

Hemoglobin A_{1c}

Diyabetes Mellitus, tüm dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Diyabetik hastalardaki mortalite ve morbiditenin çoğundan uzun dönem içerisinde gelişen mikro ve makrovasküler komplikasyonlar sorumludur. Bu komplikasyonların gelişmesinin ve ilerlemesinin önlenmesi de glisemik kontrolle direkt ilişkilidir(1). Glisemik kontrol kan glukoz düzeyi ve glikozillenmiş proteinlerin ölçülmesi ile sağlanır. Ancak kan glukozu diyabetik olmayanlarda gün içinde 2 kat düşüp yükselme gösterirken kontrolsüz diyabetlilerde 10 kata kadar değişim gösterir ve ölçüldüğü andaki glisemi düzeyini yansıtır ortalama glukoz düzeyi hakkında fikir vermez(2). Glikozillenmiş hemoglobin ve fruktozamin gün-içi değişim, açlık-tokluk, egzersiz yada kan

glukozundaki geçici değişikliklerden etkilenmeden geriye dönük olarak kan glukoz düzeyi hakkında fikir veren parametrelerdir(3). Diyabetik hastalarda anormal hemoglobinin varlığı ilk olarak 1960'lı yıllarda New York kan bankasında uzman olarak çalışan İranlı S.Rahbar tarafından tanımlanmıştır. Aslında hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) anormal bir hemoglobin değil, hemoglobin elektroforezi ile ölçülen diyabetik hasta kanlarında daha yüksek oranda bulunan hemoglobin A1 fraksiyonudur. Diyabetik hastalarda yüksek HbA_{1c} düzeylerinin varlığı 1970'li yılların ortalarına kadar çeşitli araştırmacıların sadece diyabetli hastalarda değil, hipergliseminin derecesi ile orantılı olarak yükseldiğini saptayana kadar fazla dikkat çekmemiştir(2).

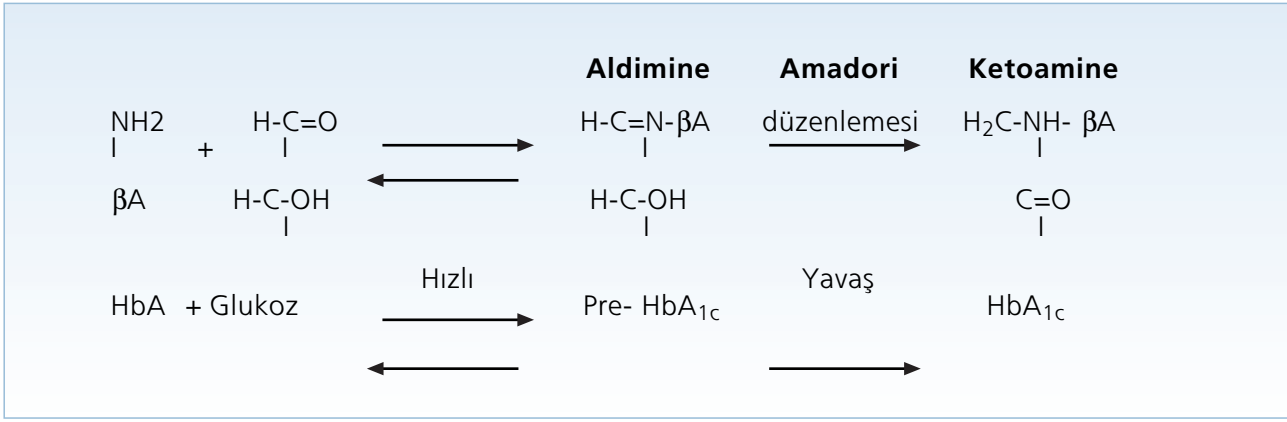
Glikozillenmiş Hemoglobin (Ghb)

Hemoglobin non-enzimatik glikozillenmeye uğrayan pek çok proteinden biridir(4). Erişkin hemoglobininin %97'si Hb A, %2.5'i Hb A₂, %0.5'i Hb F'dir. Hb A, 2 α , 2 β zincirinden oluşur. Hemoglobin A molekülündeki potansiyel glikozillenme bölgeleri, 4 polipeptid zincirindeki N-terminal valin kalıntısının amino grupları ve lizin kalıntısının tüm serbest C - amino gruplarıdır. Hb A₀ non glikozile Hb A fraksiyonudur. Hb A₁ Hb A'ya göre daha negatif yüklüdür ve katyon değişim kromatografisinde kolondan daha erken ayrılır. Hb A₁ de, kolondan ayrılma sırasına göre Hb A_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} ve HbA_{1c} olarak adlandırılır(5). Hb A_{1a1}'de β zincirinin N- terminal ucuna fruktoz 1-6 difosfat, HbA_{1a2}'de glukoz- 6 fosfat, HbA_{1b}'de pirüvik asit bağlanmıştır. HbA_{1c} Hb A₁'in %80'nini oluşturan major fraksiyondur ve glukoz Hb A'nın bir yada her iki β zincirinin N terminal valin kalıntısına bağlanır. Başlangıçta unstable schiff baz (aldimine, pre HbA_{1c}) oluşur. Schiff baz ayrılabilir yada irreversible Amadori düzenlemesine girer ve stabil ketoamine oluşur(6) (şekil 1). Total glikozillenmiş hemoglobin, glukozun hemoglobinin β zincirinin N- terminal valin ucu dışında, β zincirinin N- terminal valin kalıntısının

amino gruplarına yada lizin kalıntısının C - amino gruplarına bağlanmasıyla oluşan tüm glikozillenmiş hemoglobin formlarıdır. Tablo 1'de Hemoglobinin yapısı özetlenmektedir.

Tablo 1: Hemoglobinin yapısı

Hemoglobin	Yapı
Hb A	$\alpha_2\beta_2$
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$
Hb A2	$\alpha_2\delta_2$
Hb A1a1	$\alpha_2(\beta\text{-N-Fruktoz-1,6 difosfat})_2$
HbA1a2	$\alpha_2(\beta\text{-N-Glukoz-6 fosfat})_2$
HbA1b	$\alpha_2(\beta\text{-N-Pirüvik asit})_2$
Labile HbA1c	$\alpha_2(\beta\text{-N=Glukoz})_2$
Stabil Glikozillenmiş Hemoglobin	
Stabil HbA1c	$\alpha_2(\beta\text{-N-Glukoz})_2$
Hb A-Glukoz	$\alpha_2(\beta\text{-Lizin N-Glukoz})_2$
	$(\alpha\text{-Lizin N-Glukoz})_2 \beta_2$
	$(\alpha\text{-N-Glukoz})_2 \beta_2$



Şekil 1: HbA_{1c} oluşumu

Kan Glukozu ile HbA_{1c} İlişkisi

Eritrositler glukozu serbest geçiren olduğundan HbA_{1c} oluşma hızı, eritrositlerin dolaşımında bulunduğu sürece ortamda var olan glukoz konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır(1). Eritrositlerin yaşam süresi yaklaşık 2-3 ay olduğuna göre HbA_{1c} 2-3 ay boyunca maruz kalınan ortalama glukoz düzeyini gösterir(2). Ancak bilinmelidir ki HbA_{1c} son haftalardaki glukoz düzeyleri ile daha yakın ilişkilidir. Son 1

aydaki glukoz düzeyi HbA_{1c}'nin %50'sini oluştururken 60-120. günler %25'ini, 30-60. günler de diğer %25'ini oluşturur(7). Kan glukozunda hızlı bir değişim olduğunda HbA_{1c} ilk 2 ayda hızla değişir. 3. ayda ise daha kademeli bir değişim gösterir(6). Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)'nin yayınladığı normograma göre kan glukoz düzeyi ve HbA_{1c} arasındaki ilişki Tablo 2'de gösterilmektedir(8).

Tablo2: Kan glukoz düzeyi ile HbA_{1c} arasındaki ilişki

HbA _{1c} %	Ortalama plazma glukozu		Yorum
	mg/dl	mmol/L	
4	65	3.5	Non-diabetik aralık
5	100	5.5	Non-diabetik aralık
6	135	7.5	Non-diabetik aralık
7	170	9.5	Diabetik hastalarda tedavi hedefi (American Diabetes Association-ADA)
8	205	11.5	Diabetik hastalarda hedefin üzeri
9	204	13.5	Diabetik hastalarda hedefin üzeri
10	275	15.5	Diabetik hastalarda hedefin üzeri
11	310	17.5	Diabetik hastalarda hedefin üzeri
12	345	19.5	Diabetik hastalarda hedefin üzeri

HbA_{1c} düzeyindeki her %1'lik artma ortalama kan glukozunda 35 mg/dl artmaya eşdeğerdir. HbA_{1c} düzeyi ile 2-3 ay önceki

ortalama glukoz düzeyi arasındaki ilişki şu şekilde formülize edilmiştir.

DCCT/NGSP standardizasyonunu göre (8)

Ortalama Plazma Glukozu(mmol/L) = 1.98x HbA_{1c}(%) -4.29

Ortalama Plazma Glukozu(mg/dl) = 35.6x HbA_{1c}(%) -77.3

IFCC standardizasyonunu göre(8)

Ortalama Plazma Glukozu(mmol/L) = 1.73x HbA_{1c}(%) +0.20

Ortalama Plazma Glukozu(mg/dl) = 31.2x HbA_{1c}(%) +3.51

HbA_{1c} ölçüm metodları

Son 20 yılda pek çok glikohemoglobin ölçüm metodu geliştirilmiştir. Bu metodlar, glikozile hemoglobin ile non glikozile hemoglobin arasındaki yük farkına dayalı olanlar; ("cation-exchange high performance liquid" kromatografi, elektroforez ve izoelektrik fokuslama), yapısal farka dayalı olanlar; (boronat affinite kromatografisi ve "immunoassay"ler) ya da kimyasal farka dayalı olanlar (elektrosprey kütle spektrometrisi) şeklinde ayrılır(9). 1999 yılında CAP (College of American Pathologists) tarafından yapılan bir çalışmada

değerlendirmeye alınan laboratuvarların % 50'den fazlasının boronat affinite kromatografisi, % 30'unun "cation" ya da "ion exchange high performance liquid kromatografi, % 15'inin immunoassay metodları, % 5'den azının da elektroforetik yöntemleri kullandıkları görülmüştür(2). Laboratuvarımızda HbA_{1c} düzeyi NGSP tarafından sertifikeli edilmiş boronat affinite kromatografisi ile ölçülmektedir.

Farklı ölçüm metodları glikozillenmiş hemoglobinin farklı fraksiyonlarını farklı yollarla ölçtüğünden kullanılan metoda

bağlı olarak laboratuvarlar arasında farklı sonuçlar bulunabilir. Bu nedenle pek çok diyabet organizasyonu HbA_{1c} düzeyi ile ilgili standardizasyon yapılmasını gerekli görmüştür. Ancak standardizasyonun sağlanması çeşitli metodlarda var olan interferans problemlerine çözüm getirmez. Sadece klinisyenlerin farklı laboratuvarlardan çıkan sonuçlara aynı değerlendirme kriterlerini uygulayabilmelerini sağlar. 1993 yılında Amerika'da National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) kurulmuş ve çevre laboratuvarların HbA_{1c} ölçüm metodlarını DCCT'ye (Diabetes Control and Calibration Trial) göre kalibre etmeleri istenmiştir(2). DCCT'nin kullandığı prosedür pek çok ölçüm metodunu standardize etmek için kullanılan karşılaştırma

metodu olsa da uluslararası kabul edilmiş referans metod değildir(1). 2001 yılında International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) yeni iki metod olarak elektrosprey kütle spektrometrisi (ES-MS) ve kapiller elektroforezi referans metodlar olarak önermiştir(10). IFCC metoduna göre kalibre edilen metodların sonuçları DCCT sonuçlarından %1.5-2 oranında daha düşüktür(2). Referans aralık, tedavi hedefleri, HbA_{1c} düzeyleri ile komplikasyon gelişme ilişkisini gösteren değerler DCCT'ye göre verildiğinden, IFCC değerlerini kullanmak karmaşaya yol açacaktır. Bunu engellemek için IFCC'ye göre kalibre edilmiş metodların değerlerini DCCT düzeyine dönüştüren formül kullanılmaktadır.

Klinik kullanımı

Dünya Sağlık Örgütü erişkinlerde yılda 3-4 kez, American Diabetes Association (ADA) stabil glisemik kontrolü olanlarda yılda en az 2, tedavisi değişen yada glisemi hedefi sağlanamayanlarda yılda 4 kez HbA_{1c} ölçülmesini önermiştir(1). Diyabetik gebelerde ve gestasyonel diyabette 1-2 ayda bir HbA_{1c} ölçümü önerilir. 2 ölçüm arasında en az 2 hafta ideal olarak 4-6 haftalık zaman farkı olmalıdır(3). ADA diyabetik hastalardaki tedavi hedefini HbA_{1c} <%7 olarak belirlemiştir. Bu hedef sağlandığında diyabetik hastalardaki mikrovasküler komplikasyon riskinin anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. HbA_{1c} >%8'in üzerinde ise tedavi rejiminin yeniden düzenlenmesi gerektiği bildirilmiştir(11). Bu düzeylerin DCCT'ye

göre kalibre edilmiş sistemlerde sonuç veren laboratuvarlar için uygun olduğu unutulmamalıdır. HbA_{1c}'nin tanı yada tarama amaçlı kullanılıp kullanılmayacağı hala tartışma konusudur. ADA, tek başına HbA_{1c} testinin tanı yada taramada kullanılmasını önermemektedir. Bunun en önemli nedeni ölçüm metodlarının çeşitliliği ve interferanslardan farklı düzeylerde etkileniyor olmalarıdır. HbA_{1c} ölçümü ile bozulmuş glukoz toleransı tanısı da konamamaktadır(12). Bazı çalışmacılar açlık plazma glukozu ile beraber HbA_{1c} ölçmenin açlık plazma glukozu minimal yüksek yada non diyabetik düzeyde olan riskli kişilerde daha erken dönemde diyabet tanısı koyabilme şansını arttırdığını bildirmişlerdir.(13).

HbA_{1c} düzeyini etkileyen faktörler

HbA_{1c} düzeyi normal yaşam süresine sahip eritrositlerde değerlidir. Eritrosit yaşam süresini kısaltan tüm durumlarda ölçüm metodundan bağımsız olarak HbA_{1c} düzeyi azalır. Hemolitik anemiler yada son dönemde ciddi kan kaybı geçiren hastalarda genç eritrositlerin artmasına bağlı olarak HbA_{1c} düzeyi yanlış olarak düşük bulunur(14). Fe eksikliği anemisinde yaşlı eritrositlerin oranının artmasına bağlı olarak yüksek HbA_{1c} düzeyleri bulunabilir. HbA_{1c} düzeyi bu hastalarda da glisemi moniterizasyonunda kullanılabilir ancak sonuçlar referans aralığa göre değil, hastanın önceki düzeyine göre değerlendirilir(6). Başka bir hata kaynağı, renal yetmezlikli diyabetlilerde ürenin hemoglobine bağlanmasıyla oluşan karbamilenmiş hemoglobin yada fazla miktarda aspirin kullanan hastalarda oluşan asetillenmiş hemoglobindir. Karbamilenmiş hemoglobin HbA_{1c}'ye benzer bir izoelektrik noktaya sahiptir bu nedenle yüke dayalı ölçüm yapan metodları (katyon exchange kromatografisi, elektroforez ve izoelektrik fokuslama gibi) daha yüksek oranda interfere eder. İmmunoassay ve boranate affinite kromatografisinin karbamilenmiş hemoglobinden etkilenmediği gösterilmiştir

(15). Vitamin C ve E'nin hemoglobinin glikozillenmesini engelleyerek yanlış düşük sonuçlara neden olduğu düşünülür. Hipertrigliseridemi, hiperbilirubinemi, kronik alkolizm, opiat kullanımının bazı ölçüm metodlarını etkileyip yanlış yüksek sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir.

Orak hücre hastalığı(Hb SS), homozigot Hb C hastalığı(Hb CC), HbSC hastalığı, Hb F yüksekliği ve B talaseminin de dahil olduğu pek çok hemoglobinopatide HbA_{1c} ölçüm metodları farklı oranlarda interfere olur. Ticari olarak mevcut metodlar arasında, boronate affinite kromatografisi Hb varyantları ve derivelerinin varlığından kaynaklanan interferanslardan en az düzeyde etkilenir.(15,16) Bu tip hastalarda varyant hemoglobinin yanında artmış transfüzyon gereksinimi, eritrosit yaşam süresinin etkilenmesi gibi etkenler de ölçümün değerini kısıtlar(17). HbA_{1c} ölçümünün kısıtlı değer taşıdığı bu tür durumlarda ve de diyabetik gebelerde daha sık takip yapılması gerektiğinden ortalama 2 hafta önceki glisemi düzeyini gösteren Fruktozamin ölçümü gibi alternatif testlere gereksinim duyulur.

Öneriler

HbA_{1c} sonucunun en iyi şekilde değerlendirilebilmesi için test metodunun ve interferanslardan ne düzeyde etkilendiğinin iyi bilinmesi gerekir. Hastanın kliniği ile uyumsuz sonuç bulunduğu, HbA_{1c} sonucunu etkilediği bilinen hemolitik anemi, üremi, demir eksikliği anemisi, hemoglobinopati ve benzeri hastalıklar açısından hastalar sorgulanmalıdır. Sonucu değerlendirirken laboratuvar ve klinisyen iletişim içinde olmalıdır. Laboratuvar HbA_{1c} test metodunu seçerken çalışacağı popülasyonun özelliklerini iyi tanıyıp ona göre karar vermelidir.

Örneğin hemoglobinopati prevalansı yüksek olan bir toplumda varyant hemoglobinlerin varlığından etkilenmeyen bir ölçüm metodu seçilmelidir. NGSP tarafından sertifikeli edilmiş ölçüm metodları kullanılmalı, referans aralığın altında yada %15'in üzerinde bulunan sonuçlarda ölçüm mutlaka tekrarlanmalıdır. Çalışma içi CV'si % 3'ün altında olan ölçüm metodları kullanılmalı, iki farklı düzeyde kontrol materyali ile ölçümün performansı her gün değerlendirilmeli ve mutlaka bir dış kalite kontrol programına dahil olunmalıdır(18).

Referans Kaynaklar

1. Krishnamurti U, Steeffes MW. Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. Clin Chem 2001;47:1157-1165.
2. Saudek CD, Rastogi R, Derr RL. Assesment of glycemia in diabetes mellitus: Hemoglobin A1c. J Assoc Physicians India 2005;53:299-304.
3. Thomas L. Glycohemoglobins. Christoph MN, Hans R. Clinical Laboratory Diagnostics. First edition. Marburg, Germany. 1998;142-148.
4. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin Chem 1968;22:296-308.
5. Nuttall FQ. Comparasion of percent total GHb with percent HbA_{1c} in people with and without known diabetes. Diabetes Care 1998;21:1475-1480.
6. Tietz, NW. Glycated Proteins. Burtis CA, Ashwood ER(Ed). Tietz Textbook of Clinical Chemistry, USA. 1999;790-806.
7. Beach KW. A theoretical model to predict the behavior of glycosylated hemoglobin levels. J Theor Biol 1979;81:547-561.
8. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA_{1c}. Diabetes Care. 2002;25:275-278.
9. Garry J. Hemoglobin A1c:Analysis and Standardisation. Clin Chem2003;41:1199-1212.
10. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JQ. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA_{1c} determinations. Clin Chem Lab Med 1998;36:299-308.
11. American Diabetes Association. Clinical practice recommendations. Diabetes Care 2000;23:32-42,69-72,80-2.
12. The Expert Committee on the diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2000;23:4-18.
13. Perry RC, Shankar RR, Fineberg N, Mc Gill J, Baron AD. HbA_{1c} measurement improves the detection of type 2 diabetes in high risk individuals with nondiagnostic levels of fasting plasma glucose. Diabetes Care 2001 24:465-471.
14. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JJ, Nathan D, Peterson CM: American Diabetes Association Technical Review on tests of glycemia. Diabetes Care 1995 ;18:896-909.
15. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin methods. Clin Chem 2001;47:153-63.
16. Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, Ospina M, Safar-Pour S, Roberts WL. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits. Clin Chem 2005;51:264-5.
17. De BK, Safar- Pour S, Rohlfing C, Little RR, Weykamp CW, Roberts WL. Effects of hemoglobin C and S traits on hemoglobin measurements by 10 methods. Clin Chem 2004;50(S6):A110
18. 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 48:436-472.

