



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HbA1C ÖLÇÜMÜNDE YÖNTEM KARŞILAŞTIRMASI

Yasemin YILMAZ

HAZİRAN 2022

DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HbA1C ÖLÇÜMÜNDE YÖNTEM KARŞILAŞTIRMASI

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süleyman DEMİR

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Yasemin YILMAZ

İmza :

ÖZET

HbA1C ÖLÇÜMÜNDE YÖNTEM KARŞILAŞTIRMASI

Yasemin YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Süleyman DEMİR

Haziran 2022, 58 Sayfa

HbA1C ölçümlerinde standardizasyon çalışmaları dünya çapında sürmekte ve bu konuda iyileşmeler sağlanmaktadır. Bu çalışmada, turbidimetrik immünoinhibisyon (TINIA) yöntemini kullanan Roche Cobas 6000 cihazı ile HbA1C ölçümü için referans olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemini kullanan Tosoh G8 cihazı karşılaştırılmıştır. Her iki cihazda yirmişer kontrol ve hasta örnekleri ile gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Her iki cihaz için doğrusalılık ve stabilite çalışmaları yapıldı. Rutin HbA1C ölçümü için laboratuvara gönderilen ve HPLC yöntemi ile ölçülen altmış örnek rasgele alınarak Roche Cobas 6000 cihazında ölçüldü ve sonuçlar karşılaştırıldı. Kontrol serumlarında gün içi ve günler arası CV'ler HPLC'de $<0,45$ ve $<0,80$; TINIA yönteminde $<1,46$ ve $1,79$ olarak bulundu. HbA1C düzeyleri HPLC'de $4,8$ - $13,3$ (29 mmol/mol-122 mmol/mol) aralığında olan taze tam kan örnekleri ile yapılan yöntem karşılaştırmasında TINIA yöntemiyle $4,49$ - $12,01$ (26 mmol/mol-109 mmol/mol) aralığında dağıldı. İki yöntemin korelasyon katsayısı $R^2=0,987$, $p<0,05$; regresyon denklemi, $\%HbA1C = 0,903 \cdot HPLC \%HbA1C + 0,159$ idi. HPLC ($6,55$) ve TINIA ($6,07$) yöntemleriyle elde edilen $\%HbA1C$ düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). TINIA yöntemi HPLC sistemi ile iyi korelasyon vermekle birlikte $7,9$ 'luk düşük HbA1C sonucu üretmesi diyabet tanı ve takibi açısından sorun oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Glikozillenmiş hemoglobin, HbA1C, turbidimetri, TINIA, HPLC.

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE002).

ABSTRACT

METHOD COMPARISON IN HbA1C MEASUREMENT

Yasemin YILMAZ

M. Sc. Thesis in Medical Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Süleyman DEMİR

June 2022, 58 Pages

Standardization studies in HbA1C measurements are continuing worldwide and improvements are being made in this regard. In this study, we compared the Roche Cobas 6000 device using the turbidimetric immunoinhibition (TINIA) method with Tosoh G8 device, which uses high-performance liquid chromatography (HPLC) method, as a reference for HbA1C measurement. Intra- and inter-day reproducibility studies were performed with twenty control and patient samples on both devices. Linearity and stability studies were performed for both devices. Randomly selected sixty samples which were sent to the laboratory for HbA1C measurement and measured by HPLC method were measured by Roche Cobas 6000 and these results were compared. Intra- and inter-day CVs in control sera were <0.45% and <0.80% in HPLC; these CVs were found to be <1.46% and 1.79% in the TINIA method. HbA1c levels ranged from 4.8% to 13.3% (29 mmol/mol-122 mmol/mol) in HPLC and ranged from 4.49% to 12.01% (26 mmol/mol-109 mmol/mol) with the TINIA method in the method comparison with fresh whole blood samples. The correlation coefficient of the two methods was $R^2=0.987$, $p<0.05$; the regression equation was $\%HbA1C = 0.903 \times HPLC \%HbA1c + 0.159$. A significant difference was found between %HbA1C levels obtained by HPLC (6,55%) and TINIA (6,07%) methods ($p<0.05$). Although the TINIA method correlates well with the HPLC system, producing a low HbA1C result of 7.9% may pose a problem in terms of diabetes diagnosis and follow-up.

Keywords: Glycosylated hemoglobin, HbA1C, turbidimetry, TINIA, HPLC.

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through (Project Number: 2020ABE002)

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteğini sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Süleyman DEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen başta Doç. Dr. Esin AVCI olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Deneylerin gerçekleşmesindeki yardımları ve içten dostlukları için Teknisyen Abdullah ÖZLÜK ve Biyomedikal Teknikeri Salih ERDOĞAN'a,

Yüksek lisans tez projemin gerçekleşmesi için gerekli kaynağı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Birlikte güzel anılar paylaştığımız, iyi ve kötü günümde her daim yanımda olan ve manevi desteklerini eksik etmeyen dostlarıma,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZETiii
ABSTRACTiv
TEŞEKKÜRv
İÇİNDEKİLER DİZİNİvi
ŞEKİLLER DİZİNİviii
TABLolar DİZİNİix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİx
1 GİRİŞ1
1.1 Amaç2
2 KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI3
2.1 Hemoglobin3
2.1.1 Hemoglobinin Yapısı3
2.1.1.1 Hem Grubunun Yapısı3
2.1.1.2 Globin Zincir Tipleri4
2.1.2 Hemoglobinin Fonksiyonları5
2.1.3 Hemoglobin Bileşikleri6
2.1.3.1 Karboksihemoglobin6
2.1.3.2 Karbaminohemoglobin6
2.1.3.3 Sülfahemoglobin7
2.1.3.4 Methemoglobin ve Siyanomethemoglobin7
2.1.4 Hemoglobinin Glikozillenmesi7
2.1.4.1 Glikozile Hemoglobinin Klinik Kullanımı9
2.2 Diabetes Mellitus11
2.2.1 Diabetes Mellitusun Tanısı12
2.2.2 Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması13
2.2.3 Serbest Radikaller ve Diabetes Mellitus14
2.2.4 Polyol Yolu15
2.2.5 Diyabet Komplikasyonları16
2.2.6 Glisemik Kontrol ve Diabetes Mellitus19
2.3 HbA1C Ölçüm Yöntemleri19
2.3.1 Elektroforez20
2.3.2 Kapiller Elektroforez20
2.3.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)21

2.3.4	Boronat Afinite Kromatografisi	22
2.3.5	İmmünolojik Test Yöntemi	22
2.3.6	Enzimatik Test Yöntemi	24
2.3.7	Biyosensörler	25
2.4	HbA1C'nin Standardizasyonu	27
2.5	Hipotezler	29
3	GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1	Kişiler	30
3.2	Gereç	30
3.3	Yöntem	31
3.3.1	Tekrarlanabilirlik Çalışması	31
3.3.1.1	Gün İçi Tekrarlanabilirlik Çalışması	31
3.3.1.2	Günler Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması	32
3.3.2	Doğrusallık Çalışması	32
3.3.3	Stabilite Çalışması	32
3.3.4	Yöntem Karşılaştırması Çalışması	32
3.3.5	İstatistiksel Analiz	32
4	BULGULAR	34
5	TARTIŞMA	46
6	SONUÇLAR	50
7	KAYNAKLAR	52
8	ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hem molekülünün yapısı	4
Şekil 2.2 Amadori düzenlenmesi	9
Şekil 2.3 Polyol yolağı	15
Şekil 2.4 İmmünolojik yöntemin şematik gösterimi	23
Şekil 2.5 HbA1C ölçümünde enzimatik yöntem	25
Şekil 4.1 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının gün içi tekrarlanabilirlik grafiğı.	36
Şekil 4.2 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan farklı derişimlerdeki örneklerin doğrusallık grafiğı.	39
Şekil 4.3 Düşük ve yüksek düzey HbA1C'ye sahip iki hasta örneğinin 0, 2, 4 ve 24.saatlerde tekrar ölçümü ile elde edilen stabilite grafiğı.	41
Şekil 4.4 HPLC ve TINIA yöntemlerinde ölçülen HbA1C sonuçlarının medyan, 1.ve 3.çeyrekliklerini gösteren kutu grafiğı.	43
Şekil 4.5 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının regresyon analiz grafiğı.	44
Şekil 4.6 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının Bland-Altman grafiğı.	44

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Diyabet tanısı için kriterler	12
Tablo 2.2 Pre – diyabeti tanımlayan kriterler	12
Tablo 2.3 Diyabette etyolojik sınıflandırma	14
Tablo 2.4 Herhangi bir NGSP-%HbA1C değerine karşılık gelen mg/dL ve mmol/L olarak hesaplanmış açlık glukoz değerleri	29
Tablo 4.1 Kontrol serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.	34
Tablo 4.2 Hasta serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.	35
Tablo 4.3 Kontrol serumlarında günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.	37
Tablo 4.4 HbA1C ölçümünde doğrusalılık çalışmasının sonuçları.	38
Tablo 4.5 HbA1C ölçümünde stabilite çalışmasının sonuçları.	40
Tablo 4.6 Altmış hasta örneğinin %HbA1C sonuçları.	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AACC	Amerkan Klinik Kimya Derneği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
AGE's	Glikasyon Son Ürünleri
APG	Açlık Plazma Glukozu
BAG	Bozulmuş Açlık Glukozu
BGT	Bozulmuş Glukoz Toleransı
CE	Kapiller Elektroforezi
CO	Karbonmonoksit
CV	Varyasyon Katsayısı
DCCT	Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Denemeleri
DKA	Diyabetik Ketoasidoz
DM	Diabetes Mellitus
eAG	Hesaplanmış Açlık Glukozu
EDIC	Diyabet Müdahale ve Komplikasyonları Epidemolojisi
FVO	Fruktozil Valin Oksidaz
GLUT	Glukoz Transferaz
GPP	Glikatlı Pentapeptit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
Hb	Hemoglobin
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HHb	Deoksihemoglobin
HHS	Hiperglisemik Hiperosmolar Sendrom
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IDDM	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
IFCC	Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
JDS	Japonya'da Japon Diyabet Derneği
JSCC	Japon Klinik Kimya Derneği
kDa	Kilodalton
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MS	Kütle Spektrometrisi
NADPH	Nikotinik Asit Adenin Dinükleotid Fosfatı

NGSP.	Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı
NIDDM.	İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
NO.Nitrik Oksit
NPDR.	Proliferatif Olmayan Diyabetik Retinopati
O ₂ Hb.Oksihemoglobin
OGTT.	Oral Glukoz Tolerans Testi
pCO ₂Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PDR.	Proliferatif Diyabetik Retinopati
pO ₂	Parsiyel Oksijen Basıncı
r.Korelasyon Katsayısı
R ²	Determinasyon Katsayısı
ROS.	Reaktif Oksijen Türleri
SVH.	Serebrovasküler Hastalıklar
Sy/x.	Standart Hata
TEa.İzin Verilebilir Toplam Hata
TINIA.	Türbidimetrik İnhibisyon İmmünolojik Testi
TTAB.	Tetradesil Trimetil Amonyum Bromür
UKPDS.İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması
α.	Alfa
β.	Beta
γ.	Gama
δ.	Delta
ε.Epsilon
ζ.Zeta

1 GİRİŞ

Diabetes Mellitus halk sağlığını olumsuz etkileyen, yüksek kan glukozu ile seyreden kronik ilerleyici bir hastalıktır. Yüksek glisemi, glukozun serbest karbonil grupları ile hemoglobin zincirinin N-terminal valin kalıntısının amino ve lizin amino asitlerinin ϵ amino gruplarına non-enzimatik olarak bağlanmasıyla yüksek HbA1C oluşumuna neden olur (Kurt 2003, Rohlfing vd. 2002).Günümüzde diyabetik hastaların glisemik kontrollerinin takibinde kan glukozu ve HbA1C ölçümleri kullanılır. Glisemik kontrolün günlük takibinde sıklıkla kan glukoz ölçümü kullanılırken uzun dönem glisemik kontrolün takibinde HbA1C ölçümü kullanılır (Kurt 2003, Pandey vd 2015). Amerikan Diyabet Derneğine (ADA) göre, diyabet tanı kriteri amacıyla kullanılan HbA1C değerin $\geq 6,5$ olması gerekir (Nitin 2010).

HbA1C ölçümü için çok sayıda analitik ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), HbA1C'nin ölçülmesinde kullanılan en yaygın analitik tekniklerden biridir. HPLC'de HbA1C'yi diğer hemoglobin moleküllerinden ayırt etmek için iyon değişimi veya afinite kolonları kullanılır. İmmünokimyasal ve enzimatik yöntemler glikozile ve glikozile olmayan hemoglobini yapısal farklarından yararlanarak ayırır. İmmünolojik testler, antijen ile antikor reaksiyonuna bağlı analitin miktarının belirlendiği testlerdir (Gupta vd 2017). Farklı laboratuvarlardan alınan aynı kan örneğinin HbA1C sonuçları aynı yöntemler ile ölçülmesine karşın farklı olabildiğinden HbA1C ölçüm yöntemlerinin standardize edilme gereği duyulmuştur. Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Denemeleri (DCCT) çalışmasında, dünyanın herhangi bir yerinde ölçülen HbA1C değerin DCCT ile aynı değerleri vermesi gerektiği konusunda fikir birliğine varılmıştır (Leslie 2008). HbA1C testi, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) tarafından onaylanmış ve Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Denemeleri (DCCT) ile standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak yapılmalıdır (ADA 2019). HbA1C ölçümlerini daha kolay ve ucuz yapma iddiası ile birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin laboratuvarlarda kullanılmadan önce referans yöntemle karşılaştırılması gerekmektedir.

1.1 Amaç

Çalışmamızda HbA1C ölçümü için referans yöntem olarak gösterilen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemini kullanan Tosoh G8 cihazı ile Türbidimetrik İmmüno-İnhibisyon (TINIA) yöntemini kullanan Roche Cobas 6000 cihazı ile elde edilen sonuçları karşılaştırmayı amaçladık.

2 KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Hemoglobin

Erişkin insan vücudu günde 500 g oksijen tüketir; ancak kalbin bir günde pompaladığı kan hacmi değerlendirildiğinde plazma yolu vasıtasıyla dokulara girebilen oksijen miktarı günlük 30 gramdır. Bu da bir insanın günlük gereksiniminin %6'sını oluşturur. Bundan dolayı oksijen transportu için hemoglobin denilen özel bir moleküle ihtiyaç vardır. Eritrositler içinde bulunan hemoglobin, akciğerlerden periferik dokulara oksijen; periferik dokulardan akciğerlere karbondioksit ve proton taşır. Erkeklerde 100 mL kanda ortalama 15 gr, kadınlarda ise 13 gr hemoglobin bulunmaktadır (Sözmen 2006, Gürdöl 2017).

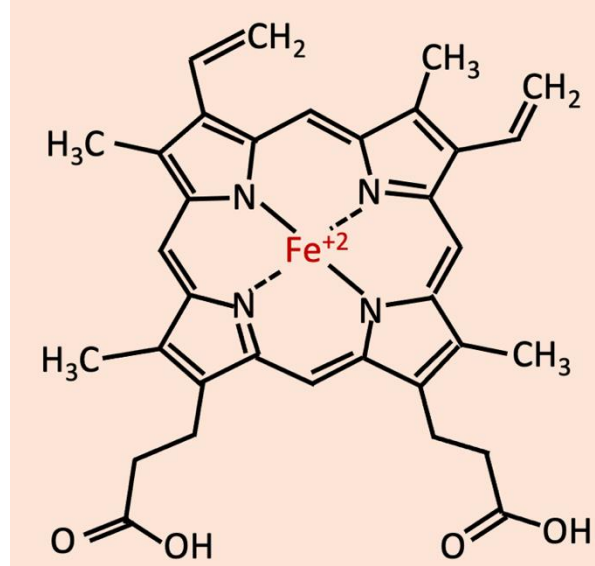
2.1.1 Hemoglobinin Yapısı

Hemoglobin, iki farklı polipeptit zincirinden ikişer adet içeren tetramer yapıda globüler bir proteindir. Hemoglobin, 5,5 nm çapında ve 64,5 kDa molekül ağırlığındadır. Hemoglobinin her zincirinde kendisine prostetik olarak bağlı birer hem molekülü bulunur. Tüm hemoglobin çeşitlerinde hem molekülü aynı yapıda olmasına karşın globin zincirlerinin sayısı, sırası ve cinsleri farklılık göstermektedir (Huisman 1993, Sözmen 2006).

2.1.1.1 Hem Grubunun Yapısı

Hem molekülü, dairesel dizilmiş ve birbirlerine meten köprüleri (= CH -) ile bağlı dört tane pirol halkasından (tetrapireol halka) oluşur. Bu yapı porfirin halka sistemidir ve bu sistemdeki çift bağlar görünür ışığı absorbe ederek kanın kırmızı renkte görünmesine neden olur. Bir pirol halkası dört karbon ve bir azottan oluşur. Dört pirol halkasının azot atomları iç kısımda kalacak şekilde dizilmiştir. Porfirin halka sistemindeki sekiz dış köşeye dört metil, iki vinil, iki propiyonik grup bağlıdır (Sözmen 2006, Gürdöl 2017,

Banach vd. 2019). Bu tetrapirrol halka yapısının merkezinde ferröz formda demir (Fe^{+2}) atomu yer alır. Bu Fe^{+2} atomu, tetrapirrol halka yapısındaki azot (N) atomlarına bağlanarak merkezde tutunur (Şekil 2.1). Hem molekülün yapısında bulunan bu ferröz demir (Fe^{+2}) atomu iki bağ daha yapar; bu bağlardan biri demiri globin zincirinde bulunan histidin amino asidinin yan zincirinde bulunan imidazol azotuna, diğeri ise oksijene bağlar. Hem molekülün oksijen ile yaptığı bağ sayesinde hemoglobin molekülü oksijen taşıma kapasitesine sahip olur. Tetramer yapıdaki hemoglobin molekülü dört molekül hem grubu içerdiğinden bir molekül hemoglobin toplamda dört molekül oksijen taşır (Huisman 1993, Banach vd. 2019). Hem molekülüne oksijen bağlanabilmesi için demir atomunun Fe^{+2} formda olması gerekir. Çünkü ferrik (Fe^{+3}) yapıdaki demir atomu okside olduğundan oksijen ile bağ yapamaz (Huisman 1993, Sözmen 2006, Champe ve Harvey 2007).



Şekil 2.1 Hem molekülünün yapısı (Gürdöl 2017).

2.1.1.2 Globin Zincir Tipleri

Hemoglobin molekülünde dört adet globin polipeptit zinciri bulunur. Her bir zincirin sentezi farklı gen bölgeleri ile gerçekleştirilir. Alfa globin zincirini sentezleyen iki ayrı gen bölgesi 16.kromozom üzerinde yer alırken, beta zincirini sentezleyen gen 11.kromozom üzerinde bulunur. Bu durumda alfa gen ailesi iki gen taşırken, beta gen ailesi tek genden oluşur. Ayrıca 16.kromozom üzerinde zeta, zeta benzeri globin ve alfa benzeri globin genler; 11.kromozom üzerinde ise epsilon, delta, beta benzeri globin geni ve iki adet gama genleri bulunmaktadır (Dönbak 2005, Gürdöl 2017).

HbA, erişkinlerde bulunan başlıca hemoglobindir, total hemoglobinin %97'sini oluşturur. Bu hemoglobinin yapısında alfa ve beta zincirleri ($\alpha_2\beta_2$) bulunur. HbA2, erişkinlerdeki hemoglobinin %2'sini oluşturur, alfa ve delta zincirlerini ($\alpha_2\delta_2$) içerir. Erişkinlerdeki total hemoglobinin %1'ini ise HbF içerir. HbF, alfa ve gama zincirlerinden ($\alpha_2\gamma_2$) oluşur (Berg vd. 2002, Champe ve Harvey 2007).

Hemoglobinin tetramerik yapısını oluşturan globin zincirlerinin çeşidi yaşamın farklı evrelerinde farklılık gösterir. İntrauterin gelişim esnasında altı farklı zincir (α , β , ϵ , γ , δ , ζ) sentezlenir (Gürdöl 2017). Embriyolojik dönemin 5.haftasından itibaren hematopoez, embriyo kesesinden fetüs karaciğerine geçer. Hematopoez, 30.haftadan sonra dalakta, doğumdan sonra ise kemik iliğinde gerçekleşir. Embriyolojik dönemin ilk iki ayında sırasıyla Gower-I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower - II ($\alpha_2\epsilon_2$) sentezlenir. Gebeliğin 8.haftasından sonraki evrelerde sırasıyla Portland-I ($\zeta_2\gamma_2$) ve Portland-II ($\zeta_2\beta_2$) sentezlenir. Fetusta HbF ($\alpha_2\gamma_2$), gebeliğin 13. haftasından itibaren sentezlenmeye başlar, embriyolojik hemoglobinler kaybolur. Yapısında beta yerine gama zinciri bulunan HbF'nin oksijene ilgisi HbA'nınkinden fazladır (Berg vd. 2002, Dönbak 2005, Gürdöl 2017). Gebeliğin ilerleyen haftalarında gama zincir sentezinde azalma gözlenirken, beta zincir sentezinde artma gözlenir (Karlsson ve Nienhuis 1985, Dönbak 2005, Manning vd. 2007).

Alfa ve zeta globin zincirleri 141, beta, gama, delta ve epsilon globin zincirleri 146 amino asit uzunluğundadır. Alfa ve beta globin zincirlerinin her ikisinde 64 amino asit aynıdır ve N-terminallerinde valin amino asidi bulunur. Beta ve gama globin zincirlerinin uzunlukları eşittir ve birbirlerinden 39 amino asit farklıdırlar. Beta ve delta zincirlerinde de 10 amino asitlik fark bulunur (Berg vd. 2002).

2.1.2 Hemoglobinin Fonksiyonları

Hemoglobinin oksijen taşınması ve tamponlama olmak üzere başlıca iki fonksiyonu vardır.

Hemoglobin, akciğerlerden periferik dokulara oksijen ve ayrıca periferik dokulardan akciğerlere karbondioksit ve proton taşır. Hemoglobin molekülünde dört adet hem grubu bulunduğundan bir molekül hemoglobin dört molekül oksijen taşır (Sözmen 2006, Gürdöl 2017). Ancak pratikte %100 doygunluk sağlanamaz; hemoglobin için maksimum doygunluk oranı %97'dir. Hem molekülü ile bağ yapmış ferröz demir (Fe^{+2}) oksijen ile reversible (geri dönüşümlü) olarak bağlıdır. Hem halkasının iç kısmının hidrofobik olması suyun demirden uzak olmasını sağlayarak demirin oksitlenmesini

engeller. Bu sayede demir oksijen ile reversible olarak bağ yapabilir. Çünkü oksitlenmiş demir (Fe^{+3}) oksijen ile bağ yapamaz (Gürdöl 2017).

Hemoglobinin gergin ve gevşek formları oksijen taşınması olayında oldukça önemlidir. Hemoglobinin gergin formda olması oksijene olan ilgisini düşürür, gevşek formda olması ise oksijene olan ilgisini artırır. Hemoglobinin oksijene bağlama yeteneği ortamın parsiyel oksijen basıncına (pO_2), parsiyel karbondioksit basıncına (pCO_2), ortamın pH ve ısısına ve ayrıca 2,3-bisfosfogliserat düzeylerine bağlıdır. 2,3-bisfosfogliserat, en önemli düzenleyici mekanizmayı oluşturmaktadır (Nelson ve Cox 2013, Rodwell vd. 2019).

2.1.3 Hemoglobin Bileşikleri

Hemoglobinin oksijen ile bağ yapması sonucu oksihemoglobin (O_2Hb) oluşur. Oksijen bağlı olmayan hemoglobine deoksihemoglobin (HHb) denir. Bunların dışında eritrositlerde farklı hemoglobin tipleri de bulunabilir (Baranoski vd. 2012).

2.1.3.1 Karboksihemoglobin

Hemoglobine karbonmonoksit (CO) bağlanması sonucunda oluşur. Hemoglobin molekülündeki ferröz demire bağlanan CO hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltır. Hemoglobinin CO'ya olan ilgisi oksijene olan ilgisinden yaklaşık 220 kat fazladır. Dolayısıyla oksijen miktarı CO miktarı ile aynı olsa da hemoglobin CO ile bağ yaparak hipoksiye neden olur (Sözmen 2006, Champe ve Harvey 2007).

2.1.3.2 Karbaminohemoglobin

Hemoglobinin karbondioksit (CO_2) ile geri dönüşümlü olarak bağlanması sonucunda oluşur. Karbondioksitin hemoglobin ile bağ yapması hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltır. CO_2 , plazmada %7 oranında çözülmüş olarak, %23 oranında hemoglobine bağlı şekilde ve %70 oranında bikarbonat iyonu (HCO_3^-) halinde taşınır (Sözmen 2006, Champe ve Harvey 2007, Cox 2013).

2.1.3.3 Sülfhemoglobin

Hidrojen sülfürün hemoglobinin porfirin halkasına bağlanması sonucunda oluşur. Hidrojen sülfürün Hb'ye ilgisi demire oranla azdır, ancak hidrojen sülfürün Hb'ye bağlanması ile Hb'nin oksijene olan ilgisi azalır (Park vd. 1986). Hidrojen sülfür hemoglobine geri dönüşümsüz olarak bağlanır, bu nedenle vakalar nadir olarak görülse de genelde ölümcüldür (Park vd. 1986, Sözmen 2006).

2.1.3.4 Methemoglobin ve Siyanomethemoglobin

Siyanürün vücuda alınması ile birlikte öncelikle hemoglobinin yapısında bulunan Fe^{+2} , elektron kaybederek Fe^{+3} formuna yani methemoglobin formuna dönüşür. Daha sonra siyanomethemoglobin oluşur. Normal koşullarda Fe^{+2} 'nin elektron kaybederek Fe^{+3} formuna dönüşümü sitokrom b5 sistemi (methemoglobin redüktaz enzimi) tarafından engellenir. Vücutta hemoglobinin sadece %1 - 2'si ferrik durumda bulunur. Oluşan siyanomethemoglobin, sitokrom oksidaz ve birçok solunum enzimini inhibe eder (Baranoski vd. 2012).

2.1.4 Hemoglobinin Glikozillenmesi

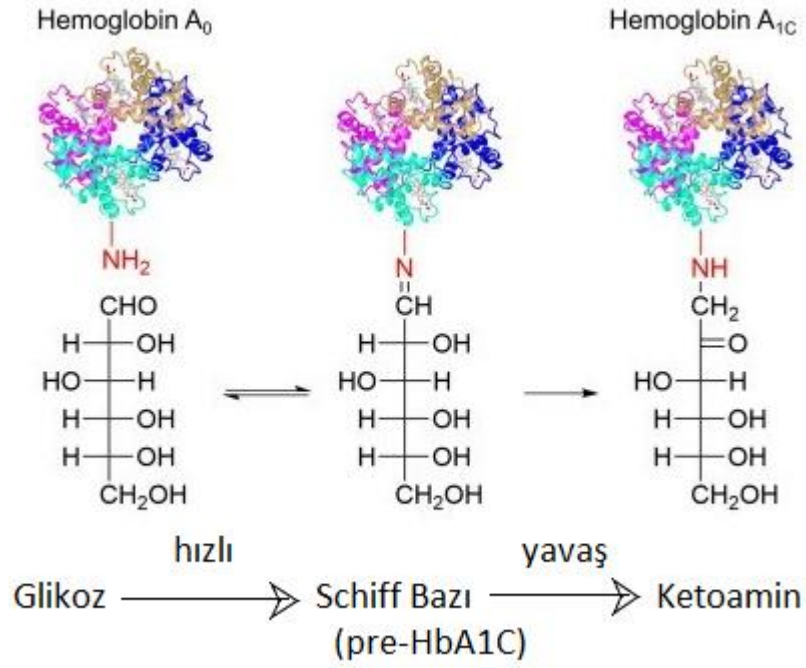
Karbonhidratlar enzimatik reaksiyonlar ile proteinlere kovalent olarak bağlanırlar. Oluşan bu kompleks moleküllere glikoproteinler denir. Glikoproteinlerin karbonhidrat kısımları miktar ve yapısal olarak farklılık gösterir (Rohlfing vd. 2002, Sözmen 2006, Cox 2013). Glikozillenme, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Enzimatik glikozillenmede glikozil transferazlar kullanılır ve proteinlerin asparajin, serin, treonin ve hidroksilizin amino asitlerine N-glikozid ve O-glikozid bağları ile glukoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, N-asetil glukozamin, N-asetil mannozamin ve siyalik asitlerin bağlanması ile glikoproteinler oluşur (Alıcı ve Dülger 2001). Enzimatik olmayan reaksiyonlarla, glukoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, riboz, siyalik asitler ve bazı heksozların fosforillenmiş şekilleri, serbest karbonil grupları ile proteinlerin N-terminal valin kalıntısının amino ve lizin amino asitlerinin ϵ amino gruplarına bağlanırlar (Alıcı ve Dülger 2001, Kurt 2003). Enzimatik olmayan glikozillenmenin gösterildiği ilk protein hemoglobindir (Bunn 1981, Kurt 2003).

İlk kez 1958'de iyon değiştirici kolon kromatografisi ile HbA1 komponentleri izole edilmiş ve elüsyon sırasına göre HbA1A, HbA1B ve HbA1C olarak adlandırılmıştır. Bu HbA1 komponentleri, erişkin insan eritrositinin başlıca hemoglobini olan HbA (HbA0)'dan enzimatik olmayan glikozillenme ile oluşur (Brownlee ve Cerami 1981). Diyabetik hastalarda HbA1C komponenti diğer komponentlere kıyasla 2-3 kat daha yüksektir (Weykamp vd. 2009, Nitin 2010). 1978'de McDonald ve arkadaşları tarafından HbA1A1, HbA1A2 olmak üzere iki alt fraksiyonu tanımlamıştır (McDonald vd. 1978). HbA1A1'de beta zincirinin N-terminal ucuna fruktoz-1,6-bisfosfat, HbA1A2'de glukoz 6-fosfat, HbA1B'de ise pirüvik asit bağlanmıştır. HbA1C'de bir ya da her iki beta zincirinin N-terminal valin kalıntısına glukoz bağlanır. HbA1C, HbA1'in %80'ini oluşturur (Smith vd. 2007, Aydın 2014).

Eritrositlerdeki HbA0'ın aktivitesi eritrosit yaşamının ilk başlarında oldukça fazladır, ancak zamanla bu aktivite azalır. Aksine HbA1A, HbA1B ve HbA1C'nin aktiviteleri eritrositlerin yaşam süreleri uzadıka hemen hemen lineer biçimde artar (Rohlfing vd. 2002). Bu hemoglobinin glikozilasyonunun yavaş gerçekleştiğini, eritrositlerin 120 günlük yaşam süreleri boyunca devam ettiğini gösterir. Yaşlı eritrositlerdeki HbA1C düzeyleri genç olanlara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Bunn 1981). Eritrositlerde glukoz ve hemoglobin enzimatik olmayan reaksiyonla kondanse olduğundan hemoglobinin glikozilasyonu yavaş gelişir (Rohlfing vd. 2002).

HbA0, diğer glikolize hemoglobinlerden (HbA1A, HbA1B ve HbA1C) afinite kromatografisi ile ayrılabilir iken yüke bağlı kromatografik yöntemlerle ayrılamaz (Alıcı ve Dülger 2001, Burtis ve Ashwood 2008).

HbA0 molekülü iki α ve iki β olmak üzere dört polipeptit zincirinde glikasyon yapar. Bu glikasyon, zincirlerdeki N-terminal amino asidin (valin) amino grubu ile lizin kalıntılarının tüm serbest ϵ amino grupları arasında sağlanır. Temel glikasyon bölgesi β zincirlerinin N-terminalinde bulunan valin kalıntıları olup, glukoz bağlanmasının yaklaşık %60'ından sorumludur. Glukoz α zincirlerinin N-terminal valin kalıntısına da bağlanabilir (Kurt 2003).



Şekil 2.2 Amadori düzenlenmesi (Hörber vd 2020).

HbA1C oluşumunda glukoz molekülü, hemoglobinin β zincirlerinin N-terminal amino grubuna enzimatik olmayan yolla bağlanır. Bu bağlanma sonucunda önce aldimin yapısı (Schiff bazı) oluşur. Bu yapıya pre-HbA1C de denilmektedir. Bu reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşir ve çift yönlüdür; pre-HbA1C labil formdadır. Oluşan pre-HbA1C, amadori yeniden düzenlenmesi ile stabil ketoaminler oluşturur. Bu olay yavaş ve geri dönüşümsüzdür. Oluşan bu stabil ketoaminler ileri glikasyon son ürünleri (AGE's) olarak adlandırılır (Burtis ve Ashwood 2008, Rodwell vd. 2019) (Şekil 2.2). İyi kontrol edilemeyen diyabette ileri glikasyon son ürünleri hem mikrovasküler hem de makrovasküler hasara neden olabilir (Rodwell vd. 2019).

Geçici ve ani glukoz yükselmeleri glikozillenmiş hemoglobin düzeylerine ciddi bir etki yapmazken, uzun süren yüksek glukoz konsantrasyonları HbA1C oluşumunu hızlandırır (Dönbak 2005).

2.1.4.1 Glikozile Hemoglobinin Klinik Kullanımı

Plazmada bulunan glukoz, eritrosit membranındaki GLUT1 aracılığıyla hücre içerisine girer. Eritrosit içerisine giren yüksek miktardaki glukoz, eritrositte bulunan hemoglobin ile geri dönüşümsüz bir reaksiyonla kondense olarak HbA1C'yi oluşturur. Bu

nedenle eritrosit içerisindeki HbA1C yüzdesi plazma glukozunun belirli bir zaman içerisindeki "kümülatif" ortalamasını yansıtır. Bu nedenle HbA1C, diyabetik hastaların tanısı ve takibinde kullanılmaktadır. Glikozillenmiş hemoglobin değeri, kan glukozunun kısa süreli değişimlerinden etkilenmez ve ayrıca kanın alınmasından önceki yaklaşık 2-3 aylık bir sürenin ortalama kan glukoz düzeyini yansıtır (Nitin 2010, Sherwani vd. 2016). Diyabetli hastalarda ölçülen HbA1C'lerin %50'si alınan örnekten önceki ayda, %25'i önceki iki ayda, %25'i ise 2-4 ay öncesinde oluşmuştur (Kurt 2003). Glikozillenmiş hemoglobin konsantrasyonu, plazmadaki glukoz düzeyine ve eritrosit yaşam süresine bağlıdır (McDonald vd. 2007). Genç eritrositler olgun eritrositlerden daha düşük düzeyde glikozillenmiş hemoglobin içerirler. Bu nedenle HbA1C, diyabette daha önceki glukoz düzeyini tahmin etmek için kullanılır (Panzer vd. 1982).

Yapılan bazı çalışmalarda, eritrosit ve trombosit agregasyonunun artmasının, eritrosit deformabilitesi ve ömrünün azalmasının, lökosit adhezyonunun azalmasının diyabetik hastalarda glikozillenmiş hemoglobin değerinin yükselmesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Brownlee ve Cerami 1981).

Bazı çalışmalarda demir eksikliği anemisinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası HbA1C düzeylerinin farklı olduğu bildirilmiştir. Tedavi öncesinde yüksek HbA1C düzeyleri tespit edilmiş ve tedavi ile HbA1C düzeylerinde anlamlı düşme olduğu gösterilmiştir (Brooks vd. 1980, Panzer vd. 1982).

Amerikan Diyabet Derneği (ADA) 2007'den bu yana HbA1C'yi A1C olarak da adlandırmaktadır (Nitin 2010). Diyabetin klinik başlangıcından önce glukoz ve A1C düzeyleri artmaktadır. Kılavuza göre tedavi sonucu iyi ve stabil glisemik kontrol hedefine ulaşan diyabetli hastaların yılda en az iki kez; tedavinin değiştiği veya glisemik hedeflerine ulaşamayan hastaların üç ayda bir HbA1C ölçümünü yaptırmaları gerekmektedir. Kılavuz, diyabetli hastalar için glukoz ile hemoglobin hedefinin <7% olmasını öngörmektedir (Nitin 2010).

HbA1C testi, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) tarafından onaylanmış ve Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Denemeleri (DCCT) ile standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak yapılmalıdır (ADA 2019).

Ölçülen HbA1C ve plazma glukoz düzeyleri arasındaki belirgin uyumsuzluğun en önemli nedeni, HbA1C testinin hemoglobin varyantlarından (hemoglobinopatiler) etkilenmesidir. Bu durumda diyabet tanısı için plazma glukozu kullanılmalı veya hemoglobin varyantlarından etkilenmeyen bir ölçüm yöntemi seçilmelidir. Dolaşımda eritrosit yaşam sürelerini etkilemeyen hemoglobin varyantlarına sahip olan hastalarda varyantların varlığı HbA1C ölçümünü etkilemez. Ancak normal yaşam süresinden önce

eritrosit yıkımına neden olan hemoglobin varyantları HbA1C ölçümünün yanlış çıkmasına neden olur (ADA 2019).

Diyabetli hastalarda glisemik kontrolün belirlenmesinde her ne kadar HbA1C kullanılsa da bazı nedenlerden ötürü HbA1C düzeyleri hastalığın doğru yorumlanmasına engel olabilir. Bu nedenler aşağıdaki gibidir.

- Akut veya kronik kan kaybı veya hemolitik anemi sebebi ile eritrositlerin sağ kalma oranı azaldığından HbA1C düzeylerinde azalma gözlenir.
- Hemoglobin varyantları (HbS, HbC, HbF, HbE) A1C düzeylerini değiştirebilir.
- Gebeliğin ikinci trimester döneminde A1C düzeyleri azalırken üçüncü trimester sırasında artar.
- Böbrek yetmezliğinde artan karbamid Hb, A1C düzeylerini artırır.
- Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda hemoliz veya gastrointestinal kan kaybı sebebi ile A1C düzeyleri düşer.
- Metabolik asidoz ve üre konsantrasyonundaki artış A1C düzeylerini artırır.
- Tahlil yöntemleri A1C düzeylerini değiştirebilir.
- Demir ve B12 eksikliğinin A1C üzerindeki etkileri net olarak belirlenememiştir.

A1C değerleri yalnızca kan şekeri düzeylerinden etkilenmediğinden A1C konsantrasyonu ölçülürken diğer şaşırtıcı faktörler dışlanmalıdır (Nitin 2010).

2.2 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın yeterli miktarda insülin hormonu üretememesi ya da ürettiği insüline hücrelerin etkin bir şekilde yanıt verememesi durumunda gelişir. DM, insülin hormonunun miktarında ya da etkisindeki azalma sonucunda gelişen hiperglisemi ile karakterizedir. DM, organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı metabolik bir hastalıktır (Rohlfing vd 2002, Arneth vd 2019, WHO 2011).

DM, dünyada halk sağlığını tehdit eden önemli hastalıklardandır. Dünya sağlık örgütü (WHO), dünya nüfusunun %37 artacağını ve diyabetli insan sayısının ise %114 artacağını tahmin etmektedir (Pandey vd 2015). DM'de mikro ve makrovasküler komplikasyonlar hastalarda morbidite ve mortaliteyi etkiler. Mikrovasküler komplikasyonlar olan retinopati, nefropati, ve nöropatinin gelişme riski doğrudan glisemik kontrol derecesi ile ilişkilidir (Nathan vd 1993, Rohlfing vd 2002, WHO 2011).

2.2.1 Diabetes Mellitusun Tanısı

Diyabet Açlık Plazma Glukoz (APG) değeri, 75 g Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) süresince 2 saatlik plazma glukoz (PG) değeri veya A1C kriteri gibi plazma glukoz kriterlerine bağlı olarak teşhis edilebilir. Bozulmuş Açlık Glukozu (BAG) ve Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT) pre-diyabetik evrenin tanımlanması için kullanılır. ADA' nın güncel DM tanı kriterleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Diyabet tanısı için kriterler (ADA 2019).

(APG) \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L), en az 8 saat boyunca açlık durumu
Veya
OGTT, 2.saat PG için \geq 200 mg / dL (11,1 mmol/L), suda çözünen 75 g anhidroz glukoz çözeltisi hastaya verilir
Veya
A1C \geq %6,5 (48 mmol/mol)
Veya
Hiperglisemik olan hastanın PG \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) Hastada belirgin hiperglisemi bulunmuyorsa ya aynı örnekten ya da farklı bir örnekten iki test sonucunun anormal olması ile tanı konulur.

Pre-diyabet, plazma glukoz düzeyi normal kabul edilemeyecek kadar yüksek; fakat diyabet tanısı için gerekli kriterden düşük olan bireyler için kullanılan terimdir. Pre-diyabetli hastalarda %A1C değeri 5,7 ila 6,4 (39-47 mmol/mol) arasındadır. Pre-diyabet, diyabet ve kardiyovasküler hastalık için artmış bir risktir. Pre-diyabet obezite, yüksek trigliserid dislipidemi ve hipertansiyon ile ilişkilidir (ADA 2019). Pre-diyabet için tanı kriterleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2 Pre-diyabeti tanımlayan kriterler (ADA 2019).

APG = 100 – 125 mg/dL (5,6–6,9 mmol/L) (BAG)
Veya
2 saatlik PG süresince 75 g OGTT = 140–199 mg/dL (7,8–11,1 mmol/L) (BGT)
Veya
A1C = %5,7-6,4 (39–47 mmol/mol)

2.2.2 Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Diyabetes Mellitus için sınıflandırma başlangıçta OGTT ile yapılmaktaydı. Ancak daha sonra DM, insüline bağımlı diabetes mellitus (IDDM) ve insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma da gözden geçirilmiş ve insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet terimlerini kaldırmıştır; sırasıyla tip 1 DM ve tip 2 DM isimleri verilmiştir (Dinççağ 2011). Bazı hastalar tip 1 DM ya da tip 2 DM olarak net bir şekilde sınıflandırılmaz. Bu sebepten ADA (2019) kriterlerine göre diyabet aşağıdaki gibi kategorize edilebilir:

1. Tip 1 Diyabet: Genellikle insülin eksikliğine neden olan beta-hücre yıkımı sonucu oluşur. Vücutta insülin hormonunun yokluğuna bağlı olarak kan şekeri hızla yükselir. Hasta enerji olarak glukoz yerine yağları kullanmaya başlar ve kilo kaybı çok belirgindir.
 - Tip 1A Diyabet: Hastaların %90'ında görülür, otoimmün bir hastalıktır. Pankreatik beta hücreleri virüs, toksin, stres gibi çevresel koşullarda immün hücreleri tarafından yıkıma uğrar.
 - Tip 1B Diyabet: Hastaların %10'unda görülür, non - immün bir hastalıktır. Otoimmünite dışındaki bazı nedenlerden dolayı insülin eksikliği gözlenir.
2. Tip 2 Diyabet: Hastalarda insülin direnci artar ve insülin salgılanmasında azalma gözlenir. Tip 1 diyabete göre daha yaygındır ve genellikle ileri yaşlardaki insanları etkiler. Yaşam şekli değişikliği (diyet ve egzersiz) ve gerekirse ilaç tedavisi ile önlenabilir bir hastalıktır.
3. Gestasyonel Diyabet: Gebelikte başlayan, doğumla sonlanan diyabettir. Kişide genetik yatkınlık bulunur ve plasental hormonlar nedeniyle dekompanse hale geçen insülin direnci vardır.
4. Spesifik Diyabet Türleri: Kriterlerin Tip 1 veya Tip 2 diyabet yönünde net olmadığı durumlarda değerlendirilen diyabet tipleridir. MODY (Maturity Onset Diabetes of Youngs), monogenik diyabet formlarındandır ve sık görülendir.

DM'nin daha geniş etyolojik sınıflandırması Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3 Diyabette etiyolojik sınıflandırma (Dinççağ 2011, ADA 2019).

-
1. Tip 1 Diyabet: Genellikle insülin eksikliğine neden olan beta-hücre yıkımı sonucu oluşur
 - A. İmmün aracılı
 - B. İdiyopatik
 2. Tip 2 Diyabet: İnsülin sekresyon defekti ile karakterizedir.
 3. Gestasyonel Diyabet: Gebelik sırasında oluşan ve genellikle doğumla sona eren diyabettir.
 4. Spesifik Diyabet Tipleri
 - Monogenik Diyabet Formları
 - İnsülin Etkisindeki Genetik Defektler
 - Pankreasın Ekzokrin Doku Hastalıkları
 - Endokrinopatiler
 - İlaç veya Kimyasal Ajanlar
 - İmmün Aracılıklı Nadir Diyabet Formları
 - Diyabetle İlişkili Genetik Sendromlar
-

2.2.3 Serbest Radikaller ve Diyabetes Mellitus

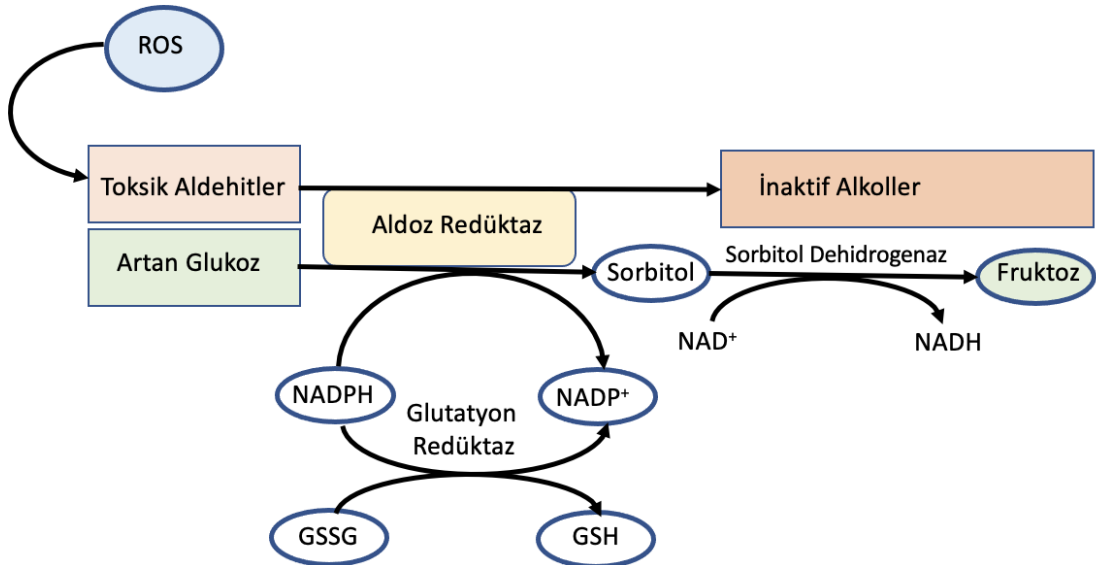
Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra artmış bir oksidatif stres durumudur (Memişoğulları 2005). Oksidatif stres, serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller yönünde bozulmasıdır (Macit ve Akbulut 2015). Birçok çalışma oksidatif stresin diyabet ve bununla ilişkili komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesinde anahtar bir unsur olduğunu göstermiştir (Chawla vd 2020). Artan serbest radikaller lipidler ile etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve nükleik asitler ile etkileşerek genetik mutasyonlara yol açar (Memişoğulları 2005, Ullah vd 2016). Diyabette kan glukoz konsantrasyonunun sürekli yükselmesi sonucunda oksidatif stres artarak proteinlerin glikasyonu artar ve bu durumda hücre dışı matrikste bulunan kollajen ve diğer proteinlerin özellikleri değişir. Kollajenin glikasyona uğraması sonucunda kollajen çapraz bağları artar. Çapraz bağların artması kan damarlarının duvarlarında başta düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) olmak üzere çeşitli plazma proteinlerinin birikimine neden olur. LDL birikimi aterogeneze katkıda bulunabilir (Yağmur 2010, Rodwell vd. 2019). Serbest radikallerin oluşumu sonucu meydana gelen oksidan maddeler nitrit oksidin (NO) azalmasına yol açarak vazokonstriksiyon ve hipoksiye neden olur. Diyabetik retinopatide antioksidan olarak vitamin E kullanımının retinal kan akımını normaleştirdiği görülmüştür (Yağmur 2010).

2.2.4 Polyol Yolu

Polyol yolu, hiperglisemi durumunda glukozdan sorbitol ve früktoz oluşturan bir yoldur. Sorbitol oluşumunda aldoz redüktaz kullanılır. Normalde aldoz redüktaz enzimi glukoz için düşük afiniteye sahiptir. Ancak hiperglisemi durumunda aldoz redüktaz miktarı artar ve bu enzimle glukoz sorbitole çevirir. Bu reaksiyonda kofaktör olarak nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Sorbitol, kofaktör olarak NAD^+ 'yi kullanan sorbitol dehidrogenaz (SDH) ile früktoza oksitlenir (Giacco ve Brownlee 2010, Ighodaro 2018).

Aldoz redüktaz sinir, retina, lens, glomerulus ve vasküler gibi dokularda bulunur. Bu dokuların çoğunda, dokulara glukoz alımına insülininden bağımsız GLUT'lar aracılığı ile olur. Bu nedenle hiperglisemiye paralel olarak bu dokularda hücre içi glukoz konsantrasyonları yükselir (Giacco ve Brownlee 2010, Ighodaro 2018).

Glutasyon, reaktif oksijen türleri (ROS) için önemli bir antioksidandır. Glutasyonun hücrede etkinliğini gerçekleştirebilmesi için redükte formda olması gerekir. Okside glutasyonun redükte forma çevrilebilmesi için NADPH gereklidir. DM'de hiperglisemi nedeni ile artan sorbitol miktarı ile birlikte NADPH miktarı azalır. Azalmış NADPH'ye bağlı olarak glutasyon redüktaz aktivasyonu azalır. Redükte glutasyon miktarının azalması DM'nin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında önemli rol oynar (Giacco ve Brownlee 2010, Ighodaro 2018).



Şekil 2.3 Polyol yolağı (Çetiner ve Rakıcıoğlu 2020).

2.2.5 Diyabet Komplikasyonları

Diyabet, eksik veya azalmış insülin üretimi veya etkisi ile karakterize edilen metabolik bozukluktur. Ayrıca plazmadaki yüksek glukoz düzeyi ile de ilişkilendirilir. Plazma glukoz konsantrasyonlarındaki kontrolün sağlanamaması sonucu organizmada damarlar ile sinirler hasar görür. Diyabetin sebep olduğu bu hasarlara komplikasyonlar denir. Diyabet komplikasyonları hem tip 1 hem de tip 2 diyabetli bireylerde görülür (Ullah vd 2016).

Akut komplikasyonlar metabolik ve kısa süreli komplikasyonlardır. Diyabetik ketoasidoz (DKA), hiperglisemik hiperosmolar sendrom (HHS), laktik asidoz ve hipoglisemi gibi diyabetin akut komplikasyonları büyük ölçüde önlenbilir. Ancak yine de diyabetli kişiler arasında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olur (Marcovecchio 2017).

Diyabetik ketoasidoz (DKA) hayatı tehdit eden ciddi bir komplikasyondur. Plazmadaki glukozu hücre içine alacak insülin düzeylerindeki azalma sonucunda oluşan hiperglisemi ortamda görülür (Ghimire ve Dhammon 2020). Beyin, kalp, iskelet kas dokuları enerji için yeterli glukoz alamadıklarında vücutta serbest yağ asitlerinin oksidasyonu ve lipoliz gerçekleşir. Sonuçta keton cisimleri birikerek asidoz artar (EL-Mohandes ve Huecker 2019).

Hiperglisemik hiperosmolar sendrom (HHS), DKA gibi insülin salgısının azlığı ve aşırı hiperglisemi ile karakterizedir (Fayfman vd 2017). HHS, kişiyi komaya götürebilen çok ciddi bir metabolik sendromdur. DKA'ya kıyasla keton cisimlerinin üretimi azdır. Plazmadaki aşırı hiperglisemi kanın osmotik basıncının artmasına ve hücrelerden plazmaya su taşınmasına sebep olur. Sonuçta hücrelerde su kaybı gözlenir ve ayrıca böbreklerden suyun geri emilimi azalır. Bu da elektrolit dengesizliklerine sebep olur. Kanın osmotik basıncının giderek artması beyin hücrelerinden su kaybına sebep olarak kişiyi komaya kadar götürür (Baldrighi vd 2018, Adeyinka ve Kondamudi 2019).

Hipoglisemi, plazma glukoz konsantrasyonunun 70 mg/dL'nin altına düşmesi sonucu gözlenen metabolik bir sendromdur. Ancak belirtiler genellikle plazma glukoz düzeyi 55 mg/dL'nin altına düşünce gözlenir. Başta tip 1 DM olmak üzere tip 2 DM ve böbrek hastalığı olan diyabetik olmayan hastalarda gözlenir. İnsülin tedavisi uygulanan tip 1 diyabetli hastalarda sık gözlenir. Diyabetli olmayan bireylerde glukoz düzeyi aşırı düştüğünde insülin salgısı azalarak glukagon salgısı artırılır. Bu sayede hipoglisemi düzeltilir. Ancak tip 1 diyabetli hastalarda tedavi için alınan insülinin düzeyi azaltılamadığından hipoglisemi düzeltilemez (Mathew ve Thoppil 2019).

Laktik asidoz, vücutta laktik asit birikmesidir. Laktik asit üretimi birçok hücrede gözlenir; ancak en çok cilt, eritrositler, beyin ve iskelet kasında gerçekleşir. Anormal olarak kabul edilen düzeyi ≥ 2 mmol/L'dir, ancak bu düzeyin ≥ 4 mmol/L olması hastaların yüksek riskte olduğunu belirtir. Plazma laktat düzeylerinin zamanla azaltılamaması çoklu organ yetmezliği ve mortalite olasılığını artırır. Laktat üretimi metformin, etanol, karaciğer yetmezliği, tiyamin eksikliği, anaerobik metabolik durum gibi hastalıklarda artar (Foucher ve Tubben 2019).

Plazma glukozunun uzun süre yüksek olması büyük ve küçük damarlar ile birlikte nöronlarda hasarlara sebep olarak makro ve mikrovasküler hastalıkların gelişmesine sebebiyet verir. Makrovasküler komplikasyonlar kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferik arter hastalığını kapsar. Akut hiperglisemi, kronik hipergliseminin doku hasarı oluşturucu etkisini artırabilir (Marcovecchio 2017).

Kardiyovasküler hastalık, diyabetli bireylerde en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Diyabetli bireylerde kardiyovasküler hastalıklar diyabetli olmayanlara oranla 2-4 kat daha fazla görülmektedir (Yılmaz vd 2018, Santulli 2019). Diyabetli bireylerde endotel fonksiyon bozukluğu ve aterosklerozun kardiyovasküler hastalık gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Çayır ve Turan 2015, Marcovecchio 2017). Hiperglisemi, polyol ve heksozamin yollarının aktivasyonu, diasilgliserol-protein kinaz C (DAG-PKC), gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE's) aktivasyonu, büyüme faktörlerinin artan sentezi, sitokinler ve oksidatif stres gibi çeşitli mekanizmalarla vasküler komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunur (Marcovecchio 2017). Ancak yine de DM ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (Santulli 2019).

Serebrovasküler Hastalıklar (SVH), inme olarak da adlandırılır ve beyne giden damarların tıkanması ya da kanaması sonucunda beynin kalıcı ya da geçici olarak etkilenmesi durumudur. Diyabetli hastalarda azalmış insülin salınımı, ateroskleroz riskini artırdığından inme riski bu hastalarda fazladır (Şahin vd 2015).

Periferik arter hastalığı kollara, bacaklara ve iç organlara kan akışını sağlayan atardamarların ateroskleroz nedeniyle tamamen veya kısmen tıkanması sonucu oluşan ciddi bir hastalıktır. DM, aterosklerotik hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Diyabetli hastalarda periferik arter hastalığının ilerlemesi daha olasıdır. DM ve periferik arter hastalığı birlikte bulunan hastalar için kardiyovasküler risk oranı artar (Giannopoulos ve Armstrong 2020).

Mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nefropati ve nöropatiyi kapsar.

Retinopati, diyabetin en önemli ve en sık görülen komplikasyonu diyabetik retinopatidir (Wang ve Lo 2018, Servat vd 2019). Kan glukoz konsantrasyonunun artması ile diyabetik retinopati gelişimi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. DCCT'nin yaptığı çalışmada sıkı glisemik kontrol ile Tip 1 diyabetli hastalarda yeni retinopati riskinin %76 ve mevcut retinopatinin ilerlemesinin %54 azaldığı gösterilmiştir. Tedavi amaçlı yapılan son çalışmalarda HbA1C konsantrasyonunu %7,6'nın (60 mmol / mol) altında tutmanın Tip 1 diyabetik hastalarda diyabetik retinopati gelişimini 20 yıla kadar önlediği gösterilmiştir (Servat vd 2019).

Diabetes mellitusun mikrovasküler komplikasyonlarından birisi nefropatidir. Diyabetik nefropatinin en erken belirtisi albüminüridir. Üç-altı aylık zamanda yapılan üç tetkikten ikisinde albüminürinin >300 mg/24 saat veya >20 µg/dk olması diyabetik nefropati varlığının göstergesidir (Atasoy vd 2014).

Hayatı tehdit eden bir komplikasyon olan diyabetik nöropati, hem periferik hem de otonom sinirleri içerir ve diyabetik popülasyonun neredeyse yarısını etkilemektedir. Diyabetik nöropatinin gelişme riski hipergliseminin süresi ve büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Diyabetik nöropatinin bir veya daha fazla makrovasküler komplikasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Periferik nöropatiye sahip DM'li hastaların nöropatiye sahip olmayan DM'li hastalardan daha yüksek kardiyovasküler ve periferik vasküler hastalığa sahip oldukları belirlenmiştir. Nöropatiye sahip DM'li hastalarda felç görülme oranı da artmaktadır (Chawla vd 2020).

Tip 2 DM'li hastalarda makrovasküler komplikasyon riskinin mikrovasküler komplikasyon riskinden 4 kat daha fazla olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. İyi glisemik kontrol ile nöropati oluşumunun ve ilerlemesinin azaldığı sonucuna varılmıştır. 10 yıl süre boyunca 5102 hasta ile yapılan geniş çaplı çalışmada iyileştirilmiş glukoz düzeyleri ile mikrovasküler komplikasyonlarda %25, miyokart enfarktüsü ve ani ölüm riskinde %16 ve ayrıca makrovasküler komplikasyon insidansının azaldığı rapor edilmiştir. UKPDS çalışmasında, HbA1C düzeylerindeki her %1'lik düşüş ile miyokart enfarktüsü prevalansında %14, kalp yetersizliği gelişiminde %16 ve inme gelişiminde %12'lik risk azalması sağlandığı gösterilmiştir. (Yağmur 2010).

2.2.6 Glisemik Kontrol ve Diabetes Mellitus

DM dünyada hemen hemen her toplumu etkileyen, hiperglisemiye neden olan bir hastalıktır. DM'li hastalarda mikrovasküler (retinopati, nefropati, nöropati) ve makrovasküler hastalıklar (kardiyovasküler hastalığı, inme ve periferik vasküler hastalıklar) ve hipertansiyon gelişebilir. Kardiyovasküler komplikasyonlar morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli unsurdur. DM'li hastalarda kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranı diyabetik olmayan hastalara oranla daha fazladır (Pandey vd 2015, Cannon vd 2018). DM'li hastaların %90-95'i Tip 2 DM'li hastalardır ve bu hastaların %60-75'i makrovasküler hastalıklar nedeniyle hayatlarını kaybetmektedir (Yağmur 2010).

Diyabet takibinde temel nokta glisemik kontroldür. İyi bir glisemik kontrol ile mikro ve makro komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesi önenebilir (Avcı ve Selçuk 2016). Yapılan çalışmalar insülin ve anti-diyabetik ilaçların glisemik kontrolü sağlayarak diyabetlilerin yaşam sürelerini uzattığını; ancak komplikasyon görülme sıklığını arttırdığını göstermiştir (Yağmur 2010).

Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları (DCCT) çalışmasında glisemik kontrol sağlanmış hastalarda mikrovasküler komplikasyonların gelişme hızının yavaşladığı bildirilmiştir. Hedef düzey olan $<7\%$ HbA1C düzeyine, standart tedavi yerine yoğun glisemik kontrol ile ulaşılması ciddi hipoglisemi riskini artırmakta ve kilo artışlarına neden olmaktadır (Yağmur 2010, Harris vd 2018). İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması (UKPDS) çalışmasında yağun tedavi ile mikrovasküler ve nöropatik komplikasyonlarda anlamlı azalmanın görüldüğü belirtilmiştir (Yağmur 2010).

2.3 HbA1C Ölçüm Yöntemleri

HbA1C ölçümü için çok sayıda ölçüm yöntemi bulunmaktadır. Başlarda HbA1C'nin ayrımı için yük farkını temel alan yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler iyon değişim kromatografisi, elektroforez, kapiller elektroforez ve izoelektrik odaklamadır. Yük farkına dayalı yöntemler diğer hemoglobin tipleri ile interferans oluşturabilmektedir. Bu interferanstan kaçınmak için seçiciliğin artırıldığı diğer yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Afinite kromatografisi, immünokimyasal yöntemler ve enzimatik yöntemlerden oluşan bu yöntemler glikozile ve glikozile olmayan hemoglobinin yapısal farklarından yararlanır(Çalışır 2019).

2.3.1 Elektroforez

Elektroforez, ortamın pH' sine göre (+) veya (-) yüklü moleküllerin elektriksel bir alanda farklı yerlere göç etmesi ve birbirinden ayrılması temeline dayanır. Bu yöntemde biyomoleküller elektrik yükleri ve büyüklüklerine göre hareket ederler. Sıvı veya katı bir ortama elektrik akımı uygulanarak yüklü moleküllerin ayrımı ve analizi yapılır. Pozitif yüklü moleküller (katyonlar) negatif yüklü elektroda (katoda), negatif yüklü moleküller (anyonlar) pozitif yüklü elektroda (anoda) doğru ilerler. Göç sonunda moleküller ayrı bantlar oluşturarak birbirlerinden ayırt edilirler (Sönmez Ç ve Yurtarlan A).

Elektroforezde analizi yapılacak olan örnek bir destek ortamına bir leke ya da bant şeklinde uygulanır. Destek ortamı olarak çoğunlukla jeller tercih edilir. En çok kullanılan destek matrisi agaroz jeldir. Jeller, örneklerin yüklenmesi için gözenekler içeren ince bir kalıptır. Bütün jel belirli bir pH'ye ayarlanmış olan bir tampon içerisine daldırılır (Akar vd 2013).

Klinik laboratuvarlarda elektroforez, vücut sıvı ve dokularında bulunan proteinler, peptitler, amino asitler, nükleik asitler, organik asitler gibi yüklü moleküllerin ayrımı ve analizi için kullanılmaktadır (Akar vd 2013).

Hemoglobin amfoterik bir moleküldür. İçinde bulunduğu çözeltinin pH'sine göre pozitif veya negatif yük alır. Genellikle negatif yüklüdür. Ortamın pH'si selüloz asetat agar kullanıldığında 8,6; sitrat agar kullanıldığında 6,3'tür. Hemoglobin molekülünün (HbA0) izoelektrik noktada pH değeri 7,0'dır. Ancak amino asit kalıntısının amino grubuna glukoz bağlanarak meydana gelen HbA1C molekülünün sahip olduğu pozitif yüklerin sayısı azaldığından net yük negatife kayar. HbA0 ve HbA1C arasındaki bu yük farkına bağlı olarak moleküllerin ayrımı gerçekleştirilir (Gupta vd 2017).

2.3.2 Kapiller Elektroforez

Kapiller elektroforez, yüklü moleküllerin genellikle 10-100 µm iç çapa sahip, 20-200 cm uzunluklarda olabilen erimiş silika kapiller borular içerisinden geçerek ayrılması prensibine dayanan tekniktir. Erimiş silika kapiller borular tampon ile doldurularak, içinde elektrotlar bulunan iki tampon haznesi arasına yerleştirilir. Analizi yapılacak örnek bir uçtan verilerek ayrımı gerçekleşen moleküller diğer uca göçer, bu sırada dedektör tarafından okunur (Akar vd 2013).

Kapiller HbA1C elektroforezinde ortamın pH'sine ve yüksek voltajda uygulanan elektrik akımına bağlı olarak hemoglobin fraksiyonları silika kapiller içerisinde farklı bölgelere hareket ederek birbirinden ayrılırlar. Eğer kullanılan tampon hemoglobinin izoelektrik noktasından (pI) düşük bir pH'ye sahipse katyonlar gibi davranır ve pozitif yüklü bir amino grubunun glukoz bağlanması nedeniyle diğer hemoglobinlerden ayrılmasıyla HbA1C ayırt edilebilir. Alkali destek ortamında ise bir anyon gibi davranır ve bir borat anyonu ile HbA1C'nin glukoz biriminin etkileşimi ile duyarlılık artırılır (Akar vd 2013).

2.3.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, HbA1C'nin llmesinde kullanılan en yaygın analitik tekniklerden biridir. HPLC'de HbA1C'yi diğer hemoglobin moleküllerinden ayırt etmek için iyon değişimi veya afinite kolonları kullanılır (Gupta vd 2017).

HPLC, maddeleri kolondan çıkış zamanlarına göre analiz etmektedir. Test edilecek biyomolekül uygun bir çözücüde çözdürülür, çözünen karışım kolona enjekte edilir. Sabit faz μm boyutundaki porlara sahip olduğundan hareketli fazdan oluşan sıvının hareket edebilmesi için yüksek basınç uygulanır. Enjekte edilen bileşenler kolon boyunca ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar. Ayrımı gerçekleşen ve farklı zamanlarda çıkışa ulaşan bu bileşenlerin pikleri kaydedilir. Her bir bileşen için alınan dedektör cevabı, bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir (Eser ve Dinçel 2018). HbA1C'nin lm, HbA1C pik alanının toplam hemoglobin pik alanına oranına dayanarak llr (Gupta vd 2017). HPLC yöntemi HbA1C'yi 415-500 nm çift dalga boyu ile ölür (Genç vd 2012).

Karşılaştırma amaçlı kullanılan Tosoh G8'in test prensibi şu şekildedir:

Tosoh G8 Otomatik Glikohemoglobin Analizörü HLC – 723G8, HPLC ilkesine dayanmaktadır. HLC, bir katyon değişim kolonu kullanır ve kandaki normal hemoglobin bileşenlerini HbF, s-A1C, toplam HbA ve hemoglobin varyantları olmak üzere farklı fraksiyonlara ayırır. Cihaz, ayırma işlemi için hemoglobin bileşenleri arasındaki iyonik etkileşim farklılıklarını kullanır. Ayırma işlemi, farklı tuz konsantrasyonları içeren üç elüsyon tamponunun aşamalı gradyan elüsyonu ile sağlanır.

2.3.4 Boronat Afinite Kromatografisi

Karbonhidratlar ile bağ yapmış analitlerin ayrılması ve analizi için kullanılan kromatografi tekniğidir. Glikozillenmiş hemoglobin ve plazma proteinleri borat bağlayarak kendine özgü oluşturduğu 1,2-cis diol yapısı içermesi nedeniyle glikozillenmemiş diğer proteinlerden farklılık gösterirler (Willey vd 1984). Boronat ile karbonhidratın diol grupları arasında kovalent bağ oluşarak kovalent ürün meydana gelir. Oluşan bu ürüne boronat esteri denir. Karbonhidrat ile boronat arasındaki ester oluşumu bazik pH'de gerçekleşir (Çalışır 2019).

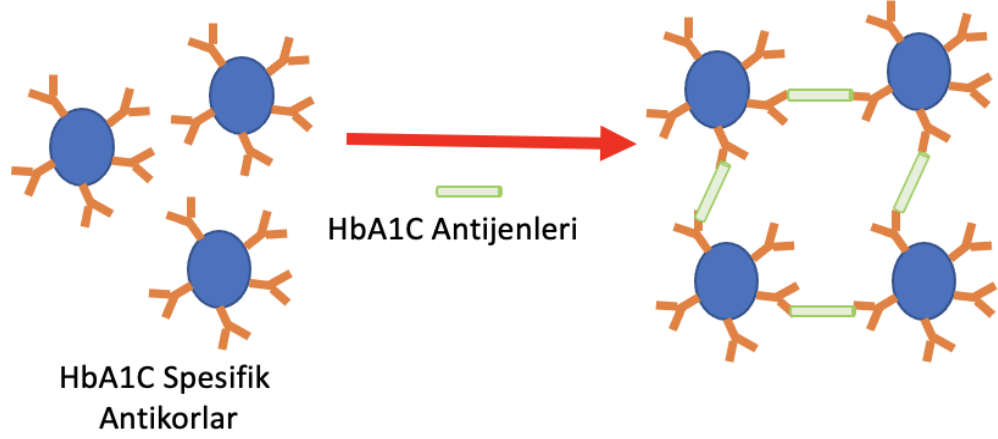
Boronat afinite kromatografi yönteminde hemoglobinlerin ayrımları yalnızca glikozillenmiş ve glikozillenmiş hemoglobin olarak iki ayrı fraksiyonda gerçekleştiğinden glikozillenmiş hemoglobin, toplam hemoglobinle karşılaştırılır ve sonuçlar % HbA1C olarak ifade edilir (Gupta vd 2017).

2.3.5 İmmünolojik Test Yöntemi

İmmünolojik testler, antijen ile antikor reaksiyonuna bağlı analitin miktarının belirlendiği testlerdir. Buradaki antijen genellikle test edilen analittir. Yarışmalı immünolojik test, sınırlı miktardaki bağlanma bölgesine sahip, oldukça spesifik antikora (anti-analit) bağlanmak için sabit miktardaki etiketlenmiş analit ile değişken miktardaki etiketlenmemiş analit arasında rekabeti içerir. Rekabetçi yarış reaksiyonunda reaktifler inkübe edilir ve antikor-antijen kompleksi meydana gelir. Bu kompleksten fiziksel veya kimyasal ayırma tekniği ile bağlanmamış reaktif fraksiyonları ayrılır. Antijen-antikor kompleksinde antikordaki bağlanma bölgelerinin hepsi doymayacağından antikorda serbest fraksiyonlar bulunur. Bağlı veya serbest fraksiyondaki etiket aktivitesi ölçülür. Bu ölçüm radyasyon, floresan veya enzim etiketleme şeklinde yapılabilir. Ölçüm sonucunda koordinat düzlemi oluşturulup elde edilen ölçüm değerleri konsantrasyonlarına göre koordinat düzlemine yerleştirilir. Konsantrasyonlar ve bunlara ait okuma değerlerinin kesişme noktaları birleştirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Bu kalibrasyon eğrisinden bilinmeyen analit konsantrasyonu belirlenir (Sivaraman 2020).

HbA1C için immünolojik test, antijen molekülleri (HbA1C) ile bu antijene özgü antikor arasındaki etkileşime dayanır. Antikorlar, HbA1C'nin β zincirinin N-ucunda bulunan glukoz bağlanmış amino asitleri hedefler (Sivaraman 2020). Antikorlar ile HbA1C arasında gerçekleşen çapraz bağlanmalar çözeltide bulanıklık (türbidite) oluşturur. Bulanıklık HbA1C konsantrasyonu ile orantılı olarak artar. HbA1C için ticari

olarak temin edilen immünolojik testlerin çoğunda kullanılan antikorlar, N-ucunda glukoz bağlanan ilk dört veya daha fazla amino asidini tanır (Hörber vd 2020). HbA1C için immünolojik testlerin sayısı giderek artmaktadır. Immünolojik testler genellikle sıvı kromatografi veya enzimatik yöntemlerle elde edilebilecek olandan daha yüksek laboratuvarlar arası % CV'ye sahiptir (Pentilla vd 2016).



Şekil 2.4 Immünolojik yöntemin şematik gösterimi (Gupta vd 2017).

Karşılaştırma amaçlı kullanılan türbidimetrik cihaz olan Roche Cobas 6000'in test prensibi şu şekildedir:

HbA1C'nin tayini, hemolize tam kan için türbidimetrik inhibisyon immünolojik analizine (TINIA) dayanır. β -zinciri N-terminal kısmında glukozillenmiş ve HbA1C'ninkine özdeş antikor tarafından tanınabilir bölgeleri olan tüm hemoglobin varyantları bu test ile tayin edilir. Bu sayede üremisi olan hastaların metabolik durumları ve en sık görülen hemoglobinopatiler (HbS, HbC, HbE) bu test kullanılarak belirlenir (Chang vd 1998).

Hemoliz edici reaktif içerisinde deterjan olarak Tetradecil trimetil amonyum bromür (TTAB) kullanılır. TTAB, lökositlerin neden olabileceği etkileşimi lökositleri parçalamadan ortadan kaldırır. Bu yöntemde kararsız HbA1C'nin uzaklaştırılması için ön işleme gerek yoktur.

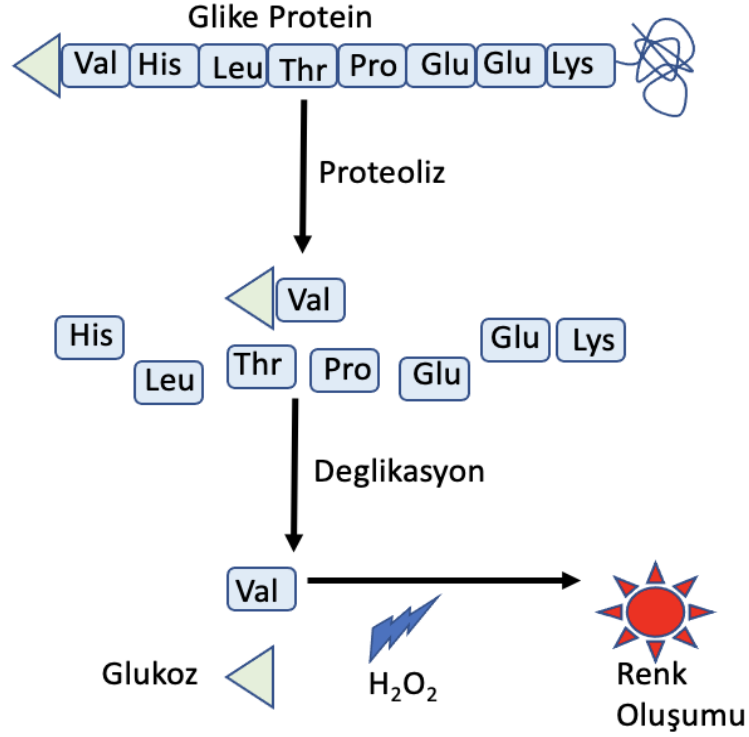
Numune içindeki HbA1C'nin, anti-HbA1C antikoruna girerek çözünbilir antikor-antijen komplekslerinin oluşması için test edilecek numuneye R1 antikor reaktif (tampon/antikor) eklenir. HbA1C antikor bölgesi HbA1C molekülünde yalnızca bir yerde bulunduğu için çözünmeyen kompleksler oluşmaz. R1-antikor reaktif 0,025 mol / L MES tamponu; pH 6,2' de 0,015 mol / L TRIS tamponu; \geq

0,5 mg/mL HbA1C antikoru (koyun serumu), deterjan, stabilizatörler ve koruyucu maddeler içerir. Antikor-antijen kompleksi oluşturmamış serbest anti-HbA1C antikoru ile polihaptenlerin reaksiyona girebilmesi için numuneye R3-polihapten reaktifi (tampon/polihapten) eklenerek çözünmez antikor-polihapten kompleksleri oluşturulur ve bu sayede reaksiyon başlatılır. Bu antikor-polihapten kompleksleri türbidimetrik olarak tayin edilir. R3-polihapten reaktifi 0,025 mol/L MES tamponu; pH6,2'de 0,015 mol/L; TRIS tamponu ≥ 8 mg/mL HbA1C polihapten; deterjan; stabilizatör; koruyucu maddeler içerir. R2 reaktifi distile su içerir.

Hemolize numunede serbest kalan hemoglobin, immünolojik reaksiyonun enkübasyon öncesi fazı (numune+R1) sırasında bikromatik yöntemle ölçülebilen karakteristik absorpsiyon spektrumuna sahip bir türeve dönüştürülür.

2.3.6 Enzimatik Test Yöntemi

Enzimatik test yönteminde tam kan numuneleri proteolitik sindirime tabi tutulur. Proteoliz sonucu β zincirinden ayrılan N-terminal glukoz bağlanmış valinler rekombinant teknolojiyle üretilmiş olan fruktozil valin oksidaz (FVO) enziminin substratı olur. FVO, enzimatik deglikasyon denilen bir reaksiyon ile N-terminal valinden glukozu ayırır. Bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Oluşan H_2O_2 uygun bir kromojen kullanılarak kolorimetrik test ile ölçülür. Reaksiyonda oluşan sinyal ile % HbA1C olarak ifade edilen doğrusal kalibrasyon eğrisi oluşturularak numunedeki HbA1C yüzdesi doğrudan raporlanır (Rhea ve Molinaro 2014, Liu vd 2008).



Şekil 2.5 HbA1C ölçümünde enzimatik yöntem (Rhea ve Molinaro 2014).

Enzimatik test yöntemi hemoglobin varyantlarından analitik olarak etkilenmez (Rhea ve Molinaro 2014). Bu yöntem ayrıca toplam hemoglobin ölçümüne gerek kalmaksızın % HbA1C değerlerini doğrudan bildirir ve doğruluk, kimya analizörlerine uygulanabilirlik açısından hem HPLC hem de immünoanaliz yöntemlerinin tüm avantajlarına sahip olmasına rağmen uygun maliyetlidir. Enzimatik analiz diğer analizlere kıyasla daha basittir ve daha az müdahale gerektirir. Enzimatik HbA1C deneylerinin en önemli özelliği diğer tüm HbA1C deneylerine kıyasla en yüksek özgüllüğe sahip olmasıdır. Doğrudan enzimatik HbA1C yöntemi, %4 ila %16 arasında test lineerlik aralığına sahiptir (Liu vd 2008).

2.3.7 Biyosensörler

Biyosensörler, reaksiyondaki analite karşı seçici özellik gösteren, analitin konsantrasyonu ile orantılı sinyaller üreterek biyolojik ve kimyasal reaksiyonları ölçen cihazlardır. Bu cihazlar ile ölçülen analiter substrat, enzim, antikor, hormon, antijen, mikroorganizma, nükleik asitler olabilir. Biyosensörler aracılığıyla ayrıca vücut sıvılarındaki hastalığa neden olan belirteçlerin tespiti yapılabilir (Bhalla vd 2016).

Biyosensörlerde genel olarak elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır. Bu sistemler vasıtasıyla biyoreseptör ve tespit edilecek analit arasında oluşan etkileşim sonucunda meydana gelen sinyal ölçülür (Bhalla vd 2016).

Elektrokimyasal biyosensörler, enzim ile substrat arasındaki biyokimyasal etkileşim sırasında tüketilen veya üretilen elektrokimyasal sinyali ölçer (Fracchiolla vd 2013).

Optik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonların sonucunda yayılan ışığı yüksek özgüllük ve hassasiyetle ölçer. Küçük boyut ve düşük maliyet avantajları arasındadır (Damborsky vd 2016, Fracchiolla vd 2013).

Kalorimetrik biyosensörler, ekzotermik reaksiyon sırasında açığa çıkan ya da endotermik reaksiyonda tüketilen ısının ölçümünde kullanılırlar (Pearson vd 2000). Bu biyosensörlerde istenen enzimin sabitlendiği termal olarak yalıtılmış sütunlar kullanılır. Numunenin optik ve elektrokimyasal özelliklerine duyarlıdır (Fracchiolla vd 2013).

Piezoelektrik biyosensörler, kütle tabanlı sensörlerdir ve biyoreseptör ile kaplı kuartz kristaline sahiptirler. Kristal, yüzeyde analitlerin birikmesi ile kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesini temel alarak çalışır. Kullanımı basit ve ucuzdur; fakat özgüllük, seçicilik ve hassasiyetten yoksundurlar (Fracchiolla vd 2013).

Analit–biyoreseptör ilişkisine göre biyosensörler üç farklı şekilde sınıflandırılır:

1. Biyoafinite esaslı biyosensörler; transducer (dönüştürücü) sistem üzerinde antikor/antijen immobilizasyonu ile antijen/antikor tayini yapılır.
2. Biyokatalitik esaslı biyosensörler; dönüştürücü sistem üzerinde enzim immobilizasyonu ile substrat tayini yapılır.
3. İmmobilize hücre esaslı biyosensörler; dönüştürücü sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonu ile o hücreler tarafından metabolize edilen maddelerin tayini yapılır (Li 2006).

Biyoreseptörlerin genel olarak dönüştürücü sistem üzerinde immobilizasyonu (sabitleme) yapılarak reaksiyonun etkili şekilde çalışması, verimli sinyal aktarımı, yüksek stabilite ve tekrarlanan deneyler gerçekleştirme olanağı sağlanır. İmmobilizasyon yöntemleri arasında kimyasal veya fiziksel adsorbsiyon, jel içinde veya polimer matrikste tutuklama, moleküllerin çapraz veya kovalent bağlanması yer alır (Dennison ve Turner 1995).

Analitin tespiti açısından biyosensörler doğrudan ve dolaylı olarak iki genel kategoriye ayrılırlar. Doğrudan biyosensörler, etiketsiz biyosensörler olarak da

adlandırılır ve bu sensörler vasıtasıyla reaksiyon sonucunda açığa çıkan sinyaller, doğrudan analitin varlığı ve miktarını belirtir. Örneğin; glukoz tayini doğrudan biyosensörler ile yapılır. Dolaylı biyosensörler ise etiketli biyosensörler olarak adlandırılırlar ve bu sensörlerde analitlerin varlığı ve miktarı etiketler vasıtasıyla tespit edilir. Etiketler yardımıyla biyoreseptörden dönüştürücüye giden sinyaller güçlendirilebilir (Li 2006).

HbA1C biyosensörleri boronik asit türevleri, antikorlar ve enzimler olmak üzere üç ayrı kategoriye ayrılır. Bu üç farklı HbA1C sensörü elektrokimyasal biyosensörleri kullanır. En çok tercih edileni ise boronik asit türevli biyosensörlerdir (Lin ve Yi 2017).

2.4 HbA1C'nin Standardizasyonu

Farklı laboratuvarlardan alınan aynı kan örneğinin HbA1C sonuçları aynı yöntemler ile ölçülmesine karşın farklı olabildiğinden HbA1C ölçüm yöntemlerinin standardize edilme gereği duyulmuştur. 1993 yılında Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Denemeleri (DCCT) çalışması sonucunda, dünyanın herhangi bir yerinde ölçülen HbA1C değerinin DCCT ile aynı değerleri vermesi gerektiği önerilmiştir (Leslie 2008).

HbA1C yöntemlerini standartlaştırmak için 1996'da Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) çalışma grubu oluşturulmuş ve böylece farklı laboratuvarlardan gelen HbA1C sonuçlarının DCCT çalışması ile karşılaştırılabilir olması hedeflenmiştir. HbA1C yöntemlerinin NGSP ile standardizasyonu ABD, Kanada, Meksika, Güney Amerika, çoğu Avrupa ülkesi ve çoğu Asya ülkesinde kullanılmaktadır. Japonya ve İsveç'te ise farklı HbA1C standardizasyon programları kullanılmaktadır. Japonya'da Japon Diyabet Derneği (JDS) ve Japon Klinik Kimya Derneği (JSCC); İsveç'te Mono S katyon değişim kromatografi kolonu kullanarak ulusal referans laboratuvar ağı oluşturmuştur. Bu üç standardizasyon programının kullanımıyla HbA1C testlerinin kalitesi artırılmıştır. Bununla birlikte, bu standardizasyon programlarında kullanılan yöntemler birincil referans yöntemleri olmayıp doğrudan karşılaştırma yöntemleridir ve farklı sonuçlar vermektedir (Leslie 2008).

1994 yılında, Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC) bünyesinde HbA1C standardizasyonu üzerine bir çalışma grubu kurulmuştur (Finke vd 1998). Bu çalışma grubu birincil referans malzemesi olarak saf HbA ve HbA1C'yi birincil kalibrasyonda kullanan bir referans yöntemi geliştirmiştir. Referans yöntemde, endoproteaz Glu - C enzimi ile β zincirin N-terminal heksapeptidleri elde edilmekte, daha sonra elde edilen glikozile ve glikozile olmayan N-terminal heksapeptidlerin ayrımı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile sağlanmaktadır. Ardından kütle spektrometresi (MS) veya kapiller elektroforez ile miktar tayini yapılır. İkincil referans

materyaller kit üretici firmalar tarafından yöntemlerin kalibrasyonunda kullanılmaktadır. Bu yöntemde HbA1C sonuçları HbA1C'nin HbA'ya mmol/mol olarak oranlanması ile verilmektedir (Leslie 2008).

IFCC standardizasyonu kullanılması ile HbA1C ölçüm yöntemlerinde iyileşmeler sağlanmış ve laboratuvar içi varyasyon katsayıları (CV) ortalama %1,0-1,2 ve laboratuvarlar arası CV'leri %1,4-1,9 aralığına düşürülmüştür (Leslie 2008).

IFCC - HbA1C yöntemi ile elde edilen değerler NGSP-HbA1C yöntemi ile elde edilen değerlerden yaklaşık %2 daha düşüktür. Bu nedenle IFCC-HbA1C ve NGSP-HbA1C arasında bir dönüşüm formülü geliştirilmiştir. IFCC referans yöntemi ile NGSP (ABD), JDS/JSCC (Japonya) ve Mono S (İsveç) standartlaştırma programlarında kullanılan doğrudan karşılaştırma yöntemleri arasındaki ilişki aşağıdaki denklemlerde verilmiştir (Leslie 2008):

1. NGSP - % HbA1C = (0,915 x IFCC - % HbA1C) + 2,15 ($r^2 = 0,998$)
2. JDS / JSCC - % HbA1C = (0,927 x IFCC - % HbA1C) + 1,73 ($r^2 = 0,997$)
3. İsveç - % HbA1C = (0,989 x IFCC - % HbA1C) + 0,88 ($r^2 = 0,996$)

HbA1C sonuçlarının klinisyenler ve hastalar için kafa karıştırmaması için %HbA1C yerine mmol HbA1C/mol Hb şeklinde verilmesi önerilmiştir (Leslie 2008).

2008 yılında Klinik Biyokimya ve Diyabet Çalışma Grubu tarafından düzenlenen toplantıda aşağıdaki kararlar alınmıştır (Leslie 2008):

1. HbA1C, IFCC Referans Ölçüm prosedürü kullanılarak standardize edilmelidir.
2. Laboratuvar raporlarında ve klinik ortamda testin adı, A1C değil HbA1C olarak verilmelidir.
3. HbA1C sonuçları hem IFCC'nin önerdiği şekilde mmol/mol olarak hem de NGSP'nin önerdiği şekilde % olarak rapor edilmelidir.
5. Çocuklarda, farklı etnik gruplarda ve hamilelikte hesaplanmış açlık glukozu (eAG) kullanımı konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Tablo 2.4 Herhangi bir NGSP - % HbA1C değerine karşılık gelen mg/dL ve mmol/L olarak hesaplanmış açlık glukoz değerleri (Leslie 2008).

NGSP (%) ve IFCC (mmol/mol) HbA1C Değerleri	Hesaplanan Açlık Glukoz	
	Ortalama (Aralık) mg/dL	Ortalama (Aralık) mmol/L
%5 (31 mmol/mol)	97 (76 – 120)	5,4 (4,2 – 6,7)
%6 (42 mmol/mol)	126 (100 – 152)	7,0 (5,5 – 8,5)
%7 (53 mmol/mol)	154 (123 – 185)	8,6 (6,8 – 10,3)
%8 (64 mmol/mol)	183 (147 – 217)	10,2 (8,1 – 12,1)
%9 (75 mmol/mol)	212 (170 – 249)	11,8 (9,4 – 13,9)
%10 (86 mmol/mol)	240 (193 – 282)	13,3 (10,7 – 15,7)
%11 (97 mmol/mol)	269 (217 – 314)	14,9 (12,0 – 17,5)
%12 (108 mmol/mol)	298 (240 – 347)	16,6 (13,3 – 19,3)

2.5 Hipotezler

H0: Test yöntemi olan Türbidimetrik İmmüno-İnhibisyon Analiz (TINIA) yöntemi ile çalışılan HbA1C ölçüm sonuçları referans yöntem olarak kullanılan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ölçülen HbA1C değerlerinden farklıdır.

H0: Türbidimetrik İmmüno-İnhibisyon Analiz (TINIA) yöntemi ile 2,4 ve 24.saatlerdeki ölçüm sonuçları 0.saatteki ölçüm sonuçlarından farklıdır.

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Biriminde yürütülen bu çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 27/11/2019 tarih ve 84375 sayılı etik onay alınmıştır. Çalışma 2020SABE002 proje numarası ile Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Kurulu tarafından desteklenmiştir.

3.1 Kişiler

Yöntem karşılaştırılmasında rutin olarak HbA1C ölçümü için laboratuvara gönderilen altmış hasta örneği kullanılmıştır. Rutin HbA1C ölçümü için laboratuvarımıza gelen ve ölçümleri yapılan rastgele altmış örnek karşılaştırma yapmak üzere Türbidimetrik İmmüno–İnhibisyon (TINIA) yöntemini kullanan Roche Cobas 6000 cihazlarına verilerek HbA1C ölçümleri yapılmıştır.

3.2 Gereç

HbA1C ölçümleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemini kullanan Tosoh G8 Otomatik Glikohemoglobin Analizörü HLC–723G8 ve Türbidimetrik İmmüno–İnhibisyon (TINIA) yöntemini kullanan Roche Cobas c501 modülü, Cobas 6000 otoanalizöründe Roche Tina-quant® Hemoglobin A1C Gen.3-Hemoliz ve Tam Kan Aplikasyon kiti (0105336163 190c 501V11.0) kullanılarak yapıldı.

Kontrol ölçümleri için Tosoh G8’de HbA1C Control Level 1 (%5,0±0,3; 31±3 mmol/mol) ve HbA1C Control Level 2 (%10,0±0,5; 86±5 mmol/mol); Roche Cobas 6000 cihazı için ise PreciControl HbA1C norm (%5,65±0,34; 38±3,4 mmol/mol) ve PreciControl HbA1C path (%10,7±0,6; 93 ±6 mmol/mol) kullanıldı.

3.3 Yöntem

Hasta örneklerinde tekrarlanabilirlik ve yöntem karşılaştırması için EDTA içeren tüplere alınan tam kan örneklerinin HbA1C ölçümleri Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000 cihazlarında yapıldı. HPLC yöntemi, ölçümü yapılacak analiti önce HSI Hemolysis & Wash Solution ile hemoliz eder. Hemolize olan tam kan kolona transfer olur, burada A1A, A1B, HbF, LA1C, SA1C ve HbA0 olarak farklı fraksiyonlara ayrılır ve 1,6 dakikada her birinin piki elde edilir. Cihaz, HbA1C'nin pik alanının toplam hemoglobinin pik alanına oranını kalibrasyonda elde ettiği denklemde yerine koyarak HbA1C'yi yüzde olarak hesaplar. HPLC yöntemi HbA1C'yi 415-500 nm çift dalga boyu ile ölçer.

TINIA yöntemi ile HbA1C ölçümleri Roche Cobas 6000 cihazında yapıldı. Bunun için hasta örnekleri hemoliz edildikten sonra reaktifler ile 37°C, 10 dakika boyunca inkübe edildi. Hemoglobin absorbansı 376–660 nm, HbA1C absorbansı 340–660 nm dalga boylarında ölçüldü. Çıkan sonuçlar $A1C/Hb \times 91,5 + 2,15$ formülü ile yüzde olarak ifade edildi.

3.3.1 Tekrarlanabilirlik Çalışması

Araştırmanın birinci aşamasında analitik performans karakteristikleri açısından kontrol ve hasta örnekleri kullanılarak doğruluk ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı.

3.3.1.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik Çalışması

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları için HPLC yöntemiyle HbA1C hedef değeri %5,0 (31 mmol/mol) olan düşük düzey kontrol (kontrol 1) ve hedef değeri %10,0 (86 mmol/mol) olan yüksek düzey kontrol (kontrol 2) günde yirmişer kez ölçüldü. Düşük düzey (%5,4; 36 mmol/mol) ve yüksek düzeyden (%7,4; 57 mmol/mol) oluşan iki hasta örneklerinin aynı gün içerisinde yirmişer kez ölçümü de yapıldı.

Türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemiyle HbA1C hedef değeri %5,65 (38 mmol/mol) olan düşük düzey kontrol (kontrol 1) ve hedef değeri %10,7 (93 mmol/mol) olan yüksek düzey kontrol (kontrol 2) günde yirmişer kez ölçüldü. HPLC yönteminde ölçümü yapılan düşük ve yüksek düzeyden oluşan iki hasta örneklerinin aynı gün içerisinde yirmişer kez ölçümü TINIA yöntemi ile de yapıldı.

Serum ve hasta örneklerindeki matriks farklılığının tekrarlanabilirliği etkileyip etkilemediğini kontrol etmek amacı ile hasta örneklerinde de tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı.

3.3.1.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik alışması

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için HPLC yöntemiyle HbA1C hedef değeri %5,0 (31 mmol/mol) olan düşük düzey kontrol (kontrol 1) ve hedef değeri %10,0 (86 mmol/mol) olan yüksek düzey kontrol (kontrol 2) içeren HbA1C rnekleri on farklı günde ikişer kez ölçüldü.

Türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemiyle HbA1C hedef değeri %5,65 (38 mmol/mol) olan düşük düzey kontrol (kontrol 1) ve hedef değeri %10,7 (93 mmol/mol) olan yüksek düzey kontrol (kontrol 2) içeren HbA1C rnekleri on farklı günde ikişer kez ölçüldü.

3.3.2 Doğrusallık alışması

Doğrusallık alışması için yüksek (%13,6; 125 mmol/mol) ve düşük (%5,7; 39 mmol/mol) HbA1C düzeylerine sahip iki hasta kanının farklı oranlarda karıştırılarak %12,1 (109 mmol/mol); %10,2 (88 mmol/mol) ve %8,2 (66 mmol/mol) değerleri elde edildi. Elde edilen bu beş farklı düzey her iki cihazda ikişer kez ölçüldü. Doğrusallıktan sapma değerlendirildi.

3.3.3 Stabilite alışması

Stabilite alışması için 0.saatte HbA1C lm yapılan düşük (%5,5; 37 mmol/mol) ve yüksek düzeye (%10,7; 93 mmol/mol) sahip iki hasta rneği her iki cihazda 2, 4 ve 24. saatlerde tekrar ölçüldü.

3.3.4 Yöntem Karşılaştırması alışması

Çalışmanın ikinci aşamasında hastanemize başvuran ve rutin olarak HPLC ile HbA1C lm yapılmış havuzdan rastgele alınan altmış kan örneğinin HbA1C düzeyleri TINIA yöntemi ile tekrar ölçülerek karşılaştırıldı.

3.3.5 İstatistiksel Analiz

Her iki yöntem için aritmetik ortalama (AO), standart sapma (SD), yüzde değişim katsayıları (%CV), ortanca (Q2), Q1 ve Q3 hesaplandı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile incelendi. İki yöntemin ortalamaları arasındaki fark non-parametrik test olan Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında farkın hesaplanmasında Bland-Altman analizi yapıldı, bias hesaplandı ve veriler grafikte

gösterildi. İki yöntem arasındaki ilişkinin saçılım grafiği çizildi; eğim ve y–kesişim hesaplandı. İki grup arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Spearman’s korelasyon analizi ve Passing-Bablok regresyon analizi yapıldı ve regresyon katsayısı hesaplanarak regresyon denklemi elde edildi. Ölçülen HbA1C değerleri beklenen HbA1C değerleri ile karşılaştırılarak determinasyon katsayısı hesaplandı. HPLC bağımsız değişken, TINIA ise bağımlı değişken olarak belirlendi.

4 BULGULAR

4.1 Tekrarlanabilirlik

Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de HbA1C ölçümlerinin kontrol serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Kontrol serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.

Düzyey %	Kontrol 1		Kontrol 2	
	HPLC	TINIA	HPLC	TINIA
1	5,0	5,43	10,2	10,30
2	5,0	5,45	10,1	10,46
3	5,0	5,56	10,2	10,75
4	5,0	5,56	10,2	10,32
5	5,0	5,46	10,1	10,33
6	5,0	5,56	10,1	10,44
7	5,0	5,61	10,1	10,27
8	5,0	5,48	10,1	10,48
9	5,0	5,42	10,1	10,26
10	5,0	5,46	10,1	10,13
11	5,0	5,49	10,1	10,26
12	5,0	5,33	10,1	10,20
13	4,9	5,41	10,1	10,24
14	5,0	5,36	10,1	10,32
15	5,0	5,38	10,1	10,22
16	5,0	5,36	10,1	10,19
17	5,0	5,57	10,1	10,07
18	5,0	5,49	10,1	10,22
19	5,0	5,48	10,1	10,15
20	5,0	5,43	10,1	10,26
Ortalama	5,0	5,5	10,1	10,3
SS	0,02	0,08	0,04	0,15
% CV	0,45	1,43	0,36	1,46

HPLC'de %HbA1C hedef değeri %5,0 (31 mmol/mol) olan kontrol 1 serumunun gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen ortalama, standart sapma ve %CV

değerleri sırasıyla 5,0; 0,02 ve %0,45 olarak hesaplandı. Hedef değeri %10,0 (86 mmol/mol) olan kontrol 2 için bu değerler 10,1; 0,04 ve %0,36 olarak bulundu.

TINIA yöntemi kullanan Cobas 6000 cihazında %HbA1C hedef değeri %5,65 (38 mmol/mol) olan kontrol 1 serumunun gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen ortalama, standart sapma ve %CV değerleri sırasıyla 5,5; 0,08 ve %1,43 olarak hesaplandı. Hedef değeri %10,7 (93 mmol/mol) olan kontrol 2 için bu değerler 10,3; 0,15 ve %1,46 olarak bulundu.

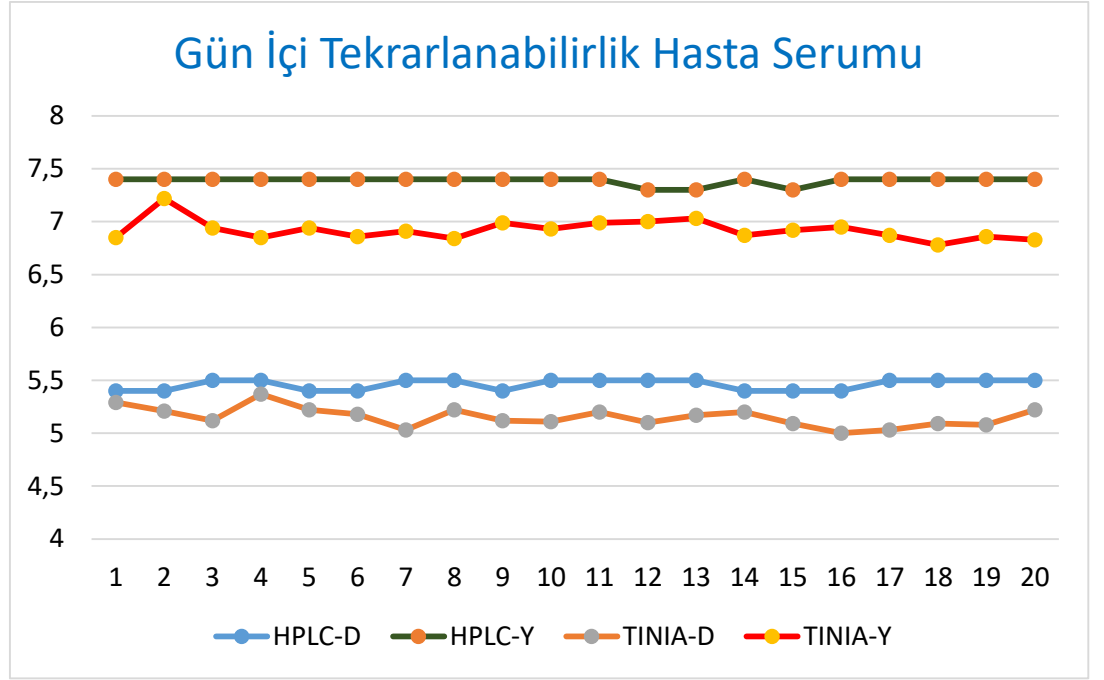
Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de HbA1C ölçümlerinin hasta serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 Hasta serumlarında gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.

Düzye %	Hasta 1		Hasta 2	
	HPLC	TINIA	HPLC	TINIA
1	5,4	5,29	7,4	6,85
2	5,4	5,21	7,4	7,22
3	5,5	5,12	7,4	6,94
4	5,5	5,37	7,4	6,85
5	5,4	5,22	7,4	6,94
6	5,4	5,18	7,4	6,86
7	5,5	5,03	7,4	6,91
8	5,5	5,22	7,4	6,84
9	5,4	5,12	7,4	6,99
10	5,5	5,11	7,4	6,93
11	5,5	5,20	7,4	6,99
12	5,5	5,10	7,3	7,00
13	5,5	5,17	7,3	7,03
14	5,4	5,20	7,4	6,87
15	5,4	5,09	7,3	6,92
16	5,4	5,00	7,4	6,95
17	5,5	5,03	7,4	6,87
18	5,5	5,09	7,4	6,78
19	5,5	5,08	7,4	6,86
20	5,5	5,22	7,4	6,83
Ortalama	5,5	5,2	7,4	6,9
SS	0,05	0,09	0,04	0,10
% CV	0,92	1,79	0,50	1,39

HPLC'de düşük düzey HbA1C hasta sonuçlarının ortalama, standart sapma ve %CV değerleri sırasıyla 5,5; 0,05 ve %0,92 olarak hesaplandı. Yüksek düzey HbA1C hasta sonuçları için bu değerler 7,4; 0,04 ve %0,5 olarak bulundu.

TINIA'da düşük düzey HbA1C hasta sonuçlarının ortalama, standart sapma ve %CV değerleri sırasıyla 5,2; 0,09 ve %1,79 olarak hesaplandı. Yüksek düzey HbA1C hasta sonuçları için bu değerler 6,9; 0,1 ve %1,39 olarak bulundu.



Şekil 4.1 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının gün içi tekrarlanabilirlik grafiği.

Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de HbA1C ölçümlerinin kontrol serumlarında günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Kontrol serumlarında günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.

Düzyer %	Kontrol 1		Kontrol 2	
	HPLC	TINIA	HPLC	TINIA
1	5,0	5,39	10,1	10,22
2	5,0	5,50	10,1	10,33
3	5,0	5,44	10,1	10,28
4	5,0	5,38	10,2	10,25
5	5,1	5,36	10,2	10,27
6	5,0	5,40	10,2	10,09
7	5,0	5,44	10,2	10,15
8	5,0	5,35	10,1	10,20
9	5,0	5,40	10,1	10,10
10	5,0	5,38	10,1	10,05
11	5,0	5,40	10,2	10,20
12	5,1	5,53	10,3	10,28
13	5,0	5,44	10,3	10,33
14	5,1	5,37	10,3	10,28
15	5,1	5,50	10,2	10,28
16	5,0	5,43	10,2	10,68
17	5,0	5,91	10,2	10,93
18	5,0	5,69	10,2	10,43
19	5,0	5,67	10,1	10,51
20	5,0	5,60	10,1	10,68
Ortalama	5,0	5,48	10,2	10,33
SS	0,04	0,14	0,1	0,22
%CV	0,8	2,6	0,7	2,1

HPLC'de %HbA1C hedef değeri %5,0 (31 mmol/mol) olan kontrol 1 serumunun günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen ortalama, standart sapma ve %CV değerleri sırasıyla 5,0; 0,04 ve %0,8 olarak hesaplandı. Hedef değeri %10,0 (86 mmol/mol) olan kontrol 2 için bu değerler 10,2; 0,1 ve %0,7 olarak bulundu.

TINIA yöntemini kullanan Cobas 6000 cihazında %HbA1C hedef değeri %5,65 (38 mmol/mol) olan kontrol 1 serumunun günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen ortalama, standart sapma ve %CV değerleri sırasıyla 5,48, 0,14 ve %2,6 olarak hesaplandı. Hedef değeri %10,7 (93 mmol/mol) olan kontrol 2 için bu değerler 10,33; 0,22 ve %2,1 olarak bulundu.

4.2 Doğrusallık

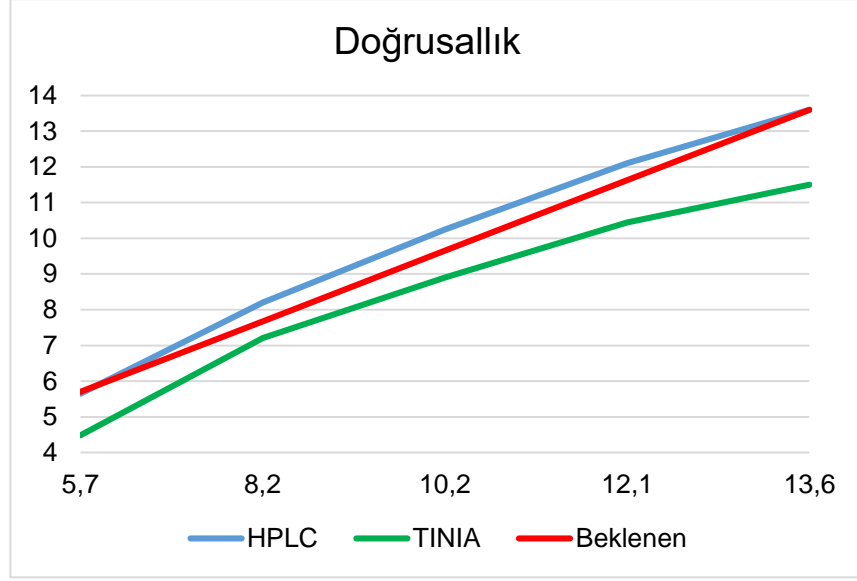
Düşük (%5,7; 39 mmol/mol) ve yüksek düzey (%13,6; 125 mmol/mol) iki hasta örneğinin farklı derişimlerde karıştırılması ile elde edilen örnekler (%8,2; 66 mmol/mol;

%10,2; 88 mmol/mol ve %12,1; 109 mmol/mol) doğrusallık çalışması için Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4 HbA1C ölçümünde doğrusallık çalışmasının sonuçları

HPLC					
Düzyey %	5,7	8,2	10,2	12,1	13,6
1	5,70	8,20	10,20	12,10	13,60
2	5,60	8,20	10,30	12,10	13,60
Ortalama	5,65	8,20	10,25	12,10	13,60
TINIA					
Düzyey %	5,7	8,2	10,2	12,1	13,6
1	4,40	7,18	8,98	10,45	11,65
2	4,56	7,24	8,81	10,42	11,35
Ortalama	4,48	7,21	8,90	10,44	11,50

Beş farklı düzeyin HbA1C değerleri HPLC ve TINIA yöntemleri ile ölçülerek beklenen değerler ile karşılaştırıldı. HPLC yöntemi ile elde edilen HbA1C değerleri beklenen değerler ile karşılaştırıldığında $y=0,997*x+0,507$ denklemi elde edildi ve $p>0,05$ olarak bulundu. TINIA yöntemi ile elde edilen HbA1C değerleri beklenen değerler ile karşılaştırıldığında ise $y=0,838*x+0,694$ denklemi elde edildi ve $p>0,05$ olarak bulundu. HPLC ve TINIA yöntemleri ile ölçülerek elde edilen değerler ile beklenen değerlerin doğrusallık grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan farklı derişimlerdeki örneklerin doğrusallık grafiği.

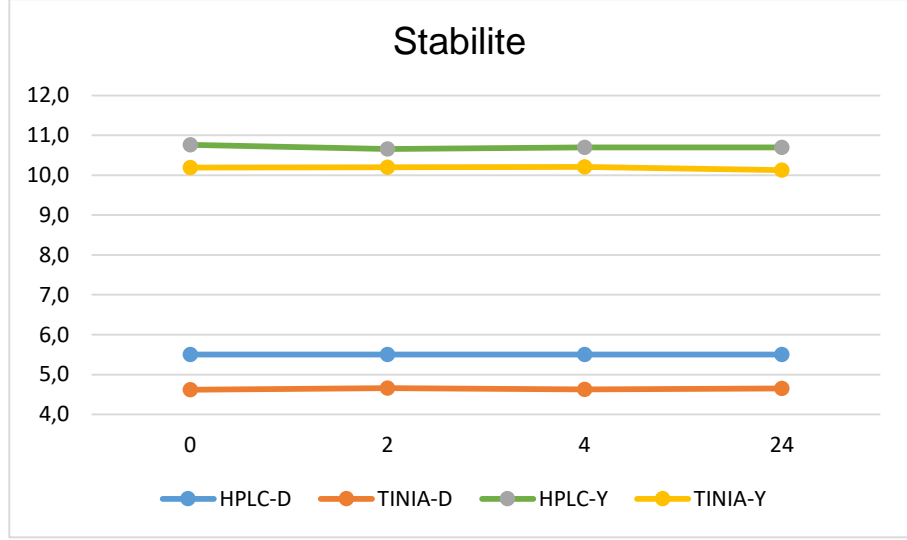
4.3 Stabilite

Düşük (%5,5; 37 mmol/mol) ve yüksek düzeyde (%10,7; 93 mmol/mol) iki hasta örneği 0, 2, 4 ve 24.saatlerde Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5 HbA1C ölçümünde stabilite çalışmasının sonuçları.

Düzye %	Düşük Düzye		Yüksek Düzye		Düzye %	Düşük Düzye		Yüksek Düzye	
	HPLC	TINIA	HPLC	TINIA		HPLC	TINIA	HPLC	TINIA
Ölçümler					Ölçümler				
0.saat					4.saat				
1	5,50	4,68	10,70	10,15	1	5,50	4,63	10,70	10,33
2	5,50	4,61	10,70	10,13	2	5,50	4,59	10,80	10,14
3	5,50	4,56	10,80	10,2	3	5,50	4,69	10,60	10,24
4	5,50	4,56	10,80	10,19	4	5,50	4,6	10,70	10,14
5	5,50	4,67	10,80	10,29	5	5,50	4,63	10,70	10,18
Ortalama	5,50	4,62	10,76	10,19	Ortalama	5,50	4,63	10,70	10,21
2.saat					24.saat				
1	5,50	4,74	10,60	10,20	1	5,60	4,66	10,60	10,19
2	5,50	4,62	10,60	10,17	2	5,50	4,68	10,70	10,22
3	5,50	4,61	10,70	10,22	3	5,50	4,63	10,70	10,15
4	5,50	4,66	10,70	10,26	4	5,50	4,64	10,70	10,05
5	5,50	4,66	10,70	10,15	5	5,40	4,66	10,80	10,03
Ortalama	5,50	4,66	10,66	10,20	Ortalama	5,50	4,65	10,70	10,13

İki farklı düzey hasta örneğinin farklı saatlerde ölçülmesi ile elde edilen stabilite grafiği Şekil 4,3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Düşük ve yüksek düzey HbA1C'ye sahip iki hasta örneğinin 0, 2, 4 ve 24.saatlerde tekrar ölçümü ile elde edilen stabilite grafiği.

4.4 Yöntem Karşılaştırması

Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000'de altmış hasta örneğinin HbA1C ölçümlerinin sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 Altmış hasta örneğinin %HbA1C sonuçları.

Örnek No	HPLC	TINIA
1	5,7	5,37
2	7,9	7,25
3	6,8	5,70
4	6,6	6,20
5	9,8	8,96
6	6,4	5,79
7	6,5	6,36
8	6,1	5,81
9	8,7	8,29
10	8,1	7,34
11	5,8	5,26
12	7,0	6,38
13	7,0	6,49
14	7,8	7,22
15	8,6	7,88
16	5,8	5,43
17	6,8	6,28
18	5,5	5,05
19	5,9	5,65
20	8,4	7,73
21	7,4	6,85
22	9,4	8,79

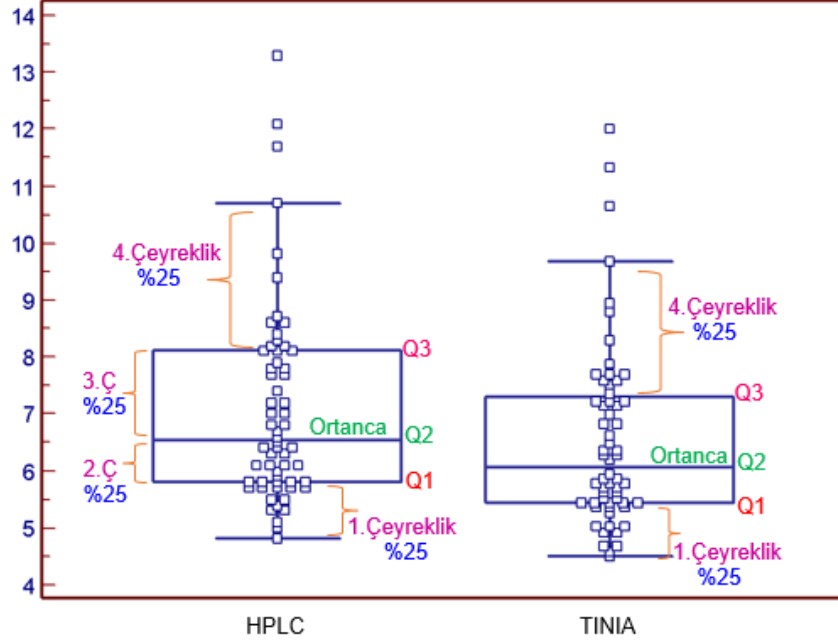
Örnek No	HPLC	TINIA
23	8,2	7,64
24	5,3	5,05
25	8,6	7,70
26	7,2	6,62
27	10,7	9,67
28	7,8	7,14
29	5,8	5,01
30	5,0	4,68
31	5,7	5,43
32	5,7	5,63
33	6,1	5,73
34	5,4	4,57
35	4,8	4,49
36	7,7	7,20
37	6,4	5,85
38	6,1	5,83
39	5,8	5,39
40	12,1	11,33
41	7,7	7,22
42	5,8	5,45
43	8,1	6,98
44	8,1	7,50
45	6,3	5,47
46	11,7	10,66
47	13,3	12,01
48	8,2	7,58
49	5,5	4,96
50	5,7	5,39
51	6,7	6,29
52	8,3	7,72
53	5,1	4,74
54	5,3	4,91
55	6,1	5,58
56	6,4	5,93
57	6,0	5,51
58	7,2	6,83
59	6,3	5,90
60	5,7	5,47
Ortanca (Q2)	6,55	6,07
Q1	5,80	5,44
Q3	8,05	7,32

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi ve değişkenlerin normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Non-parametrik test olan Wilcoxon test ile sonuçların ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

Yöntem karşılaştırması çalışmasında hasta örneklerinin HPLC yöntemini kullanan Tosoh G8 sonuçlarına göre HbA1C dağılımı %4,8 ile %13,3 aralığında olarak

ölçüldü. Hasta sonuçlarının ortanca (Q2), Q1 ve Q3 değerleri sırasıyla 6,55; 5,80 ve 8,05 olarak hesaplandı.

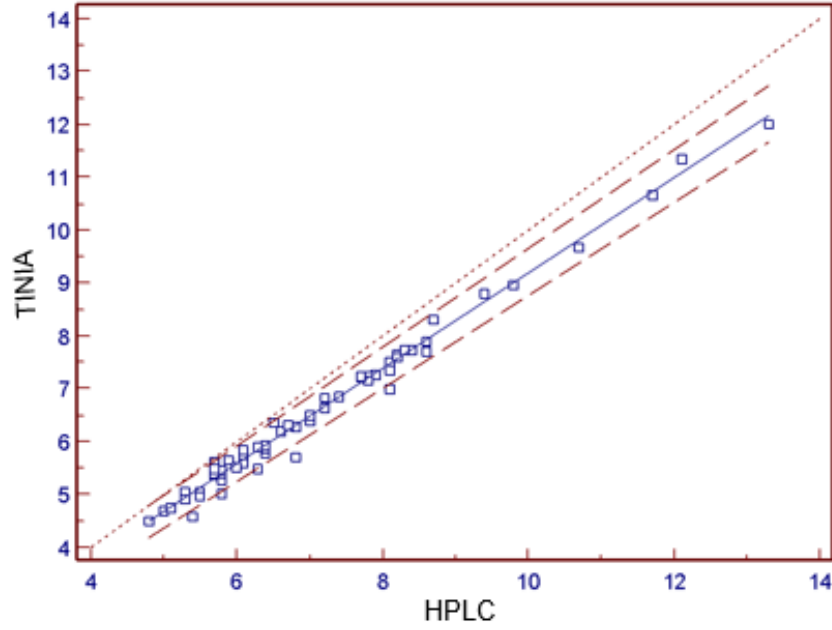
TINIA yöntemini kullanan Roche Cobas 6000 sonuçlarına göre HbA1C dağılımı %4,49 ile %12,01 aralığında olarak ölçüldü. Hasta sonuçlarının ortanca (Q2), Q1 ve Q3 değerleri sırasıyla 6,07; 5,44 ve 7,32 olarak hesaplandı.



Şekil 4.4 HPLC ve TINIA yöntemlerinde ölçülen HbA1C sonuçlarının medyan, %25 ve %75 çeyrekliklerini gösteren kutu grafiği.

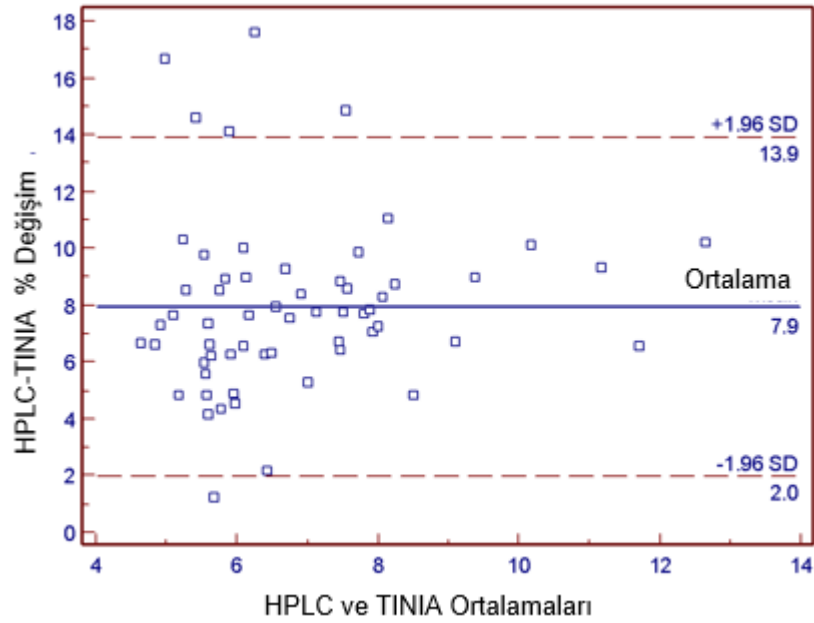
HPLC yöntemi ile ölçülen HbA1C değerlerinin %25'inin en düşük düzey olan 4,8 ile 5,8 arasında, %75'inin en düşük düzey olan 4,8 ile 8,05 arasında dağıldığı gözlemlendi. TINIA yöntemi ile ölçülen HbA1C değerlerinin %25'inin en düşük düzey olan 4,49 ile 5,44 arasında, %75'inin en düşük düzey olan 4,49 ile 7,32 arasında dağıldığı gözlemlendi.

Korelasyon analizi için Spearman's testi; regresyon analizi için Passing-Bablok testi yapıldı. İki yöntem arasındaki korelasyon katsayısı $r=0,982$, regresyon denklemi $y=0,903*x+0,159$ ve $R^2=0,987$ olarak hesaplanarak iki yöntemin sonuçları arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Regresyon grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. Regresyon analizi ile elde edilen eğimin güven aralığı için üst sınır 0,933, alt sınır ise 0,881 olarak bulundu. Yöntemler arasında sistematik hata gözlemlendi.



Şekil 4.5 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının regresyon analiz grafiği.

Yöntem karşılaştırmasında HPLC ve TINIA yöntemlerinin ortalamalarına karşı HPLC-TINIA yöntem farkından elde edilen sonuçların yüzde değişimleri saçılım grafiği olarak Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 HPLC ve TINIA yöntemlerinde kullanılan hasta serumlarının Bland-Altman grafiği.

Blant-Altman grafiği incelendiğinde HPLC-TINIA ortalamalarına karşılık gelen HPLC-TINIA fark yzde değişimlerin ortalamasının %7,9 olduğu gzlendi. Bu %bias değerlendirildiğinde TINIA yntemi ile elde edilen HbA1C değerlerinin HPLC yntemi ile elde edilenlere gbre ortalama 0,56 daha dűřuk sonuğ verdiği bulundu.

5 TARTIŞMA

HbA1C, hastaların son üç aylık ortalama kan glukoz geçmişini vermesinden ötürü diyabetli hastalarda glisemik kontrolün değerlendirilmesi için kullanılır (Leslie 2008). HbA1C'nin ölçümü için otuzdan fazla yöntem laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC), HbA1C için referans yöntem olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisini (HPLC) önermiştir (Kurt 2003). Biz de çalışmamızda referans yöntem olarak HPLC yöntemini kullandık.

Farklı laboratuvarlardan alınan aynı kan örneğinin HbA1C sonuçları aynı yöntemle ölçülmesine karşın farklı olabildiğinden HbA1C ölçüm yöntemlerinin standardize edilme gereği duyulmuştur (Kurt 2003). HbA1C ölçümü için mevcut yöntemlerin tümü çok çeşitli sonuçlar verdiği için ABD'de 1993 yılında Diyabet Kontrol ve Komplikasyonlar Çalışmasında (DCCT) HbA1C sonuçlarının DCCT sonuçlarıyla uyumlu hale gelmesi gerektiği yayınlandı (Leslie 2008). Farklı laboratuvarlardan alınan HbA1C sonuçlarının DCCT çalışmasında bildirilenlerle karşılaştırılabilir olması için HbA1C yöntemlerini standardize etmek adına Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programını (NGSP) 1996'da Amerikan Klinik Kimya Derneği (AACC) tarafından oluşturulmuştur (Leslie 2008). Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC) 1994 yılında HbA1C'nin standardizasyonu için kurulan çalışma grubu referans yöntem olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Kütle Spektrometrisi (MS) veya Kapiller Elektrofrezisi (CE) önermiştir (Leslie 2008).

Biz çalışmamızda HbA1C ölçümünde referans yöntem olarak gösterilen HPLC'ye göre çalışma kolaylığı ve maliyet açısından daha uygun bir yöntem olan Türbidimetrik İmmüno-İnhibisyon Analiz (TINIA) yöntemini karşılaştırmayı amaçladık.

Amerikan Diyabet Derneği (ADA) HbA1C ölçüm değerlerinin kabul edilebilir olması için tüm laboratuvarların NGSP tarafından sertifikalandırılmış çalışma içi CV değerinin %5'ten küçük olan kitlerle çalışılmasını önermiştir. IFCC çalışma grubu da HbA1C standardizasyonu için referans laboratuvarları için kriter olarak CV değerinin %2,5'ten küçük olmasını önermiştir (Aslan vd 2011, Demirezen vd 2016). Çalışmamızda HPLC yönteminde gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında CV değerini <%1

olarak bulduk. TINIA yönteminde ise gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında CV değerini $<1,8$ ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında CV değerini $\leq 2,6$ olarak bulduk. HPLC için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında bulduğumuz değerler NGSP ve IFCC çalışma gruplarının önerdiği CV değerlerinin altında olduğu için laboratuvarımızda kullanılan HPLC yöntemini referans yöntem olarak kabul ettik. TINIA yöntemi ile de tekrarlanabilirlik çalışmasında kabul edilebilir sonuçlar elde ettik. Demirezen ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları katyon değişim kromatografisi ve boranat afinite kromatografisi HPLC yöntem karşılaştırma çalışmasında CV değerlerini $<2,5$ olarak; Üstündağ ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları immünotürbidimetrik ve HPLC yöntem karşılaştırma çalışmasında gün içi tekrarlanabilirlik için CV değerlerini $1,7-2,8$ arasında, günler arası tekrarlanabilirlik için ise $4,0-4,8$ arasında bulmuşlardır. Genç ve arkadaşları Tina-quant ikinci nesil (TINIA) ile Adams HA-8160 (HPLC) cihazları ve Tina-quant üçüncü nesil (TINIA) ile Adams HA-8160 (HPLC) cihazları arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri bir çalışmada HPLC, ikinci nesil TINIA ve üçüncü nesil TINIA yöntemleri ile gün içi CV'lerini sırasıyla $\leq 1, \leq 1$ ve $\leq 1,6$; günler arası CV değerlerini ise sırasıyla $\leq 1,3, \leq 0,96$ ve $\leq 2,1$ bulmuşlardır.

Biz doğrusallık çalışmamızda düşük ($5,7; 39$ mmol/mol) ve yüksek düzey ($13,6; 125$ mmol/mol) iki hasta örneğinin farklı derişimlerde karıştırarak beş farklı düzey ($8,2; 66$ mmol/mol; $10,2; 88$ mmol/mol ve $12,1; 109$ mmol/mol) elde ettik. Elde edilen düzeyleri Tosoh G8 ve Roche Cobas 6000 cihazında ölçerek beklenen değerler ile karşılaştırdık. HPLC ve TINIA yöntemi ile elde edilen HbA1C değerlerinin beklenen değerlerden anlamlı bir şekilde farklı olmadığını gözlemledik ($p>0,05$). Altawallbeh ve arkadaşlarının 2020 yılında tam otomatik HPLC (The Adams™ HA-8180V) yöntemi ile HPLC yöntemini kullanan Tosoh G8 ve türbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemini kullanan Roche Cobas c501 yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında $3,4$ (14 mmol/mol) ile $18,1$ (172 mmol/mol) arasında değişen HbA1C değerlerine sahip doğrusal eğri elde etmişlerdir. Khashoggi ve arkadaşları ise 2018 yılında yaptıkları HbA1C için kapiller elektroforez ve immünolojik test yöntemi karşılaştırmasında yöntem doğrusallığının $3,5$ (15 mmol/mol) ile $18,5$ (176 mmol/mol) arasında olduğunu bulmuşlardır.

HPLC ve TINIA yöntemiyle düşük düzey ($5,5; 37$ mmol/mol) ve yüksek düzey ($10,7; 93$ mmol/mol) iki kan örneğini 0, 2, 4 ve 24. saatlerde beşer kez ölçerek yaptığımız stabilite çalışmasında hem HPLC hem de TINIA yönteminde 2, 4 ve 24. saatlerde ölçülen HbA1C değerleri ile 0. saatte ölçülen HbA1C değerleri arasında fark olmadığını gözlemledik. Buna göre HbA1C ölçümünün 24 saat süreyle her iki yöntemde de stabil olduğu sonucuna vardık. Khashoggi ve arkadaşları da 2018 yılında yaptıkları

HbA1C için kapiller elektroforez ve immünolojik test yöntemi karşılaştırmasında stabilite çalışması için %3,8 (18 mmol/mol) ile %10,8 (94 mmol/mol) arasında beş farklı numune seçerek bunların 0, 2, 4, 6, 8 ve 24 saatlerde ölçümlerini gerçekleştirmişler ve bizim çalışmamız ile uyumlu olarak HbA1C değerlerinin 24 saat boyunca değişmediğini bulmuşlardır. Klingenberg ve arkadaşları ise bir haftaya uzayan bir stabilite çalışması yapmışlar ve HbA1C için kapiller elektroforez ve immünolojik test yöntemi karşılaştırmasında oda sıcaklığında dört gün bekletilen örneklerin HbA1C değerlerinin değişmediğini, yedi günlük depolamanın HbA1C değerlerini düşürdüğünü ve 4 °C'de yedi gün boyunca depolanan kan örneklerinin HbA1C değerlerinin değişmediğini gözlemlemişlerdir.

Yöntem karşılaştırmada referans yöntem ile test edilen yöntem arasındaki kabul edilebilir korelasyon 0,98 veya daha yüksek bir R^2 değerine sahip olmalıdır (Yücel 2014, Clinlab Navigator, 2022). Küçük bir aralığı kapsayan veriler için korelasyon katsayısı $r \geq 0,975$ ve büyük bir aralığı kapsayan veriler için korelasyon katsayısı $r \geq 0,990$ ise regresyon denklemindeki eğim ve y-kesişim oransal hata ve sabit hata hakkında bilgi verir. Eğim 1'den önemli ölçüde farklıysa oransal hatayı, y-kesişim 0'dan önemli ölçüde farklıysa sabit hatayı gösterir (Jensen ve Hansen 2008). Bu doğrultuda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda %95 güven aralığında korelasyon katsayısını $r=0,982$, $R^2=0,987$ ve regresyon denklemini $y=0,903 \cdot x + 0,159$ olarak elde ettik. Elde ettiğimiz korelasyon katsayısının ve determinasyon katsayısının kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğunu gözlemledik ve sonuçlar ile yöntemlerin birbiri ile uyumlu olduğunu belirledik. Genç ve arkadaşlarının 2012 yılında ikinci ve üçüncü nesil turbidimetrik immüno-inhibisyon (TINIA) ile HPLC yöntemlerinin değerlendirilmesi çalışmalarında Tina-quant ikinci nesil (TINIA) ile Adams HA-8160 (HPLC) cihazları arasındaki determinasyon katsayısını $R^2=0,960$ ve Tina-quant üçüncü nesil (TINIA) ile Adams HA-8160 (HPLC) cihazları arasındaki determinasyon katsayısını $R^2=0,980$ olarak bulmuşlardır. Altawallbeh ve arkadaşlarının 2020 yılında tam otomatik HPLC (The Adams™ HA-8180V) yöntemi ile HPLC yöntemini kullanan Tosoh G8 ve turbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemini kullanan Roche Cobas c501 yöntemlerini kıyasladıkları çalışmalarında HPLC (The Adams™ HA-8180V) yöntemi ile HPLC (Tosoh G8) yöntemleri arasındaki determinasyon katsayısını $R^2=0,996$ olarak buldular. Turbidimetrik immüno-inhibisyon (Roche Cobas c501) yöntemi ile HPLC (Tosoh G8) yöntemleri arasındaki determinasyon katsayısını da $R^2=0,997$ olarak buldular.

HbA1C için izin verilebilir toplam hatanın (TEa) %3'ten düşük olması gerektiği kılavuzlarda yer almaktadır (EFLM). Toplam hata rastgele hata (%CV) ve sistematik hata (%bias) bileşenlerinden oluşur ve toplam hata = $1,65 \cdot (\%CV) + \%bias$ denklemi ile

hesaplanır (Westgard vd 1974). İç kalite kontrol programında iki farklı düzey kontrol serumu kullanan bir laboratuvarın toplam analitik CV'sinin hesaplanmasında $CV = \sqrt{[(CV1)^2 + (CV2)^2]}/2$ formülü kullanılabilir (Allen ve Crawford 2014). Biz de TINIA yönteminde gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında düşük ve yüksek düzeyden elde ettiğimiz HbA1C sonuçlarının CV toplamını bu formüle göre hesapladık ve %1,60 olarak bulduk. Tüm bu bilgiler doğrultusunda bizim bulduğumuz toplam hata %10,54 idi. Bizim bulduğumuz toplam hata izin verilebilir toplam hatadan (TEa) büyük olduğu için TINIA yönteminin HPLC yöntemi yerine kullanılmasının diyabet tanı ve takibinde sorun çıkartabileceğini söyleyebiliriz.

Yöntem karşılaştırmasında kullanılacak diğer bir yöntem de karşılaştırmanın biyolojik varyasyon temelinde yapılmasıdır. Buna göre yöntemler arasındaki fark (bias) biyolojik varyasyonun üçte birinden daha düşük olmalıdır (Coşkun vd 2007, EFLM). HbA1C için birey içi biyolojik varyasyon EFLM'nin veri tabanına göre $CV_i=1,9$ 'dur. Buna göre iki farklı yöntem ile çalışılan HbA1C değerleri arasındaki fark %0,63'ten düşük olmalıdır. Çalışmamızda TINIA yöntemi ile elde edilen HbA1C düzeylerinin HPLC yönteminden elde edilen düzeylerden 0,56 birim daha düşük olduğunu bulduk. Bu farklılık %7,9'a denk gelmektedir. Bu nedenle biyolojik varyasyon temelinde değerlendirdiğimizde de iki yöntemin farklı sonuçlar verdiğini ve TINIA yöntemindeki bu düşük sonuçların diyabetli hastaların takibinde sorun yaratabileceğini söyleyebiliriz. Bu sorun TINIA yöntemini kullanan laboratuvarlarda göz önüne alınması gereken bir husustur.

Coşkun ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları HPLC ve türbidimetrik immünoinhibisyon çalışmasında HPLC yöntemiyle elde edilen HbA1C sonuçlarını türbidimetrik immünoinhibisyon ile elde edilenden 0,04 (%0,64) daha düşük bulmalarına karşın 2015 yılında Tekçe ve arkadaşlarının HbA1c Ölçümünde HPLC (MQ-2000PT) ile immüntürbidimetrik (Architect C 8000) sonuçlarının karşılaştırılması çalışmasında HPLC ile elde edilen HbA1C sonuçlarını immüntürbidimetrik yöntemine göre 0,37 (%5,7) daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışma bizim çalışmamızla paralel sonuç vermiştir.

6 SONUÇLAR

HbA1C ölçümü için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Türbidimetrik İmmüno-İnhibisyon (TINIA) yöntem karşılaştırmasında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında CV değerleri her iki yöntemle de %2,7'nin altında bulundu.

Doğrusallık çalışmasında düşük (%5,7; 39 mmol/mol) ve yüksek düzey (%13,6; 125 mmol/mol) iki hasta örneğinin farklı derişimlerde karıştırılmasıyla elde edilen beş farklı düzey (%8,2; 66 mmol/mol; %10,2; 88 mmol/mol ve %12,1; 109 mmol/mol) HPLC ve TINIA yöntemiyle ölçüldü. HPLC ve TINIA yöntemleri ile elde edilen HbA1C değerlerinin beklenen değerlerden anlamlı şekilde farklı olmadığı gözlemlendi.

Stabilite çalışmasında HPLC ve TINIA yöntemiyle düşük düzey (%5,5; 37 mmol/mol) ve yüksek düzey (%10,7; 93 mmol/mol) iki kan örneğinin HbA1C ölçümünün 24 saat süreyle her iki yöntemde de stabil olduğu gözlemlendi.

Yöntem karşılaştırma çalışmasında TINIA yöntemi ile elde edilen HbA1C düzeylerinin HPLC yönteminden elde edilen düzeylerden 0,56 birim daha düşük olduğu bulunarak bu farklılığın %7,9'a denk geldiği gözlemlendi. %95 güven aralığında korelasyon katsayısı $r=0,982$, $R^2=0,987$ ve regresyon denklemi $y=0,903*x+0,159$ olarak elde edildi.

HbA1C ölçümü için HPLC ve TINIA yöntem karşılaştırmasında %95 güven aralığı kullanılarak elde edilen korelasyon katsayısının yüksek olduğu gözlemlendi. Determinasyon katsayısının da 1'e yakın olmasından dolayı iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Fakat iki yöntem arasındaki farkın (biasın) önerilen değerden yüksek çıkmasından dolayı sistematik hatanın varlığı söz konusudur.

TINIA yönteminde gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında düşük ve yüksek düzey hasta örneklerinden elde edilen HbA1C sonuçlarının CV toplamı %1,60; toplam hata ise %10,54 olarak bulundu. Elde edilen toplam hatanın izin verilebilir toplam hatadan (TEa) büyük olduğu gözlemlendi.

İki yöntem arasındaki farkın biyolojik varyasyonun üçte birinden yüksek çıkması ve bulguların izin verilebilir toplam hatadan büyük olmasından dolayı TINIA yöntemi ile elde edilen HbA1C sonuçlarının diyabet tanı ve takibinde sorun oluşturabileceği sonucuna varıldı.

7 KAYNAKLAR

- Adeyinka A and Kondamudi NP. Hyperosmolar Hyperglycemic Nonketotic Coma. **State Pearls** 2019.
- Akar P, Akbıyık F, Lay İ S, Pınar A, Şeneş M, Yücel D. Klinik Laboratuvarında Elektroferez Uygulamaları: Elektroferezde Temel Prensipler. **Türk Biyokimya Derneği** İzmir, 2013, s. 4 - 12.
- Alıcı S, Dülger HH. Hemoglobinlerin Nonenzimatik Glikozilasyonu. **Van Tıp Derg** 2001; 8 (3).
- Allen L ve Crawford L. Guidance on Measurement Uncertainty for Medical Laboratories. **Institute for Quality Management in Healthcare** 2014; s. 10.
- Altawallbeh G, Makky VF, Saenger AK, Peters JM, Killeen AA. Evaluation of an Ion-Exchange HPLC Device for HbA1c Measurement. **American Association for Clin Chem** 2020; 695-703.
- American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care** 2019; 42(1): 13 - 28.
- Arneith B, Arneith R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and 2 Diabetes. **Int J Mol Sci** 2019; 20 (2467): 2 - 14.
- Aslan D, Yılmaztürk GC, Akalın G, Büyükbeşe MA, Sermez Y, Fenkçi S. Klinik Laboratuvar Test Sonuçlarının Uluslararası ve Ulusal Harmonizasyonu, Standardizasyonu ve HbA1c Örneği. **Türk Biyokimya Derg** 2011; 36 (4) ; 374–383.
- Atasoy A, Atay A, Ahbab S, Hanedar M, Yenigün M. Diyabetik Nefropati'ye Genel Bir Bakış. **Galenos Yayınevi** 2014; s. 1 - 3.
- Avcı D, Selçuk KT. Tip 2 Diyabetli Hastalarda Glisemik Kontrol Durumu ve Etkileyen Etmenler: Depresyonun Rolü. **Gümüşhane Üni Sağ Bilim Derg** 2016; 5 (3): 70 - 79.
- Aydın M. HbA1c Ölçümünde HPLC, Immunassay ve LC/ESI/MS Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Doktora Tezi, **Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Mersin, 2014, s.84.
- Baldrighi M, Sainaghi PP, Bella M, Bartoli E, Costello LM. Hyperglycemic Hyperosmolar State: A Pragmatic Approach to Properly Manage Sodium Derangements. **Current Dia Rev** 2018; 14(6): 534 - 541.
- Banach M, Konieczny L, Roterman I. Secondary and Supersecondary Structure of Proteins in Light of the Structure of Hydrophobic Cores. **Methods Mol. Biol** 2019; 347 - 378.

Baranoski GVG, Chen TF, Kimmel BW, Miranda E, Yim D. In Silico Spectral Investigation of Methemoglobin and Sulphemoglobin Effects on Human Skin Reflectance. **Technical Report CS** 2012.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry, 5th edition, **W.H. Freeman and Company**, New York, 2002.

Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to Biosensors. **Essays Biochem** 2016; 60: 1 – 5.

Brooks AP, Metcalfe J, Day JL, Edwards MS. Iron Deficiency and Glycosylated HbA1. **Lancet** 1980, 8186: 141.

Brownlee M and Cerami A. The Biochemistry of Complications of Diabetes Mellitus. **Annu Rev Biochem** 1981; 50: 385-432.

Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of proteins; Relavence to diabetes. **Am J Med** 1981; 70: 325-330.

Burtis AC and Ashwood ER. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı, Eds. Aslan D, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2008, s.1091.

Cannon A, Handelsman Y, Helle M, Shannon M. Burden of Illnes in Type 2 Diabetes Mellitus. **J Manag Care Spec Pharm** 2018; 24 (9): 5-13

Champe PC, Harvey RA. "Globuler ve Fibroz Proteinler". Lippincott Biyokimya. 3.baskı. **Nobel Kitabevleri**, Ankara, 2007, 25 -42.

Chang J, Hoke C, Ettenger B, Penerian G. Evaluation and Interference Study of Hemoglobin A1C Measured by Turbidimetric Inhibition Immunoassay. **Am J Clin Pathol** 1998; 109 (3): 274 - 278.

Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvasular and Macrovascular Complications in Diabetes Mellitus: Distinct or Continuum? **Indian J Endo Met** 2020; 20 (4): 546-551.

Clinlab Navigator internet sitesi: [Method Comparison is a Requirement for Setting Up a New Lab Test](#), (03.06.2022).

Coşkun A, Yavuz Ö, Memişoğulları R, Yüksel HK. HbA1c Ölçümünde HPLC ve Türbidimetrik Immüno-inhibisyon Yöntemlerinin Karsilastirilmesi . **Düzce Tıp Fakültesi Derg** 2007; 1: 17-21.

Cox M M. "Proteinlerin İşlevi", Lehninger Biyokimyanın Temel İlkeleri, 5.baskı, Eds. Elçin YM, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2013, s.210 -220.

Çetiner Ö ve Rakıcioğlu N. Hiperglisemi, Oksidatif Stres ve Tip 2 Diyabette Oksidatif Stres Belirteçlerinin Tanımlanması. **Türk Diyabet ve Obezite Derg** 2020; 1: 60-68.

Çalışır M. Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler. Yüksek Lisans Tezi, **Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2019, 59.

Çayır A ve Turan Mİ. Diabetes Mellitus ile İlişkili Kardiyak Bozukluklar. **Ankara Med J** 2015; 15 (4): 231-234.

Damborsky P, Svitel J, Katrlık J. Optical Biosensors. **Essay Bioch** 2016; 60: 91 – 92.

Demirezen ÖU, Uzuncan N, Bilgili S, Akşit M, İhtiyar AH, Esenlik Ö, Bozkaya G. HbA1c Tayininde HPLC Yöntemlerinin Karşılaştırması. **Türk Klinik Biyokimya Derg** 2016; 14(2): 73-78

- Dennison M J and Turner P F. Biosensors for Environmental Monitoring. **Biotech Adv** 1995; 13: 1 – 12.
- Dinççağ N. Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisinde Güncel Durum. **İç Hastalıkları Derg** 2011; 18: 181-223.
- Dönbak L. İnsan Hemoglobini (Hb) Varyantları KSÜ. **Fen ve Mühendislik Derg** 2005; 8(2).
- EL-Mohandes N and Huecker MR. Pediatric Diabetes Ketoacidosis. **StatPearls** 2019.
- Eser B, Dinçel A. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. **J Health Ser Edu** 2018; 2 (2): 51 - 57.
- Fayfman M, Pasquel FJ, Umpierrez GE. Management of Hyperglycemic Crises: Diabetic Ketoacidosis and Hyperglycemic Hyperosmolar State. **Med Clin North Am** 2017; 101(30): 587-606.
- Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J-O, Miedema K. Preparation of A Candidate Primary Reference Material for the International Standardisation of HbA1c Determinations. **Clin Chem Lab Med** 1998; 36: 299 - 308
- Foucher CD and Tubben RE. Lactic Acidosis. **StatPearls** 2019.
- Fracchiolla N S, Artuso S, Cortelezzi A. Biosensors in Clinical Practice: Focus on Oncohematology. **Sensors** 2013; 13: s.6424.
- Genç S, Ömer B, Üstyol AE, Ince N, Bal F, Gürdöl F. Evaluation of Turbidimetric Inhibition Immunoassay (TINIA) and HPLC Methods for Glycated Haemoglobin Determination. **Jour Clin Lab Anal** 2012; 26: 481–485.
- Genç S, Ömer B, Üstyol AE, Ince N, Bal F, Gürdöl F. Evaluation of Turbidimetric Inhibition Immunoassay (TINIA) and HPLC Methods for Glycated Haemoglobin Determination.
- Ghimire P and Dhamoon AS. Ketoacidosis. **Stat Peals** 2020.
- Giacco F and Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circ Res** 2010; 107 (9): 1058-1070.
- Giannopoulos S and Armstrong EJ. Diabetes Mellitus: An Important Risk Factor For Peripheral Vascular Disease. **Expert Rev of Cardiovasc Ther** 2020; s. 1-5.
- Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory Diagnosis of HbA1c: A Review. **J Nanomed Res** 2017; 5 (4): 3-4.
- Gürdöl F. "Hemoglobin ve Miyoglobin". Tıbbi Biyokimya, 3.baskı, Eds. Gürdöl F, **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 2014, s.99-100.
- Harris K, Boland C, Meade L, Battise D. Adjunctive Therapy for Glucose Control in Patients with Type 1 Diabetes. **Dia Met Synd Obe: Targ Ther** 2018; s.159-173.
- Hörber S, Achenbach P, Scheicher E, Peter A. Harmonization of Immunoassays for Biomarkers in Diabetes Mellitus. **Biotech Adv** 2020; 39: 2 – 3.
- Huisman THJ. The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. **Br Clin Haematol** 1993; 6: 1 -30.
- Ighodaro OM. Molecular Pathways Associated with Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. **Biomedic & Pharm** 2018; 108: 656-662.

Jensen AL and Hansen MK. Method Comparison in the Clinical Laboratory. **An International Jour Lab Med** 2006; 35(3): 276-286.

Karlsson S and Nienhuis AW. Developmental regulation of human globin genes. **Ann Rev Biochem** 1985; 54: 1071-1108.

Kaur J, Jiang C, Liu G. Different Strategies for Detection of HbA1c Emphasizing on Biosensors and Point-of-Care Analyzers. **Biosens Bioelect** 2018.

Khashoggi H, Pignalosa S, Russo C, Pieri M, Bernardini S. New HPLC Instrument Performance Evaluation in HbA1C Determination and Comparison with Capillary Electrophoresis. **Scandinavian Jour of Clin and Lab Invest** 2018; 78(5): 393-397.

Klingenberg O, Furuset T, Hestbraten CR, Hallberg MH, Steiro A, Orset IR, Berg JP. HbA1c Analysis by Capillary Electrophoresis–Comparison with Chromatography and an Immunological Method. **Scandinavian Jour of Clin and Lab Invest** 2017; 77(6): 458-464.

Kurt İ. Glikozile Hemoglobin Ölçümü ve Diabetes Mellitusun Uzun Dönem Glisemik Kontrolünde Kullanılması. **Gülhane Tıp Derg** 2003; 45 (4): 387-395.

Leslie C. Global Standardisation of HbA1C. **Malaysian J Pathol** 2008; 30(2): 67-71.

Li Y. Biosensors. 2006; 2: 52 – 93.

Lin H and Yi J. Current Status of HbA1c Biosensors. **Sensors** 2017; 17 (8): 1798.

Liu L, Hood S, Wang Y, Bezverkov R, Dou C, Datta A, Yuan C. Direct Enzymatic Assay for %HbA1c in Human Whole Blood Samples. **Clin Bio** 2008; 41: 576 – 583.

Macit S ve Akbulut G. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. **Bes Diy Derg** 2015; 43 (1): 59-65.

Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, Manning JM. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. **Science** 2007; 16: 1641-1658.

Marcovecchio ML. Complications of Acute and Chronic Hyperglycemia. **US Endocrinology** 2017; 13 (1): 1-5.

Mathew P and Thoppil D. Hypoglycemia. **Stat Pearl** 2019.

McDonald MS, Shapiro R, Bleichman M, Solway J, Bunn HF. Glycosylated Minor Components of Human Adult Hemoglobin. **J Biol Chem** 1978; 253: 2327-2332.

Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. **Düzce Tıp Fak Derg** 2005; 3: 30-39.

Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Sibert C. 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** 1993; 329: 977-986.

Nelson DL and Cox MM. (2008) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, 5.baskı, Eds. Elçin YM, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2013, s.1196.

Nitin S. HbA1c and Factors Other Than Diabetes Mellitus Affecting It. **Singapore Med J** 2010; 51 (8): 616-622.

Pandey A, Chawla S, Guchhart P. Type-2 Diabetes: Current Understanding and Future perspectives. **Inter Un Bioch Mol Biol** 2015; 67 (7): 506-513.

- Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R. Glycosylated Hemoglobins (GHb); An Index of Red Cell Survival. **Blood** 1982; 59 (6): 1348-1350.
- Park CM, Nagel RL, Blumberg WE, Peisach J, Magliozzo RS. Sulfhemoglobin Properties of Partially Sulfurated Tetramers. **J Biol Chem** 1986; 261: 8805-8810.
- Pearson J E, Gill A, Vadgama P. Analytical aspects of Biosensors. **Ann Clin Biochem** 2000; 37: s.133.
- Penttilä I, Penttilä K, Holm P, Laitinen H, Ranta P, Törrönen J, Rauramaa R. Methods, Units and Quality Requirements for The Analysis of Haemoglobin A1c in Diabetes Mellitus. **World J Meth** 2016; 6(2): s.135.
- Rhea J M and Molinaro R. Pathology Consultation on HbA1c Methods and Interferences. **Am J Clin Pathol** 2014; 141: 5 - 16.
- Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper'ın Resimli Biyokimyası, 31.baskı, Eds. Yücel D, **Güneş Tıp Kitabevi**, Ankara, 2019, s.800.
- Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: Analysis of glucose profiles and HbA1c in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care** 2002; 25: 275–278.
- Santulli G. Editorial : cardiovascular Disease and Diabetes. **Frontiers in Endoc** 2019; 10: s.314.
- Servat OS, Hernandez C, Simo R. Diabetic Retinopathy in the Context of Patients with Diabetes. **Ophthalmic Res** 2019; 62: 211-217.
- Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetes Mellitus. **Biomarker Insights** 2016; 11: 95-104.
- Sivaraman P. Choosing a test method to measure HbA1c. 2020.
- Smith C, Marks AD, Lieberman M. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım, 1.baskı, Eds. İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A, **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara, 2007, s.976.
- Sönmez Ç, Yurtarslan A. Agaroz Jel ve İmmunfiksasyon Elektroforezi Uygulamaları. <http://www.turkiyokimyadernegi.org.tr/upload/48/Dosyalar/tmp/AgarozJel.pdf>
- Sözmen E. "Normal Vücut Proteinleri ve Fonksiyonları". İnsan Biyokimyası, 2.baskı, Eds. Sözmen E, Onat T, Emerk K, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2006, s.150-161.
- Şahin AD, Üstü Y, Işık D. Serebrovasküler Hastalıklarda Önlenebilir Risk Faktörlerinin Yönetimi. **Ankara Med J** 2015; 15(2): 106-113.
- Tekçe BK, Tekçe H, Aktaş G, Tosun M. HbA1c Ölçümünde Architect C 8000 ile MQ-2000PT Sonuçlarının Karşılaştırılması. **JAREM** 2015; 5: 52-5.
- Türkmen E. Glukoz Tayini İçin Bir Biyosensör Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, **Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Konya, 2015, s.114.
- Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. **Saudi Phar J** 2016; 24: 547-553.
- Use of Glycated Hemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. **World Health Organization** 2011.

Üstündağ Y, Huysal K, Tarakçı G. HbA1C Ölçümünde Bir İmmünotürbidimetrik ve HPLC Yöntemin Karşılaştırılması. **Türk Klinik Biyokimya Derg** 2011; 9(1): 15-21.

Wang B, Takahashi S, Du X, Azai J. Electrochemical Biosensors Based on Ferroceneboronic Acid and Its Derivatives. **Biosensors** 2014; 4: 243 – 249.

Wang W and Lo ACY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. **Int J Mol Sci** 2018; 19 (1816): 2-14.

Westgard JO, Carey RN, Wold S. Criteria for Judging Precision and Accuracy in Method Development and Evaluation. *Clin Chem* 1974;20:825-33.

Weykamp C, John W G, Mosca A. A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c. **J Diabetes Sci Tec** 2009; 3(3): 439-445.

Willey DG, Rosenthal MA, Caldwell S. Glycosylated Haemoglobin and Plasma Glycoprotein Assays by Affinity Chromatography. **Diabetologia** 1984; 27: 56-58.

Yağmur M. Kötü Glisemik Kontrolü Olan Tip 2 Diyabetes Mellitus Hastalarında Mikrovasküler Komplikasyonlar İle Karotis İntima Media Kalınlığı ve Endotel Fonksiyonları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, **İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Malatya, 2010, s.53.

Yılmaz FT, Kumsar AK, Çelik S. Tip 2 Diyabetli Bireylerde Kardiyovasküler Hastalıklar Risk Faktörleri Bilgi Düzeyi İle Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışları Arasındaki İlişki. **Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Derg** 2018; 15 (2): 63-70.

Yücel D. Pratik Metot Validasyonu ve Verifikasyonu. **Türk Biyokimya Derneği** 2014.

8 ÖZGEÇMİŞ

Yasemin YILMAZ 1995 yılında Trabzon'da doğdu. Lise eğitimi dahil ilk ve orta öğretimini Trabzon'da tamamladı. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2018 yılında mezun oldu. 2018 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.