

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği ile HbA1c ölçümünde HbF'in interferansı: olgu sunumu

Tuncer Çaycı (*), Yasemin Gülcan Kurt (*), İbrahim Aydın (*), Halil Yaman (*), Erdinç Çakır (*)

ÖZET

Diyabetes mellituslu hastaların kan glikoz düzeyinin izlenmesinde, hemoglobin A1c (HbA1c) ölçümleri yaygın olarak kullanılmaktadır. HbA1c ölçümünde değişik yöntemler kullanılmaktadır. HbA1c ölçümlerinde farklı interferanslar nedeniyle yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu makalede, bir bebeğe ait kan örneğinde, yüksek basınçlı sıvı kromatografi tekniğiyle yapılan HbA1c ölçümü esnasında meydana gelen interferansa dikkat çekilmek istenmiştir.

Anahtar kelimeler: HbA1c, HbF, HPLC, interferans

SUMMARY

Interference of HbF in HbA1c measurement by high performance liquid chromatography method: a case report

Hemoglobin A1c (HbA1c) measurements are widely used in the monitoring of blood glucose levels in patients with diabetes mellitus. Different methods are used in the measurement of HbA1c. It is possible to obtain false results in HbA1c measurement because of the effect of different interferences. In this article, an interference which occurred during measurement of HbA1c using high pressure liquid chromatography in blood sample belonging to a baby was emphasized.

Key words: HbA1c, HbF, HPLC, interference

Giriş

Hemoglobin A1c (HbA1c), hemoglobin (Hb) yapısındaki β -zincirinin N-terminal (valin) amino grubuna enzimatik olmayan bir reaksiyon ile glikozun geri dönüşümsüz olarak bağlanmasıyla oluşmaktadır. HbA1c, özellikle diyabetes mellituslu hastaların kan glikoz düzeyinin geriye dönük olarak izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1).

HbA1c ölçümünde yapısal, kimyasal ve elektriksel yük özelliklerine göre geliştirilmiş 30'dan fazla değişik yöntem kullanılmaktadır (enzimatik ve immunoassay yöntemler, iyon değiştirici kromatografi, afinite kromatografisi, kapiller elektroforez, kütle spektrometresi, vb.) (1,2).

Günümüzde HbA1c ölçümünde hem yöntemlerin farklı olması, hem de bu ölçümleri interfere eden durumların fazlalığı nedeniyle standardizasyon henüz tam olarak sağlanamamıştır.

HbA1c ölçümü GATF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile iyon değiştirici kromatografi yöntemiyle yapılmaktadır. HPLC tekniği, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı ("National Glycohemoglobin Standardization Program", NGSP) tarafından sertifikalandırılmış bir yöntemdir (1,3).

Bu makalede epilepsi ön tanısıyla tetkik edilen 4 aylık bir bebeğe ait örnekte, HPLC-iyon değiştirici kromatografi yöntemiyle yapılan HbA1c ölçümü esnasında meydana gelen interferansa dikkat çekilmek istenmiştir.

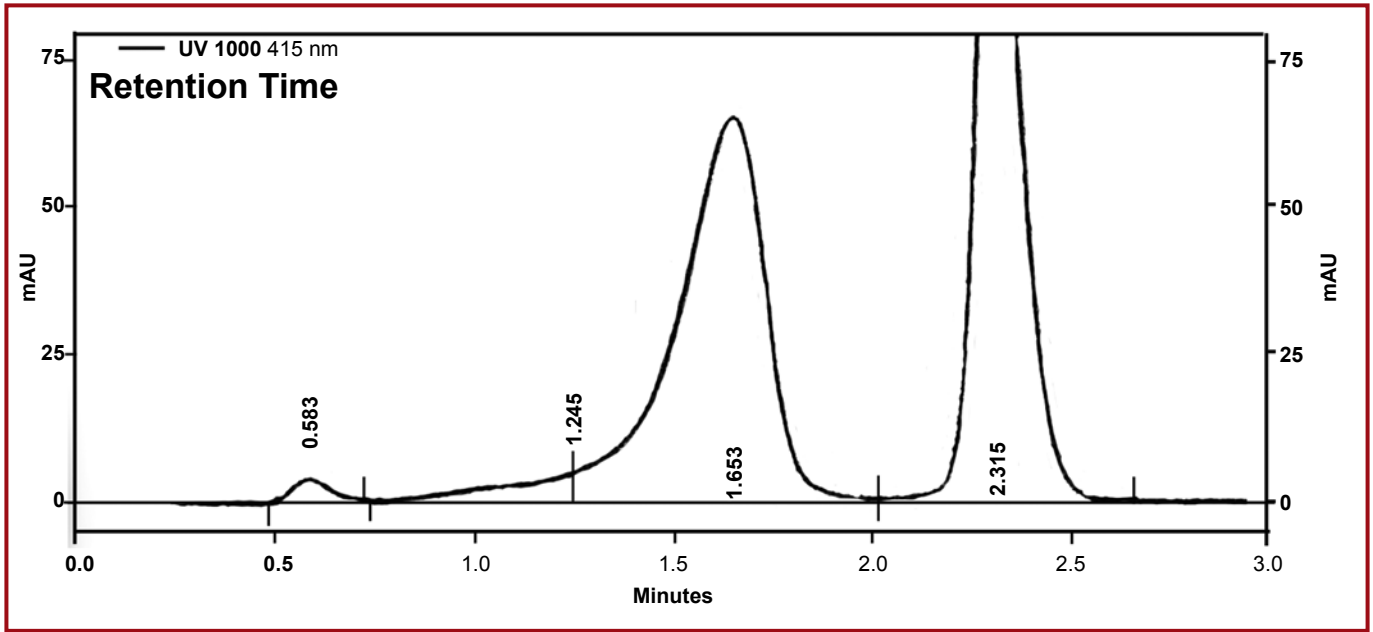
Olgu Sunumu

Üç ay 19 günlük bir erkek bebekte HbA1c tetkiki istenmiştir. HPLC ile iyon değiştirici kromatografi yöntemiyle yapılan ölçümde sırasıyla HbA %48.0 ve HbA1c %48.1 olarak bulunmuştur. Hasta sonucuna ait kromatogram Şekil 1'de sunulmuştur. Aşırı yüksek HbA1c değeri nedeniyle hasta örneğinden hemoglo-

*GATF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Aynı basım isteği: Dr. Tuncer Çaycı, GATF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Etilik-06018, Ankara
E-mail: tçaycı@gata.edu.tr

Makalenin geliş tarihi: 13.07.2010 • **Kabul tarihi:** 11.01.2011



Şekil 1. HPLC yöntemiyle yapılmış HbA1c ölçümüne ait kromatogram

bin elektroforezi yapılmış ve HbA %57.1, HbF %42.4 ve HbA2 %0.5 olarak bulunmuştur. Hastaya ait hemoglobin elektroforez sonucu Şekil 2’de sunulmuştur.

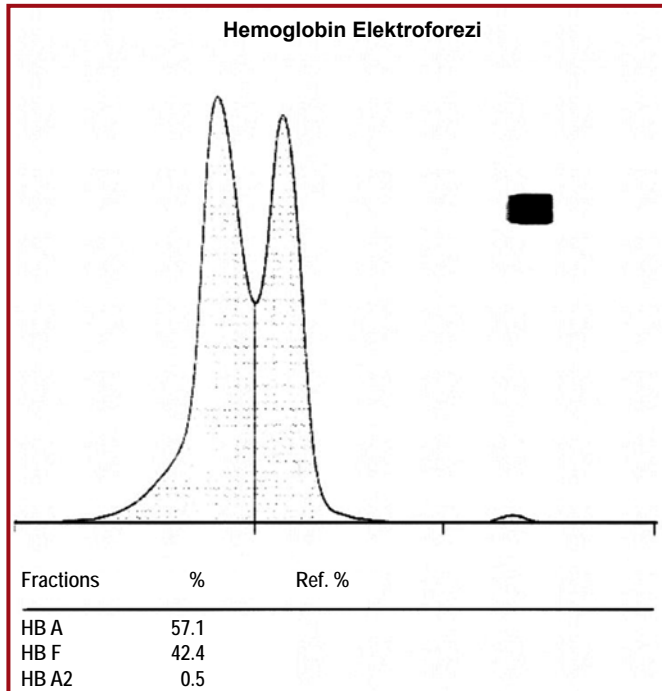
HbA1c ölçümleri, UV-1000 visible dedektörlü HPLC (Thermo Electron, Thermo finnigan (TSP) San Jose, CA, USA) cihazı ve Recipe HbA1c kiti (Recipe Chemicals-Instruments GmbH, Munich, Germany) kullanılarak yapıldı. HbA1c ölçümü için kullanılan kontrol ve standartlar Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu (“International Federation of Clinical Chemistry”, IFCC) standartlarına uygundu. HbA1c

ölçümlerine ait gün içi ve günler arası % CV değerleri sırasıyla %1.6 ve %2.4 idi. Hemoglobin elektroforezi, Sebia Hydrasys (Sebia, Parc Technologique Léonard de Vinci CP 8010 Lisses Evry Cedex, France) cihazı ile Hydragel Hemoglobin (E) kiti kullanılarak yapıldı.

Tartışma

İki alfa ve iki delta zincirinden meydana gelen HbF, fetal hayatın ana hemoglobindir. Doğum esnasında da majör hemoglobin olan HbF (%50-80) altı aydan sonra yerini yetişkin hemoglobini olan HbA’ya bırakmaktadır. Yetişkinlerde HbF düzeyi %1’in altında bulunmaktadır (4).

HbA1c ölçümleri için 30’dan fazla ölçüm yöntemi vardır ve bu ölçümler birçok faktör tarafından interfere edilebilmektedir. HPLC tekniğiyle yapılan HbA1c ölçümlerinde meydana gelen interferansa dikkat çeken çalışmalar mevcuttur. Weykamp ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada üremiye bağlı oluşan karbamile hemoglobinin iyon-değiştirici bazlı tüm HPLC yöntemlerinde, HbA1c ölçümünde yanlış yüksek sonuçlara sebep olduğu gösterilmiştir (5). Sickle cell hastalığı, homozigot HbC hastalığı ve β -talasemili hastalarda, sıklıkla HbA2 ve HbF gibi hemoglobinlerde yüzdesel bir artış gözlenir. Bu hastalardaki HbA2 ve HbF artışının hatalı yüksek HbA1c sonuçlarına sebep olduğu Bry ve ark. tarafından ileri sürülmüştür (6). Schnedl ve ark. da yüksek HbF değerleri olan hastalarda yaptıkları HbA1c ölçümlerinde benzer interferasyonu göstermişlerdir (7). Bu çalışmadaki vakanın HPLC kromatogramında, HbF pikinin HbA1c pikiyle üst üste gelmesi nedeniyle, hatalı ola-



Şekil 2. Hastaya ait hemoglobin elektroforegramı

rak yüksek HbA1c değeri tespit edilmiş ve bu sonuç, diğer çalışmalardaki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak HbF yüksekliğinin eşlik ettiği doğum sonrası ilk yıl ile yine HbF yüksekliğine neden olan birçok patolojik durumda (özellikle talasemili diyabet hastaları), HPLC ile yapılan HbA1c ölçümlerinde hatalı yüksek sonuçlar vermemek için dikkatli olmak gerektiği açıktır. Bu durumun klinisyenler tarafından da göz önünde bulundurulması önem arz etmektedir.

Kaynaklar

1. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78-89.
2. Goldstein D, Little R, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1761-1773.
3. Thevarajah M, Nadzimah MN, Chew YY. Interference of hemoglobin A1c (HbA1c) detection using ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) method by clinically silent hemoglobin variant in University Malaya Medical Centre (UMMC)--a case report. *Clin Biochem* 2009; 42: 430-434.
4. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999: 1642-1710.
5. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993; 39: 1717-1723.
6. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163.
7. Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, Trinker M, Lipp RW, Krejs GJ. Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care* 2000; 23: 339-344.