

## Hemoglobin Varyantının HbA1c Ölçümüne Etkisi

Berrak GÜVEN<sup>a1</sup>, Murat CAN<sup>1</sup>, Zeynep ESKİCİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

### ÖZET

HbA1c testi diabetes mellitusun tanısı ve takibinde kullanılmaktadır. Bu olgu sunumunda, klinik ile uyumsuz HbA1c sonucuna sahip bir hasta sunulmuştur. İleri araştırmalar asemptomatik hemoglobin varyantının bu uyumsuzluğa neden olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Diabetes Mellitus, HbA1c, hemoglobin varyant

### ABSTRACT

#### The Effect Of Hemoglobin Variant On HbA1c Measurement

HbA1c test is used in diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. In this case report, a patient was presented that had discordance between clinical status and HbA1c result. Further investigations showed asymptomatic hemoglobin variant was caused this discordance.

**Key Words:** Diabetes Mellitus, HbA1c, hemoglobin variant

**H**bA1c, diabetes mellitusun uzun dönemli glisemik kontrolünün değerlendirilmesinde kullanılan ve bu hastalarda komplikasyon gelişme olasılığını gösteren değerli bir testtir. Amerikan Diyabet Cemiyeti'nin (ADA) önerisine göre kronik komplikasyonların önlenmesi ve/veya azaltılması için HbA1c'nin %7'nin altında tutulması gerekmektedir (1). ADA'nın son yayınladığı raporlara göre HbA1c ölçümlerinin standardizasyonun artmasıyla beraber HbA1c testi diyabetin tanı kriterleri arasına girmiştir (2).

Normal erişkin hemoglobini (Hb A) dört polipeptit (2 $\alpha$  ve 2 $\beta$ ) zincirinden oluşur.  $\beta$  zincirinin N-terminal bölgesi ile glukoz arasında oluşan geri dönüşsüz nonenzimatik glikasyon reaksiyonu sonucu HbA1c oluşur. Reaksiyonun oluşumu 2 aşamalıdır; ilk basamakta hemoglobin ile glukoz birleşerek kararlı olmayan Schiff bazı yapısını (aldimin) oluşturur, ikinci basamakta ise oluşan Schiff bazı düşük kan şekeri düzeylerinde parçalanarak ayrılırken, yüksek kan şekeri düzeylerinde Amadori yeniden düzenlenmesi ile kararlı bir ketoamin yapısındaki HbA1c'i oluşturur (3). Bu reaksiyon kan glukoz konsantrasyonlarına ve eritrositlerin glukozla maruz kalma süresine bağlı olarak eritrositlerin yaşam süresi boyunca meydana gelir. Bu nedenle HbA1c ölçümü eritrosit yaşam süresi (120 gün) ile ilişkili olarak son 3 aylık glisemi düzeyleri hakkında bilgi verir. Yaş, cins, ırk ayrımının test üzerinde klinik etkisinin olmaması, günün herhangi bir saatinde yapılabilir olması ve testin pahalı olmaması bu testin yaygın olarak kullanımına izin verir (3).

HbA1c ölçümü için birçok farklı analitik metot kullanılmaktadır. İmmünoölçüm, yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC) ve boronat affinite kromatografisi en yaygın olarak kullanılan metotlardır (4). Bu yazıda altın standart olarak kabul edilen HPLC metodu ile ölçülen kliniği ile uyumsuz HbA1c sonucuna sahip bir olgu sunduk.

### OLGU SUNUMU

Hastanemiz polikliniğine başvuran 55 yaşında bayan hasta, hepatit şüphesi ile araştırılmıştır. Hastanın laboratuvar bulguları; HbsAg pozitif, AntiHBs negatif, karaciğer fonksiyon testleri (AST 16 IU/L, ALT 17 IU/L) ve hemoglobin düzeyi (Hb 13.4 g/dl) referans aralıkları (AST:<34 IU/L, ALT:10-49 IU/L, Hb:12.0-18.0 g/dl) içerisinde tespit edilmiştir. Rutin testleri arasında istenen açlık kan şekeri düzeyi 116 mg/dl tespit edilince klinisyen tarafından hastanın laboratuvar paneline HbA1c testi eklenmiştir.

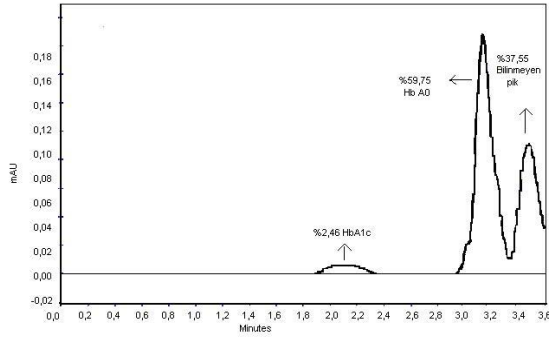
HbA1c ölçümü laboratuvarımız bünyesinde HbA1c'nin ticari kiti (Recipe, Munich, Germany) kullanılarak HPLC cihazında (Zivak, Gebze, Turkey) cihazında yapıldı. Bu hastanın HbA1c ölçümündeki kromatogram görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir. Hastanın HbA1c değeri %2.47 ölçüldü. Yapılan analizde tanımlanamayan bir pikin varlığı ve buna bağlı olarak yanlış düşük HbA1c sonucu elde edildiği görüldü. Anormal pik tespit edilen hasta örneğinden hemoglobin varyant kiti (Recipe, Munich, Germany) ile HPLC cihazında hemoglobin varyant incelemesi yapıldı. Hemoglobin varyant incelemesi sonucunda Hb S (%39.02), Hb A (%50.88), Hb F (%3.65), Hb A2 (%3.02) değerleri Şekil 2'de verilen kromatogramda gösterildi.

Hasta örneğinden eş zamanlı olarak Dimension RXL otoanalizör cihazında (Siemens Healthcare Diagnostic, IL,

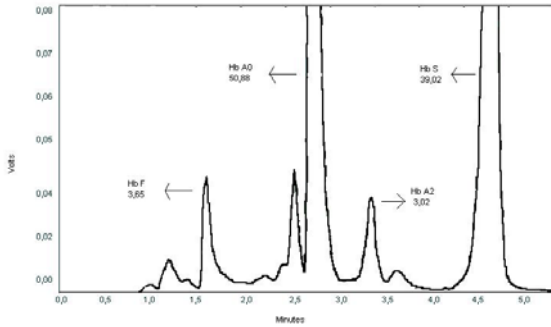
<sup>a</sup> Yazışma Adresi: Dr. Berrak GÜVEN, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye  
e-mail: berrak\_guven@hotmail.com

Tel: 0 372 2612839

USA) aynı markalı kitlerle immünoölçüm yöntemle yapılan analiz sonucunda HbA1c değeri %4.8 (referans değer < %6) olarak bulundu. Bu çalışma sonucunda klinisyenle iletişime geçilip hastanın hemoglobin varyantı açısından da değerlendirilmesi görüşü bildirildi.



**Şekil 1.** HPLC ile ölçülen HbA1c analizi



**Şekil 2.** HPLC ile ölçülen hemoglobin varyant analizi

## TARTIŞMA

HbA1c ölçümü diabetes mellitusun tanısında ve takibinde yaygın olarak kullanılır. Ülkemizde 35 yaş üstü popülasyonun %11'i diabetes mellitus (2.89 milyon) hastasıdır ve bu sıklık gün geçtikçe artmaktadır (5). Hemoglobinin bozukluklarının heterozigot taşıyıcıları dünya popülasyonunun yaklaşık %7' sini oluşturmaktadır ve ülkemizde de sık olarak gözlenmektedir (4,6).

HbA1c ölçüm yöntemleri, glikozillenmiş hemoglobinin iyon farkına göre ölçüm yapanlar ve glikozillenmiş hemoglo-

binin yapısal farklılığına dayananlar olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir. Yük farkına dayalı olan analiz metotları HPLC, elektroforez ve izoelektrik odaklama metotlarını içerir. Yapısal farklılığa dayananlar ise boronat affinite kromatografisi ve immünoölçüm yöntemleridir. Hemoglobinin  $\beta$  zincirinin N-terminalindeki glikozillenmiş amino asitleri tanıyarak HbA1c ölçümü yapan immünoölçüm yöntemleri ile HbA1c ve diğer hemoglobinler arasındaki yük farkına dayalı ölçüm çeşidi olan HPLC metodu en sık uygulanan ölçümlerdendir (7). Tran ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, immünoölçüm ve HPLC sistemlerinin HbA1c ölçümleri karşılaştırılmış, hem immünoölçüm yöntemlerinin hem de HPLC sistemlerinin kabul edilir sistemler olduğu, fakat HPLC analizörlerin daha üstün analitik performansa sahip olduğu gösterilmiştir (8).

Hemoglobin  $\beta$  zincirinde tek bir amino asit değişimi nedeniyle oluşan hemoglobin varyantlarının varlığının, HbA1c sonuçlarında interferansa neden olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (9,10). Camargo ve ark. 2001-2006 yılları arasında diyabet polikliniğinde takip edilen 29.657 hastanın 130'unda HPLC ile analiz edilen HbA1c sonuçlarını referans aralığının altında tespit etmişlerdir. Bu hastaların örneklerine daha sonra Hb elektroforezi uygulanmış ve hastaların %56'nın hemoglobin varyantına sahip olduğu gösterilmiştir (11). Chu ve ark. HPLC yöntemi ile HbA1c çalışılan 1434 hastayı incelediğinde 11 hastada çeşitli hemoglobin varyantlarının yanlış HbA1c sonuçlarına neden olduğunu belirlemişlerdir (12). Hemoglobin varyantlarının heterozigot formları sıklıkla asemptomatiktir ve normal eritrosit yaşam ömrüne sahiptir.

HPLC ile yapılan ölçümlerde anormal pikler nedeniyle HbA1c sonuçlarında düşük veya yüksek sonuçlar oluşabilmektedir. Klinik biyokimya uzmanları sonuçları rapor ederken, anormal pikler açısından kromatogramları dikkatle incelemelidir. Anormal piklerin belirlendiği durumlarda farklı bir ölçüm yöntemi ile HbA1c düzeyinin yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu hastaların klinik takibinde HbA1c yerine fruktozamin düzeyleri kullanılabilir.

Sonuç olarak diyabetik hastaların takibinde hemoglobinopatilerin HbA1c ölçüm yöntemlerini etkileyerek yanlış sonuçlara neden olduğu bilinmelidir. Her ne kadar hemoglobinin varyant varlığında HbA1c sonuçlarını etkilese de, bu yöntemle pek çok asemptomatik varyant hastasının belirlenebileceği unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2003; 26: 106-108.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care 2010; 33: 11-61.
3. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D.E (Editors). Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2006: 879-884.
4. Little RR, and Roberts W L, A Review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. J Diabetes Sci Technol 2009; 3: 446-451.
5. Onat A, Hergenç G, Uyarel H, Can G, Ozhan H. Prevalence, incidence, predictors and outcome of type 2 diabetes in Turkey. Anadolu Kardiyol Derg 2006; 6: 314-321.
6. Cürük MA, Zeren F, Genç A ve ark. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia in southern Turkey. Hemoglobin 2008; 32: 525-530.

7. Sacks DB. Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: problem solved? Clin Chem 2003; 49: 1245–1247.
8. Tran DV, Lyon AW, Higgins TN, et al. Use of serial patient hemoglobin A1c differences to determine long-term imprecision of immunoassay and high-performance liquid chromatography analyzers. J Diabetes Sci Technol 2009; 3: 424-428.
9. Schnedl WJ, Liebminger A, Roller RE, Lipp RW, Krejs GJ. Hemoglobin variants and determination of glycosylated hemoglobin (HbA1c). Diabetes Metab Res Rev 2001; 17: 94–98.
10. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin Clin Chem 2001; 47: 153–163.
11. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohemoglobin measured by an HPLC method. J Clin Pathol 2004; 57: 346-349.
12. Chu CH, Lam HC, Lee JK, et al. Common hemoglobin variants in southern Taiwan and their effect on the determination of HbA1c by ion-exchange high-performance liquid chromatography. J Chin Med Assoc 2009; 72: 362-367.

*Gönderilme Tarihi: 29.07.2010*