodologię. Ich rezultaty wskazywały jednak na istnienie także innego niż MBG, osobniczego czynnika warunkującego stężenia HbA<sub>1c</sub>.

Przypuszczalnym mechanizmem sprawczym międzyosobniczej zmienności związku HbA<sub>1c</sub> i MBG w badaniu DCCT była możliwość wystąpienia artefaktów wynikających z błędów pomiaru. Prawdopodobieństwo, że obserwowane wyniki powstały na skutek błędów laboratoryjnych, było jednak minimalne, ponieważ wszystkie oznaczenia glikemii i HbA<sub>1c</sub> wykonano w laboratorium centralnym. Jakkolwiek błąd związany z przeprowadzeniem oznaczeń glikemii lub HbA<sub>1c</sub> powinien cechować się powtarzalnością lub przypadkowością i mimo że błąd przypadkowy mógłby wpłynąć na międzyosobniczą zmienność HbA<sub>1c</sub>, nie może być jej źródłem. Nieprzypadkowe odchylenia w wartościach pomiarów, które stały się przyczyną trwałych fałszywych różnic między mierzoną a przewidywaną HbA<sub>1c</sub>, mogłyby spo-

wodować wystąpienie międzyosobniczej zmienności HGI. W porównaniu z HbA<sub>1c</sub> oznaczenia MBG są bardziej podatne na błąd pomiaru. Pobieranie próbek krwi w określonym czasie — przed i po posiłkach — ogranicza, ale nie eliminuje możliwości występowania odchyłek w pomiarach. Dlatego niemierzone (np. nocne) wartości glikemii, które mogły być istotnie różne od wartości zmierzonych, byłyby potencjalną przyczyną niedoszacowania lub przeszacowania MBG. By wyjaśnić wyniki prezentowanego badania, MBG musiałoby być trwałe w trakcie wieloletniego okresu obserwacji DCCT. Ponadto, analiza danych poszczególnych pacjentów DCCT z ekstremalnymi wartościami HGI wskazuje, że niemierzone wartości glikemii musiałyby być zupełnie różne od wartości zmierzonych i w wielu przypadkach, z punktu widzenia biologii człowieka, wręcz absurdalne. Stale utrzymujące się osobnicze różnice w niemierzonych wartościach glikemii mogłyby wynikać z równie trwałych w czasie różnic w wahaniami glikemii w ciągu doby. Autorzy ustalili jednak standardowe odchylenia wartości glikemii użyte do obliczania MBG i dowiedli, że zmienność glikemii nie ma znaczenia zarówno dla wartości HbA<sub>1c</sub>, jak i HGI. W jednym z niedawno opublikowanych badań [26], przeprowadzonym w grupie 256 chorych na cukrzycę, również wykazano, że wartości HbA<sub>1c</sub> nie zależą w sposób istotny od zmienności glikemii. Istnieje zatem ścisły związek międzyosobniczej zmienności HbA<sub>1c</sub> ze zmiennością biologiczną, a nie z błędem pomiaru.

Nieenzymatyczna glikacja białek, w tym hemoglobiny, następuje zgodnie z reakcją Maillarda, która zachodzi między cukrami redukującymi a końcowymi lub  $\epsilon$ -aminami; jest to ważny etap powstawania zaawansowanych produktów glikacji (AGE, *advanced glycation end products*). Zaawansowane produkty glikacji to heterogenna grupa substancji, których cechy biochemiczne leżą u podstaw patofizjologii powikłań cukrzycy, procesów starzenia lub choroby Alzheimera [27]. Wykazanie związku między biologiczną zmiennością hemoglobiny glikowanej a występowaniem mikroangiopatycznych powikłań cukrzycy w badaniu DCCT sugeruje, że czynniki odpowiedzialne za zmienność biologiczną procesów nieenzymatycznej glikacji hemoglobiny mogą również wpływać na indywidualną skłonność do rozwoju powikłań cukrzycy. Nieenzymatyczna glikacja hemoglobiny jest uwarunkowana wewnątrzkomórkowym stężeniem glukozy oraz czynnikami regulującymi wiązanie glukozy z hemoglobiną. Do czynników tych zalicza się na przykład pH płynu wewnątrzkomórkowego, stężenie 2,3-difosfoglicerynianu oraz ilość lub aktywność enzymów glikolitycznych i de-

glikujących [13–15, 28, 29]. We wcześniejszej pracy [16] autorzy wykazali, że HGI nie zależy od obrotu erytrocytów mierzonego stężeniami kreatyny, mimo że na stężenia HbA<sub>1c</sub> może wpływać również wiek krwinki czerwonej.

Nowym i ważnym odkryciem niniejszej pracy jest ustalenie, że biologiczna zmienność HbA<sub>1c</sub> jest istotnym czynnikiem ryzyka powstawania i rozwoju powikłań cukrzycy. Oznacza to, że istnieją dwie składowe ryzyka mikroangiopatycznych powikłań cukrzycy. Pierwszą z nich jest dobrze poznany i opisany efekt długotrwałej hiperglikemii. Drugą — mniej poznany i nie do końca zrozumiany wpływ czynników innych niż glikemia, odpowiedzialnych za biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub>. Współistnienie dwóch czynników ryzyka wskazuje na możliwość dwóch różnych sposobów terapii cukrzycy, skutecznych w opóźnianiu rozwoju jej powikłań. Jednym z nich jest obecnie stosowane leczenie, oparte na interwencji farmakologicznej i zmianie trybu życia, co ma na celu obniżenie glikemii do stężeń prawie fizjologicznych (prawie normoglikemii). Jednak, jak wskazują wyniki autorów niniejszej pracy, obniżanie glikemii może okazać się niewystarczające, ponieważ nawet u chorych z względnie niskimi MBG ryzyko retinopatii było wyższe w grupie o wysokim HGI (ryc. 3A). Ponadto, należałoby wprowadzić metody równoległego leczenia cukrzycy, które zapobiegałyby obecnie szkodliwym efektom niejasnych mechanizmów warunkujących biologiczną zmienność HbA<sub>1c</sub>. Opisanie tych mechanizmów może być początkiem powstawania nowych metod terapii i indywidualnie dobieranych schematów postępowania. Indeks glikacji hemoglobiny lub podobne wskaźniki mogą okazać się przydatne w praktyce klinicznej w identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka i w kontrolowaniu skuteczności leczenia.

## Podziękowania

Praca została częściowo sfinansowana przez *the Foundation for the Louisiana State University Health Science Center*, New Orleans, Louisiana (dla J.M.H. i S.A.C.) oraz dzięki grantowi *Research Institute for Children*, New Orleans, Louisiana (dla J.M.H.).

## PIŚMIENNICTWO:

1. Service F.J., O'Brien P.C.: The relation of glycaemia to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetologia* 2001; 44: 1215–1220.
2. DCCT Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in IDDM. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 977–983.

3. Koenig R.J., Peterson C.M., Jones R.L., Saudek C., Lehrman M., Cerami A.: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1976; 295: 417–420.
4. Svendsen P.A., Lauritzen T., Soegaard U., Nerup J.: Glycosylated haemoglobin and steady-state mean blood glucose concentration in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1982; 23: 403–405.
5. DCCT Research Group: Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): results of feasibility study. *Diabetes Care* 1987; 10: 1–19.
6. Service F.J.: Correlation between glycemia and glycosylated hemoglobin. *Compr. Ther.* 1990; 16: 33–40.
7. Fraser C.G.: Biological Variation: From Principles to Practice. AACC Press, Washington, DC 2001; 151.
8. Kilpatrick E.S., Maylor P.W., Keevil B.G.: Biological variation of glycosylated hemoglobin: implications for diabetes screening and monitoring. *Diabetes Care* 1998; 21: 261–264.
9. Rohlfing C., Wiedmeyer H.M., Little R. i wsp.: Biological variation of glycohemoglobin. *Clin. Chem.* 2002; 48: 1116–1118.
10. Snieder H., Sawtell P., Ross L., Walker J., Spector T., Leslie R.: HbA<sub>1c</sub> levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. *Diabetes* 2001; 50: 2858–2863.
11. Modan M., Meytes D., Rozeman P. i wsp.: Significance of high HbA<sub>1c</sub> levels in normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 1988; 11: 422–428.
12. Yudkin J.S., Forrest R.D., Jackson C.A., Ryle A.J., Davie S., Gould B.J.: Unexplained variability of glycosylated haemoglobin in nondiabetic subjects not related to glycaemia. *Diabetologia* 1990; 33: 208–215.
13. Gould B.J., Davie S.J., Yudkin J.S.: Investigation of the mechanism underlying the variability of glycosylated haemoglobin in nondiabetic subjects not related to glycaemia. *Clin. Chim. Acta* 1997; 260: 49–64.
14. Madsen H., Kjaergaard J.J., Ditzel J.: Relationship between glycosylation of haemoglobin and the duration of diabetes: a study during the third trimester of pregnancy. *Diabetologia* 1982; 22: 37–40.
15. Hudson P.R., Child D.F., Jones H., Williams C.P.: Differences in rates of glycation (glycation index) may significantly affect individual HbA<sub>1c</sub> results in type 1 diabetes. *Ann. Clin. Biochem.* 1999; 36: 451–459.
16. Hempe J., Gomez R., McCarter R., Chalew S.: High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control. *J. Diabetes Complications* 2002; 16: 313–320.
17. Singer D.E., Nathan D.M., Keaven M.A., Wilson P.W.F., Evans J.C.: Association of HbA<sub>1c</sub> with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes* 1992; 41: 202–208.
18. Vitelli L.L., Shahar E., Heiss G., McGovern P.G., Brancati F.L., Eckfeldt J.H.: Glycosylated hemoglobin level and carotid intimal-medial thickening in non-diabetic individuals. *Diabetes Care* 1997; 20: 1454–1458.
19. Khaw K.T., Wareham N., Luben R. i wsp.: Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 2001; 322: 15–18.
20. Cohen R.M., Holmes Y.R., Chenier T.C., Joiner C.H.: Discordance between HbA<sub>1c</sub> and fructosamine. *Diabetes Care* 2003; 26: 163–167.
21. DCCT Research Group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int.* 1995; 47: 1703–1720.
22. DCCT Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA<sub>1c</sub>) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1995; 44: 968–983.
23. DCCT Research Group: Feasibility of centralized measurements of glycosylated hemoglobin in the Diabetes Control and Complications Trial: a multicenter study. *Clin. Chem.* 1987; 33: 2267–2271.
24. Akaike H.: Fitting autoregressive models for prediction. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* 1969; 21: 243–247.
25. StataCorp: Stata Statistical Software: Release 6.0. T. 3. Stata, College Station, 1999; 606.
26. Derr R., Garrett E., Stacy G.A., Saudek C.D.: Is HbA<sub>1c</sub> affected by glycemic instability? *Diabetes Care* 2003; 26: 2728–2733.
27. King G.L., Brownlee M.: The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1996; 25: 255–270.
28. Rendell M., Stephen P.M., Paulsen R. i wsp.: An interspecies comparison of normal levels of glycosylated hemoglobin and glycosylated albumin. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1985; 81: 819–822.
29. Szwergold B.S., Howell S.K., Beisswenger P.J.: Intracellular nonenzymatic glycation of hemoglobin in human erythrocytes is controlled by enzymatic deglycation mechanisms (streszczenie). *Diabetes* 2003; 53 (supl. 1): A815.