

## HbA<sub>1c</sub> Ölçümünde HPLC ve Türbidimetrik Immüno-inhibisyon Yöntemlerinin Karsilastirilmesi

Abdurrahman COSKUN<sup>1</sup>, Özlem YAVUZ<sup>2</sup>, Ramazan MEMISOGULLARI<sup>1</sup>, Hatice Kurt YÜKSEL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Yrd Doç Dr, <sup>2</sup>Doç Dr, <sup>3</sup>Asistan Dr Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce

### ÖZET

**Amaç:** Diabetes Mellitus (DM) hastalarında retrospektif glisemik kontrolün değerlendirilmesinde HbA<sub>1c</sub> ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde klinik laboratuvarlarda HbA<sub>1c</sub> ölçümü için çok sayıda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunların bir kısmı karmaşık ve pahalı yöntemlerdir. Bu çalışmada HbA<sub>1c</sub> ölçümünde kullanılan Yüksek performanslı sıvı kromatografi-High performance liquid chromatography (HPLC) ve türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemlerini karşılaştırılarak klinik laboratuvarlar için daha uygun olanını seçmeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya DM'li 178 olgu alındı. Olgulardan alınan kan örneklerinden HbA<sub>1c</sub> düzeyleri hem HPLC ve hem de türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemleriyle çalışıldı. Her iki yöntemle elde edilen veriler farklı istatistiksel teknikler kullanılarak karşılaştırıldı.

**Bulgular:** HPLC (%6.27±2.0) ve türbidimetrik immüno-inhibisyon (%6.31±2.2) yöntemleriyle ölçülen HbA<sub>1c</sub> düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0.05). Yapılan korelasyon analizinde iki yöntemin sonuçları arasında pozitif ve güçlü bir korelasyon olduğu görüldü (r = 0.934, p < 0.001).

**Sonuç:** Klinik laboratuvarlarda kullanılan HPLC yöntemi karmaşık, zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Buna karşılık türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemi basit, ucuz ve laboratuvarlarda yaygın olarak bulunan çok sayıda otoanalizörlere uyarlanabilir. Bu nedenle DM'li hastaların glisemik kontrol ve takiplerinde HbA<sub>1c</sub> ölçümü için türbidimetrik immüno-inhibisyon yönteminin HPLC'ye tercih edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Sözcükler:** Diabetes Mellitus, HbA<sub>1c</sub>, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, türbidimetrik immüno-inhibisyon

### Comparison of HPLC and turbidimetric immuno-inhibition method for determination of HbA<sub>1c</sub>

#### SUMMARY

**Purpose:** Measurement of HbA<sub>1c</sub> is widely accepted as retrospective index of glycemetic control in Diabetes Mellitus (DM) patients. Currently several different methods are used in clinical laboratories for measurement of HbA<sub>1c</sub>. However most of these methods are complicated and expensive. In the present study we aimed to make a comparison between HPLC and turbidimetric immuno-inhibition methods for determination HbA<sub>1c</sub> to decide the more suitable one for clinical laboratories.

**Methods:** One hundred and seventy eight patients with DM were included into the study. Blood levels of HbA<sub>1c</sub> were determined by both HPLC and turbidimetric immuno-inhibition methods. Data obtained from two methods were compared with various statistical techniques.

**Results:** There was no significant difference between HbA<sub>1c</sub> results measured with HPLC (%6.27±2.0) and turbidimetric immuno-inhibition (%6.31±2.2) methods (p>0.05). We also observed a strong positive correlation between both methods (r = 0.934, p < 0.001). **Conclusion:** In clinical laboratory practice HPLC method is complicated, time consuming and expensive. However turbidimetric immuno-inhibition method is simple, cheap and could be apply to most autoanalyzers which is common in clinical laboratories. We concluded that turbidimetric immuno-inhibition method should be preferred to HPLC method for measurement of HbA<sub>1c</sub> for monitoring glycemetic control in Diabetes Mellitus patients.

**Key Words:** Diabetes mellitus, HbA<sub>1c</sub>, high performance liquid chromatography, turbidimetric immunoinhibition

## GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) dünyada halk sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biridir. Halen dünyada DM'li 171 milyon hasta bulunmakta olup bu sayının 2030 yılında iki katından fazla artış gösterip 366 milyona ulaşması beklenmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde çalışan eriskinleri etkilediği için DM'nin önemi daha da artmaktadır (1).

DM'de morbidite ve mortaliteyi belirleyen en önemli faktör mikro ve makrovasküler komplikasyonlardır. Retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonların gelişme riski doğrudan glisemik kontrol derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2).

Kan glikohemoglobin (GHb) ve özellikle bunun majör bir bileşeni olan hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) düzeylerinin ölçümü DM'li hastalarda retrospektif gliseminin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (3).

İnsan yetişkin hemoglobini genellikle HbA (%97), HbA<sub>2</sub> (%2.5) ve HbF (%0.5) birimlerinden oluşmaktadır. HbA'nın yapılan kromatografik analizinde küçük farklılıklar gösteren çok sayıda alt gruptan oluştuğu gösterilmiştir. Bunlardan HbA<sub>1</sub> olarak bilinen grubun HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> ve HbA<sub>1c</sub> gibi farklı alt birimlere ayrıldığı bulunmuştur. Çok sayıda diğer proteinler gibi hemoglobinin de non-enzimatik glikasyona uğrar. HbA<sub>1c</sub>, HbA molekülünün β-zincirinin N-terminal valin kalıntısına glikoz moleküllerinin non-enzimatik eklenmesiyle meydana gelmektedir. HbA<sub>1c</sub> kandaki ana glikozile hemoglobin olup HbA<sub>1</sub>'in yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (4,5). DM'li hastalarda artış gösteren inflamasyon belirteçleri ile HbA<sub>1c</sub> arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur (6). Günümüzde DM'li hastalar için klinik önemi giderek artan HbA<sub>1c</sub>'nin ölçümü farklı laboratuvarlarda farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

Glikozile Hb ölçümü için 30'dan fazla yöntem kullanılmaktadır. Özellikle klinik laboratuvarlarda glikozile hemoglobini glikozile olmayan hemoglobinden ayırmak için yüksek farklılıkları (iyon değiş tokuş kromatografisi, izoelektrik odaklama, HPLC, elektroforez), yapısal farklılıklar (afinite kromatografisi, immünoassay metodları) veya kimyasal analizlere (fotometrik, spektrofotometrik metodları) dayanan yöntemler kullanılmaktadır. HPLC-kütle spektrometresi ve kapiller

elektroforez HbA<sub>1c</sub> ölçümünde International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) tarafından referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın HbA<sub>1c</sub> sonucu daima total hemoglobinin yüzdesi şeklinde verilir.

HbA<sub>1c</sub> ölçümü için çok sayıda farklı prensiplere dayanan yöntemler kullanılmış olmasına rağmen tüm laboratuvarlarda uygulanabilir, güvenli ve pratik bir yönteminin standardizasyonunda bazı sıkıntılar yaşanmaktadır (7-10). Glikasyon dışında çok farklı nedenlerden kaynaklanan hemoglobinin yapı ve metabolizmasındaki değişimler, HbA<sub>1c</sub> ölçümünü olumsuz yönde etkilemektedir (11). Bu çalışmada HbA<sub>1c</sub> ölçümünde rutin olarak kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile otoanalizörlerde kullanılan türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemlerini karşılaştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 40 gün boyunca hastanemize başvuran DM'li hastalardan rasgele seçilen 178 kişiden alınan kan örneklerinde HbA<sub>1c</sub> düzeyleri HPLC ve türbidimetrik immüno-inhibisyon olmak üzere iki farklı yöntemle ölçüldü. Her iki yöntem için de 12 saatlik açlıktan sonra hastalardan alınan venöz kan örnekleri EDTA'li tüplere konuldu.

### HPLC ile HbA<sub>1c</sub> Ölçümü

Çalışmada Chromsystems (Chromsystems, Instruments and Chemicals, München –Germany) reaktifleri ile Agilent 1100 (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Germany) cihazı kullanıldı. 5µL kan örneği borat içeren 1 ml hemoliz reaktifi ile karıştırıldıktan sonra labil HbA<sub>1c</sub> fraksiyonunun ayrılabilmesi için 20 dk 37°C'de inkübe edildi. Analizden önce hemoliz olmuş örnekler, 5 dk 10.000 x g'de santrifüj edildi. Okumalar 417 nm dalga boyunda UV-visible dedektör kullanılarak yapıldı. Kromatogram da 1.75. dk da elde edilen pik'in alanı (HbA<sub>1c</sub>) ile tüm piklerin alanları (Total Hb) hesaplandı ve (HbA<sub>1c</sub>/Hb)x100 denklemi ile % HbA<sub>1c</sub> değerleri bulundu.

### Türbidimetrik Immüno-inhibisyon Yöntemi ile HbA<sub>1c</sub> Ölçümü

IFCC tarafından onaylanan türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemi ile ticari kitler (Olympus Diagnostica) kullanılarak klinik kimya analiz cihazında (Olympus AU640, Japonya) çalışıldı. Lökosit interferansını önlemek için

deterjan olarak tetradetiltrimetilamonyum bromid (TTAB) içeren hemoliz reaktifi kullanıldı. Numuneler 1/100 oranında hemoliz reaktifi ile dilüe edilip karıştırıldıktan sonra klinik kimya analiz cihazında (Olympus AU 640, Japonya) Hb ve HbA<sub>1c</sub> düzeyleri ölçüldü. Hb ölçümünde eritrositler hemoliz olduktan sonra açığa çıkan Hb molekülleri, bikromatik olarak (570 ve 660 nm) ölçülebilen karakteristik spektrumu olan moleküllere dönüştürüldü. HbA<sub>1c</sub> ölçümünde, numunede bulunan HbA<sub>1c</sub> anti-HbA<sub>1c</sub> antikorları ile reaksiyona girerek çözülebilir antijen-antikor kompleksleri oluşturuldu. Daha sonra ilave edilen polihaptenler arta kalan anti-HbA<sub>1c</sub> antikorları ile reaksiyona girip çözülemeyen antikor-polihapten kompleksleri oluşturuldu. Oluşan bu antikor-polihapten kompleksleri türbidimetrik (340 ve 700nm) olarak ölçüldü. HPLC'de olduğu gibi HbA<sub>1c</sub> ve Hb konsantrasyonları ayrı ayrı ölçüldükten sonra (HbA<sub>1c</sub>/Hb)x100 denklemi ile %HbA<sub>1c</sub> konsantrasyonu hesaplandı.

### İstatistiksel Analizler

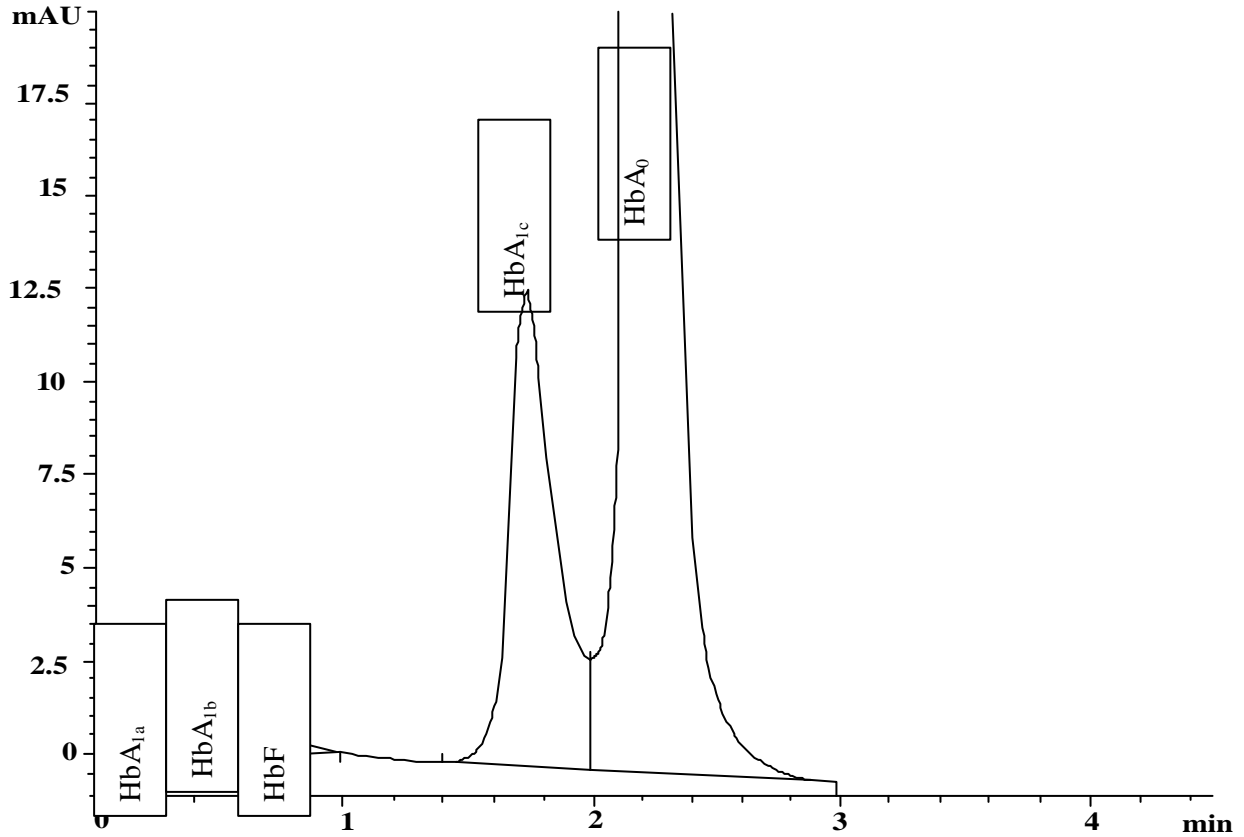
Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Varyansların eşitliğini

belirlemek için F testi yapıldı. İki grup arasındaki istatistiksel farkın önemi paired t testi ile; korelasyonların anlamlılığı Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı kabul edildi.

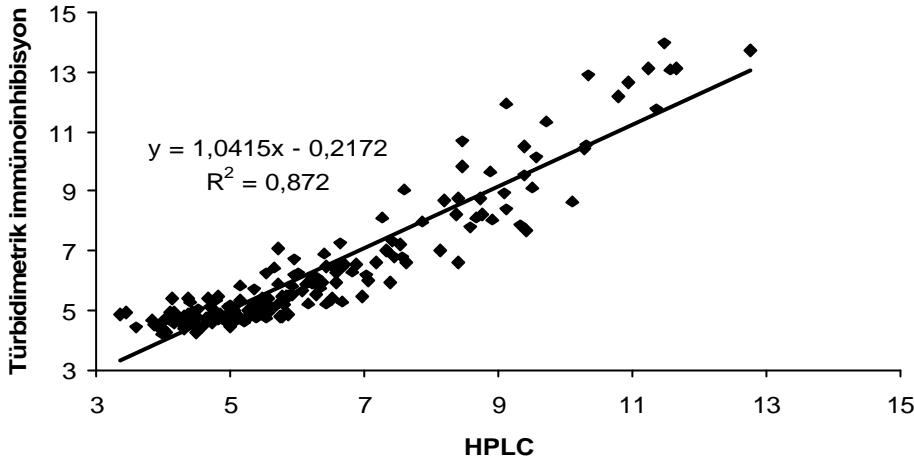
### BULGULAR

Sekil 1'deki görüldüğü gibi Kromatogramda HbA<sub>1c</sub> piki 1.75 dk'da çıkmakta olup her bir numunenin ölçülmesi 5 dk'da tamamlanmaktadır. HbA<sub>1c</sub>'nin HPLC ile ölçümünde varyasyon katsayısı (CV) %4.6 ortalama için % 3.8 ve %9.9 ortalama için % 2.1 olarak bulundu. Türbidimetrik immüno-inhibisyon yönteminin CV değeri ise %4.5 ortalama için % 3.5 ve %10.0 için % 3.0 olarak bulundu.

F testine göre grupların varyansları arasında anlamlı fark bulunamadı ( $F_{hes} < F_{test}$ ). Hastalardan alınan numunelerde ölçülen HbA<sub>1c</sub> düzeyi HPLC grubunda  $6.27 \pm 2.0$  olarak bulunurken türbidimetrik immünoinhibisyon grubunda ise  $6.31 \pm 2.2$  olarak bulundu. Gruplar karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ( $p > 0.05$ ). Yapılan korelasyon incelemesinde iki grup arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlemlendi ( $r = 0.934$ ,  $p < 0.001$ ) (Sekil 2).



Sekil 1. HbA<sub>1c</sub> ve diğer hemoglobin varyantlarını gösteren HPLC kromatogramı



**Sekil 2.** HPLC ve türbidimetrik immünoinhibisyon metotlarıyla ölçülen HbA<sub>1c</sub> degerleri arasindaki korelasyon.

### TARTISMA

HbA<sub>1c</sub> ve diger Hb fraksiyonlari katyon degis-tokus kromatografisi yöntemine dayanan HPLC ile ayrilabilmektedir. Tüm HPLC ile HbA<sub>1c</sub> ölçümlerinde CV degerleri %3.5'in altında bulunmudur (4). Çalışmamızda ise sadece düşük konsantrasyonlarda (%5.6) CV degeri %3.8 bulundu. Bu hafif yüksekligin muhtemelen ön hazirlik asamasindaki manuel nedenlerden kaynaklandigini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, HbA<sub>1c</sub>'nin türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemiyle ölçülmesinde elde edilen sonuçların HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile iyi korele olduğunu gözledik. IFCC tarafından da onaylanan immüno-inhibisyon yönteminde kullanılan antikorlar HbA<sub>1c</sub>'nin labil komponentleri ve glikozile hemoglobinin diger varyantlarını (HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> gibi) tanımamaktadır. Daha da önemlisi immün-inhibisyon yöntemi HbF, HbS, HbA<sub>2</sub> ve karbamile hemoglobinden etkilememektedir (12).

İki farklı yöntemin karşılaştırılmasında, çalışılan testin biyolojik varyasyonu temel alınarak karşılaştırma yapılabilir. Bu amaçla metotlar arasındaki fark ilgili testin birey içi biyolojik varyasyonun 0.33 katından daha düşük olmalıdır (13). HbA<sub>1c</sub>'nin birey içi biyolojik varyasyonu %4.1 olarak hesaplanmıştır (14). Buna göre iki farklı yöntemle çalışılan HbA<sub>1c</sub> degerleri arasındaki fark %1.35'den (0.33x4.1) daha düşük olmalıdır. Çalışmamızda hastalardan alınan örneklerden ölçülen HbA<sub>1c</sub> düzeyleri

arasındaki ortalama fark % 0.64 olarak bulunduğundan iki yöntemin farklı sonuçlar vermediği ve hasta örneklerinin iki metottan herhangi birisi ile ölçülebileceğini söyleyebiliriz.

HbA<sub>1c</sub> düzeyi HPLC ile ölçüleceği zaman analiz öncesi numunelerin inkübasyon gibi ön hazirlik işlemlerinin yapılması gerekir. Bu durum hem zaman kaybı hem de kişiye bağlı hata oluşumunu artırmaktadır. Günümüz laboratuvarlarında birim test maliyeti test seçimini etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Anormal hemoglobin varyantların belirlenmesinde faydalı olmakla birlikte, HPLC pahalı bir sistem olup çalışılması zaman ve personel gereksinimini artırmaktadır. Oysa klinik kimya analiz cihazları oldukça pratik olup çok sayıda testin çalışılması az sayıda personel ve düşük maliyetle gerçekleştirilebilmektedir. Çalışmamızın sonuçları her iki yöntemin varyansları eşit olduğunu ve aralarında anlamlı bir farkın bulunmadığını göstermektedir. Sonuç olarak klinik biyokimya laboratuvarlarında, HbA<sub>1c</sub> düzeylerinin HPLC yerine immüno-inhibisyon yöntemi ile klinik kimya analiz cihazında ölçülmesinin daha pratik ve ekonomik olacağını söyleyebiliriz. Ayrıca tüm testlerin tek bir cihazda çalışmasıyla kontrolün daha kolay sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

### Yazisma Adresi:

Yrd Doç Dr Abdurrahman COSKUN  
Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya  
Anabilim Dalı 81620 Konuralp DÜZCE  
Tel: 0380 5414107 Fax: 0380 5414105  
e-posta: [dr.abdurrahmancoskun@gmail.com](mailto:dr.abdurrahmancoskun@gmail.com)

**KAYNAKLAR:**

1. World Health Organization. Welcome to the Diabetes programme. <http://www.who.int/diabetes/en/>
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent Diabetes Mellitus. *N Eng J Med.* 329:977-986, 1993.
3. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Rohlfing CL, Wilke AL: Is glycohemoglobin testing useful in diabetes mellitus? Lessons from the diabetes control and complications trial. *Clin Chem.* 40:1637-1640,1994.
4. Sacks DB, Path FRC. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Missouri: Elsevier Saunders Inc. 837-901, 2006.
5. Kurt I: Glikozile hemoglobin (HbA1c) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi.* 45:387-395, 2003.
6. Gomes MB, Piccirillo LJ, Nogueira VG, Matos HJ: Acute-phase proteins among patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 29:405-411, 2003.
7. Gillery P, Labbé D, Dumont G, Vassault A: Glycohemoglobin assays evaluated in a large-scale quality control survey. *Clin Chem.* 41:1644-1648, 1995.
8. Eckfeldt JH, Bruns DE: Another step toward standardization of methods for measuring hemoglobin A1c. *Clin Chem.* 43:1811-1813, 1997.
9. Groche D, Hoeno W, Hoss G, Vogt B, Herrmann Z, Witzigmann A: Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. *Clin Lab.* 49:657-661, 2003.
10. Miedema K: Standardization of HbA1c and optimal range of monitoring. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 240:61-72, 2005.
11. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W: Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem.* 39:1717-1723, 1993.
12. Bary L, Chen PC, Sacks DB: Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem.* 47:153-163, 2001.
13. Fraser CG: *Biological variation: from principles to practice.* Washington: AACCC Press. 151 pp, 2001.
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.* 48:436-472, 2002.