

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HBA1C TESTİ ÖLÇÜMLERİ İÇİN HPLC VE
İMMÜNÖTÜRBİDİMETRİ YÖNTEMLERİNİN
KIYASLANMASI

ESMA TİRYAKİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA

Temmuz, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ BAŞLIĞI

Esma TİRYAKİ tarafından hazırlanan tez çalışması 08-07-2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Bürge AŞÇI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU, Üye
Marmara Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “HBA1C TESTİ ÖLÇÜMLERİ İÇİN HPLC VE İMMÜNÖTÜRBİDİMETRİ YÖNTEMLERİNİN KIYASLANMASI” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Esmâ TİRYAKİ

İmza



*Aileme
ve
dostlarima*

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu çalıőmayı yaparken benden desteklerini esirgemeyen sevgili annem Hatice TİRYAKİ, babam Veysel TİRYAKİ ve ablam Ayőe TİRYAKİ ERTOP' a sonsuz teşekkür ederim. Ders dönemimde ve tez aşamasında bana yardımlarından dolayı sevgili danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA' ya sonsuz teőekkürler ederim. Bu çalıőmayı gerçekleőtirdiđim ve benim için gerçekten çok değerli olan Kinetik Bilişim Diagnostik A.Ő. firmasındaki benden yardımlarını esirgemeyen sevgili patronum Ernas UCA ve teknik müdürümüz Halil İbrahim ATAŐ' a sonsuz teşekkür ederim.

Esmat İRYAKİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	viiiii
KISALTMA LİSTESİ	iiix
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiii
1 GİRİŞ	1
1.1 Klinik Kimya.....	1
1.1.1 Klinik Kimyada HbA1c	1
2 LİTERATÜR VERİLERİ	3
2.1 Diyabet.....	3
2.1.1 Tip1 Diyabet.....	5
2.1.2 Tip2 Diyabet.....	7
2.1.3 Tip 1 ve Tip 2 Dışındaki Diyabet Türleri	7
2.2 Diyabet Koşulları.....	9
2.3 Hemoglobin.....	13
2.4 Hemoglobin Proteini (Pigmenti).....	13
2.4.1 Hemoglobinin Görevleri.....	15
2.4.2 Hemoglobin Bileşikleri.....	16
Karbonilhemoglobin/Karboksihemoglobin.....	16
Karbaminohemoglobin.....	16
Oksihemoglobin.....	16
Deoksihemoglobin.....	16
Sülfohemoglobin.....	16
Methemoglobin ve Siyanmethemoglobin.....	16
2.5 Glikozlanmış Hemoglobin.....	17

3 HbA1c ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	19
3.1 HbA1c Ölçümü.....	19
3.2 HbA1c Analiz Yöntemleri.....	20
3.2.1 İyon Değişim Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	20
3.2.2 Elektroforez.....	20
3.2.3 Kapiler Elektroforez.....	21
3.2.4 Boronat Afinite Kromatografisi.....	22
3.2.5 İmmünolojik Testler.....	22
3.2.6 Enzimatik Analizler.....	24
4 DENEYSEL VERİLER	26
4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kitler.....	26
4.2 Deneysel Süreç	26
4.2.1 Doğrusallık ve Tekrarlanabilirlik Çalışması.....	27
Gün İçi Tekrarlanabilirlik.....	27
Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	27
Linearite (Doğrusallık) Çalışması	27
Stabilite (Tekrarlanabilirlik) Çalışması	27
Yöntem Kıyaslaması.....	28
5 SONUÇ	29
5.1 Linearite ve Tekrarlanabilirlik Çalışması	29
5.2 Stabilite Çalışması	33
5.3 Yöntem Kıyaslaması.....	34
6 TARTIŞMA	42
KAYNAKÇA	43

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
R^2	Determinasyon Katsayısı
ε	Epsilon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Fe+3	Ferrik
Fe+2	Ferröz
F-6P	Fruktoz-6-fosfat
γ	Gama
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCN	Hidrojen Siyanür
IgG	İmmüoglobülin G
pI	İzoelektronik Nokta
CO ₂	Karbondioksit molekülü
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen molekülü
SD	Standart Sapma
CV	Varyasyon Katsayısı
ζ	Zeta

KISALTMA LİSTESİ

ADA	Amerikan Diyabet Derneği
B.C	Beckman Coulter
BFG	2,3-Bifosfogliserik asit
COHb-HbCO	Karboksihemoglobin
DCCT	Diyabet Kontrol ve Komplikasyon alışmaları
DKA	Durum Diyabetik Ketoasidoz
DM	Diabetes Mellitus
FPG	Açlık Plazma Glikozu
F-VH	Fruktozil Valil Histidin
FVO	Fruktozil Valin Oksidaz
FPOX	Fruktozil Peptid Oksidaz
GDM	Gebelik Diabetes Mellitus
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin A
HbA1c	Hemoglobin A1c
HbA2	Hemoglobin A2
HbF	Hemoglobin F
HbS	Hemoglobin S
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IFG	Bozulmuş Açlık Glikozu
IGT	Bozulmuş Glikoz Toleransı
MODY	Olgunluk Başlangıçlı Diyabet
NGSP	Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı
NHANES	Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması
OGTT	Oral Glikoz Tolerans Testi
pCO2	Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PG	Postprandiyal Glikoz
pO2	Parsiyel Oksijen Basıncı
RPM	Referans lm Prosedürü
UKPDS	İngiltere Prospektif Diyabet alışması
UV-Vis.Spek.	Ultraviyole Görünür Spektroskopisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Hemoglobin Proteininin Yapısı.....	14
Şekil 2.2 Hem molekülü.....	14
Şekil 2.3 Hemoglobin A (HbA) ve glikoz arasında glikozlanmış hemoglobin(A1c) üretmek için enzimatik olmayan reaksiyon (glikasyon).....	17
Şekil 3.1 HbA1c ölçüm yöntemlerinin analitik kavramları ve IFCC-RPM' ye göre izlenilirlikleri.....	19
Şekil 3.2 HbA1c için immünolojik yöntemin şematik gösterimi	24
Şekil 3.3 HbA1c ölçümü için enzimatik yöntemin şematik gösterimi.....	25
Şekil 5.1 HPLC cihazı için HbA1c kalibrasyon grafiği.....	29
Şekil 5.2 B.C.AU680 cihazı için HbA1c kalibrasyon grafiği.....	29
Şekil 5.3 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında 5 farklı değer ölçüm sonuçlarının grafiği.....	32
Şekil 5.4 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında kıyaslanan hastaların sonuçlarının Q1, Q2 ve Q3 değerlerinin dağılımını gösteren box-plot (kutu) grafiği.....	36
Şekil 5.5 İki yöntemin sonuçlarının Passing Bablok Regresyon Analiz Grafiği.....	37
Şekil 5.6 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında kıyaslanan hastaların sonuçlarının regresyon grafiği.....	37
Şekil 5.7 Deming Regresyon Analizi Grafiği.....	38
Şekil 5.8 İki metottun ölçüm sonuçlarının Bland Altman grafiği.....	39

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Diyabet Tanı Kriterleri.....	12
Tablo 5.1 HbA1c Kontrol 1 ve 2 numunelerinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları	30
Tablo 5.2 HbA1c Kontrol 1 ve 2 numunelerinin her iki cihaz içinde günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.....	30
Tablo 5.3 Düşük ve yüksek değerli hasta numunelerinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.....	31
Tablo 5.4 Düşük ve yüksek değerli hasta numunelerinin günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.....	31
Tablo 5.5 HPLC ve B.C AU680 cihazında 5 farklı HbA1c değerinin doğrusallık ölçümü	32
Tablo 5.6 Düşük ve yüksek değer (% 5,5 ve % 10,7) olarak belirlenen HbA1c hastalarının 0, 2, 4 ve 24.saatlerdeki ölçüm sonuçları	33
Tablo 5.7 Rastgele alınan 60 hasta numunesinin HPLC ve B.C AU680 cihazlarında karşılıklı olarak çalışmasının sonuçları	34

HbA1c Testi Ölçümleri İçin HPLC ve İmmünotürbidimetri Yöntemlerinin Kıyaslanması

Esmâ TİRYAKİ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA

Glikozlanmış hemoglobin (HbA1c) uzun vadeli glisemik kontrolünün bir göstergesidir. Klinik testlerde glikozlanmış hemoglobin ölçümleri son 90 -120 gün içindeki glisemik kontrolü yansıtır. Bu çalışmada HPLC ve immünotürbidimetrik analiz yöntemleriyle ölçülen HbA1c değerlerinin kıyaslanması amaçlandı.

Bu çalışmada her iki cihazda onar kontrol ve hasta örnekleri ile gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Her iki cihaz içinde linearite ve stabilite çalışmaları gerçekleştirildi. Rutin HbA1c ölçümü için laboratuvara gelen numunelerden rastgele 60 örnek alınarak ilgili çalışmalar yapıldı.

HbA1c ölçümü için HPLC ve immünotürbidimetrik yöntem arasında anlamlı bir farka rastlanmadı. Her iki cihazında kalite kontrol değerlerinin karşılaştırılması anlamlı bir fark ifade etmemektedir. Yapılan çalışmalarda her iki yöntemde HbA1c sonucu için güvenilir ve diyabetli hastaların takibi için önerilebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: HbA1c, HPLC, immünotürbidimetrik yöntem, diyabet, kan şekeri

Comprasion of HPLC and Immunoturbidimetry Methods for HBA1C Test Measurements

Esma TIRYAKI

Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA

Glycated hemoglobin (HbA1c) is an indicator of long-term glycemic control. In clinical testing, glycated hemoglobin measurements reflect glycemic control over the past 90-120 days. This study aimed to compare HbA1c values measured using HPLC and immunoturbidimetric analysis methods.

In this study, intra-day and inter-day repeatability tests were performed on both instruments using ten control and patient samples each. Linearity and stability studies were also conducted for both devices. Sixty random samples from routine HbA1c measurements in the laboratory were selected for these analyses.

No significant difference was found between the HPLC and immunoturbidimetric methods for HbA1c measurement. Additionally, the comparison of quality control values for both devices did not indicate a significant difference. The study concluded that both methods are reliable for HbA1c measurement and can be recommended for monitoring diabetic patients.

Keywords: HbA1c, HPLC, immunoturbidimetric method, diabetes, blood sugar

1.1 Klinik Kimya

Klinik kimya günümüzde bir bilim dalı, bir hizmet sektörü ve bir endüstri alanı olarak kabul görür. Bir bilim dalı olarak klinik kimya; genel kimya, organik kimya, analitik kimya ve biyokimya bilgisini, insan fizyolojisini anlamak için kullanır. Hizmet sektörü açısından ise klinik tıbbi laboratuvarlar insan hayatı için önemli tıbbi kararların alınabilmesini sağlayan somut veriler sunar. Bir endüstri alanı olarak ise ticareti yönlendiren düzenlemeler ve uygulamalarla faaliyet gösteren işletmelerdir. Klinik kimya laboratuvarları sağlık durumu veya hastalık süreçlerinin bir belirteci olarak biyokimyasal bileşiklerdeki değişimi izler. Bu değişimler hastalığa yanıt olarak doku ve organlarda sıradan olmadığından belirli biyokimyasal belirteçlerin ölçümü hastalık sürecinin takip edilmesini sağlar. Örneğin kanda üre azotu konsantrasyonundaki artış böbrek yetmezliğini, kan kolesterolünün artan konsantrasyonu kalp rahatsızlıkları riskinin arttığını gösterebilir.

1.1.1 Klinik Kimyada HbA1c

Dünya giderek artmaya başlayan diyabet hastalığının tanı ve tedavisi için yöntemler geliştirmeye devam ediyor. Günümüzde 220 milyondan fazla kişiye diyabet teşhisi konuldu fakat Tip 2 diyabetin sinsi başlangıcı nedeniyle diyabetli kişilerin gerçek sayısının daha yüksek olması muhtemeldir. Bozulmuş glukoz toleransı olan birçok birey tanı konulan hasta havuzuna dahil değildir. Tip 2 diyabet tüm diyabet tanılarının % 90-95'ini oluşturur [1]. Ayrıca Tip 2 diyabetin kalp rahatsızlıkları ve felç riskini ciddi oranda arttırdığı belirlenmiştir [2]. Diyabetli bireylerin % 50'sinin kalp damar rahatsızlıklarından dolayı hayatlarını kaybettikleri bilinmektedir.

Uluslararası uzman komitesi 2009 yılından itibaren % 6,5'tan büyük diabetes mellitus'u (DM) teşhis etmek için HbA1c kullanımını önerdi. Ancak bu tanı testi Diyabet Kontrol ve Komplikasyon Çalışmaları (DCCT) referans testine veya Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) tarafından onaylanmış bir metoda göre standardize edilmiş olmalıdır [3].

HbA1c'nin diyabet tanı testi olarak kullanılabilmesi için yaklaşık otuz yıllık ayrıntılı incelemelerden geçmesi gerekti. Araştırmacılar tarafından uzun zamandır diyabet taraması ve tanısı için kullanılacak, kronik glisemik kontrolü sağlayabilecek glisemi testi aranıyordu; çünkü bu tür bir test komplikasyonların başlangıcını da belirleyebilirdi. Glikozile hemoglobin (hb) daha az kişisel değişkenliğe sahip ve açlık plazma glikozu (FPG) ve oral glikoz tolerans testi (OGTT) ile karşılaştırıldığında kardiyolojik risklerin daha iyi öngörebilir. Bu sebeple glisemik kontrolün testi olarak önem kazanır. Ek olarak diyabetli hastaların glukoz düzeyinin takip edilmesi için kullanılan bir testtir. Başka bir çalışmada HbA1c ve FPG' nin kardiyovasküler hastalıkla sürekli bir ilişkisi olduğu belirtildi.

Glikosile hemoglobin klinik çalışmalarda detaylı bir şekilde araştırıldı. HbA1c'nin oldukça tekrarlanabilir olduğunu ve glikoz toleransındaki değişimlere hassas olduğu belirlendiği için glisemik kontrolü sağlamakta önemli rol oynar.

Akut olarak hastaneye yatırılan hastalarda HbA1c değeri % 4-6 arasında olan glisemik kontrol açısından sağlıklı teşhisi konulduğu gibi, % 6'dan yüksek sonuçlara ise diyabet tanısı konabilir.

2

LİTERATÜR VERİLERİ

2.1 Diyabet

Diyabet, vücudun insülin salgılamasında veya insülinin etkisinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle ortaya çıkan ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize edilen bir metabolik hastalık grubudur. Yüksek kan şekeri seviyelerinin uzun süre devam etmesi halinde, vücudun çeşitli organlarına, özellikle gözlere, böbreklere, sinirlere ve kalp damarlarına ciddi zararlar verebilir. Zamanla, bu organlarda fonksiyon kaybı ve yetmezlik gelişebilir. Bu durum, organların düzgün çalışmasını engelleyerek, sağlığı önemli ölçüde olumsuz etkileyebilir [1].

Diyabet hastalığının sürecinde çok fazla etken vardır. Örneğin; pankreasta insülin salgılayan β hücrelerinin bağışıklık sistemine saldırması neticesinde insülin miktarı düşüklüğü veya insülin hormonuna verilen yanıtın zayıflaması gibi olaylar söz konusu olabilir. Diyabet hastalığında protein, karbonhidrat ve yağ yapısının bozulmasının temel nedeni, insülinin hedef dokular üzerindeki etkisinin yetersizliğidir. Bu durum, insülinin yeterince salgılanmaması veya dokuların insüline yeterince yanıt vermemesi gibi farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilir. Çoğu zaman, hastada hem insülin salgılanmasında hem de insülin etkisinde bozukluk bir arada bulunur ve hipergliseminin temel sebebinin hangisi olduğu net olarak belirlenemez.

Yüksek kan şekerinin (hiperglisemi) etkilerinden bazıları şunlardır; gün içinde sürekli idrara gitme (poliüri), ağız kuruluğu sonucu aşırı su içme isteği (polidipsi), aşırı zayıflama, bazen aşırı yemek yeme isteği (polifaji) ve görüşün net olmaması. Uzun süreli yüksek kan şekere bağlı hormon düzensizliği ve bazı enfeksiyonel hastalıklara da eğilim görülebilir. Diyabeti kontrol altında tutulamayan hastalar, hızla kötüleşen ve hayatı tehdit eden durumlarla karşı karşıya kalabilir. Bu tür durumlardan en tehlikeli olanları arasında, diyabetik ketoasidoz ve nonketotik hiperozmolar sendrom yer alır. Bu sağlık sorunları, kan şekerinin aşırı yükselmesi ve vücutta dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar, tedavi edilmediğinde ciddi sonuçları olur. Diyabetin uzun vadede etkileri ise şu şekilde sıralanabilir:

- **Retinopati:** Görme kaybı
- **Nefropati:** Böbrek yetmezliği
- **Periferik nöropati:** Ayak ülseri, uzuv kaybı ve Charcot eklemi
- **Otonomik nöropati:** Sindirim, idrar yolu, kardiyovasküler sistem ve cinsel işlev bozukluklarına sebep olabilir [4].

Ayrıca, diyabetli bireylerde genellikle hipertansiyon ve lipoprotein metabolizmasında bozukluklar da görülmektedir.

Diyabet hastalarının çoğu hastalığın nedenleri ve süreçlerine göre 2 gruba ayrılır. Bunlardan ilki, halk arasında Tip 1 diyabet şeklinde adlandırılan ve insülinin yeteri kadar salgılanmamasından kaynaklı gelişen diyabettir. Tip 1 diyabet oluşma riski yüksek olan kişiler, genelde pankreas hücrelerinde oluşan bağışıklık sistemi bozukluklarının belirtileri ve birkaç genetik faktör ile teşhis edilebilir.

Bir başka diyabet çeşidi ise daha sık görülen Tip 2 diyabettir. Tip 2 diyabetin asıl sebebi, insülin direnci ile yeterli hassasiyete sahip olmayan insülin salgılama tepkisinin birleşimidir [1]. Tip 2 diyabette, çeşitli hedef dokularda patolojik ve işlevsel değişikliklere yol açabilecek düzeyde hiperglisemi bulunabilir. Ancak, klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce uzun bir süre boyunca diyabet fark edilmeden kalabilir.

Bu belirteçlerin görülmediği zamanlarda, açlık kan şekeri ölçümü veya oral glikoz tolerans testi ile karbonhidrat yapısındaki bozukluklar tespit edilebilir. Yüksek kan şekeri düzeyi, esasında buna sebep olan esas hastalığın ilerlemesine veya gerilemesine göre süreç dahilinde farklılık gösterebilir. Diyabet gelişimi için gerekli eşik seviyeye ulaşmamış bir hastalık süreci, bozulmuş açlık glikozu (IFG) ve/ veya bozulmuş glikoz toleransı (IGT) gibi durumlara neden olabilir.

Bu nedenle bazı Tip 2 diyabetli bireylerde zayıflama, egzersiz yapılarak ve/ veya oral glikoz düşürücü ilaçlarla yeterli glisemik kontrol yapılabilir. Bu bireyler insülin tedavisine gerek duymayabilir [1]. Metabolik bozulmanın şiddetinin zamanla ilerleme, gerileme veya sabit kalma gibi durumları söz konusu olabilir. Yüksek kan şekeri (hiperglisemi) düzeyi, sadece bu sürecin gelişimini değil, aynı zamanda vücutta var olan metabolik bozulmanın ne kadar ciddi olduğunu ve tedaviye nasıl bir yanıt verildiğini yansıtan bir göstergedir. Yani, hiperglisemi, temeldeki

düzensizliğin bir yansımasıdır ve tedaviye ne kadar etkili bir şekilde yanıt verildiğini gösterir.

Bir kişiye diyabet tanısı koymak, o anki sağlık durumuna bağlıdır ve birçok kişi belirli bir diyabet türüne tam olarak uymaz. Örneğin, gebelik diyabeti (GDM) geçiren biri, doğumdan sonra da kan şekeri yüksek kalabilir ve aslında Tip 2 diyabet olduğu ortaya çıkabilir. Benzer şekilde, yüksek dozda steroid kullanan biri, bu ilaçlar kesildiğinde kan şekeri normale dönebilir. Ancak yıllar içinde tekrarlayan pankreas iltihapları (pankreatit) sonrası tekrar diyabet gelişebilir. Bir başka örnek ise, idrar söktürücü ilaçlar (tiyazidler) kullanan ve ilerleyen yıllarda diyabet tanısı alan kişilerdir. Tiyazidler genellikle tek başına diyabete neden olmaz, ancak bazı kişilerde var olan Tip 2 diyabeti tetikleyebilir [18].

Bu yüzden, doktorlar ve hastalar için diyabetin belirli bir türünü adlandırmaktan çok, kan şekerinin neden yükseldiğini anlamak ve bunu doğru şekilde tedavi etmek daha önemlidir.

2.1.1 Tip 1 Diyabet

Genellikle Mutlak İnsülin Eksikliğine Neden Olan β (Beta) – Hücre Kaybı olarak bilinen diyabet türüdür.

Diyabetli hastaların sadece % 5-10'u bu tür diyabete sahiptir. "Tip 1 diyabet" ya da "çocukluk çağı diyabeti (juvenil başlangıçlı diyabet)" olarak da bilinen bu diyabet türü, pankreastaki β -hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından zarar görmesi sonucu ortaya çıkar.

Bağışıklık sistemi bu hücreleri yok ederken, bu durumunun bazı belirtileri ortaya çıkar. Bunlar, adacık hücrelerine karşı ve insüline karşı olan antikorlardır. Açlık kan şekeri yüksekliği ilk tespit edildiğinde, bu antikorların bir veya birkaçı hastaların % 85-90'ında bulunabilir.

Bu diyabet çeşidinde β -hücrelerinin yok olma hızı sabit olarak değerlendirilememektedir. Özellikle bebek ve çocuklarda, hücre yıkımı hızlı olurken, yetişkinlerde bu süreç daha yavaş ilerler. Çocuklar ve ergenlerde, hastalığın ilk belirteci olarak ketoasidoz görülebilir. Ketoasidoz; vücutta yeterli insülin bulunmadığında ortaya çıkan ciddi bir durumdur. Hücreler enerji için

yeterince glikoz kullanamayınca, vücut yağlarını yakmaya başlar. Bu süreçte keton adı verilen asidik maddeler üretilir ve kanda birikir. Keton seviyeleri çok yükseldiğinde, kanın asidik hale gelmesine neden olur ve bu durum diyabetik ketoasidoz (DKA) olarak adlandırılır. Belirtileri arasında aşırı susama, sık idrara çıkma, mide bulantısı ve kusma, karın ağrısı, aseton kokulu nefes, bilinç bulanıklığı vardır [5]. Ketoasidoz, özellikle Tip 1 diyabet hastalarında görülür ve acil tıbbi müdahale gerektirir. Diğer hastalarda ise enfeksiyon veya strese bağlı olarak orta düzeyde açlık hiperglisemisi hızla şiddetli hiperglisemiye ve/veya ketoasidoza dönüşebilir.

Bazı yetişkinlerde ise β -hücrelerinin işlevi yıllarca devam edebilir ve bu kişiler, ketoasidozu önlemek için yeterli insülin üretmeye devam eder. Ancak, bu bireyler bir noktada insüline bağımlı hale gelir ve ketoasidoz riski taşır. Hastalığın ileri aşamalarında, plazma C-peptit seviyeleri düşük veya tespit edilemez hale gelir ve bu da çok az ya da hiç insülin salgılanmadığını gösterir.

Tip 1 diyabet çoğunlukla çocukluk veya ergenlik döneminde başlar, ancak herhangi bir yaşta da teşhis edilebilir. Pankreastaki β -hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğrayarak yok edilir. Bu durum, genetik yatkınlıkla bağlantılıdır ve tam olarak bilinmeyen bazı çevresel faktörler de etkili olabilir.

Tip 1 diyabetli hastaların çoğu genellikle zayıftır, ancak bazıları kilolu olabilir. Yani, obez olmak bu diyabet türünü dışlamaz.

Bu diyabet türü var olan bireyler, diğer bazı otoimmün (bağışıklık sistemine bağlı) hastalıklara da yatkın olabilir. Bunlar arasında şunlar bulunur: **Graves hastalığı** (Bağışıklık sisteminin tiroit bezine saldırması sonucu aşırı hormon üretimine neden olan bir hastalık), **Hashimoto tiroiditi** (Bağışıklık sisteminin tiroit bezine saldırarak tiroit hormonu üretimini azaltması), **Addison hastalığı** (Böbreküstü bezlerinin yeterince kortizol ve aldosteron hormonu üretememesi), **Vitiligo** (Bağışıklık sisteminin ciltteki melanin üreten hücrelere saldırması sonucu deride beyaz lekeler oluşması), **Çölyak hastalığı** (Bağışıklık sisteminin glutene karşı aşırı tepki vererek ince bağırsağa zarar vermesi), **Otoimmün hepatit** (Bağışıklık sisteminin karaciğere saldırarak iltihaplanmaya ve hasara yol açması), **Miyastenia gravis** (Bağışıklık sisteminin sinirler ve kaslar arasındaki iletişimi bozarak kas

güçsüzlüğüne neden olması), **Pernisiyöz anemi** (Bağımsızlık sisteminin B12 vitamini emilimini engelleyerek kansızlığa yol açması).

2.1.2 Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet, diyabet hastalarının % 90-95'ini oluşturur ve genellikle erişkinlerde görülse de her yaşta ortaya çıkabilir. Bu diyabet türü, vücudun insüline direnç göstermesi ve insülin üretiminin zamanla yetersiz kalmasıyla gelişir. Başlangıçta pankreas yeterli insülin üretmeye çalışsa da hücreler insüline gerektiği gibi yanıt vermez. Zamanla pankreas yorulur ve insülin üretimi azalır. Tip 2 diyabeti olan hastaların birçoğu obezdir. Obezlik durumu, insülin direncine sebep oluşturan önemli bir etkidir. Fazla kilosu olmayan bazı bireylerde de özellikle karın bölgesinde yağlanma görülebilir, bu da insülin direncine katkıda bulunur. Tip 2 diyabet genellikle yavaş ilerler ve belirtileri hafif olduğu için uzun yıllar fark edilmeyebilir. Bu nedenle birçok kişi hastalığını ancak kan şekeri testleriyle öğrenir.

Bu diyabet türüne sahip kişilerde kalp-damar hastalıkları, böbrek sorunları ve sinir hasarı gibi komplikasyonların gelişme riski daha yüksektir. Kan şekeri seviyeleri genellikle normal veya yüksek insülin seviyelerine rağmen yüksektir. Bunun sebebi pankreas, insülin hassasiyetini dengelemek adına olması gereken miktarda insülin hormonu üretmez.

Bireylerde yaş ilerledikçe, Tip 2 diyabet hastalığı geliştirme ihtimali de artar. Obezite, fiziksel aktivite eksikliği, gebelik diyabeti (GDM) öyküsü, yüksek tansiyon ve kolesterol gibi faktörler riski artırır. Ayrıca bu diyabet türü, genetik yatkınlıkla da ilişkilidir, ancak genetik yapısı henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Tip 2 diyabet genellikle yaşam tarzı değişiklikleri (sağlıklı beslenme, kilo kontrolü, düzenli egzersiz) ve bazı durumlarda ilaç tedavisi ile kontrol altına alınabilir. İlerleyen aşamalarda insülin ihtiyacı doğabilir, ancak hastaların çoğu hayatlarının büyük bölümünde insüline bağımlı değildir.

2.1.3 Tip 1 ve Tip 2 Dışındaki Diyabet Çeşitleri

β- Hücrelerinin Genetik Bozuklukları

Bazı diyabet türleri, pankreastaki β hücrelerinin genetik bozukluklarından kaynaklanır. Bu tür diyabetler genellikle erken yaşta (25 yaşından önce) ortaya

çıkar ve gençlerde görülen olgunluk başlangıçlı diyabet (MODY) olarak adlandırılır. Bu hastalarda insülin direnci olmadan insülin salgılama bozukluğu görülür. Ayrıca, bu durum genetik geçişli olup, aileden aktarılabilir.

İnsülin etkisindeki genetik bozukluklar; bazı kişilerde insülinin vücutta doğru şekilde çalışmasını engelleyen genetik mutasyonlar olabilir. Bu durum hafif kan şekeri yüksekliğinden şiddetli diyabete kadar değişebilir. Genetik bozukluklara sahip bazı bireylerde ciltte koyu lekelenmeler (akantozis nigrikans) görülür. Kadınlarda ise hormon dengesizlikleri nedeniyle adet düzensizlikleri ve kistik yumurtalıklar ortaya çıkabilir.

Pankreas hastalıklarına bağlı diyabet; pankreasa zarar veren hastalıklar da diyabete yol açabilir. Örneğin:

- Pankreatit (pankreas iltihabı)
- Travma (pankreasın yaralanması)
- Enfeksiyonlar
- Pankreas kanseri

Özellikle pankreasın büyük bir kısmı zarar gördüğünde diyabet gelişme riski artar.

Hormonlarla ilgili hastalıklar (Endokrin hastalıklar); bazı hormonlar, insülinin etkisini zayıflatarak kan şekerini yükseltebilir. Eğer bu hormonlar normalden fazla salgılanırsa, diyabet ortaya çıkabilir. Örneğin:

- Büyüme hormonu fazlalığı (akromegali)
- Kortizol fazlalığı (Cushing sendromu)
- Glukagon fazlalığı (glukagonoma)
- Adrenalin fazlalığı (feokromositoma)

Eğer bu hormon fazlalığı tedavi edilirse, kan şekeri genellikle normale döner.

İlaçlara bağlı diyabet; bazı ilaçlar insülin üretimini veya etkisini bozarak diyabete neden olabilir. Bunlar arasında:

- Steroidler (kortizol içeren ilaçlar)
- Nikotik asit
- Bazı kanser ilaçları

Bunlar genellikle insülin direnci olan bireylerde diyabeti tetikleyebilir, ancak herkes için aynı etkiyi göstermeyebilir.

Bazı enfeksiyonlar da diyabete neden olabilir; özellikle doğum öncesinde kızamıkçık geçiren bebeklerde diyabet riski daha yüksektir. Ayrıca:

- Cocksackievirüs B
- Sitomegalovirüs
- Kabakulak virüsü

Bu enfeksiyonlar da diyabet gelişiminde etkili olabilir.

2.2 Diyabet Koşulları

Yıllarca diyabet teşhisi FPG veya 75 g OGTT olmak üzere glukoz kriterlerine bağlanmıştır. 1997' de Diyabet Mellitus teşhisi ve gruplandırılması üzerine ilk uzman komitesi glikoz seviyesinin eşik değerini belirlemek için temel faktör olarak FPG seviyeleri ile görme kaybı varlığı arasındaki gözlemlenen ilişkiyi kullanarak tanı kriterlerini güncelledi. Komite retinopatiji fundus fotoğrafçılığı veya doğrudan oftalmoskopi ile değerlendiren ve glisemiye FPG, 2 saatlik PG ve HbA1C olarak ölçen üç kesitsel çalışmadan elde edilen bulguları inceledi. Bu çalışmalar, retinopati görülme sıklığının düşük olduğu glisemik seviyeleri ve retinopati görülme sıklığının belirgin bir şekilde doğrusal olarak arttığı glisemik seviyelerin üzerinde olduğunu gösterdi. Diyabete bağlı görme bozukluğunun görülme sıklığının arttığı bu üç farklı ölçümün sınır değerleri, her toplulukta aynı şekilde olduğu görüldü. Ayrıca, retinopatinin geliştiği kan şekeri seviyeleri, farklı toplumlar arasında benzerlik gösterir. Bu sonuçlar, FPG için 126 mg/dL (7 mmol/L) değerinde yeni bir tanı sınırının belirlenmesine yardımcı olurken, uzun zamandır geçerli olan 2 saatlik açlık PG sınırının 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması gerektiğini doğrulamış oldu [1].

Kronik gliseminin yaygın olarak kullanılan belirteci A1C testidir. Kan glikoz seviyelerinin 2-3 aylık ortalamasını gösterir. A1C testi hastaya diyabet tanısının konabilmesi ve devamında tedavisi için gerekli ve kritik bir testtir. A1C testi insan vücudunda büyük ve küçük sağlık sorunlarıyla ilgili etkili bir ilişki göstererek glisemik kontrol yönetiminin yeterliliği için standart biyobelirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Önceki uzman komiteleri testin standardizasyonun kısmen

yetersiz olduğu düşüncesiyle diyabet tanısı için A1C testini önermemiştir. Ancak, günümüzde HbA1C analizi neticesinin hem zamana hem de popülasyonlara eşit şekilde uygulanabilmesi için oldukça standardizedir. Uluslararası uzman komitesi hem yerleşik hem de ortaya çıkan epidemiyolojik bulguların kapsamlı incelemesinden sonra yakın tarihli raporlarında % 6,5' lik eşik değeriyle diyabet tanısı için A1C testini önermiştir ve ADA bu kararı onaylamaktadır. A1C'nin % 6,5'lik sınır değeri FPG ve 2 saatlik PG için tanısal eşik değerleri gibi, retinopati prevelansı için bir dönüm noktası ile ilişkilidir. HbA1C analizi Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) tarafından kabul görmüş ve Diyabet Kontrol ve Komplikasyonlar Çalışmaları referans analizine göre standart haline getirilmiş veya takip edilebilir bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmelidir [1].

Diğlisemi tanımlarken daha kronik bir belirteç kullanmanın özellikle de A1C'nin klinisyenler arasında yaygın olarak glisemik kontrolün bir göstergesi olduğu düşünüldüğünde mantıksal bir temeli vardır. A1C testinin açlık gerektirmemesi, yüksek preanalitik stabiliteye sahip olması ve stres ile hastalık dönemlerinde günlük değişimlerden daha az etkilenmesi gibi avantajları, açlık plazma glikozuna (FPG) göre daha fazla avantaj sağlar. Fakat bu durumlar, yüksek maliyet hesaba katıldığında gelişmeye çalışan birçok kesimde HbA1C testinin sınırlı erişilebilir olması ve bazı bireylerde HbA1C ile ortalama glukoz arasındaki tam olmayan ilişki gibi etkenlerle beraber düşünülmelidir. Bunun yanı sıra, HbA1C, bazı bireylerde, özellikle belirli etnik gruplara veya coğrafi bölgelere ait olan kansızlık hastalıkları ve hemoglobin bozuklukları gibi durumlardan kaynaklanan yanıltıcı sonuçlar verebilir. Orak hücre özelliği gibi hemoglobinopatisi olan ancak alyuvar dönüşümü normal olan hastalar için anormal hemoglobinlerden etkilenmeyen bir A1C testi kullanılmalıdır. Hemoliz ve demir eksikliğine bağlı olarak anemi gibi anormal kırmızı kan hücresi döngüsü olan durumlarda diyabet tanısı için yalnızca glikoz kriterleri kullanılmalıdır.

FPG (açlık plazma glukozu) ve 2 saatlik PG (postprandiyal glukoz) testleri arasında tam bir uyum olmadığı gibi, A1C ve glukoz bazlı testler arasında da % 100 uyum yoktur. Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması (NHANES) verilerine göre tanı koyulmamış kişilerin evrensel olarak tarandığını varsayarsak, \geq % 6,5 A1C eşik değerinin \geq 126 mg/dL (7 mmol/L) açlık glukozu eşik değerine göre tanı

koyulmamış diyabet vakalarının üçte birini daha az tespit ettiğini göstermektedir. Fakat pratikte Tip 2 diyabetli bireylerin büyük çoğunluğu durumlarının farkında değildir. Bu sebeple belirlenen eşik değerdeki A1C testinin duyarlılığının daha az olması diyabet için yapılan diğer testlere göre daha pratik ve daha geniş uygulama alanıyla tolere edilebilir. Aslında bu sebepten dolayı daha fazla tanı konmasına sebep olabilir.

Glisemik durumları iki farklı testle (örneğin FPG ve A1C) farklı sonuçlarla kategorize edebilecek hastaları daha net karakterize etmek için daha fazla araştırma gerekir. Bu tür uyumsuzluklar ölçüm değişkenliğinden, zaman içindeki değişimden veya glukoz yüklemesi sonrası A1C ve FPG' nin her birinin farklı fizyolojik süreçleri ölçmesinden kaynaklı olabilir. A1C'nin yüksek olduğu durumlarda diyabetsiz FPG sonucu alınabilir. Tersi senaryoda mümkün olabilir. Çoğu tanı testinde olduğu gibi diyabet tanısını veren bir test sonucu içinde klasik hiperglisemi veya hiperglisemik kriz semptomlarının tam net olmadığı durumlarda klinik açıdan laboratuvar hatasını izole etmek için test tekrarlanmalıdır. Çünkü bu durumda testin güvenilirliği ve doğru tanı koyma ihtimali artar. Örn; HbA1C değeri % 8,0 ise ve tekrarlanan sonuç % 7,8 ise diyabet teşhisi konulabilir. Fakat aynı hasta için iki farklı testin (örn. FPG ve A1C) sonuçlarının mevcut olduğu durumlarda vardır. Böyle vakalarda 2 tür testte eşik değerinin üzerindeyse diyabet teşhisi konulabilir.

Bir diğer açıdan aynı kişide 2 farklı test değeri varsa ve değerler tutarsız ise değeri eşik değerinin üstünde olan testin tekrarlanması gerekir ve teşhis tekrarlanan teste göre koyulmalıdır. Yani bir hastanın A1C testinin 2.tekrarında % 6,5 üzerinde ancak FPG' si 126 mg/dL (7 mmol/L) karşılamıyorsa veya bu durumun tam tersi de görülebilir, o kişinin diyabet hastası olduğu düşünülmelidir. Kabul edilmelidir ki çoğu durumda "diyabetsiz" testin diyabetin tanımlandığı eşığe çok yakın bir aralıkta olması muhtemeldir.

Tüm testlerde olduğu gibi preanalitik ve analitik değişkenlik olduğundan sonucu tanı eşığının üzerinde olan bir test tekrarlandığında ikinci değer tanı eşığının altında olması da olası bir ihtimaldir. Bu ihtimal HbA1C için çok düşük, FPG için biraz daha yüksek olasılığı ve 2 saatlik PG için en olası ihtimaldir. Laboratuvar kaynaklı bir hata olmadığı düşünüldüğünde, bu tür hastaların tanı için eşik değerinin yakınında test sonuçlarına sahip olma olasılığı yüksektir. Bu durumda

profesyonel sağlık uzmanları bireyi yakından izlemeli ve testi 3 - 6 ay sonra tekrarlamayı tercih edebilirler [1].

Bir hastayı diyabet açısından değerlendirmek için hangi testin kullanılacağına dair nihai karar sağlık uzmanlarının takdirinde olmalı ve bireysel olarak hastayı veya hasta gruplarını test etmenin kullanılabilirliği ve pratikliği dikkate alınmalıdır. Aslına bakılırsa hangi tanı testinin kullanıldığından daha ziyade testin tam olarak yapıldığı zaman daha önemlidir. Tehdit grubundaki birçok kişinin bu yaygınlaşan hastalık veya sıklıkla eşlik eden kalp damar hastalıkları risk faktörleri için yeterli test ve danışmanlık almadığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Diyabet teşhisi için mevcut tanı koşulları aşağıdaki Tablo 2.1 de gösterildi.

Tablo 2.1 Diyabet Tanı Kriterleri

Diyabet Teşhisi İçin Olası Koşullar
1. A1C \geq % 6,5. Bu test NGSP sertifikalı ve DCCT testine standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak laboratuvarında yapılmalıdır. *
2. FPG \geq 126 mg/dL (7 mmol/L). En az 8 saatlik açlık olması gerekir. *
3. OGTT sırasında 2 saatlik plazma glukoza 200 mg/dL (11.1 mmol/L) . Bu test Dünya Sağlık Örgütü tarafından tarif edildiği şekilde suda çözölmüş 75 g susuz glukoza eş değer bir glukoz yükü kullanılarak yapılmalıdır. *
4. Klasik hiperglisemi belirtileri olan veya hiperglisemik kriz yaşıyan hastada rastgele ölçölen plazma glukoza 200 mg/dL (11,1 mmol/L). *

*Açık bir hiperglisemi yokluğunda, kriterler 1–3 tekrar test edilerek doğrulanmalıdır.

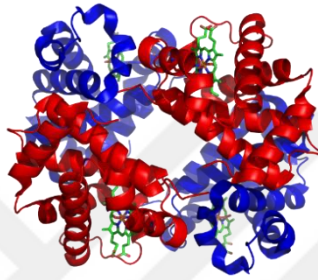
2.3 Hemoglobin

Kırmızı kan hücrelerinde bulunan hemoglobin, vücut boyunca O₂ (oksijen) ve CO₂ (karbondioksit) moleküllerini taşıyan halkasal bir yapıya sahip proteinlerdir. Her bir hemoglobin proteinin yapısı; iyonik bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri ile bir arada tutulan dört polipeptit alt biriminden ve her bir alt biriminde birer tane olmak üzere toplam dört hem pigmentinden oluşur [6]. Bu hem grupları oksijen moleküllerine tersinir bir şekilde bağlanabilen ve bunları vücudun çeşitli bölgelerine taşıyabilen pozitif yüklü demir (Fe⁺²) molekülleri içerir.

2.4 Hemoglobin Proteini (Pigmenti)

Eritrositlerin oksijen taşıyan pigmenti olan hemoglobin, bir hem kısmından (demir içeren şelat) ve dört globin zincirinden oluşur. Yetişkinlerde üç, fetüslerde üç farklı tür olmak üzere toplamda altı normal hemoglobin türü bulunur. Hemoglobin molekülüyle ilişkili globulinler (hem embriyonik aşamada hem de doğumdan sonra) alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) ve zeta (ζ) zincirini içerir [9]. Embriyonik süreçte hemoglobin Gower ve Portland olarak bulunur fakat bunlar fetüste hemoglobin F (HbF: 2 α ve 2 γ zinciri) ile değiştirilir. Garip bir durum olarak HbF yetişkin hemoglobinden daha yüksek bir oksijen ilgisi vardır ve hipoksik fetal ortamda periferik dokularda oksijen taşıyabilir. Üçüncü trimesterde beta ve gama globulin sentezinden sorumlu genler aktive olur ve bunun sonucunda hemoglobin A (HbA: iki alfa zincir, iki beta zinciri) ve hemoglobin A₂ (HbA₂: iki alfa zincir ve iki delta zinciri) gibi yetişkin hemoglobinde yeni doğanlarda bulunabilir; ancak HbF hala ana bileşendir. Yenidoğan bebekler ve 6. aya kadar olan bebekler HbA üretimine bağımlı değildirler. HbF'den HbA'ya geçiş yaklaşık üç aylıkken gerçekleşir. Bu nedenle orak hücre hastalığı gibi beta zinciri kusurlarından kaynaklanan bozukluklar klinik olarak 6 aylıktan sonra ortaya çıkabilir. Fakat alfa zinciri kusurlarından kaynaklanan hastalıklar rahim içinde veya doğumdan sonra ortaya çıkar [9]. Doğal olarak oluşan embriyonik, fetal ve yetişkin hemoglobinin farklı tipleri, ligandlanmış (karboksihemoglobin veya oksihemoglobin) durumda tetramer-dimer alt birim arayüz gücü (stabilitesi) bakımından farklılık gösterir.

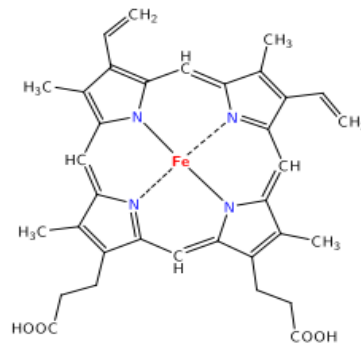
Yetişkinlerde normal hemoglobin (HbA) iki alfa zincir ve iki beta zinciri içerir. Her alfa zinciri 141 amino asit ve her beta zinciri 146 amino asit içerir. Hemoglobin A₂ (HbA₂) iki alfa iki delta zinciri içerir. Yetişkinlerde çoğunlukla HbA ve az miktarda HbA₂ (< % 3,5) ve HbF (< % 1) bulunur. F hücreleri adı verilen küçük bir hücre klonu nedeniyle yetişkinlerde az miktarda fetal hemoglobin kalır. Hemoglobin eritrositlerle birlikte dolaşırken globin zincirlerinin glikolizasyonu gerçekleşebilir. Bunlara X1c denir (X: herhangi bir hemoglobin. Örn: HbA1c) [10].



Şekil 2.1 Hemoglobin (Hb) Proteininin Yapısı

(Sırasıyla kırmızı ve mavi globin alt birimleri, Kırmızı; α ve Mavi; β içeriğinde demir bulduran hem grupları ise yeşil renkle ifade edilmiştir)

Hemoglobin, tamamı α -heliks yapısında katlanmış iki α ve iki β globin zincirinden oluşan dört alt birimli bir protein kompleksidir. Her bir zincir, merkezinde demir iyonu taşıyan ve azot atomlarıyla çevrelenmiş halkasal bir yapıya sahip, ancak protein yapıda olmayan bir hem grubunu içerir. Genellikle çeşitli alt birimler içinde gizlenen hem grubu, yakındaki bir histidin grubuna ait olan farklı bir azot atomuna kovalent olarak bağlıdır. Bu histidin zinciri diğer hidrofobik etkileşimlerle birleşerek, her bir alt birim içindeki hem grubunu stabilize eder [7].



Şekil 2.2 Hem molekülü

Hem molekülü (Merkezinde demir (Fe^{2+}) iyonu taşıyan düzlemsel bir porfirin halkasıdır. Bu yapı, başta hemoglobin olmak üzere birçok proteinde oksijen ve elektron taşıma, ayrıca katalitik reaksiyonlarda görev alır. Hem'in biyolojik önemi, demir iyonunun geçici olarak gaz moleküllerine bağlanabilme yeteneğinden kaynaklanır). 4 Azot molekülü, halkasal yapılar ile kaplı demir atomuyla reaksiyona girer.

2.4.1 Hemoglobinin Görevleri

Hemoglobinin (Hb) temel görevi kandaki oksijeni çeşitli dokulara iletmek ve ortamın tamponlanarak gerekli reaksiyonlar için hazır hale gelmesini sağlamaktır. Hemoglobin, periferik dokulardan akciğerlere oksijen taşırken ayrıca akciğerlere karbondioksit ve proton taşınmasını da sağlar. Akciğerler de ve dokularda oksijenin hemoglobine bağlanması ve serbest bırakılması hemoglobinin formlarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Düşük oksijen afinitesi durumu sıkı form ile yüksek oksijen afinitesi durumu gevşek form ile ilişkilidir. Ayrıca oksijenin hemoglobine olan ilgisini ortam koşullarına bağlı olarak pH, sıcaklık, parsiyel oksijen basıncı (pO_2) ve parsiyel karbondioksit basıncı (pCO_2) koşulları da etkiler. Oksijenin Hb'ye olan afinitesi alçak pH, 2,3 BPG (2,3-Bifosfogliserik asit) tarafından etkilenebilir. Dokularda bulunan düşük pH, yüksek BPG ve pCO_2 hemoglobinin sıkı formunu destekler ve oksijen salınır. Fakat alveollerde bulunan yüksek pH, düşük BPG ve pCO_2 derişimi nedeniyle hemoglobinin gevşek formu desteklenir ve bu durum neticesinde oksijenin hemoglobine bağlanması gerçekleşir [8].

2.4.2 Hemoglobin Bileşikleri

Karbonilhemoglobin / Karboksihemoglobin

Karboksihemoglobin (COHb – HbCO), karbon monoksit ile temas ettiğinde alyuvarlarda meydana gelen karbon monoksit ve hemoglobinin kararlı bir kompleksidir

Karbaminohemoglobin

Karbaminohemoglobin (CO₂Hb), hemoglobin ve karbondioksitin bir bileşiğidir ve karbondioksitin (CO₂) kanda bulunan çeşitlerinden birisidir. Karbondioksitin % 23' ü kanda bu şekilde taşınır. % 70' i ise karbonik anhidraz tarafından bikarbonata dönüştürülür ve akabinde plazmada taşınır, % 7' si ise plazmada çözülmüş serbest karbondioksit (CO₂) olarak taşınır.

Oksihemoglobin

Oksijenin alyuvarlardaki hemoglobin proteinin hem bileşenine bağlanmasıyla fizyolojik solunum sırasında oksihemoglobin molekülü oluşur. Bu süreç akciğerlerin alveollerine bitişik pulmaner kılcal damarlarda gerçekleşir.

Deoksihemoglobin

Oksijensiz hemoglobin, yapısında bağlı oksijeni bulunmayan hemoglobin formudur. Oksihemoglobin ve deoksihemoglobinin absorban spektrumları farklıdır. Oksihemoglobin 660 nm dalga boyunda deoksihemoglobine göre önemli ölçüde daha düşük absorban verir, 940 nm' de ise absorbanı biraz daha yüksektir. Bu fark bir hastanın kanındaki oksijen miktarının nabız oksimetresi adı verilen bir cihazla ölçülmesi için kullanılır. Bu fark ayrıca dokuların hipoksi sırasında geliştirdiği mavi ila morumsu renk olan siyanozun ortaya çıkmasını da açıklar [9].

Sülfohemoglobin

Alyuvarlarda hemoglobine anormal ve geri dönüşümsüz olarak kükürt bağlanması sonucu oksijen taşıma yeteneğini kaybetmesiyle sonuçlanan sülfohemoglobin bileşiği oluşur. Bu durum nadir olarak görülse de ölümcül sonuçları olabilir. Bu süreç asetanilid ve fenasetin gibi ilaçların kronik kullanımından kaynaklanabilir.

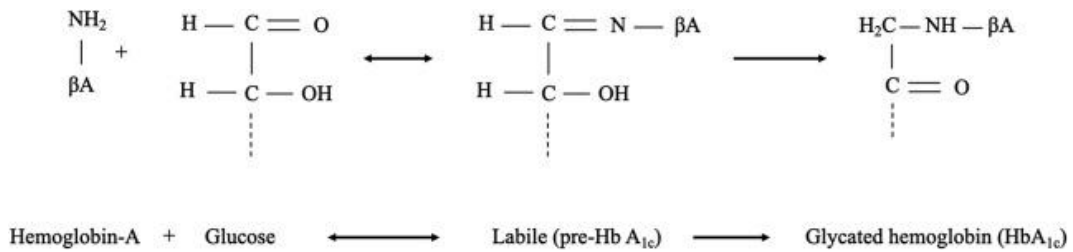
Methemoglobin ve Siyanmethemoglobin

Hem molekülündeki demirin hemoglobinin Fe^{+2} (ferröz) formunda değil, Fe^{+3} (ferrik) formunda olduğu metalloprotein durumunda bir hemoglobindir. Methemoglobin oksijen tutamaz, bu da dokulara oksijen (O_2) iletemeyeceği anlamına gelir. Mavimsi çikolata kahvesi rengindedir. Kanda methemoglobin normal koşullar altında kendiliğinden üretilir ancak aşırı miktarda var olduğunda kan fazla bir şekilde koyu mavimsi kahverengi olur.

Siyanmethemoglobin, hidrojen siyanür (HCN) gibi inorganik siyanür bileşiklerinin solunması sonucu oluşan bir bileşiktir.

2.5 Glikozlanmış Hemoglobin

HbA_{1c}, glukozun hemoglobine bağlandığı ve enzimatik glikozilasyonla meydana gelmediği nonenzimatik olarak gerçekleşen bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşur. Kimyasal tepkimedeki birinci aşama kararlı olmayan (labil) bir aldimin oluşmasıdır [11]. Bu duruma kararlılık sağlayan ve reaksiyonu kararlı glikozlanmış hemoglobine bağlayan Amadori düzenlemeleri olarak adlandırılır. Normoglisemi durumundan glikozlanmış hemoglobin oranı % 6'dan düşüktür. Glukoz konsantrasyonu ne kadar fazlaysa ve yüksek kan şekeri ne kadar uzun süre devam ederse glikozlanmış hemoglobin miktarı o kadar fazladır.



Şekil 2.3 Hemoglobin A (HbA) ve glukoz arasında glikozlanmış hemoglobin (A_{1c}) üretmek için enzimatik olmayan reaksiyon (glikasyon).

Birinci aşama, Amadori yeniden düzenlenmesinin devamında kararlı hale getirilen, değişken bir aracı üreten hızlı bir aldimin Schiff baz reaksiyonudur.

Bir hemoglobin molekülü glukozlandığında o şekliyle kalır. Bu sebeple kırmızı kan hücreleri içinde glikozlanmış hemoglobin birikimi hücrenin yaşam döngüsü boyunca maruz kaldığı ortalama glukoz seviyesini gösterir. Glukolize hemoglobin ölçülmesi uzun vadede serum glukoz seviyesinin takibi yapılarak tedavinin

etkinliğinin değerlendirilmesine yardımcı olur. A1c ölçümü için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler içerisinde kromatografi ve immunoassay temelli yöntemler bulunur. Laboratuvarlar NGSP tarafından DCCT referansına izlenebilir olarak onaylanan HbA1c analizlerini kullanmalı ve laboratuvarlar yeterlilik analiz (iç kalite, dış kalite) programlarına katılmalıdır [11]. DCCT ve UKPDS çalışmalarının neticesinde, HbA1c ile ölçülen glisemik kontrol ile diyabetle ilişkili hastalık riski arasındaki bağlantı doğrulanmıştır. A1c, bireydeki önceki 3 aylık dönemde glisemik kontrolü ölçmek için kullanılan standart yaygın olarak kabul edilmiştir ve hastaların retinopati, nefropati ve nöropati gibi diyabetle ilişkili komplikasyonlar geliştirme riskiyle ilişkilidir. HbA1c testinin ölçümü diyabetli bireylerde glisemik kontrolün takip edilmesinde önemli rol oynar. Glikoz değerlerinin sıkça değiştiği klinik kontrolün zor olduğu durumlarda glisemik kontrolün objektif olarak değerlendirilmesini sağlar. Ek olarak değişen glikoz değerlerine sahip hastalarda DM tanısı koymak için onaylanmıştır. Diyabetik reaksiyonların gelişme riski bunların ilerlemesi ve iyileşmesi A1c ile ilişkilendirilmiştir. Böbrek yetmezliği olan ve idrarında fazla miktarda albümin olan hastalarda daha düşük A1c seviyeleri daha olumlu böbrek sonuçlarıyla ilişkilidir. Benzer şekilde diyabetik görme bozukluğu gelişme riski hem diyabetin süresi hem de HbA1c düzeylerinin oranı ile bağlantılıdır [26].

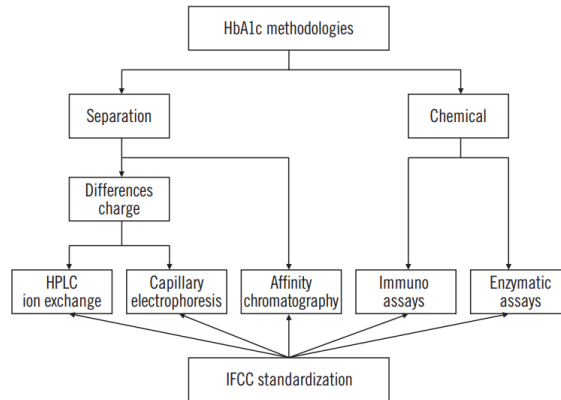
3

HbA1c ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 HbA1c Ölçümü

Glisemik kontrol ile HbA1c arasındaki ilişki açıklandıktan sonra HbA1c ölçümü için birçok farklı yöntem geliştirildi. Bu yöntemler Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) çalışmalarına uygun olarak Ulusal Klinik Kimya Programı (IFCC) Referans Ölçüm Prosedürüne (RMP) göre standardize edilmelidir. Yöntemin kullanılabilirlik açısından uzun ömürlü olması, laboratuvar akreditasyonu, özel bir iç kontrol tasarımı, harici bir dış kalite programında yeterli olması, yöntemin analiz öncesi ve sonrasının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi dahil olmak üzere sıkı bir kalite yönetimi gerektirir. HbA1c konsantrasyonunun belirlenmesini optimize etmek için performans hedefleri tanımlanmıştır. Kan şekeri kontrolünün bir belirteci ve bir risk belirleyicisi olarak HbA1c düzeyi diyabet sürecinin önemli faktörlerinden biridir.

HbA1c analizinde 2 temel analitik metot vardır; biri hemoglobin (Hb) fraksiyonlarının ayrıştırılmasına göre diğeri ise kimyasal etkileşimlere dayalıdır. Bu yöntemlerde farklı maddeler ölçülse de analizler Uluslararası Klinik Kimya Federasyonunun (IFCC) Referans Ölçüm Prosedürüne (RMP) göre standardize edilmelidir [12,13]



Şekil 3.1 HbA1c ölçüm yöntemlerinin analitik kavramları ve IFCC – RMP’ ye göre izlenebilirlikleri

3.2. HbA1c Analiz Yöntemleri

Glikolizasyon, proteinlerin amino gruplarıyla glukozun enzimatik olmayan reaksiyonu sonucunda oluşur [14]. HbA1c, glukozun hemoglobinin β zincirindeki N-terminal valinine özel olarak bağlandığı glikozlanmış bir hemoglobin türüdür. Hemoglobinlerin çoğunluğu HbA1c'den oluşur. Diğer glukozlanmış hemoglobin türlerine göre, HbA1c'nin net yükteki farkına göre rahatça ayırıştırma işlemi gerçekleştirilebilir. Elektroforez, Kapiler Elektroforez, İzoelektronik odaklanma ve iyon değişim kromatografisi gibi yöntemler yük farkında yararlanılarak uygulanan yöntemlerdir. Total GHB, tüm glukozlanmış hemoglobin türlerini tanımlamak için kullanılır. HbA1c analizinde genel olarak sıkça kullanılan 4 temel metot vardır: immüno assay, iyon değişim yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), boronat afinite HPLC ve enzimatik metotlardır.

3.2.1 İyon Değişim Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, analitin karışımdan ayrılması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan analitik bir yöntemdir. Bu yöntemde sıvı bir mobil fazın (genellikle bir çözücü) sabit bir fazdan geçirilerek karışımdan analitin karışımdan ayrılması sağlanır. Detaylandırmak gerekirse analiz edilecek madde uygun bir çözücüde çözdürülerek, çözünen karışım içerisinde sabit faz bulunan kolona enjekte edilir. İçerisinde analit bulunan mobil fazın sabit faz kolonundan geçebilmesi için yüksek basınç uygulanır. Maddelerin kolondan çıkış zamanına ve verdiği piklere göre analiz edilmesi sağlanır. Her bir madde için oluşan dedektör cevabı monitörde kromatogram olarak görüntülenir. Bu kromatogramlarda pik alanları önemlidir. HbA1c analizinde ise HbA1c pikinin alanının toplam hemoglobin (Hb) pik alanına oranlanmasıdır. HPLC yöntemi HbA1c'yi 1. Dalga boyu; 415 nm ve 2.dalga boyu; 500 nm olmak üzere çift dalga boyuyla ölçülmesini sağlar [15].

3.2.2 Elektroforez

Elektroforez yöntemi laboratuvarlarda moleküllerin fiziksel özelliklerine, öz kütle ve saflık derecesine göre ayırıştırılmasına dayanan bir yöntemdir. Genellikle canlı biliminde protein yapılarını veya DNA' yı ayırştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Moleküllerin cinsine ve fiziksel özelliklerine göre farklı süreçlerde gerçekleştirilir. Bu süreçlerde birkaç yönden değişiklik olsa tümü bir elektrik yükü kaynağı, bir

destek ortamı ve bir tampon çözeltisine ihtiyaç duyar. Elektroferez oldukça basit bir yöntemdir. Bu işlem için özel bir jel kullanılır. Jel, ya sentetik (poliakrilamid) ya da doğal (agaroz) maddelerden yapılır ve sıvı tampon çözeltileriyle birlikte çalıştırma sistemine konulur. Numune, jelin bir ucuna yerleştirildikten sonra bir elektriksel yük uygulanır. Moleküller, elektrik yükleri sayesinde jel içinde hareket etmeye başlar. Ancak hareket hızları farklıdır:

- Küçük ve yüksek yüklü moleküller jelin içinde daha hızlı ilerler.
- Büyük ve düşük yüklü moleküller ise daha yavaş hareket eder.

Bu süreç, belirli bir süre boyunca devam eder. Ayırma işlemi ya voltaj kapatıldığında ya da moleküller izoelektrik noktalarına (yani elektriksel olarak dengelendikleri noktaya) ulaştığında sona erer. Böylece, moleküller boyutlarına ve yüklerine göre sıralanmış olurlar.

Hemoglobin amfoterik bir molekül olup bulunduğu ortamın pH'ına göre negatif veya pozitif yüklü olabilir. Çoğunlukla negatif yüklü olan hemoglobin, selüloz asetat agar kullanılan ortamlarda pH 8,6, sitrat agar kullanılan ortamlarda ise pH 6,3 değerine sahiptir. Hemoglobin molekülünün (HbA0) izoelektrik noktası pH 7.0 olarak belirlendi. Ancak glikozun hemoglobinin molekülünün amino asit kalıntılarındaki amino gruplarına bağlanması sonucu oluşan HbA1C molekülünde pozitif yük taşıyan grupların sayısı azalır ve net yük daha negatif bir hal alır. HbA0 ile HbA1C molekülleri arasındaki bu yük farkıyla moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanır.

3.2.3 Kapiler Elektroferez

Kapiler elektroferez yük taşıyan parçacıkların elektrik alanı altında hareket ederek ayrılması esasına dayanan bir diğer analitik yöntemdir. Bu yöntem ince bir kapiler tüp (genellikle silika bir tüp) içerisinde gerçekleştirilir. Tüpün çapı genelde 25-100 µm arasında değişir. Bu da yüksek yüzey alanı ve hızlı ayrılma sağlar. Tüpün iki ucunda elektrotlar yer alır. Tüpe uygulanan elektrik alanı yük taşıyan moleküllerin hareket etmesini sağlar. Kapiller elektroferezde kullanılan tampon çözeltisi, pH, iyonik güç gibi etkenler moleküllerin hareketini ve ayrımını etkiler. Örneğin farklı pH değerleri, moleküllerin yüklerini değiştirebilir ve ayrım yeteneğini artırabilir.

Moleküllerin ayrılması tamamlandığında genellikle UV-vis. spektrofotometre veya floresan dedektör gibi algılayıcılar kullanılarak moleküllerin yoğunluğu ölçülür. Bu ölçümler belirli dalga boylarındaki ışığın Emilimi veya yayılımı temeline dayanılarak gerçekleştirilir. Bu ölçümler neticesinde elde edilen veriler bilgisayar ekranında grafiksel olarak görüntülenir. Bu grafikler her bir molekülün ayrıldığı pik noktaları temsil eder. Piklerin alanları moleküllerin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır. Bu yöntem birçok biyomolekülün analizi, ilaçların ve toksik maddelerin ayrılması, gıda güvenliği testleri gibi birçok alanda kullanılır. Özellikle HbA1C ölçümü gibi klinik uygulamalarda, bu yöntem yüksek hassasiyet ve hızlı sonuçlar gösterir.

3.2.4 Boronat Afinite Kromatografisi

Boronat Afinite Kromatografisi özellikle glikozilasyon (şeker eklenmesi) özelliklerine bağlı olarak belirli moleküllerin ayrılması ve ölçülmesi için kullanılan bir teknik olup HbA1c ölçümünde de önemli bir yöntemdir. Bu yöntemin temel prensibi boron asidi veya boronat bileşikleri içeren bir ayırma ortamı (kolon) kullanılmasıdır. Boron, şeker gruplarına (örn.: glikoz) spesifik olarak bağlanabilen bir molekül olduğundan, bu yöntem glikozilasyon modifikasyonları gösteren proteinlerin (HbA1c gibi) ayrılmasında etkilidir.

3.2.5 İmmünolojik Testler

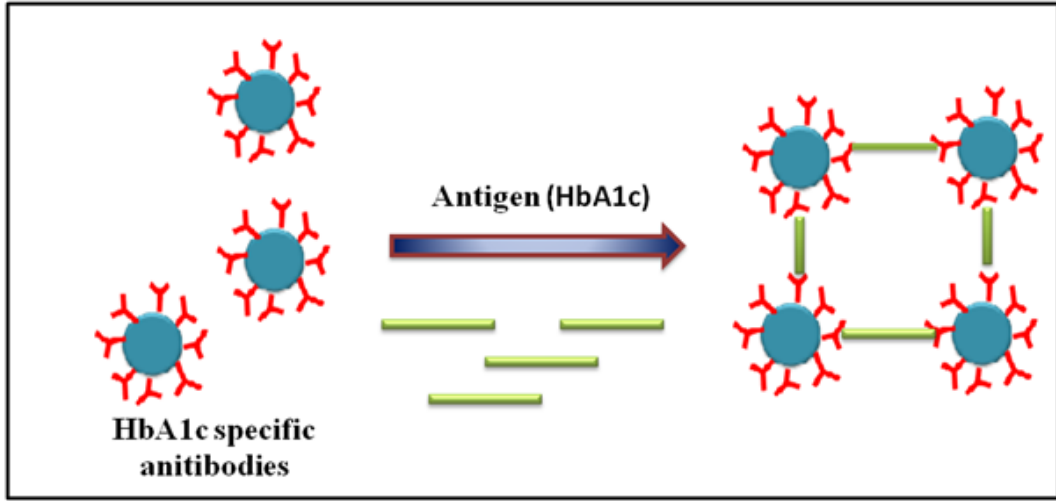
İmmünolojik testler sayesinde belirli maddeler veya patojenler (mikrop vb.) tespit edilebilir. Bunlar arasında mikroorganizma (virüs vb.), kimyasal sinyal iletici (hormon vb.) ve kan pigmenti hemoglobin (hb) bulunur. Virüs kaynaklı enfeksiyonları tespit etmek, birinin herhangi bir maddeye alerjisinin var olup olmadığını belirlemek, kolorektal kanseri erken teşhis etmek veya bireyin gebe olup olmadığını belirlemek vb. birçok değişik bölümde kullanılır.

İmmünolojik analizler bedenin otoimmün (bağışıklık) sisteminden faydalanır. Otoimmün sistemde mikrop vb. yabancı maddelere karşı vücut içerisinde antikor üretimi gerçekleşir. Bunlar “saldırganları” yakalayıp bağışıklık sistemine zarar vermelerini engelleyebilen proteinlerdir. Bir kilide uyan anahtar gibi her mikrop veya yabancı madde için farklı özel antikorlar üretilir. Günümüzde laboratuvarlarda kullanılan immünolojik tanı testleri, yabancı madde ya da mikropla tam olarak

eşleşebilen doğal olmayan antikorlar üretilerek yapılır. Bu antikor molekülleri, eşleşebilen madde veya mikrop içeren bir kan, mukoza zarı, idrar veya dışkı numunesiyle temas ettiğinde, ona bağlanır. Bundan dolayı analiz sonucu, belirli mikrop veya maddenin var olduğunu gösterir [24].

Bazı analizlerde, reaksiyon sonucu sadece bakarak görülebilir. Örneğin; kan grubunu tespit etmek için bir test kartında kanın birbirine yapışması. Diğer analizlerde, tepkime ışıkla parlayan (fluoresan) boya veya bir enzim kullanılarak görünür hale getirilir. Laboratuvar testlerinde, hassas cihazlar bağlanan antikorun sayısını ölçebilir. Işık veya renk reaksiyonunun düzeyi, testteki belirli maddenin miktarını belli eder. Laboratuvar testleri diğer hızlı testlerden daha çok zaman alır, ancak daha doğru ölçüm sonucu verir.

HbA1c ölçümü ise immünolojik analizde antijen-antikor reaksiyonuna bağlıdır. HbA1c molekülüne özgü antikorlar kullanılarak, glikolize olmuş hemoglobinin miktarı belirlenir. Bu yöntem genellikle immünotürbidimetri veya immünonefelometri ile gerçekleştirilir. Numunede HbA1c, spesifik antikorlarla bağlanır. Antijen-antikor kompleksi oluşturur. Antikorlar, HbA1c'nin β zincirinin N ucunda bulunan glukoz bağlanmış aminoasitleri yakalar. Bu komplekslerin neden olduğu bulanıklığı (türbiditeyi) ölçerek çalışan bir yöntemdir. Komplekslerin oluşumu çözeltinin bulanıklığını artırır. Bir ışık kaynağı bu çözeltiden geçirildiğinde ışık bu kompleksler tarafından saçılır veya absorbe edilir. Saçılan ışık miktarı (veya bulanıklık derecesi) bir dedektör tarafından algılanır. Saçılan ışığın yoğunluğu, antijen miktarı ile orantılıdır [16]. HbA1c için ticari olarak kullanılan bu testlerin çoğunluğunda kullanılan antikorlar N ucunda glukoz bağlanan ilk dört veya daha fazla amino asidin tanınmasını sağlar.



Şekil 3.2 HbA1c için immünolojik yöntemin şematik gösterimi

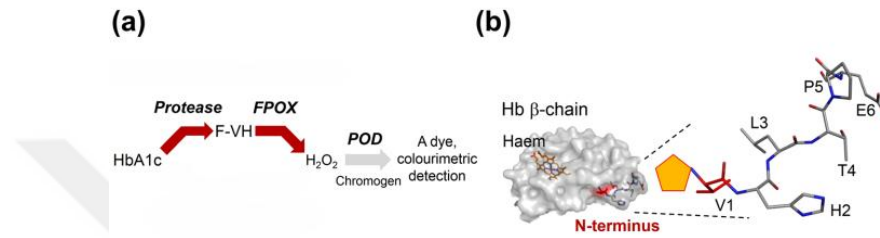
Karşılaştırma için kullanılacak olan Beckman Coulter AU680 cihazında kullanılan Kinetik markalı HbA1c kitinin çalışma prensibi ise şu şekildedir:

Lateks destekli immünotürbidimetrik kullanıma hazır sıvı reaktiflerdir. Çok noktalı kalibrasyon yöntemi ile oto-analizörde kalibre edilir. Tam kandaki toplam hemoglobinde bulunan hemoglobin A1c oranını ölçen lateks aglütinasyon yöntemidir. Hemolizat numunesi duyarlı lateks parçacıklarına eklenir ve lateksin yüzeyi numunedeki toplam hemoglobini absorbe eder. Anti-insan HbA1c fare monoklonal antikör kompleksi aglütinasyonu, anti-fare IgG antikoru ile. Bu sırada oluşan aglütinasyon miktarı, lateksin yüzeyini absorbe eden HbA1c miktarına bağlıdır, bu aglütinasyon bulanıklık olarak ölçülür. Örnekteki HbA1c (%) konsantrasyonu, seyreltilmiş standart çözeltilerin aynı testiyle elde edilen kalibrasyon eğrisine bakılarak belirlenir.

3.2.6 Enzimatik Analizler

Enzimatik yöntemle gerçekleşen testlerde hemolizat özelliği olan tampon çözeltideki parçalayıcı maddeler düşük ve yüksek molekül ağırlıklı sinyal bozucu maddeleri ortadan kaldırmak için numuneye tepkimeye girer. Daha sonra tam kan örnekleri *Bacillus sp* proteazları ile kapsamlı proteolitik sindirime tabi tutulur. Bu işlem glukozlanmış valinlerde dahil olmak üzere, hemoglobin β zincirinden amino asitleri serbest bırakır. Glikozlanmış valinler *Escherichia coli*' de özel bir yeniden düzenlenmiş fruktozil valin oksidaz (FVO) enzimi için substrat işlevi yapar [25].

Yeniden düzenlenen FVO, seçici ajanların varlığında özel olarak N terminal valinleri ayırır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretir. Bu da sırasıyla yaban turpu peroksidaz (POD) katalizli bir tepkime ve hemoglobinin doğal emiliminden yeterince uzak bir dalga boyunda ölçüm yapabilen uygun bir renk pigmenti kullanılarak ölçülür. Reaksiyonda üretilen sinyal, % HbA1c olarak ifade edilen uygun bir doğrusal kalibrasyon eğrisi kullanılarak numunenin doğrudan % HbA1c değerini tespit eder.



Şekil 3.3 HbA1c ölçümü için enzimatik yöntemin şematik gösterimi

- (a) HbA1c enzimatik metodunun reaksiyonunda, kırmızı ok mevcut enzimatik yöntemin, HbA1c'nin proteolizi ve ardından serbest kalan fruktozil valil histidinin (F-VH) fruktozil peptit oksidaz (FPOX) tarafından oksidasyonu olmak üzere spesifik iki art arda enzimatik tepkimeden oluştuğunu gösterir. Genel tespit yöntemine göre, üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2) daha sonra bir pigment üretmek için peroksidaz varlığında bir kromojen ile reaksiyona tabii tutulur. F-VH konsantrasyonu, boyanın spesifik absorbansı ölçülerek miktar olarak tespit edilebilir. F-VH miktarı HbA1c miktarını orantısal olarak belirler [23].
- (b) Hemoglobinin β -zincir yapısı bir yüzey modeli olarak ve hem grubu turuncu renkli model olarak gösterilmiştir. HbA1c'nin glikozilasyon bölgesi olan N-terminal valin kırmızı renkte gösterilmiştir. N-terminalin bağlı olduğu 6 amino asit bir çizgi modeli olarak gösterilmiş ve Hemoglobinin β -zincirinin yüzey modeli üzerine yerleştirilmiştir. Sağ tarafta, Hb β -zincirinin N-terminal 6 amino asidinin büyütülmüş yapısı. N-terminal turuncu valinin bir amino grubundaki turuncu beşgen, fruktozil parçasını gösterir ve makul bir F-6P yapısına işaret eder [23].

4

DENEYSEL VERİLER

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kitler

Bu çalışma Kinetik Bilişim Diagnostik A.Ş. bünyesinde bulunan biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. Immunotürbidimetrik yöntem için Beckman Coulter AU680 biyokimya oto-analizörü, Arkray markasının Adams HA-8160 tam otomatik HbA1c cihazı ise HPLC yöntemi için kullanıldı. Kit olarak Beckman Coulter AU680 cihazında B21175 referans no'lu KINETIC markalı HbA1c reaktifi kullanıldı. Adams HA-8160 cihazında ise Arkray marka kit kullanıldı.

4.2 Deneysel Süreç

HbA1c ölçümü için EDTA içeren hemogram tüplerine alınan tam kan numuneleri kararlılık ve yöntem karşılaştırılması için B.C. AU680 ve HA-8160 cihazında çalışıldı.

HPLC yönteminde numunedeki analit ilk olarak hemolizat ve yıkama tamponu kullanılarak hemolize edilir. Hemoliz işlemi tamamlandıktan sonra tam kan örneği kolona gönderilir. Burada farklı fraksiyonlara ayrılması sağlanır. Her bir fraksiyonun piki yaklaşık 1,5 dakikada ölçülür. HPLC cihazı HbA1c'nin pik alanını toplam hemoglobinin pik alanına oranlayarak kalibrasyon esnasında oluşturulan denkleme göre HbA1c değerini yüzde olarak ifade eder. HPLC yönteminde HbA1c ölçümü 415-500 nm olmak üzere çift dalga boyunda gerçekleşir.

Immunoturbidimetri ise tam kan örneğindeki toplam hemoglobinin içindeki HbA1c oranını ölçmeye dayalı bir lateks aglütinasyon yöntemidir. Analiz esnasında hemoliz edilmiş kan örneği cihaz içerisinde otomatik olarak lateks partikülleri ile karşılaştırılır. Lateks partiküllerinin yüzeyi numune de bulunan toplam hemoglobini bağlar. HbA1c'yi tanıyacak şekilde üretilmiş olan anti insan HbA1c fare monoklonal antikoru, anti fare IgG antikoru ile etkileşime girerek aglütinasyona neden olur. Ortaya çıkan aglütinasyon miktarı, lateks partiküllerine bağlanan HbA1c miktarı ile doğru orantılıdır. Bu oluşan aglütinasyon bulanıklık derecesi ölçülerek değerlendirilir. Örnekteki HbA1c (%) derişimi ise 660 nm de ölçülerek seyreltilmiş standart çözeltilerle hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenir.

4.2.1 Doğrusallık ve Tekrarlanabilirlik Çalışması

Çalışmanın ilk aşamasında doğru ölçüm yapılabilmesi için cihazların kalibrasyon ve kontrol işlemleri gerçekleştirildi. Devamında kontrol ve hasta numunelerinin analitik performans gereklilikleri açısından linearite (doğrusallık) ve stabilite (tekrarlanabilirlik) çalışmaları yapıldı.

Gün İçi Stabilite (Tekrarlanabilirlik)

HPLC yöntemiyle HA-8160 cihazında HbA1c % 5.0 olması gereken kontrol 1 ve % 10.0 olması gereken kontrol 2 numuneleri günde onar kez ölçüldü.

Immunturbidimetri yönteminde ise B.C AU680 cihazında HbA1c % 5.0 olması gereken kontrol 1 ve % 11,6 olması gereken kontrol 2 numuneleri günde onar kez ölçüldü. Değeri % 5,4 ve % 7,5 olan 2 hasta numunesinin aynı gün içerisinde onar kez ölçümü sağlandı.

Günler Arası Stabilite (Tekrarlanabilirlik)

HPLC yönteminde HA-8160 cihazında HbA1c değeri % 5.0 olması gereken kontrol 1 (düşük seviye) ve HbA1c değeri % 10.0 (yüksek seviye) olması gereken kontrol 2 numuneleri on gün boyunca her gün düzenli olarak çalışıldı.

Beckman Coulter AU680 cihazında ise HbA1c değeri % 5.0 olması gereken düşük seviye kontrol ve HbA1c değeri % 11,6 olması gereken yüksek seviye kontrol numuneleri on gün boyunca her gün düzenli olarak çalışıldı.

Linearite (Doğrusallık) Çalışmaları

Doğrusallık çalışması için; HbA1c değeri % 13,6 ve % 5,7 olan hasta numuneleri farklı oranlarda karıştırılarak % 12,1, % 10,2 ve % 8,2 değerleri elde edildi. Elde edilen bu 5 farklı HbA1c değeri olan numuneler her iki cihazda da ikişer kez ölçüldü.

Stabilite (Tekrarlanabilirlik) Çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışması yapılırken ilk ölçüm anında düşük değer olarak % 5,5 ve yüksek değer % 10,7 olarak belirlenen HbA1c hasta numuneleri 0, 2, 4 ve 24.saatlerde her iki cihazda ölçüldü.

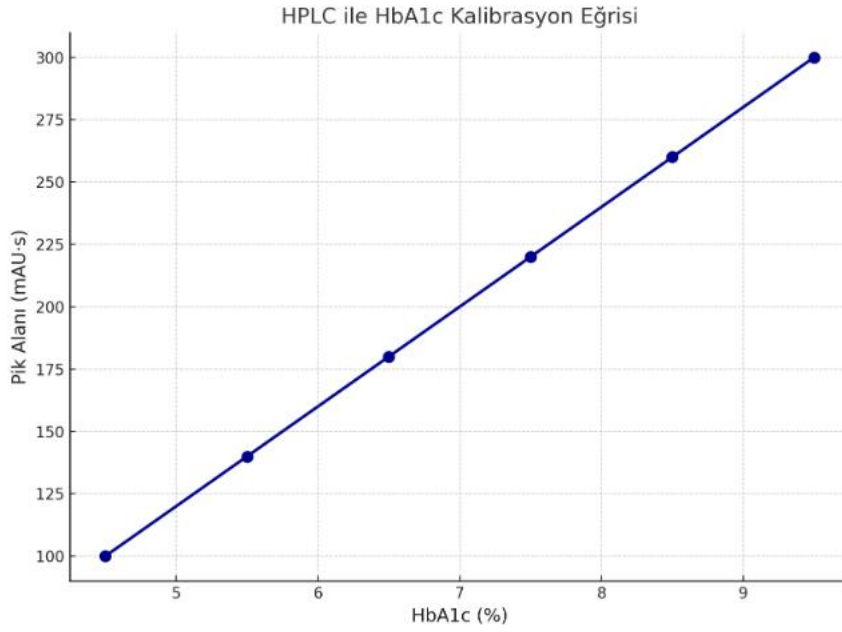
Yöntem Kıyaslaması

Çalışmanın bu aşamasında hasta havuzundan rastgele alınan altmış kan örneğinin HPLC ve immünotürbidimetri yöntemleri ile karşılıklı ölçümü sağlandı.

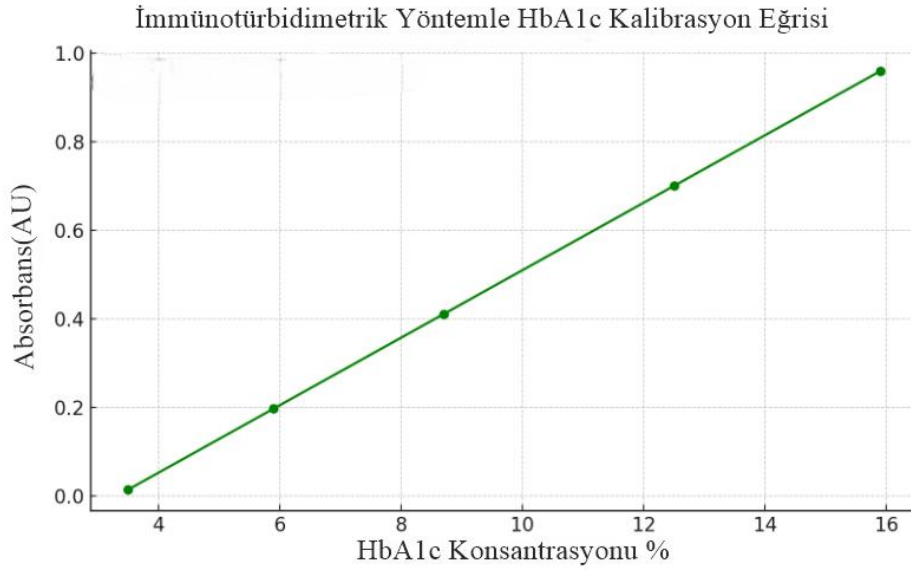


5.1 Linearite ve Tekrarlanabilirlik Çalışması

Linearite ve tekrarlanabilirlik çalışmasına geçmeden önce HPLC ve B.C AU680 cihazının kalibrasyon grafikleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 5.1 HPLC cihazı için HbA1c kalibrasyon grafiği



Şekil 5.2 B.C AU680 cihazı için HbA1c Kalibrasyon Grafiği

HbA1c kontrol numunelerinin cihazlardaki gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları sırası ile Tablo 5.1 ve Tablo 5.2 de verildi.

Tablo 5.1 HbA1c Kontrol 1 ve 2 numunelerinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik				
Düzyey %	Kontrol Seviye 1		Kontrol Seviye 2	
Tekrar Sayısı	HPLC	Beckman Coulter AU680	HPLC	Beckman Coulter AU680
1	5,0	5,1	10,1	11,6
2	5,0	5,1	10,2	11,4
3	4,9	5,2	10,1	11,5
4	5,0	5,1	10,0	11,7
5	4,9	5,0	10,0	11,5
6	5,0	5,0	10,1	11,6
7	5,0	5,0	10,0	11,6
8	5,0	5,0	10,0	11,5
9	5,0	5,1	10,2	11,6
10	5,0	5,2	10,0	11,7
Ortalama	5,0	5,1	10,1	11,6
SD	0,04	0,07	0,08	0,09
%CV	0,80	1,47	0,78	0,78

Tablo 5.2 HbA1c Kontrol 1 ve 2 numunelerinin her iki cihaz içinde günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Günler Arası Tekrarlanabilirlik				
Düzyey %	Kontrol Seviye 1		Kontrol Seviye 2	
Tekrar Sayısı	HPLC	Beckman Coulter AU680	HPLC	Beckman Coulter AU680
1	5,1	5,1	10,2	11,5
2	5,0	5,1	10,2	11,4
3	4,9	5,2	10,1	11,3
4	5,0	5,2	10,0	11,7
5	4,9	5,0	10,1	11,5
6	5,0	5,1	10,1	11,6
7	5,0	5,0	10,2	11,7
8	5,1	5,1	10,1	11,5
9	5,0	5,1	10,2	11,6
10	5,0	5,2	10,0	11,7
Ortalama	5,0	5,1	10,1	11,6
SD	0,06	0,07	0,07	0,13
%CV	1,26	1,37	0,74	1,11

HbA1c düşük değer % 5,4 ve yüksek değer % 7,5 olan 2 hasta numunesinin tekrarlanabilirlik sonuçları sırası ile Tablo 5.3 ve Tablo 5.4 te verildi.

Tablo 5.3 Düşük ve yüksek değerli hasta numunelerinin gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik				
Düzyey %	Hasta 1 (Düşük Değer % 5,4)		Hasta 2 (Yüksek Değer % 7,5)	
Tekrar Sayısı	HPLC	Beckman Coulter AU680	HPLC	Beckman Coulter AU680
1	5,4	5,5	7,4	7,5
2	5,5	5,4	7,5	7,4
3	5,5	5,3	7,4	7,6
4	5,4	5,5	7,4	7,5
5	5,5	5,6	7,4	7,3
6	5,4	5,4	7,5	7,5
7	5,5	5,3	7,5	7,5
8	5,4	5,4	7,5	7,4
9	5,5	5,5	7,4	7,4
10	5,4	5,5	7,4	7,6
Ortalama	5,5	5,4	7,4	7,5
SD	0,05	0,09	0,05	0,09
%CV	0,92	1,65	0,66	1,20

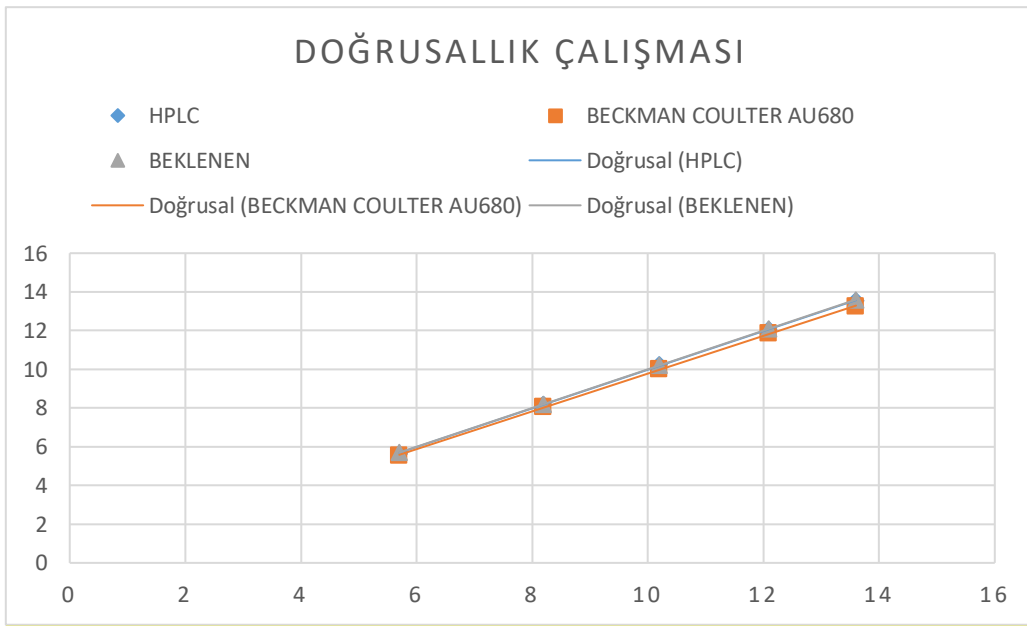
Tablo 5.4 Düşük ve yüksek değerli hasta numunelerinin günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Günler Arası Tekrarlanabilirlik				
Düzyey %	Hasta 1 (Düşük Değer %5,4)		Hasta 2 (Yüksek Değer %7,5)	
Tekrar Sayısı	HPLC	Beckman Coulter AU680	HPLC	Beckman Coulter AU680
1	5,4	5,4	7,5	7,5
2	5,3	5,4	7,6	7,5
3	5,4	5,5	7,4	7,6
4	5,5	5,3	7,5	7,4
5	5,4	5,4	7,3	7,5
6	5,3	5,5	7,5	7,4
7	5,4	5,3	7,5	7,6
8	5,3	5,3	7,6	7,5
9	5,5	5,4	7,4	7,5
10	5,6	5,5	7,5	7,4
Ortalama	5,4	5,4	7,5	7,5
SD	0,09	0,08	0,09	0,07
%CV	1,74	1,43	1,17	0,93

Doğrusallık çalışması için HbA1c değerleri % 5,7, % 8,2, % 10,2, % 12,1 ve % 13,6 olan hasta numuneleri her iki cihazda ikişer kez ölçüldü. Sonuçlar Tablo 5.5 de verildi.

Tablo 5.5 HPLC ve B.C. AU680 cihazında 5 farklı HbA1c değerinin doğrusallık ölçümü

HPLC					
Değer %	5,7	8,2	10,2	12,1	13,6
1	5,7	8,2	10,3	12,1	13,6
2	5,6	8,2	10,2	12	13,5
Ortalama	5,65	8,2	10,25	12,05	13,55
Beckman Coulter AU680					
Değer %	5,7	8,2	10,2	12,1	13,6
1	5,6	8,1	9,9	11,8	13,2
2	5,5	8	10,1	11,9	13,3
Ortalama	5,55	8,05	10	11,85	13,25



Şekil 5.3 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında 5 farklı HbA1c değerinin ölçüm sonuçlarının grafiği

5.2 Stabilite Çalışması

Tablo 5.6 Düşük ve yüksek değer (% 5,5 ve % 10,7) olarak belirlenen HbA1c hastalarının 0, 2, 4 ve 24. saatlerdeki ölçüm sonuçları

Değer %	Düşük Değer		Yüksek Değer		Değer %	Düşük Değer		Yüksek Değer	
	HPLC	BC AU680	HPLC	BC AU680		HPLC	BC AU680	HPLC	BC AU680
0. Saat					2. Saat				
1	5,5	5,5	10,7	10,6	1	5,5	5,5	10,7	10,6
2	5,4	5,4	10,7	10,7	2	5,5	5,4	10,6	10,7
3	5,5	5,5	10,6	10,5	3	5,4	5,4	10,7	10,7
4	5,5	5,4	10,7	10,7	4	5,5	5,5	10,6	10,6
5	5,5	5,4	10,7	10,7	5	5,5	5,5	10,6	10,7
Ortalama	5,48	5,44	10,68	10,64	Ortalama	5,48	5,46	10,64	10,66
Değer %	Düşük Değer		Yüksek Değer		Değer %	Düşük Değer		Yüksek Değer	
	HPLC	BC AU680	HPLC	BC AU680		HPLC	BC AU680	HPLC	BC AU680
4. Saat					24. Saat				
1	5,5	5,4	1,7	10,6	1	5,5	5,4	10,7	10,6
2	5,4	5,4	10,7	10,7	2	5,5	5,4	10,6	10,5
3	5,4	5,5	10,6	10,5	3	5,4	5,3	10,6	10,6
4	5,5	5,4	10,6	10,6	4	5,5	5,5	10,6	10,6
5	5,5	5,4	10,7	10,7	5	5,5	5,4	10,6	10,7
Ortalama	5,46	5,42	10,66	10,62	Ortalama	5,48	5,4	10,62	10,6

5.3 Yöntem Kıyaslaması

Tablo 5.7 Rastgele alınan 60 hasta numunesinin HPLC ve B.C AU680 cihazlarında karşılıklı olarak çalışmasının sonuçları

Hasta No	HPLC	BC AU680	Fark
1	5,5	5,6	0,98
2	7,5	7,7	0,97
3	5,8	5,6	1,04
4	5,2	5,1	1,02
5	5,0	5,1	0,98
6	5,3	5,4	0,98
7	4,5	4,6	0,98
8	8,6	8,3	1,04
9	6,5	6,4	1,02
10	6,9	7,0	0,99
11	7,2	7,1	1,01
12	5,5	5,4	1,02
13	5,1	5,2	0,98
14	9,8	10,0	0,98
15	9,1	9,2	0,99
16	8,3	8,4	0,99
17	4,6	4,4	1,05
18	8,6	8,7	0,99
19	6,3	6,3	1,00
20	5,4	5,5	0,98
21	7,8	7,9	0,99
22	4,2	4,3	0,98
23	5,8	5,9	0,98
24	6,3	6,4	0,98
25	11,4	11,6	0,98
26	12,8	13,0	0,98
27	5,5	5,6	0,98
28	5,2	5,4	0,96
29	8,2	8,1	1,01
30	12,4	12,0	1,03
31	5,4	5,5	0,98
32	6,5	6,3	1,03
33	9,5	9,4	1,01
34	10,5	10,2	1,03
35	4,3	4,1	1,05
36	8,4	8,5	0,99
37	6,3	6,1	1,03
38	5,3	5,4	0,98
39	5,4	5,2	1,04
40	4,6	4,3	1,07

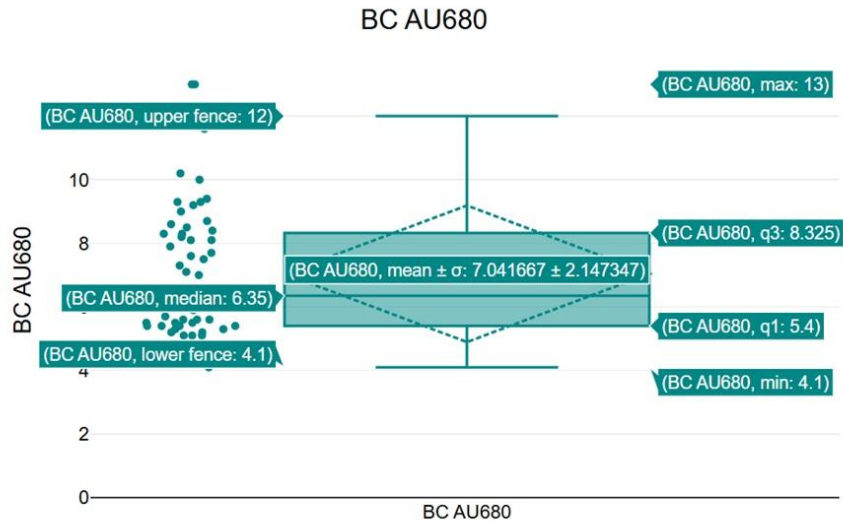
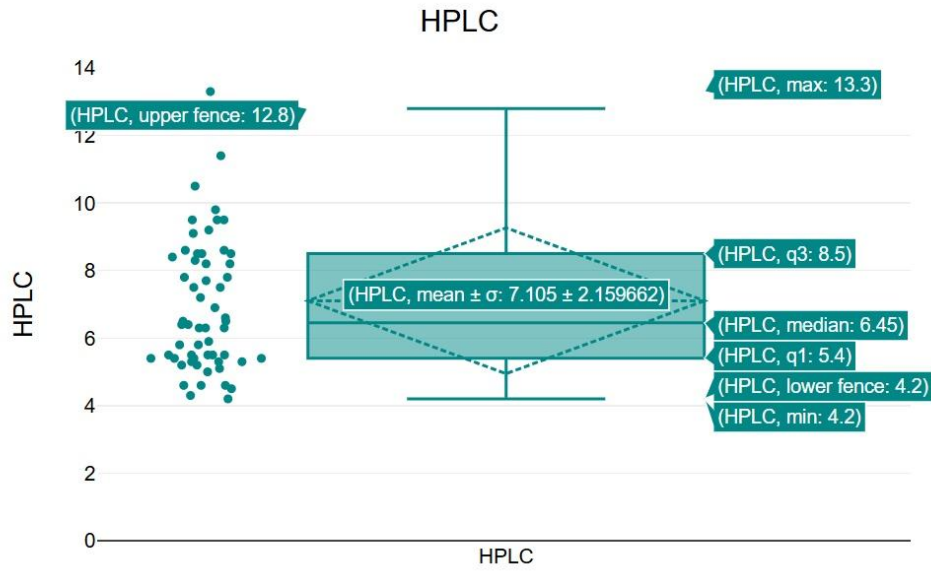
Tablo 5.7 Rastgele alınan 60 hasta numunesinin HPLC ve B.C AU680 cihazlarında karşılıklı olarak çalışmasının sonuçları (devamı)

Hasta No	HPLC	BC AU680	Fark
41	4,6	4,4	1,05
42	8,2	8,1	1,01
43	9,5	9,3	1,02
44	13,3	13,0	1,02
45	5,4	5,5	0,98
46	7,5	7,3	1,03
47	6,6	6,4	1,03
48	8,5	8,6	0,99
49	9,5	9,3	1,02
50	6,4	6,2	1,03
51	5,5	5,3	1,04
52	5,5	5,3	1,04
53	5,3	5,1	1,04
54	7,7	7,5	1,03
55	8,5	8,2	1,04
56	9,2	9,0	1,02
57	6,4	6,2	1,03
58	5,9	5,7	1,04
59	8,5	8,3	1,02
60	7,8	7,6	1,03
Ortanca (Q2)	6,5	6,4	1,00
Q1	5,4	5,4	1,02
Q3	8,5	8,4	1,01

Verilerin olması gereken dağılıma uygunluğu Kolmogorov/Simirnov testiyle analiz edildi ve sonuçların normal dağılıma uygun olmadığı görüldü. Bunun neticesinde normal dağılım varsayımı karşılanmadığı için parametrik olmayan Wilcoxon istatistiksel analizi kullanıldı.

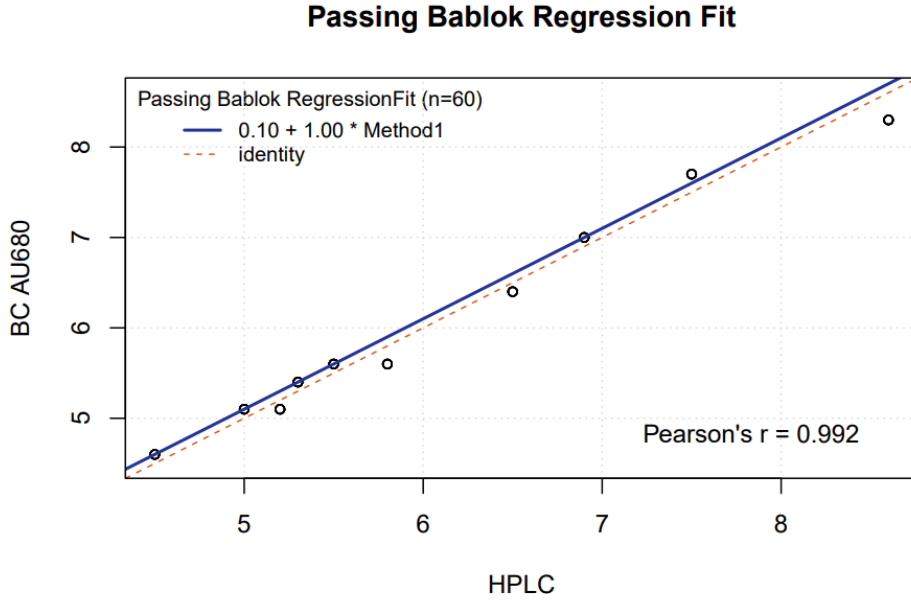
Yöntem kıyaslaması sırasında ADAMS HA-8160 cihazında HPLC yöntemi ile hasta sonuçları dağılımının % 4,2 - % 13,3 aralığında olduğu görüldü. Numune sonuçlarının ortanca Q2, Q1 ve Q3 değerleri sırası ile 6,5, 5,4 ve 8,5 bulundu.

Beckman Coulter AU680 cihazında ise hasta sonuçlarının % 4,1 - % 13,0 arasında dağıldığı görüldü. Bu yöntemde ise ortanca Q2, Q1 ve Q3 değerleri sırası ile 6,4, 5,4, ve 8,4 bulundu.

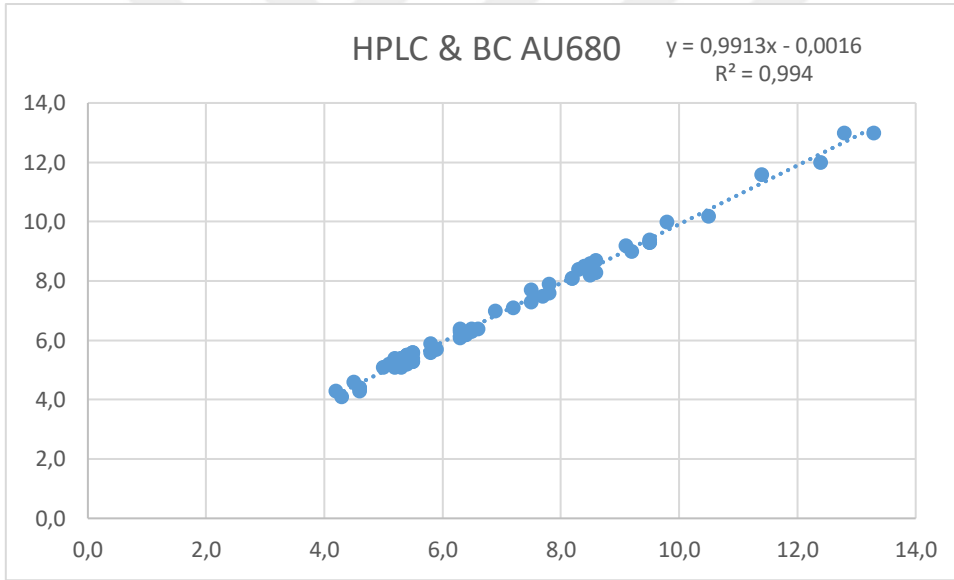


Şekil 5.4 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında kıyaslanan hastaların sonuçlarının Q1, Q2 ve Q3 değerlerinin dağılımını gösteren box-plot (kutu) grafiği.

Spearman's testi ile korelasyon sayısı incelemesi yapıldı. Bu test iki değişken arasındaki ilişkiyi inceleyen parametrik olmayan bir istatistik testidir. Devamında regresyon analizi için Passing Bablock testi uygulandı. Bu test sonucunda iki metod arasındaki korelasyon kat sayısı $r = 0,992$ regresyon eşitliği ise $y = 0,9913x - 0,0016$ $R^2 = 0,994$ şeklinde bulunduğu için iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

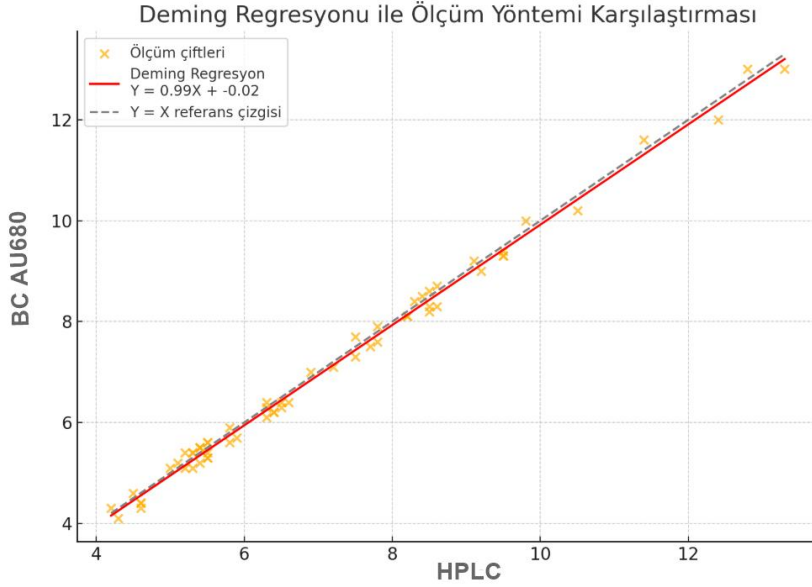


Şekil 5.5 İki yöntemin sonuçlarının Passing Bablok Regresyon Analiz Grafiği



Şekil 5.6 HPLC ve B.C AU680 cihazlarında kıyaslanan hastaların sonuçlarının regresyon grafiği

İki ölçüm arasındaki sonuçları daha net yorumlamak amacıyla Deming Regresyon analizi yapıldı. Deming Regresyonu her iki ölçüm sonucunda ölçüm hatası olabileceğini kabul ederek iki metot arasındaki doğrusallık ilişkisinin daha net görülmesini sağlar.



Şekil 5.7 Deming Regresyon Analizi Grafiği

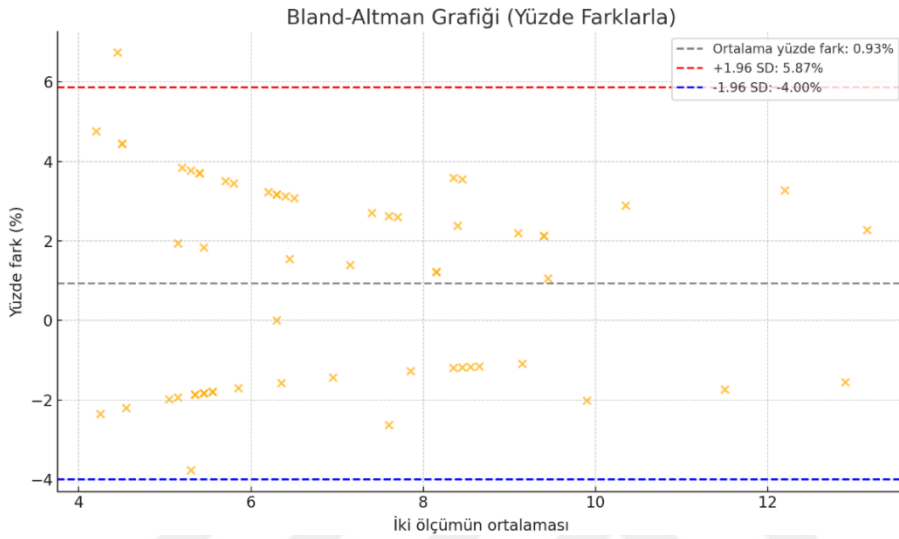
Analiz sonucunda elde edilen regresyon denklemi aşağıdaki gibidir; $y = 0,99x - 0,02$ bu eşitliğe göre iki ölçüm yöntemi arasındaki ilişkinin güçlü bir doğrusallıkta olduğu görüldü. Bulunan 0,99 değeri eğim katsayısı ölçümlerin sonuçlarının birbirine yakınlığını göstermektedir. y eksenini kesimi olan -0,02, metodlar arasında önemsiz sistematik bir fark olduğunu göstermektedir.

İki ölçüm sonucunun birbirine olan uyumluluğunun değerlendirilmesi amaçlanarak Uyum Katsayısı (Concordance Correlation Coefficient, CCC) hesaplandı. Bu değer 0,997 olarak bulundu. Bu değer ölçümler arasındaki doğrusal ilişkinin ne kadar güçlü olduğunu göstermenin yanı sıra ölçüm değerlerinde yüksek eşleşmenin de olduğunu göstermektedir. Bu sonuç yöntemlerin birbiri yerine kullanılabilir olduğunu da ifade eder.

Ölçüm sonuçlarının güvenilirliğini daha net açıklanması için sonuçların Sınıf İçi Korelasyon Katsayısı (Intraclass Correlation Coefficient, ICC) hesaplandı. Bu değer birden fazla gözlemci yöntem veya ölçüm arasındaki güvenilirliği ve tutarlılığı ölçen bir istatistiksel bir yöntemdir. Bu hesaplamalar neticesinde % 95 güven aralığında $ICC = 0,981$ olarak bulundu.

Yöntemler arasındaki kıyası değerlendirmek amacıyla yöntem sonuçlarına Bland Altman analizi yapıldı. Ölçüm sonuçları 4,2 ile 13,3 arasında değişmektedir.

Sonuçlar arasındaki farkların ortalama değere göre değişkenlik gösterdiği görüldü. Bu sebeple farkların göreceli büyüklüklerinin daha net anlaşılması için bu analiz yüzdelik farklara göre yapıldı. Yüzde farklarla elde edilen Bland Altman analizi metotlar arasındaki sistematik farkların ve ölçüm sonuçlarına bağlı varyasyonların daha iyi şekilde görülmesini sağlar.



Şekil 5.8 İki metottun ölçüm sonuçlarının Bland Altman grafiği

Grafikte verilerin ortalaması x eksenini (yatay), aralarındaki % fark ise y ekseninde (dikey) gösterildi. Gri kesikli çizgi ortalama % farkı (bias), kırmızı ve mavi çizgiler ise % 95 güven aralığında $\pm 1,96$ standart sapma limitlerini göstermektedir. Bu grafik incelendiğinde HPLC ölçüm sonuçlarının iki ölçümün ortalamasına kıyasla % 0,31 daha düşük olduğu tespit edildi. Bu değer sıfır değerine çok yakın olduğu için orantısal açıdan sistematik farkın çok düşük olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada, HbA1c ölçümünde kullanılan iki farklı yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve immünotürbidimetrik analiz yöntemleri için kalibrasyon eğrileri oluşturularak, her iki yöntemin duyarlılık düzeyleri karşılaştırılmıştır. İmmünotürbidimetrik yöntem için elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemine göre ($y = 0,0763x - 0,2524$, $R^2 = 0,998$), yöntem oldukça güçlü bir doğrusal ilişki göstermiştir. Boş örnek yerine en düşük konsantrasyona karşılık gelen absorbans değeri (0,0007) kullanılarak yapılan hesaplamada, bu yöntem için LOD değeri 0,028, LOQ değeri ise 0,092 olarak hesaplanmıştır.

Benzer şekilde, HPLC yöntemi için oluşturulan kalibrasyon doğrusu ($y = 0,991x - 0,002$, $R^2 = 0,994$) doğrusal ve yüksek korelasyon göstermektedir. Düşük konsantrasyonlu ölçümlerin standart sapması temel alınarak yapılan hesaplamada, HPLC yöntemi için LOD değeri 1,51, LOQ değeri ise 5,04 olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlar, immünotürbidimetrik yöntemin HPLC'ye kıyasla daha düşük LOD ve LOQ değerlerine sahip olduğunu, dolayısıyla bu yöntemin düşük konsantrasyonlardaki HbA1c düzeylerinin saptanmasında daha duyarlı olabileceğini göstermektedir. Ancak, her iki yöntemin de yüksek doğrusal uyum katsayısına sahip olması, klinik uygulamalarda güvenilir sonuçlar verebileceklerini ortaya koymaktadır.

F testi, iki ya da daha fazla grubun varyanslarını karşılaştırmak için kullanılan istatistiksel bir testtir. Verilere uygulanan f testi sonucunda:

HPLC ve BC AU680 yöntemleriyle elde edilen HbA1c ölçümlerinin varyanslarının karşılaştırılmasında Levene testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, F istatistiği 0,002 ($p = 0,961$) olarak bulunmuştur. Elde edilen p-değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen 0,05 düzeyinin oldukça üzerinde olduğundan, iki yöntem arasında varyans bakımından anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgu, her iki yöntemin ölçüm sonuçlarının değişkenliği açısından istatistiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir.

Tüm bu sonuçların son bir değerlendirmesi olarak yapılan analizlere Bağımlı Gruplar t-Testi (Paired Samples) uygulandı.

Testin Amacı: HPLC ve BC AU680 ile yapılan ölçümlerin ortalamalarının arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemektir.

Sıfır Hipotezi (H_0): HPLC ve BC AU680 cihazında yapılan ölçümlerin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Yani gerçekte iki yöntemin ortalaması eşittir veya eşite yakındır ve bizim bulduğumuz küçük fark önemsizdir).

Alternatif Hipotez (H₁): HPLC ve BC AU680 sonuçları arasında anlamlı bir fark vardır.

- **Ortalama Fark (HPLC- BC AU680):** -0,035
- **Farkların Standart Sapması:** 0,231
- **t-değeri (t-statistic):** -1,176
- **Serbestlik Derecesi (df):** 59 (n-1 yani 60-1)
- **p-değeri (2-yönlü):** 0,244

Sonuçlar içerisinde en önemli değer p değeridir. Testin kuralına göre istatistiksel analizlerde p değeri genellikle 0,05 olan anlamlılık düzeyi ile kıyaslanır. Eğer $p < 0,05$ ise Sıfır hipotezi reddedilir ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Bu çalışmanın sonucunda ise p değeri 0,244 yani $p > 0,05$ olduğu için H₀ hipotezini reddetmek için yeterli kanıt yoktur. Dolayısıyla hem bu ölçüm sonuçları hem de yapılan istatistiksel analizler neticesinde sonuçların birbirleriyle uyumluluğu ve yöntemlerin birbirleri yerine kullanılabileceği sonucu ortaya çıktı.

6

TARTIŞMA

HbA1c ölçümünde farklı teknikler kullanılması istenmeyen varyasyonların ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu sebeple farklı laboratuvarlarda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada her iki ölçüm yöntemi stabilite, tekrarlanabilirlik, doğrusallık ve korelasyon analizi açısından değerlendirildi. Çıkan sonuçlar doğrultusunda HbA1c' nin immünotürbidimetrik yöntemle ölçülmesinde elde edilen sonuçların HPLC ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlemlendi. IFCC tarafından onaylanan immünotürbidimetrik yöntemde kullanılan antikorlar HbA1c' nin labil bileşenlerini ve glikolize hemoglobinin diğer varyantları olan HbA1a ve HbA1b' ye karşı seçicidir. Dolayısıyla ölçüm esnasında bu varyantların varlığından etkilenmez. Ayrıca bu yöntem HbF, HbS, HbA₂ ve karbamile hemoglobinden etkilenmez. Bu yüzden immünotürbidimetrik yöntemde yüksek özgüllük ve doğruluk mevcuttur. HbA1c değeri HPLC ile ölçülen numunelerde HbA1c sonucunun HbA1c varyantlarından etkilenme olasılığı daha yüksek olduğu için sonuçların güven aralığı, immünotürbidimetrik yönteme göre daha düşük olacaktır. Günümüz teknolojisinde laboratuvarlarda yapılan testlerde maliyet ve zaman en önemli faktörlerdir. HPLC normal olmayan hemoglobin varyantlarının tespitinde önemli rol oynarken, pahalı bir sistem olması, diğer hızlı yöntemlere kıyasla analiz süresinin daha uzun olması, sonuçlarda farklı hemoglobin varyantları ve interferanslar nedeniyle elde edilen kromatogramların yorumlanmasının zor olması zaman ve personel ihtiyacını arttırmaktadır. Ayrıca HPLC ile yapılan ölçümlerde yüksek duyarlılık, ancak düşük spesifiklik riski yanlış HbA1c sonuçlarına neden olabilir. Ancak günümüz teknolojisinde klinik kimyada kullanılan biyokimya oto-analizörlerinde çok sayıda testin çalışılması daha az sayıda personel ve daha düşük maliyet gerektirdiğinden daha avantajlıdır. Elde edilen sonuçlar iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığını ve bu durumun standardizasyon ve izlenebilirlik süreçlerine bağlı olabileceğini gösterdi. Bu iki yöntem Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) ve Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu (IFCC) tarafından kabul edildi.

- [1] Diabetes Care, “2. Classification and Diagnosis of Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 39, suppl. 1, pp. 13–22, 2016.
- [2] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 10th ed., Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.
- [3] International Expert Committee, “International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 32, pp. 1327–1334, 2009.
- [4] H. Shahab, W. Kenneth, and T. Cassandra, “Linking hIAPP misfolding and aggregation with type 2 diabetes mellitus: a structural perspective,” vol. 42(5) pp.1-25, 2022.
- [5] R. Boyer et al., *The Physics of Proteins*. “Myoglobin & Hemoglobin,” pp.83-91, 2010.
- [6] E. Neer, W. Konisberg, and G. Guidotti, “The Interactions Between α and β chains of Human Hemoglobins,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, 1967.
- [7] M. F. Perutz, “Mechanisms Regulating the Reactions of Human Hemoglobin with Oxygen and Carbon Monoxide,” *Annual Review of Physiology*, vol. 52, pp. 1–26, 1990.
- [8] M. W. King, “The Medical Biochemistry Page – Hemoglobin,” archived from the original on Mar. 4, 2012.
- [9] K. Ahrens and B. Basham, *Essentials of Oxygenation: Implication for Clinical Practice*, Jones & Bartlett Learning, p. 194, 1993.
- [10] M. F. Perutz et al., “Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis,” *Nature*, vol. 185(4711), pp. 416-422, 1960.
- [11] A. I. Hashim, “Diabetes mellitus and hypoglycemic disorders,” pp. 155–180, 2024.
- [12] J. O. Jeppsson et al., “Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 40, pp. 78–89, 2002.
- [13] W. Hoelzel et al., “IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes,” *Clin. Chem.*, vol. 50, pp. 166–174, 2004.

- [14] F. B. Hamdan and H. Y. Al-Matubsi, "Assessment of erectile dysfunction in diabetic patients," *Int. J. Androl.*, vol. 32, pp. 176–185, 2009.
- [15] M. Ravindra and S. Deepthi, "Comparison of HbA1c values by immunoturbidimetric and HPLC methods," *Ethiopian J. Lab. Med.*, vol. 5, no. 5, pp. 62–69, Dec. 2018.
- [16] B. Biondi, G. J. Kahaly, and R. P. Robertson, "Thyroid dysfunction and diabetes mellitus: Two closely associated disorders," *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 3, pp. 789–824, Jun. 2019, doi: 10.1210/er.2018-00163.
- [17] N. Ogawa et al., "Creation of haemoglobin A1c direct oxidase from fructosyl peptide oxidase by combined structure-based site-specific mutagenesis and random mutagenesis," *Scientific Reports*, 9, Article number: 942, 2019.
- [18] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, 11th ed., Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2025. [Online]. Available: <https://diabetesatlas.org>
- [19] "HbA1c Ölçümünde HPLC ve Türbidimetrik Immüno-inhibisyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması," *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 1, pp. 17–21, 2007.
- [20] B. Jean, F. Vicki, and A. Wendy, "Diabetes and Other Carbohydrate Disorders," *Clinical Chemistry*, ch. 4, pp. 147–178.
- [21] G. S. Datt, T. M. Mukesh, and B. Bassam, "HbA1c: A comparison of NGSP with IFCC transformed values," *Clin. Chim. Acta*, 358(1-2), pp.81-86, 2005.
- [22] D. Sadava et al., *Life: The Science of Biology*, 8th ed., Massachusetts and Virginia: Sinauer Associates Inc. and W.H. Freeman and Company, 2008.
- [23] "Hemoglobin: Structure, Function and Allostery," *Subcell. Biochem.*, vol. 94, pp. 345–382, 2020.
- [24] I. Moran, R. A. Horton, G. Scrimgeour, and M. Perry, *Principles of Biochemistry*, Boston, MA: Pearson, p. 127, 2011.
- [25] F. Vicki and A. Wendy, "Hemoglobin Production Disorders and Testing," *Clinical Chemistry*, ch. 5, pp. 179–200, 2007.
- [26] C. L. Rohlfing et al., "Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c," *Diabetes Care*, vol. 25, pp. 275–278, 2002.
-

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. E. Tiryaki, S. Kocaoba, “Comparison of HPLC and Immunoturbidimetry Methods for HBA1C Test Measurements” 13. International Marmara Science Congress (IMASCON’24), Kocaeli, 29-30 November 2024.

