

**GELECEĞİN UZMANLARI TARTIŞIYOR – 2**  
*HbA1c Ölçümünde HPLC / İmmunoturbidimetrik Yöntem*

## HEMOGLOBİN 1AC ÖLÇÜMÜNDE HPLC

**Arzu Ateş**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD.

Diyabetes mellitus, 2022’de güncellenen Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği’nin (TEMĐ) kılavuzuna göre insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik geniş spektrumlu bir metabolizma bozukluğudur (1).

Etyolojisi %90 Tip 2 DM’dir. Altta yatan genetik sebepler yoksa iyi bir yaşam tarzına adaptasyonla aslında önlenabilir bir hastalıktır. Tip 2 DM yıllarca asemptomatik kalabilir. Kronik bir hastalık olduğu için erken teşhis, hastalığın ve komplikasyonlarının takibi açısından önemlidir (1).

Tanıda TEMĐ kılavuzuna göre %5.7-%6,4 arası HbA<sub>1c</sub> Prediyabet olarak tanımlanır ve tedavi edilmesi gerekir. HbA<sub>1c</sub> %6,5 ve üzeri ise Aşkar DM tanısı konur.

Normalde sağlıklı bir insanda hemoglobinin %90’ı HbA<sub>0</sub> şeklindedir. Globinin beta alt zincirinin N terminal ucunda valin kalıntısına enzimatik olmayan yolla glukoz bağlanmasıyla HbA<sub>1c</sub> oluşur. Eğer bu uca fruktoz 1.6 bifosfat bağlanırsa HbA<sub>1a1</sub>, glukoz 6 fosfat bağlanırsa HbA<sub>1a2</sub>, pirüvik asit bağlanırsa HbA<sub>1b</sub> oluşur. Normalde HbA<sub>1c</sub> oluşurken erken evrede labil HbA<sub>1c</sub> oluşur. Bağlanma, geri dönüşümlü olduğu için hiperglisemide akut değişiklikleri gösterdiğinden kronik süreçte diyabet takibi için yol gösterici değildir. Stabil HbA<sub>1c</sub> ise daha kararlıdır, yarı ömrü eritrosit yarı ömrüne bağlı olduğu için diyabetin takibinde asıl önerilen subfraksiyondur (2).

Hemoglobin A<sub>1c</sub>’nin avantajları; ölçüm için açlığa gerek olmaması, uzun dönem glisemiyi göstermesi, DM komplikasyonlarıyla ilişkisinin güçlü olması ve bireylerarası varyasyonunun düşük olmasıdır. Dezavantajları ise Tip 2 DM’nin sadece %30’una tanı koydurabilmesi, açlık kan şekere göre sensitivitesinin düşük olması, insülin sekresyonu ve insülin direnci ile ilişkisinin zayıf olması, hemoglobine bağımlı bir molekül olmasından dolayı eritrosit yaşam süresinin etkilendiği durumlardan (gebelik, kan transfüzyonu, hemodiyaliz, G6PD eksikliği ve çeşitli hemoglobinopatiler) etkilenmesidir (1).

Hemoglobin A<sub>1c</sub> immünotürbidimetrik, enzimatik, kapillerelektroforez ve boronatafinite gibi yöntemlerle ölçülebilse de “Diabetescontrolandcomplications trial” çalışmasına ve Amerika “Ulusal Glikehemoglobin Standardizasyon Programı”na göre altın standart ve referans metod olan yüksek basınçlı/performanslı likidkromatografi yöntemi ile ölçülmesi önerilmektedir. Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği de HbA<sub>1c</sub> için HPLC yöntemini önermektedir (2).

Kromatografi, bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin bir kolon üzerinde (genellikle katı bir destek) sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içerisinde farklı hızlarda hareket etmeleri sonucu bileşenlerin farklı zamanlarda kolonu terk etmesi prensibine göre çalışır. Sonunda küçük moleküllerin büyük moleküllerden ayrılarak kantitatif ölçülmesini sağlar (3).

Kromatografinin sınıflandırılmasında HPLC; ayrılma mekanizması olarak iyon değişimi, uygulama biçimine göre kolon, faz tipine göre sıvı, amacına göre nitel başlıkları altında değerlendirilebilir. Hemoglobin A<sub>1c</sub> ölçümünde, EDTA’lı tüpe alınan örnek, manuel ön işlem gerektirmeden raklarla cihaza sürülür. İlk etapta eritrositler hemoliz olur, sonrasında yıkanır. Ardından en az 200 bar gücünde sıvı enjekte edilerek hemoglobin moleküllerinin sabit faz kolonu üzerinde katyonik yüklerine göre gruplanarak ayrılması sağlanır. Katyonik yükü en fazla olan hemoglobin kolonda en uzun süre tutunur. Sonrasında bir dedektör yardımıyla 420 nm dalga boyunda spektrofotometrede kantitatif ölçüm yapılarak kromatogramlar elde edilir. Ayrılan hemoglobin subfraksiyonları farklı zamanlardaki piklerle belirlenmiş olur (3).

Hemoglobin A<sub>1c</sub> tek başına bir analit olmadığı, hemoglobine bağımlı bir molekül olduğu için ölçülen HbA<sub>1c</sub>, total hemoglobine oranlanır ve elde edilen sonuç NGSP önerisine göre “%” cinsinden verilir.

Ama IFCC'ye göre "mmol/mol" cinsinden de verilebilir. Bu iki sonuç birbirine aşağıdaki formülle bağlanmıştır (4):

$$\text{IFCC} = (\text{NGSP} - 2,15) * 10,929$$

Eğer bilirubin düzeyi <60 mg/dl, glukoz<1000 mg/dl, trigliserit<5680 mg/dl ve HbF<%10 ise HbA<sub>1c</sub> ölçümünde interferansa neden olmaları beklenmemektedir (4).

Diyabetin tanısı ve takibinde laboratuvar analizleri için önerilen kılavuzlara göre HbA<sub>1c</sub> ölçümünde HPLC için analitik belirsizliğin %2.9 ve altında, biasın %2.2 ve altında, toplam hatanın %6.9 ve altında olması önerilmektedir (5). Biz de laboratuvarımızda HbA<sub>1c</sub>'yi HPLC yöntemi ile ölçmekteyiz. Kitimizin LoD< %3, ölçüm aralığı %3 -%18, intraassay ve interassay CV %3 ve altındadır yani kılavuzların önerileri doğrultusundadır (4).

Yapılan birçok çalışmada HPLC, diğer yöntemlerle kıyaslanmıştır. Çoğunun ortak sonucu, elde edilen HbA<sub>1c</sub> sonuçlarının benzer olduğu, aradaki farkların klinik kararı anlamlı yönde etkilemediği şeklindedir. Ancak bu çalışmaların çoğu rastgeledir ve bazılarında hemoglobinopatisi olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu yüzden sonuçlar benzer çıkmış olabilir. Ancak sadece hemoglobinopatisi olan hastaların değerlendirildiği spesifik çalışmalarda HPLC ve kapillerelektroforezde hemoglobin varyantları ayrıştırılmıştır (6). Bu sayede hem hemoglobinopatisi hem diyabetes mellitusu olan hastalar değerlendirilebilmiştir. Aksi takdirde immünotürbidimetrik yöntem gibi manuel ön işlem gerektiren, immünojenik reaksiyondan dolayı ciddi interferansa sebep olabilen yöntemlerde HbA<sub>1c</sub> beklenen değerlerden düşük ya da yüksek saptanıp klinik yanığa sebep olabilir.

Bu yüzden HbA<sub>1c</sub> ölçümünde HPLC;

\*altın standart ve referans metod olduğu için,

\*direk stabil HbA<sub>1c</sub>'yi ölçtüğü için,

\*manuel ön işlem gerektirmediği için,

\*yüksek analitik performansından dolayı şeffaf ayrışma sağladığı için,

\*yüksek rezolüsyonlukromatografi ile hemoglobin varyantlarını (HbC, HbD, HbE, HbS) da ayrıştırabildiği için,

\*hızlı ve otomatik sonuç verdiği için,

\*düşük interferansa uğradığı için,

\*SUT Ek-2B'de "HbA<sub>1c</sub> ölçümünde HPLC sadece 3. Basamak sağlık hizmeti sunucularında ve 3 ayda bir faturalandırılır" ifadesi olduğu için, tercih edilmelidir.

#### Kaynaklar

1. Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, Diyabetin Tanı, Tedavi ve Komplikasyonları Kılavuzu 2022
2. Akpınar K., Avcı E., Demir S. Diyabetik Hastalarda Hemoglobin Subfraksiyonları ve Total Hemoglobinin Değerlendirilmesi. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2020;18(3):157-164
3. Emekli ve Yiğitbaşı. İstanbul Medipol Üniversitesi. Klinik Biyokimya, Kromatografi
4. Lifotronic H9, Hemoglobin A1C reaktif kit prospektüsü
5. 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
6. Anping Xu, MM, Weidong Chen, Miao Xu, MM, Weije Xie, and Ling Ji, MD. Identification of hemoglobin variants prevalent in China and their effects on hemoglobin a1c measurements. Am J Clin Pathol 2022;157:852-857

## HbA<sub>1c</sub> ÖLÇÜMÜNDE HPLC'YE KARŞI İMMUNOTURBİDEMETRİK YÖNTEM

Harun Şentürk

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

### Glikolize Hemoglobin

Nonenzimatik olarak şekerlerin hemoglobinin amino gruplarına eklenmesi sonucu glikolize hemoglobinler oluşur.

Erişkin insanlarda total hemoglobini %97 HbA, %2.5 HbA<sub>2</sub> ve 0.5 HbF oluşur.

Kromatografik analizlerde ayrıca minör hemoglobinlere de rastlanır.

Bunlar HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub>'dir. Kolektif olarak HbA<sub>1</sub> olarak isimlendirilirler.

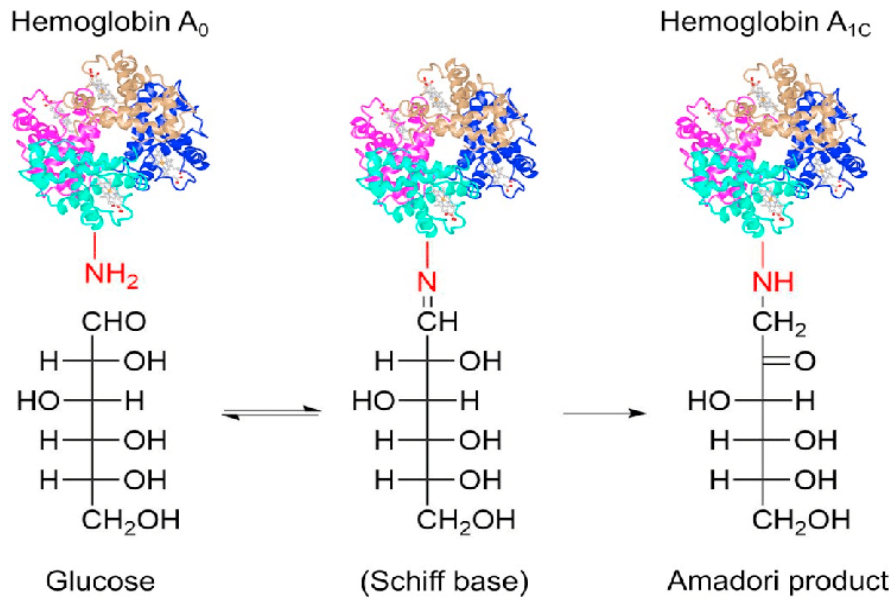
HbA'nın β zincirinin N terminal valinine glukozun kondenzasyonu sonucu Schiff bazı (aldimin) oluşur.

Bu moleküle pre-HbA<sub>1c</sub> veya labil HbA<sub>1c</sub> denir.

Bu tepkime tersinirdir.

Schiff bazı Amadori yeniden düzenlemesi ile stabil ketoamine (HbA<sub>1c</sub>) dönüşür.

HbA<sub>1</sub>'in %80'ini HbA<sub>1c</sub>'den oluşur.



- HbA<sub>1a1</sub> → Fruktoz 1-6 difosfat
- HbA<sub>1a2</sub> → Glukoz 6 fosfat
- HbA<sub>1b</sub> → Pirüvik asit → Diğer karbonhidrat bağlı hemoblobinlerle total glikolize hemoglobini oluştururlar.
- HbA<sub>1c</sub> → Glukoz
- Pre-HbA<sub>1c</sub>

### Ölçüm Yöntemleri

Ölçüm yöntemleri iki gruba ayrılabilir.

1)Yapısal Farklılığa Dayanan Yöntemler • İmmun Yöntemler

- Affinite Kromatografisi

2)Yük Farklılığına Dayana Yöntemler • İyon Değişim Kromatografisi

- Elektroforez

- İsoelektrik Fokuslama

- HPLC'de iyon değişim veya affinite kromatografisi kullanılır.

- İmmun turbidemetrik yöntemlere örnek olarak TİİA(turbidemetrik inhibisyon immunassay) ve PGİT(parçacıkla güçlendirilmiş immünassay) verilebilir.

### İmmunoturbidemetrik Yöntemlerin Üstün Yanları

- HPLC, turbidemetrik immün yöntemlere göre daha pahalıdır.[1]
- Daha fazla teknik çalışana ihtiyaç duyulur ve ekipmanları daha pahalıdır.
- Öte yandan immün yöntemlerde sonuçlar kolayca turbidemetre ile ölçülebilir.
- Ayrıca bu yöntemler HPLC'den ucuz ve hızlıdır.
- Antikorlar, glukoza ve N terminalde bulunan 4 ten 8'e kadar olan amino asitlere bağlanır[2]
- Antikorlar, pre-HbA<sub>1c</sub>'ye, HbA<sub>1a</sub> ve Hb<sub>1b</sub>'ye bağlanmaz.
- HPLC'de ise pre-HbA<sub>1c</sub>'nin ölçümde interferansa neden olabilir(?)

### HbC ve HbS Taşıyıcılığının Interferansı

- NGSP'nin yaptığı derlemeye göre immün yöntemlerden **Beckman HbA<sub>1c</sub> Advanced B93009 Online, B00389 Manual, Roche Cobas Integra Gen2, Roche Tina-quant II, Roche Cobas c513 yöntemlerinde** klinik olarak anlamlı interferans olmadığı belirtilmiştir.

- Öte yandan HPLC yöntemlerinden **Arkray ADAMS HA-8180V Variant Mode, Arkray ADAMS A1c HA-8190V Variant Mode Bio-Rad D-100, D-10 Bio-Rad Variant II Bio-Rad Variant II Turbo 2.0, Tosoh G11 Variant Mode V3.06, Trinity (Primus) Boronate Affinity** klinik olarak anlamlı interferans olmadığı belirtilmiştir.

- **Tosoh G7 Variant Mode** için bazı çalışmalarda HbC için interferans olduğu bazı çalışmalarda ise olmadığı belirtilmiştir. HbS için ise olmadığı belirtilmiştir

- **Tosoh G8 Variant Mode (\*Denotes software ver. 5.24 & 5.28)** yine benzer şekilde hem HbC ve HbS için kimi çalışmalarda interferans olduğu, bazı çalışmalarda ise olmadığı belirtilmiştir.

### **HbE ve HbD Taşıyıcılığının İnterferansı**

Little ve arkadaşlarının yaptığı 1 çalışmada [1] 9 farklı immün yöntem ve 10 farklı iyon değişim HPLC yöntemi ile HbE ve HbD taşıyıcılığının HbA<sub>1c</sub> ölçümüne olan interferansı incelenmiştir.

Bu çalışmada HbE ve HbD taşıyıcılığının kullanılan immün yöntemlerde klinik olarak anlamlı bir interferansa sebep olmadığı gösterilmiştir.

Fakat bazı iyon değişim HPLC yöntemlerinde interferans gözlemlenmiştir.

- Öte yandan boronat affinite HPLC yönteminde interferans gözlemlenmemiştir.

National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)'ye [2] göre bir immün yöntemle spesifik veri olmadığı sürece immün yöntemlerde genel olarak HbE ve HbD'nin interferansa neden olmayacağı varsayılabilir.

Çünkü antikorlar  $\beta$  zincirinin N terminaline bağlanırken HbE ve HbD'deki mutasyonlar N terminalinden uzaktadır.

### **Üremik Hastalarda Karbamide Hemoglobinin İnterferansı**

Weykamp ve arkadaşları karbamide hemoglobinin interferansına bakmışlar.

Bu çalışmada kullanılan tüm iyon değişim HPLC yöntemlerinde yanlış olarak yüksek HbA<sub>1c</sub> değerleri görülmüştür.

Çünkü ürenin hemoglobinle reaksiyona girdiği bölge ile glukozun girdiği bölge aynı ve HbA<sub>1c</sub> ve ayrıca karbamide hemoglobinin isoelektrik noktaları da aynı.

Bu iki nedenden dolayı yük farklılığına dayanan yöntemlerde yanlış sonuçlar alınmasını sürpriz olarak görmemişler.

İmmün yöntemlerde ise büyük bir farklılık görülmemiştir.