

Diyabetik Hastalarda Hemogloblin Subfraksiyonları ve Total Hemogloblinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Hemoglobin Subfractions and Total Hemoglobin in Diabetic Patients

Kadriye Akpınar Esin Avcı Süleyman Demir

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Denizli, Türkiye

Başvuru Tarihi: 07 Kasım 2020

Kabul Tarihi: 05 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: Diyabetik hastaların tanı ve takibinde kullanılan HbA1c ile bu ölçüm esnasında bakılan HbA0, HbF, HbA1 subfraksiyonlarını birlikte değerlendirmek ve hastaların total hemogloblin (THb) düzeylerini göz önünde tutarak HbA1c'nin klinik yararlılığı tartışmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu geriye dönük çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Hastanesi laboratuvar bilgi sistemi kayıtlarında bulunan ve hastanemize başvuran 338 kişi alındı. HbA1c iyon-değiştirici HPLC yöntemiyle TosohG8 cihazında, THb Mindray BC6800 hematoloji analizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştü. Kişiler HbA1c veya THb düzeylerine göre gruplara ayrıldı. İstatistiksel analizde SPSS 22.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Çalışmadaki 338 hastanın HbA1c ortalaması 7.2 ± 1.68 , THb ortalaması 13.4 ± 1.8 g/dL idi. Normal grupta (n=29) prediyabete (n=108) göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.004), LHbA1c (p=0.0001) için anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) için anlamlı yüksek farklar bulundu. Normal gruptakilerde diyabetiklere (n=201) göre ve prediyabetiklerde de diyabetiklere göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001), SHbA1c/THb (p=0.0001) düzeyleri anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) ise anlamlı yüksekti. Hastalar THb'ye göre değerlendirildiğinde; anemik grupta (n=31), normale (n=286) göre HbA1a (p=0.002), LHbA1c (p=0.002), SHbA1c/THb (p=0.0001); hiperhemogloblinemiklere (n=21) göre de HbA1a (p=0.034) ve SHbA1c/THb (p=0.0001) anlamlı yüksek bulundu. Normal ile hiperhemogloblinemikler karşılaştırıldığında; HbA0 (p=0.021) normal grupta, LHbA1c (p=0.004) ve SHbA1c (p=0.014) hiperhemogloblinemik grupta anlamlı yüksekti. THb ile SHbA1c arasında zayıf pozitif; SHbA1c ile LHbA1c ve HbA0 arasında güçlü pozitif korelasyonlar mevcuttu. THb düzeyine göre ayrılan tüm gruplar arasında anlamlı farkın olmadığı HbA1b ve HbF ile SHbA1c arasında zayıf pozitif korelasyonlar mevcuttu.

Sonuç: Diyabet hastalarında SHbA1c ile diğer Hb subfraksiyonlarını ve THb'yi birlikte değerlendirmek, hastaların glisemi durumlarını yorumlamak açısından daha doğru olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Glike hemogloblin A, hemogloblin A1c proteini, anemi.

Kadriye Akpınar 0000-0002-6951-8866
Esin Avcı 0000-0002-9173-0142
Süleyman Demir 0000-0003-4156-4040

Yazışma adresi: Kadriye Akpınar
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya
e-mail: dr.akpınar.kadriye@gmail.com

ABSTRACT

Aim: We aimed to evaluate HbA1c with HbA0, HbF, HbA1 subfractions and to discuss the clinical usefulness of HbA1c by considering the total hemoglobin (THb) levels of the patients.

Materials and Methods: This retrospektif study included 338 individuals recorded in the laboratory information system of Pamukkale University Hospital. HbA1c analysis was performed on TosohG8 device by ion-exchanger HPLC method. THb was measured by the colorimetric method on the Mindray BC6800 hematology analyzer. Subjects were divided into subgroups according to HbA1c or THb levels. SPSS 22.0 program was used for statistical analysis.

Results: The means of all patients were $7.2 \pm 1.68\%$ for HbA1c, and 13.4 ± 1.8 g/dL for THb. Compared to normals (n=29) with prediabetics (n=108), HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.004), LHbA1c (p=0.0001) were lower; HbA0 (p=0.0001) was higher. Compared to normals with diabetics (n=201) or prediabetics with diabetics HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001), SHbA1c/THb (p=0.0001) were higher; HbA0 (p=0.0001) was lower in diabetics. When the patients were evaluated according to THb; compared to normals (n=286) HbA1a (p=0.002), LHbA1c (p=0.002), SHbA1c/THb (p=0.0001); compared to hyperhemoglobinemics (n=21) HbA1a (p=0.034) and SHbA1c/THb (p=0.0001) were significantly higher in the anemic group (n=31). Compared to normal group with hyperhemoglobinemics; HbA0 (p=0.021) was higher; LHbA1c (p=0.004) and SHbA1c (p=0.014) were lower. There were strong positive correlations in SHbA1c with LHbA1c and HbA0 and weak positive correlations in HbA1b and HbF with SHbA1c.

Conclusion: Interpreting the patients' glycemia status, it could be more accurate to evaluate SHbA1c with the other Hb subfractions and THb in diabetes.

Keywords: Glycated hemoglobin A, hemoglobin A1c protein, anemia.

GİRİŞ

Monosakkaridlerin veya glukoz kalıntılarının proteinlerdeki serbest amino ($-\text{NH}_2$) grubu ile kendiliğinden (nonenzimatik) reaksiyona girmesine glikasyon denir¹. Nonenzimatik glikasyon ile in vitro ve in vivo değişime uğradığı ilk olarak gösterilen protein, hemoglobin (Hb)'dir. Erişkin insan eritrositinin başlıca Hb'i iki alfa (α) ve iki beta (β) zincirinden oluşan, dolaşımda yaklaşık %90 bulunan HbA (HbA0)'dır². HbA0'dan nonenzimatik glikasyon ile oluşan HbA1 komponentleri, kolon kromatografisi ile izole edilmiş ve elusyon sırasına göre HbA1a (HbA1a1 ve HbA1a2), HbA1b, HbA1c, HbA1d ve HbA1e olarak adlandırılmıştır³.

HbA1c en yaygın bulunan glike hemoglobindir ve ölçüm gününden en az 8-10 hafta öncesinde başlamış olan hiperglisemiye yanıtır⁴. HbA1c diyabet tanısı ve tedavisi, diyabet hastalarının bakım kalitesini değerlendirmek ve diyabet komplikasyonlarının gelişmesi ve ilerlemesinde oluşan riskleri öngörmek için kullanılır^{5,6}.

HbA1c ölçümü, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller elektroforez gibi separative yöntemler, aynı zamanda immünolojik ve enzimatik yöntemler dahil olmak üzere farklı analitik prensipler kullanılarak gerçekleştirilebilir⁷. HbA1c glisemik kontrolün bir önceki bir sonuca göre iyileşip iyileşmediğini ve hastanın HbA1c hedefine ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bu nedenle, en uygun klinik kullanım için, analitik performansın belirlenmesinde referansa göre bias ve belirsizlik (imprecision) dikkate alınmalıdır. HPLC 'National Glyhemoglobin Standardization Program/ Diabetes Control and Complications Trial' (NGSP/DCCT)'ye göre referans metot olarak kabul edilir. HbA1c'nin HPLC yöntemi ile ölçümünde analitik belirsizlik $\leq 2.9\%$, bias $\leq 2.2\%$ ve toplam hata $\leq 6.9\%$ olmalıdır^{8,9}.

Günümüzde HbA1c ölçümü için sık kullanılan yöntemlerden biri olan iyon değiştirici kromatografi (IEC) ile, labil HbA1c (LHbA1c), stabil HbA1c (SHbA1c), fetal Hb (HbF), HbA1a, HbA1b ve HbA0 analizleri yapılmaktadır¹⁰. Minör hemoglobinler, translasyon

sonrası modifikasyonlarla elde edilir. β zincirin amino ucuna glukoz (HbA1c), fruktoz 1,6-difosfat (HbA1a1), glukoz 6-fosfat (HbA1a2) ya da pirüvik asit (HbA1b) bağlanabilir^{11,12}. Minör hemoglobinlerin çoğunu oluşturan HbA1c labil ve stabil alt fraksiyonlarına ayrılır. Labil hemoglobin A1c (LA1c veya pre-glikohemoglobin olarak da bilinir) hemoglobinin glikasyonunun erken aşamasında oluşan geri dönüşümlü bir Schiff bazıdır. Unstabil fraksiyonun konsantrasyonu, plazma glukoz seviyesindeki akut değişiklik ile değişir. Bu yüzden diyabet hastaların değerlendirilmesinde stabil HbA1c kullanılır¹³. Literatürde Hb subfraksiyonları için referans aralık henüz mevcut olmayıp, sadece stabil HbA1c değerleri için; %5.7-6.4 (39-46 mmol/mol) prediyabet, \geq %6.5 (48 mmol/mol) diyabet olarak değerlendirilmektedir⁵.

HbA1c değerleri hipergliseminin değerlendirilmesinde güvenilir olmasına rağmen, analizinde hemoglobinopatiler, anemi, antioksidan (C ve E vitamini) kullanımı gibi potansiyel interferanslar ile ilgili laboratuvarlar dikkatli olmalıdır^{7, 14, 15, 16}. Sağlıklı bireylerde dolaşımında yaklaşık %2 bulunan ve iki α iki β zincirinden oluşan HbF'nin yüksek olması da HbA1c için interferansa sebep olabilir ve bu durum asemptomatik HbF yüksekliği olan kişilerde sorun teşkil edebilir¹⁷.

Bu çalışmanın amacı diyabetik hastaların tanı ve takibinde HbA1c ile bu ölçüm esnasında bakılan HbA0, HbF, HbA1 subfraksiyonlarını birlikte değerlendirmek ve hastaların total hemoglobin düzeylerini göz önünde tutarak HbA1c analizinin klinik yararlılığı tartışmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Hastanesine Mart-Haziran 2019 tarihleri arasında diyabet şüphesiyle başvuran hastaların Pamukkale Üniversitesi hastanesi Biyokimya Laboratuvarına ait laboratuvar bilgi verileri geriye dönük olarak tarandı. K₂EDTA tüplerinde

verdikleri tam kan örneklerinden HbA1c analizi ve tam kan tetkiki yapılmış 338 kişi çalışmaya dahil edildi. Hastaların HbA1c analizi, iyon-değiştirici HPLC yöntemiyle IFCC sertifikalı Tosoh HLC-723G8 otomatik glikohemoglobin cihazında (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japonya) gerçekleştirilmişti. Tam kanda THb düzeyi hematoloji analizöründe (Mindray BC6800 Shenzhen, Çin) kolorimetrik yöntemle ölçülmüştü.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 27.10.2020 tarih ve 20 sayılı etik kurul onayı alındı. Helsinki deklarasyonuna bağlı kalındı.

Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Tosoh G8 HPLC Analiz Cihazı, stabil HbA1c'nin doğrudan belirlenmesini sağlar. Tosoh G8, HbA1c'nin stabil kısmını numunede bulunan toplam hemoglobin miktarının yüzdesi olarak hızlı ve doğru bir şekilde ölçmek için gözeneksiz bir kolon ve mikrobilgisayar teknolojisi kullanır. Analizör, tam kan örneğini hemoliz ve yıkama solüsyonu ile seyreltir ve daha sonra işlemden geçirilmiş numuneyi TSKgel Glyco HSi varyant kolonu üzerine enjekte eder. Ayırma (seperasyon) işlemi, elüsyonunda kolon reçine yüzeyi üzerindeki katyon değişim grubu ile hemoglobin bileşenleri arasındaki iyonik etkileşimlerdeki farklılıklar kullanılarak sağlanır. Hemoglobin fraksiyonları (A1a, A1b, F, LA1c, SA1c, A0 ve H-V0, H-V1, H-V2) daha sonra spesifik tuz ve pH konsantrasyonlarına sahip Elution Buffers HSi Varyant 1, 2 ve 3 kullanılarak aşamalı bir elüsyon yapılarak kolondan çıkarılır. HbD, HbS ve Hb C pikleri mevcutsa, HbA0 pikini takip eden hemoglobin varyant piklerinde (sırasıyla H-V0, H-V1, H-V2) saptanabilir. Ayrılan hemoglobin bileşenleri, absorbanstaki değişikliklerin 415nm'de ölçüldüğü LED fotometre akış hücresinden geçer. G8 yazılımı ham verileri entegre eder ve azaltır ve ardından her bir hemoglobin fraksiyonunun bağlı yüzdeleri

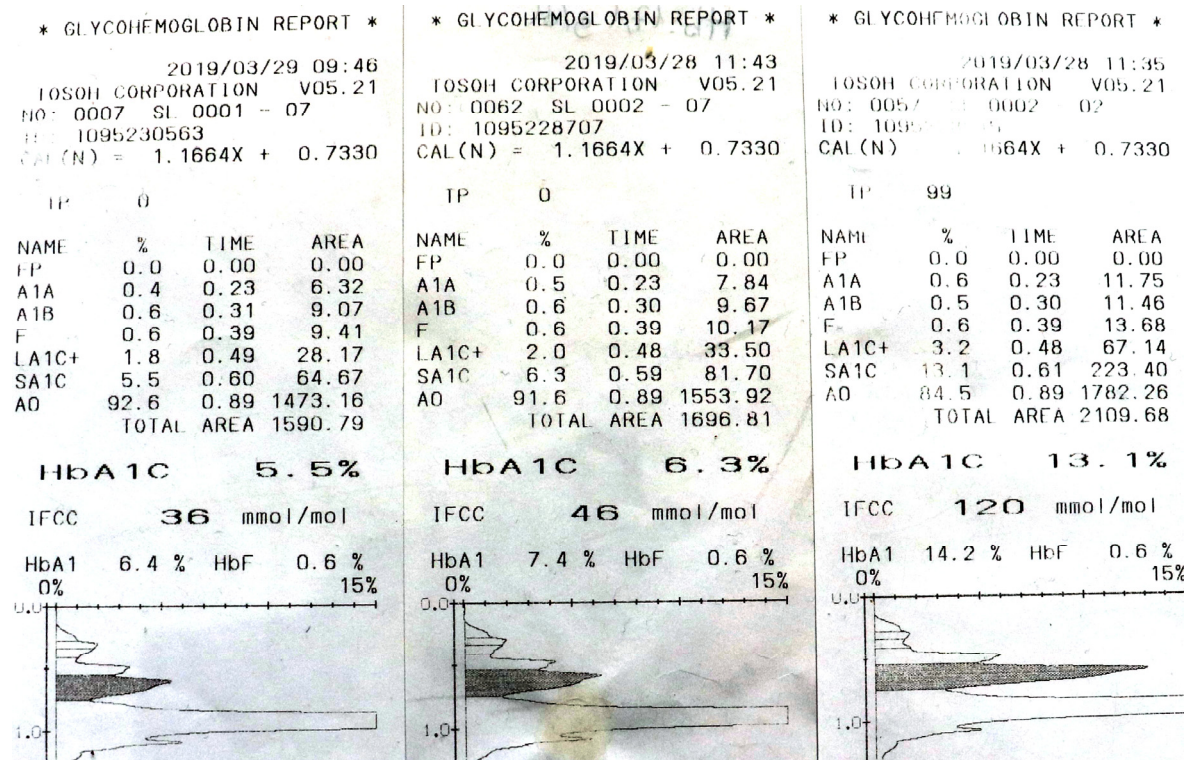
hesaplar. Bu, her pik fraksiyonu için tutulma süresine (retention time) karşı absorbanstaki değişiklikleri temsil eder. Bir analiz sadece 1.6 dakika sürer¹⁸. Bu çalışmada yapılan bazı Hb kromatografisi örnekleri Şekil 1'de gösterilmektedir.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versiyon 22, Chicago, IL, ABD) paket programıyla analiz edildi. Hastalar HbA1c düzeyine göre normal, prediyabet ve diyabet olarak ve THb düzeylerine göre (Mindray BC6800 hematoloji analizörü referans aralık tanımlaması dikkate alınarak) 11-16 g/dL arasında normal; <11 g/dL anemik, >16 g/dL hiperhemoglobinemik olarak üç gruba ayrıldıktan sonra değerlendirilip, sonuçlar bu alt gruplar arasında karşılaştırmalar şeklinde verildi. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki

farkın önemlilik testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm analizlerde p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile incelendi. Korelasyon analizinde r (korelasyon kat sayısı) değeri 0.000-0.49 aralığı zayıf ilişki, 0.50-0.69 aralığı orta ilişki, ≥0.70 olanlar güçlü ilişki olarak kabul edildi.

Çalışmaya katılan 338 kişni hemoglobin ortalama konsantrasyonu 13.4±1.8 (min: 8, maks: 17.2) g/dL, HbA1c ortalaması %7.2±1.68 (min:4 maks:16) idi. Hb kromatografisindeki sonuçlar ortanca, 1. ve 3. çeyreklikler olarak verildiğinde ise; HbA0 için %90.7 (89.1-91.6), HbA1a için %0.5 (0.5-0.6), HbA1b için %0.7 (0.6-0.9), HbF %0.6 (0.5-0.8), LHbA1c %2.2 (2-2.5), SHbA1c %6.7 (6.1-7.7) idi. Hastaların SHbA1c düzeyine göre gruplandırıldığındaki THb düzeyleri ve kromatografi analiz sonuçları Tablo 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Hb kromatografisi analiz sonucu ve grafik örnekleri

Tablo 1. SHbA1c düzeyine göre gruplanan hastaların THb ve Hb subfraksiyon düzeyleri

Grup	SHbA1c	LHbA1c	HbA1a	HbA1b	HbF	HbA0	THb	SHbA1c/ THb
Normal (n=29)	5.4 (5.2-5.5)	1.8 (1.6-1.9)	0.4 (0.4-0.5)	0.6 (0.5-0.7)	0.6 (0.4-0.7)	92.6 (92.3-92.8)	13.1±1.9 (8.5-16.6)	0.42 (0.37-0.44)
Prediyabet (n=108)	6.1 (5.9-6.2)	2 (1.9-2.1)	0.5 (0.4-0.5)	0.7 (0.6-0.8)	0.6 (0.5-0.7)	91.6 (91.3-91.9)	13.4±1.6 (9.4-17.2)	0.45 (0.42-0.49)
Diyabet (n=201)	7.5 (6.9-7.8)	2.4 (2.1-2.7)	0.5 (0.5-0.6)	0.8 (0.6-1)	0.6 (0.5-0.8)	89.6 (88.1-90.6)	13.4±1.8 (8-17.2)	0.57 (0.51-0.66)
*Sonicular normal dagılım gosteren parametrelerde ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum, normal dagılım gostermeyen parametrelerde ise ortanca ve 1.- 3. ceyreklik olarak gosterilmisttir.								

SONUÇLAR

Gruplar arasında Hb subfraksiyonları karşılaştırıldığında normal grupta prediyabet grubu göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.004), LHbA1c (p=0.0001) için istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) için anlamlı yüksek fark bulundu. Normal grupta diyabetik gruba göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001) ve SHbA1c/THb (p=0.0001) istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) için anlamlı yüksek fark bulundu. Prediyabet ile diyabet grupları karşılaştırıldığında ise prediyabetik grupta diyabetiklere göre HbA1a (p=0.0001), HbA1b (p=0.0001), LHbA1c (p=0.0001) ve SHbA1c/THb (p=0.0001) istatistiksel olarak anlamlı düşük; HbA0 (p=0.0001) açısından anlamlı yüksek fark bulundu. Tüm gruplar

arasında THb ve HbF açısından anlamlı fark bulunmadı.

Hastaların THb düzeylerine göre gruplara ayrıldıktan sonraki Hb kromatografi sonuçları ise Tablo 2'de gösterilmektedir.

Gruplar arasında Hb subfraksiyonları karşılaştırıldığında anemik grupta normal gruba göre HbA1a (p=0.002), LHbA1c (p=0.002) ve SHbA1c/THb (p=0.0001); hiperhemoglobine-miklere göre HbA1a (p=0.034) ve SHbA1c/THb (p=0.0001) açısından istatistiksel olarak anlamlı yüksek fark bulundu. Normal ile hiperhemoglobinemik hastalar karşılaştırıldığında ise HbA0 (p=0.021) normal grupta; LHbA1c (p=0.004) ve SHbA1c (p=0.014) hiperhemoglobinemik grupta anlamlı yüksek bulundu. Tüm gruplar arasında HbA1b ve HbF açısından anlamlı fark yoktu.

Tablo 2. THb düzeyine göre gruplanan hastaların Hb subfraksiyon düzeyleri

Grup	THb	HbA1a	HbA1b	HbF	LHbA1c	SHbA1c	HbA0	SHbA1c/ THb
Anemi (n=31)	10.1 (9.5-10.6)	0.6 (0.5-0.6)	0.7 (0.6-0.8)	0.6 (0.5-0.9)	2.4 (2.1-2.9)	6.9 (6-7.7)	90.1 (88.7-90.9)	0.71 (0.62-0.83)
Normal (n=286)	13.5 (12.6-14.4)	0.5 (0.5-0.6)	0.7 (0.6-0.9)	0.6 (0.5-0.8)	2.1 (1.9-2.4)	6.7 (6.1-7.6)	90.8 (89.4-91.7)	0.50 (0.44-0.57)
HiperHb (n=21)	16.6±0.4 (16.1-17.2)	0.5 (0.4-0.6)	0.8 (0.7-0.9)	0.6±0.3 (0.3-1.5)	2.7±0.7 (1.7-4.5)	8.2±2.2 (5.3-13.8)	89 (87.4-91.2)	0.49±0.13 (0.32-0.83)
*Sonicular normal dagılım gosteren parametrelerde ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum, normal dagılım gostermeyen parametrelerde ise ortanca ve 1.- 3. ceyreklik olarak gosterilmisttir.								

THb'nin Hb subfraksiyonlarıyla olan ilişkisi Tablo 3'te özetlenmiştir.

THb düzeyi ile diyabet tanısında kullanılan SHbA1c arasında pozitif yönde zayıf korelasyon mevcutken, LHbA1c ve HbA0 ile anlamlı korelasyon yoktu. SHbA1c ile LHbA1c ve HbA0 arasında pozitif yönde güçlü korelasyon mevcuttu. THb düzeyine göre ayrılan tüm gruplar arasında anlamlı farkın olmadığı HbA1b ve HbF ile SHbA1c arasında pozitif yönde zayıf korelasyon mevcuttu (Bknz Tablo 3).

TARTIŞMA

HbA1c klinik biyokimya laboratuvarlarında diyabet tanı ve takibinde kullanılan tanısal testlerden biri olup, HPLC ile analiz edildiğinde HbA1a, HbA1b, HbF, LHbA1c, SHbA1c, HbA0 subfraksiyonları ile birlikte rapor edilir ancak sadece SHbA1c klinisyenlerin değerlendirilmesine sunulur.

Çalışmamızda prediyabet ve diyabet hastalarında LHbA1c normallere göre anlamlı yüksekti ($p=0.0001$) ve LHbA1c ile SHbA1c arasında yüksek korelasyon mevcuttu ($r=0.783$, $p=0.0001$). HbA1c sentezi sırasında oluşan ve erken glikasyon ürünü olan LHbA1c, daha ileri reaksiyon ve düzenlemelerle günler ve/veya haftalar sonra inflamasyon, oksidatif stres, tromboz, vas-

küler hasar gibi bozukluklara neden olan ileri glikasyon ürünlerine (advanced glycation end products-AGEs) dönüşebilir ve bu ürünler diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarının gelişiminde rol oynar¹⁹. Plazma glukozunun akut değişikliklerinden etkilenen Labil HbA1c'nin ayrı elüe edilmesi, HbA1c'nin son 3 aylık plazma glukozunu doğru yansıtması açısından önemlidir¹⁵. Tosoh G8 cihazında, yüksek LHbA1c'nin (glukozun 1000 mg/dLye kadar olan düzeylerine kadar) SHbA1c'yi interfere etmediği belirtilmiştir¹⁸. Diyabetik retinopatili hastalarda yapılan bir araştırmada, açlık kan şekeri ve HbA1c'nin yanısıra LHbA1c'nin de hiperglisemik durumu yorumlama ve takipte faydalı olabileceği belirtilmiştir²⁰. Bizim çalışmamız da diyabetik hastalarda SHbA1c ile yüksek korelasyon gösteren ancak THb ile korelasyonu saptanmayan LHbA1c düzeylerinin hastaların hiperglisemi durumlarına daha ayrıntılı bilgi sağlayacağını destekler niteliktedir. Ancak çok yüksek glukoz değerlerinin hem labil hem de stabil HbA1c ölçümünü etkileyebileceği akılda tutulmalıdır. Diyabet ve prediyabetik gruplarda normal gruplara göre daha yüksek bulunan ve SHbA1c ile zayıf da olsa korelasyonları mevcut olan HbA1a ve Hb1b de, SHbA1c'nin yanı sıra DM hastalarının değerlendirilmesinde faydalı olabilir²¹.

Tablo 3. THb ile Hb subfraksiyonları arasındaki ilişki

		THb	HbA1a	HbA1b	HbF	LHbA1c	SHbA1c	HbA0
THb	r		-0.221**	0.153**	-0.113*	0.073	0.109*	-0.037
	p		0.0001	0.005	0.039	0.181	0.045	0.499
HbA1a	r			0.176**	0.501**	0.387**	0.404**	-0.538**
	p			0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
HbA1b	r				-0.210**	0.251**	0.286**	-0.308**
	p				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
HbF	r					0.295**	0.234**	-0.412**
	p					0.0001	0.0001	0.0001
LHbA1c	r						0.783**	-0.847**
	p						0.0001	0.0001
SHbA1c	r							-0.932**
	p							0.0001

* $p<0.05$ olup anlamlı fark vardır.

**r korelasyon katsayısını ve kırmızı: ilişki yok, mavi: 0.000-0.49 zayıf ilişki, sarı:0.50-0.69 orta ilişki, yeşil: ≥ 0.70 güçlü ilişkiyi ifade eder.

Çalışmamızda normal ile anemik gruplar arasında SHbA1c açısından anlamlı fark bulunmadı. Bu durum farklı anemi türlerinin HbA1c'yi farklı yönde etkilemiş olmasından kaynaklı olabilir²². Hiperhemoglobinemik grupta ise LHbA1c ($p=0.004$) ile SHbA1c ($p=0.014$) düzeyleri normallere göre anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca THb düzeyi ile SHbA1c arasında zayıf pozitif yönde korelasyon mevcuttu ($r=0.109$, $p=0.045$). HbA1c'nin tek başına bir analit olmaması ve total hemoglobin miktarlarına göre oluşmasından dolayı hemoglobinin konsantrasyonundaki birey içi ve bireyler arası farklılıklar HbA1c sonuçlarını etkilemiş olabilir. Bu değişimi bertaraf etmek için HbA1c sonuçlarına ek olarak SHbA1c/THb oranı verilebilir. Ancak bu oranı elde etmede HbA1c ve THb için iki ayrı ölçüm yapılması gerekir. Bu da ayrı iki ölçüm belirsizliğin işin içine girmesine sebep olacaktır. Bu yüzden her iki ölçümü de yapabilen özgüllüğü iyi ve klinik olarak doğruluğu yüksek bir analitik cihazın kullanılması ideal olacaktır¹⁰.

THb düzeyine göre ayrılan tüm gruplarda Hb1b açısından anlamlı fark saptanmaması ve Hb1b'nin SHbA1c ile zayıf da olsa korele olmasından dolayı özellikle hiperhemoglobinemiklerde Hb1b'inde değerlendirilmesi, gliseminin yorumlanmasına LHbA1c gibi yardımcı test olabilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada Hb1b'nin diyabetik nefropatili hastalarda erken dönemde yükselebileceği de belirtilmiştir²³.

Çalışmamızda hiçbir hastanın kromatografik analizlerinde yüksek HbF ve anormal varyant pikine rastlanmadı. Ancak, asemptomatik HbF veya minör hemoglobinopatisi olan hastalarda yanlış HbA1c sonuçlarının saptanabileceği unutulmamalıdır^{7,24}. Çalışmamızda SHbA1c ile LHbA1c arasında pozitif yönde güçlü korelasyonun olması bize LHbA1c/SHbA1c oranlarına bakılarak, bu oranın HbA1c bandında anormal pikin tespitinde yararlı olabileceğini düşündürdü²⁵. Ayrıca HbA1c değerleri klinikle uyumsuz gelen hastalara hematolojik değerleri de göz önünde bulundurularak hemoglobin varyant analizi yapılabilir ve sonuçlarına göre HbA1c düzeyleri yeniden yorumlanabilir.

Çalışmamızda hastaların plazma glukoz, üremi, lipit ve anemi paneli sonuçlarıyla Hb kromatografi değerlerinin karşılaştırılmaması hastalardaki metabolik durumun daha geniş yorumlanması açısından bir kısıtlılık yaratmıştır. Yine bu hastaların varyant analizleri yapılarak hemoglobinopati açısından da değerlendirilmesi, daha doğru HbA1c sonuçları elde etmek adına uygun bir yaklaşım olacaktır. Ancak bu analizler multidisipliner olarak değerlendirme gerektirmesi ve maliyet etkin olmaması açısından çalışmamızda uygulanamamıştır. Bu bağlamda klinik bölümlerle işbirliği yapılarak daha çok hasta ile daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Özetle; yapılan çalışmalarda HbA1c ölçüm sonuçlarının pek çok faktörden etkilendiği raporlanmıştır. Bu faktörler göz önünde bulundurularak, hastaların SHbA1c ile diğer Hb subfraksiyonlarını ve total hemoglobini birlikte değerlendirmek hastaların glisemi durumlarını yorumlamak açısından daha doğru olacaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın veri toplama aşamasında desteği olan Uz. Dr. Fahriğür Dede'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. States U, Health N, Survey NE, et al. Diabetes Mellitus. Tietz Textb Clin Chem Mol Diagnostics. 2012; 6th Ed.:1415-1456.
2. Harvey R. F. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 5th Edition.; 2011.
3. Schnek AG, Schroeder WA. The relation between the minör components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and

starch block electrophoresis. JAm Chem Soc 1961;83:1472-8.

4. Gürdöl F. Tıbbi biyokimya. Nobel Kitabevleri. 2015:107-108.
5. Dorsey JL, Becker MH, Al. E. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. Diabetes Care. 2018;41(1):55-64.
6. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. Clin Chim Acta. 2013;418:63-71.

7. Piehler AP, Grimholt RM, Bjerner J, Buchmann MS. Interference of common haemoglobin variants with the Tosoh G7 standard mode HbA1c method. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(5):362-366.
8. Welsh KJ, Kirkman MS, Sacks DB. Role of glycosylated proteins in the diagnosis and management of diabetes: Research gaps and future directions. *Diabetes Care.* 2016;39(8):1299-1306.
9. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011;34:61-99.
10. Weykamp C, John WG, Mosca A. A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol.* 2009;3(3):439-445.
11. Flückiger R, Mortensen HB. Glycated Haemoglobins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1988;429:279-292.
12. Prome D, Blouquit Y, Ponthus C, Prome JC, Rosa J. Structure of the human adult hemoglobin minor fraction A(1b) by electrospray and secondary ion mass spectrometry: Pyruvic acid as amino-terminal blocking group. *J Biol Chem.* 1991;266(20):13050-13054.
13. Singh K, Mahajan B, Singh S, Mahdi AA. Labile hemoglobin A1c: a factor affecting the estimation of glycated hemoglobin. *J Clin Exp Investig.* 2018;8(4): 124-126.
14. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem.* 2002;48(3):436-472.
15. Cox T, Hess PP, Thompson GD, Levinson SS. Interference with glycated hemoglobin by hemoglobin F may be greater than is generally assumed. *Am J Clin Pathol.* 1993;99(2):137-141.
16. Weykamp C. HbA1c: A review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med.* 2013;33(6):393-400.
17. Randie R. Little, Curt L. Rohlfing, Steven E. Hanson, Robert L. Schmidt C-NL, Richard W. Madsen and WLR. The effect of increased fetal hemoglobin on seven common HbA1c Assay methods. *Clin Chem.* 2012;58(5):945-947.
18. Little R. Laboratory Procedure Manual Analyte: Glycohemoglobin in Whole Blood. Univ Minnesota Columbia Columbia, Missouri. NHANES 2011-2012.
19. Advanced Glycation End Products: Building on the Concept of the "Common Soil" in Metabolic Disease. HH Ruiz, R Ramasamy, AM Schmidt. *Endocrinology.* 2020;161(1):bqz006.
20. Göktaş A, Karakükçü Ç, Ataş M, Demircan S. Labil Hemoglobin A1c ve Tip II Diyabetik Retinopati Arasındaki İlişki. *Retina-Vitreus.* 2012;20(2):124-128.
21. The clinical value of the different component of glycosylated hemoglobins. J Yuzhang, JI Sujing, YIN Xande, LU Weihua - *Laboratory Medicine*, 2008; 04.
22. Sakamoto N, Hu H, Nanri A, et al. Associations of anemia and hemoglobin with hemoglobin A1c among non-diabetic workers in Japan. 2020; 11(3): 719-725.
23. Saiedullah M, Hayat S, Kamaluddin SM, Begum S. Association of glycated minor hemoglobin fraction of A 1 with microalbuminuria and glycemic status in diabetic subjects. *Diabetes Endocr J.* 2012; 40(1): 14-16
24. Yatcoff RW, Tevaarwerk GJM, Clarson CL, Warnock LM. Interference of fetal hemoglobin and labile glycosylated hemoglobin with measurements of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem.* 1983;29(3): 543-545.
25. Falsely C, Hemoglobin L. Labile Hemoglobin A 1c Threshold Is Useful in Identifying the Hemoglobin J Variant, Which Concentrations. 2017; (November): 464-465.