



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HbA1c ÖLÇÜMÜNDE HPLC, İMMÜN ASSAY ve
LC/ESI/MS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Mahmut AYDIN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. BURAK Y. ÇİMEN

MERSİN – 2014



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HbA1c ÖLÇÜMÜNDE HPLC, İMMÜN ASSAY ve
LC/ESI/MS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Mahmut AYDIN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. BURAK Y. ÇİMEN

Bu tez, BAP BAP-TF TTB (MA) 2012 -8 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

MERSİN – 2013

TEŐEKKÜRLER

Dört buçuk yıllık asistanlığım süresince, ayrıca zorlu ve uzun bir süreç olan tez yazımı ve çalışmalarını esnasında manevi desteğini, anlayışını ve yardımlarını eksik etmeyen tez hocam Prof. Dr. M. Burak Y. ÇİMEN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince sorularıyla kapılarını aşındırdığım ve hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan, destek, ilgi ve gülümsemelerini eksik etmeyen hocalarım Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Lülüfer Tamer Gümüő, Prof. Dr. Gülçin Eskandari ve Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Tezimin klinik süreci ve hasta grubu örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Dahiliye Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ramazan Gen'e,

MEİTAM sorumlusu Prof. Dr. Ali Döndaő'a, HPLC/MS sorumlusu Ema Yorulmaz, Fadile Defne Yıldız ve Tuncay İnce'ye,

Tezimin istatistik analizlerinde desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Gülhan Oreki Temel'e,

Anlamadığım ya da çözemediğim her soruda, yardımlarını eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Lokman Ayaz ve Yrd. Doç. Dr. Bahadır Ercan'a,

Yıllarımızı birlikte geçirip, güzel anılara, kalıcı dostluklara yelken açtığımız, çalışmalarımnda yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum giden ve kalan tüm asistan ve mesai arkadaşlarıma,

Yaşamımın her aşamasında sevgi, destek, güven, anlayış ve sabırları için aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
Hemoglobin	10
Hem Grubunun Yapısı	10
Globin Zincir Yapısı	11
Dönemsel Globin Zincir Sentezi ve Hemoglobin	12
Hemoglobinin Fonksiyonları	13
Hemoglobin Bileşikleri	14
a. Karboksihemoglobin	14
b. Karbaminohemoglobin	14
c. Sulfohemoglobin	14
d. Methemoglobin ve Siyanomethemoglobin	14
Hemoglobinin Glikozillenmesi	15
Glikozile Hemoglobinin Klinik Kullanımı	18
Diyabetes Mellitus	19
Diyabetes Mellitusun Tanısı	19
Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması	19
Glisemik Kontrol ve Diyabetes Mellitus	22
Glikozile Hemoglobin Ölçümünün Standardizasyonu	24
Glikozile Hemoglobin Ölçüm Yöntemleri	27

a. HPLC	27
b. İyon Değiştirici Kromotografi	28
c. Affinite Kromotografisi	28
d. Agaroz Jel Elektroforezi	29
e. HPLC/CE	29
f. İzoelektrik Odaklanma	29
g. Kolorimetrik Yöntem	30
h. İmmün Ölçüm	30
ı. Kütle Spektrometrisi	30
HbA1c Ölçümünde İnterferans Nedenleri	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	33
İmmün Assay Metod ile HbA1c'nin Çalışılması	33
HPLC ile HbA1c'nin Çalışılması	34
LC/ESI/MS Metodu ile HbA1c'nin Çalışılması	34
a. Cihaz ve Kimyasal Maddeler	35
b. Çözeltilerin Hazırlanması	36
c. Örneklerin Hazırlanması	37
d. Endoproteinaz Glu-C enziminin çalışma prensibi	41
e. LC-MS Cihazının Koşullarının Hazırlanması	42
f. Kalibrasyon ve Hesaplama	43
İstatistiksel Değerlendirme	44
BULGULAR	45

İmmün assay yöntemi için tekrarlanabilirlik	45
HPLC yöntemi için tekrarlanabilirlik	46
Çalışmamız ile IFCC'nin Örnek Hazırlama Farklılığı	47
LC/ESI/MS yöntemi için tekrarlanabilirlik	47
İstatistiksel Analiz Sonuçları	55
TARTIŞMA	61
SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	68
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	75
TABLolar DİZİNİ	77
ŞEKİLLER DİZİNİ	79

ÖZET

Glikozile hemoglobinin majör formu olan HbA1c, IFCC tarafından HbA1'in beta zincirinin amino terminal ucunda bulunan valin amino asitinin amino grubuna glukoz bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı [N-(1-deoksifruktozil) hemoglobin] olarak tanımlanmıştır. HbA1c; DM' de orta ve uzun dönem glisemik kontrolün izlenmesi ve DM hastalarında, diyabetik komplikasyonların gelişme riskinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde çok sayıda glikozile Hb ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. HPLC/ESI/MS ve HPLC/CE yöntemi, HbA1c ölçümünde IFCC tarafından referans metot olarak kabul edilmektedir. IFCC; referans HbA1c ölçüm yöntemi, hemoglobinin beta zincirinin Endoproteinaz Glu-C ile kesilmesi sonrası oluşan glikozile hekza peptidlerin, total hekzapeptidlere oranlanması temeline dayanmaktadır. HPLC-ESI-MS özellikle Hb'nin beta zincirinin N-terminal ucundaki glikozilasyonu ölçtüğü için HbA1c'nin tam ölçümünü sağlamaktadır.

Biz bu çalışmada, laboratuvarımızda kullanılan, HPLC ve İmmün assay metotlarını, IFCC tarafından referans metot olarak kabul edilen HPLC/ESI/MS metodu ile yöntem karşılaştırma yapmayı amaçladık. 27 sağlıklı ve 27 diyabetik bireyden; iki grup oluşturuldu. Her iki HPLC ve İmmün assay yönteminin HPLC/ESI/MS ile karşılaştırıldığında; hem sağlıklı (sırasıyla 0,8972, 0,8875) grupta, hem de diyabetik (sırasıyla 0,9243, 08588) grupta korelasyon vardır.

HPLC, İmmün Assay ve LC/ESI/MS yöntemlerinin; gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlikleri hem sağlıklı (sırasıyla gün içi -günler arası; 3.87, 4.4 / 3.93, 4.22/ 2.07, 2.3) grupta, hem de diyabetik (sırasıyla gün içi -günler arası 3.47, 3.9/ 3.34, 3.82 / 1.74, 1.9) grupta çalışıldı.

Sonuç olarak; her iki yönteminde, HPLC/ESI/MS yöntemi ile uyumlu olduğu ancak; yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında HPLC ve İmmün assay yöntemlerinde, HPLC/ESI/MS yöntemine göre yüksek %CV değerleri elde edildiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: HbA1c, HPLC/ESI/MS, HPLC, İmmün Assay

ABSTRACT

Measurement of HbA1c HPLC, Immunoassay and LC/ESI/MS Comparison of Methods

The major glycosylated hemoglobin HbA1c has been defined as stable form [N-(1-deoxyfructosyl) formed by glycation of N-terminal-end Valin residue of beta chain of HbA1 by IFCC. HbA1c is frequently used for long and mid-term monitoring of diabetes and evaluation of risk of diabetic complication development. Today there are many glycosylated Hb evaluation methods developed. HPLC/ESI/MS and HPLC/CE methods has been refered as reference methods by IFCC. The reference methods principle is based on the ratio of hexapeptides formed by digestion of beta chain by endopeptidase Glu-C to total hexapeptides. HPLC/ESI/MS gives the best results due to the measurement of specific measurement of N-terminal glycation of beta chain of Hb.

In this study, both HPLC and immunoassay methods used in our laboratory had been compared to the reference method HPLC/ESI/MS. Two groups composed including 27 health subjects and 27 diabetes patients. There is a correlation between HPLC/ESI/MS method with HPLC and immunoassay methods in both healthy subjects (0,8972, 0,8875 respectively) and diabetic patients (0,9243, 08588 respectively).

All HPLC, immunoassay and HPLC/ESI/MS methods within-day and inter-day reproducibilities were tested and has been found in healthy subjects as 3,87;4,4, 3,93;4,22, 2,07;2,3 and in diabetic patients as 3,47;3,9, 3,34;3,82, 1,74, 1,9 respectively.

In conclusion: results obtained from both methods are consistent with the results of the reference method but within-day and inter-day reproducibility studies showed that both methods have higher %CV values compared to HPLC/ESI/MS methods.

Key Words: HbA1c, HPLC/ESI/MS, HPLC, Immunoassay

GİRİŞ ve AMAÇ

Hemoglobin (Hb); eritrositlerde bulunan, oksijen taşınmasında görev yapan kabaca küresel bir proteindir. Hb'nin yapısında hem grubu ve dört subünitten oluşan, her subüniti iki çift polipeptit zincirinden meydana gelen tetramer yapıda olan globin proteini yer almaktadır (Şekil 1). Hem halkası tüm hemoglobinlerde aynı yapıda iken, globin zincirleri; sayı, sıra ve cins bakımından farklılıklar göstermektedir¹⁻³.

Erişkin hemoglobininin %97'si HbA, %2,5'i HbA₂, yaklaşık %1'i HbF'dir. HbA; 2 alfa, 2 beta globin zincirinden oluşur. Hb, non enzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinlerden biridir. HbA molekülündeki potansiyel glikozillenme bölgeleri, 4 polipeptid zincirindeki N-terminal valin kalıntısının amino grupları ve lizin kalıntısının tüm serbest C-amino gruplarıdır^{1, 4, 5}.

Hemoglobin A1c (HbA_{1c}); HbA₁'in %80'nini oluşturan en önemli kısmıdır ve glukoz HbA'nın bir ya da her iki beta zincirinin N-terminal valin kalıntısına bağlanır. Glikozile Hb oluşumu yaklaşık 120 günlük eritrosit yaşam süresi boyunca devam eder ve plazma glukoz seviyeleri ile yakından ilişkilidir. HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c}'nin spesifik aktiviteleri eritrosit ömrü ile birlikte lineer biçimde artmaktadır. Hb'nin glikozilasyonu yavaş gerçekleşmekte ve eritrositlerin yaşam süreleri boyunca devam etmektedir. Yaşlı eritrositlerdeki HbA_{1c} seviyeleri genç olanlara göre anlamlı şekilde yüksektir. Bu durum eritrosit yaşam süresi ile ilişkilidir⁶⁻⁹.

Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association, ADA) 2011'de yayınladığı Diyabetes Mellitus (DM) tanı kriterlerinde HbA_{1c} tanı kriteri olarak alınmıştır. ADA 2011'de yayınladığı DM tanı kriterleri;

1. HbA_{1c} % 6,5 ve üstü.(HbA_{1c}, ancak uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında tanı testi olarak kullanılabilir.)
2. Açlık kan glukozu (AKG) 126 mg/dL (7,0 mmol/L) ve üstü. (Açlık; en az 8 saat kalori alımı olmamasını tanımlamaktadır)
3. Oral glukoz tolerans testi (OGTT) sırasında 2 saatlik plazma glukozu 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üstü. (OGTT, 75 gram oral glukoz alımı ile yapılmalıdır.)

4. Klasik hiperglisemi veya hiperglisemik krizli hastada rastgele kan glukozu 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üstü olarak kabul edilmiştir¹⁰.

İyi bir glisemik kontrole sahip diyabetik hasta örneklerinde ölçülen HbA1c'lerin %50'si alınan örnekten önceki aya, %25'i alınan örnekten iki ay öncesine ve geriye kalan HbA_{1c}'nin %25'i ise 2-4 ay öncesi glisemik seviyelerle ilişkilidir¹¹.

HbA1c için referans aralık %4-6 arasındadır. ADA'nın önerisine göre diyabetik hastalarda tedavinin primer amacı HbA1c düzeyini %7'nin altında tutmak olmalıdır. HbA1c düzeyi %8'den fazlaysa tedavi rejimini tekrar değerlendirmek gerekir¹².

Uluslar Arası Klinik Kimya ve Tıbbi Laboratuvar Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC), HbA1c'ye spesifik standartlar kullanan bir referans metod geliştirmiş ve geliştirilen bu metod 2001 yılında kabul edilmiştir. İnsan kanından HbA1c ve HbA0 izole edilip primer referans materyal elde edilip, referans metodun primer kalibrasyonunda kullanılmıştır. Referans metod, örneğin endoproteinaz Glu-C enzimi ile inkübasyon sonucu Hb'nin beta zincirinin N-terminal hekzapeptidlerinin elde edilmesini takiben yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC) ile hekzapeptidlerin ayrımı sağlanır. Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS) veya kapiller elektroforez (capillary electrophoresis, CE) ile kantitasyon sağlanır^{13, 14}.

Milano'da 2007 yılında IFCC ve diyabet cemiyetlerinin katılımıyla dünya çapında HbA1c sonuçlarının standardizasyonu için yapılan toplantıda alınan kararlar yayımlanmıştır. 2010' da güncellenen bu kararlara göre:

1. HbA1c ölçümlerinin dünya çapında standardize edilmesi, geçerli referans yöntem olarak IFCC yönteminin kullanılması,
2. IFCC ve Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP) sonuçlarının birlikte rapor edilmesi ve birimlerin birbirine dönüşüm tablolarının ulaşılabilir olması,
3. Dergi editörlerince her iki birimi birlikte belirten makalelerin tercih edilmesi ve
4. Rapor edilen terimin HbA1c olması önerilmiştir¹⁵.

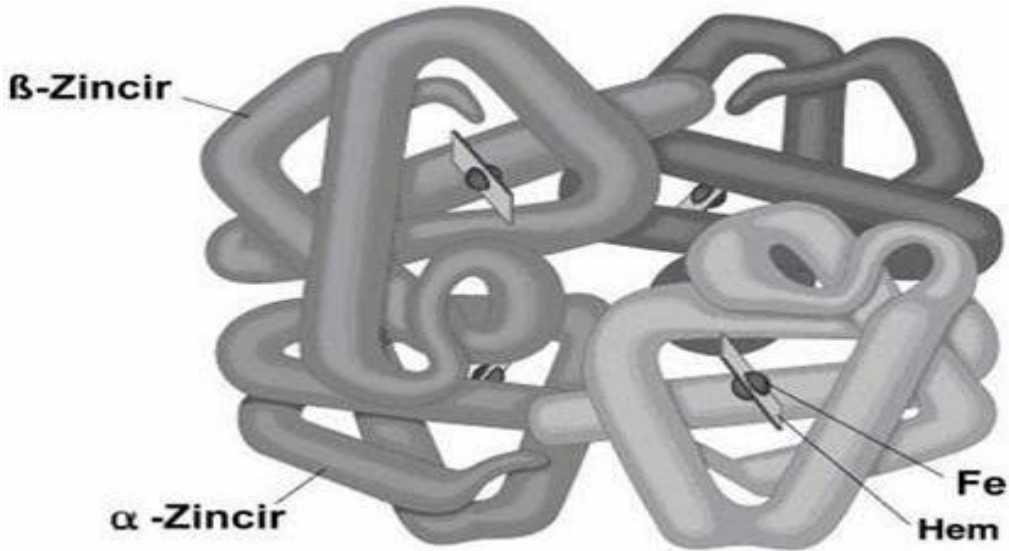
Bu çalışmada sağlıklı grup ve DM'lu hastalarda HbA1c ölçümünde, laboratuvarımızda kullanılan HPLC ve immün assay metodları ile IFCC

tarafından referans metot olarak kabul edilen HPLC/ESI/MS metodlarının karşılaştırması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hemoglobin

Hb; eritrositlerde bulunan, oksijen taşınmasında görev yapan, dördüncül yapıya sahip, 5,5 nm çapında, 64,5 kDa molekül ağırlığında, küresel bir proteindir. Hb, oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksiti ve protonları ise dokulardan akciğere taşır. Erkeklerde 100 mL kanda ortalama 15 gr, kadınlarda ise 13 gr Hb bulunmaktadır. Yapısında oksijen alıp veren hem grubu ve her subüniti iki çift polipeptit zincirinden oluşan tetramer yapıdaki globin proteini yer almaktadır (Şekil 1). Hem halkası tüm Hb'lerde aynı yapıda iken, globin zincirleri sayı, sıra ve cins bakımından farklılıklar göstermektedir¹⁻³.



Şekil 1: Hb molekülünün yapısı

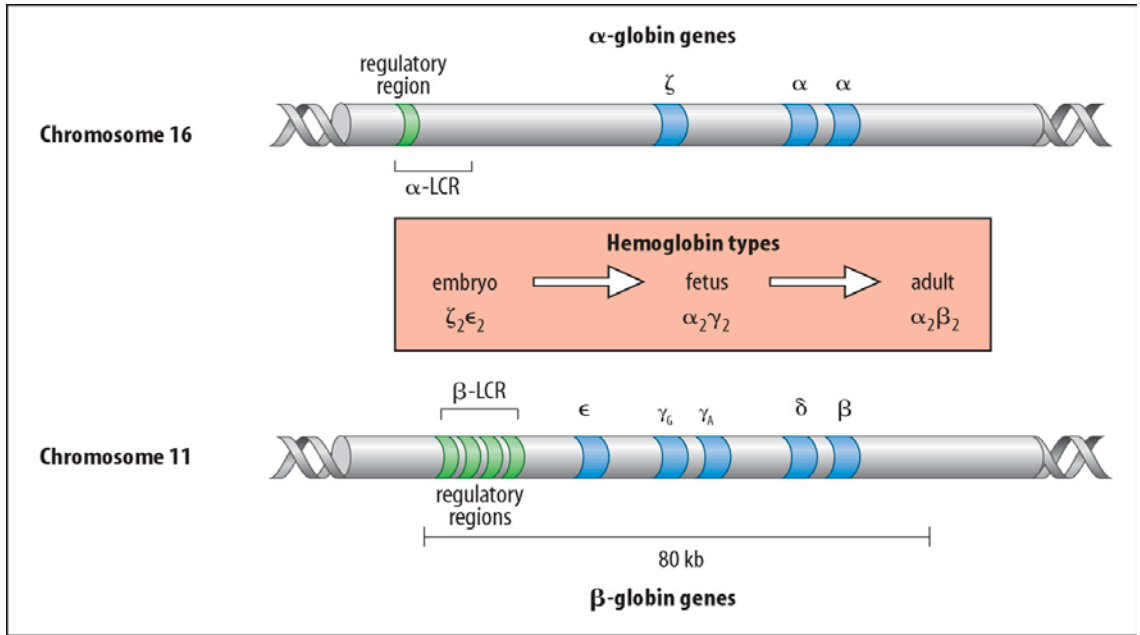
Hem Grubunun Yapısı

Hem, tetrapirrol halka yapısındadır ve merkezinde demir (Fe^{+2}) atomundan oluşur. Fe atomu, dört porfirin halka yapısındaki azot (N) atomuna bağlanarak merkezde tutunmaktadır. Hem'in merkezindeki ferröz demir (Fe^{+2}) atomu porfirin halkalarının iki ayrı tarafında iki bağ daha yapar. Bu bağlardan biri globin zincirinde bulunan histidin amino asidinin yan zinciri ile bağ oluşturur, diğeri oksijen ile bağlanmaya uygundur. Bu bağ sayesinde Hb oksijen taşıyacak fonksiyona sahip olur. Hb'nin yapısında bulunan bu bağ sayesinde bir Hb

molekölü dört oksijen taşımaktadır. Hem'in oksijen bağlayabilmesi için demir Fe^{+2} formda olmalıdır. Demir ferrik (Fe^{+3}) duruma okside olmuş ise hem oksijen bağlayamaz^{1, 2, 16}.

Globin Zincir Yapısı

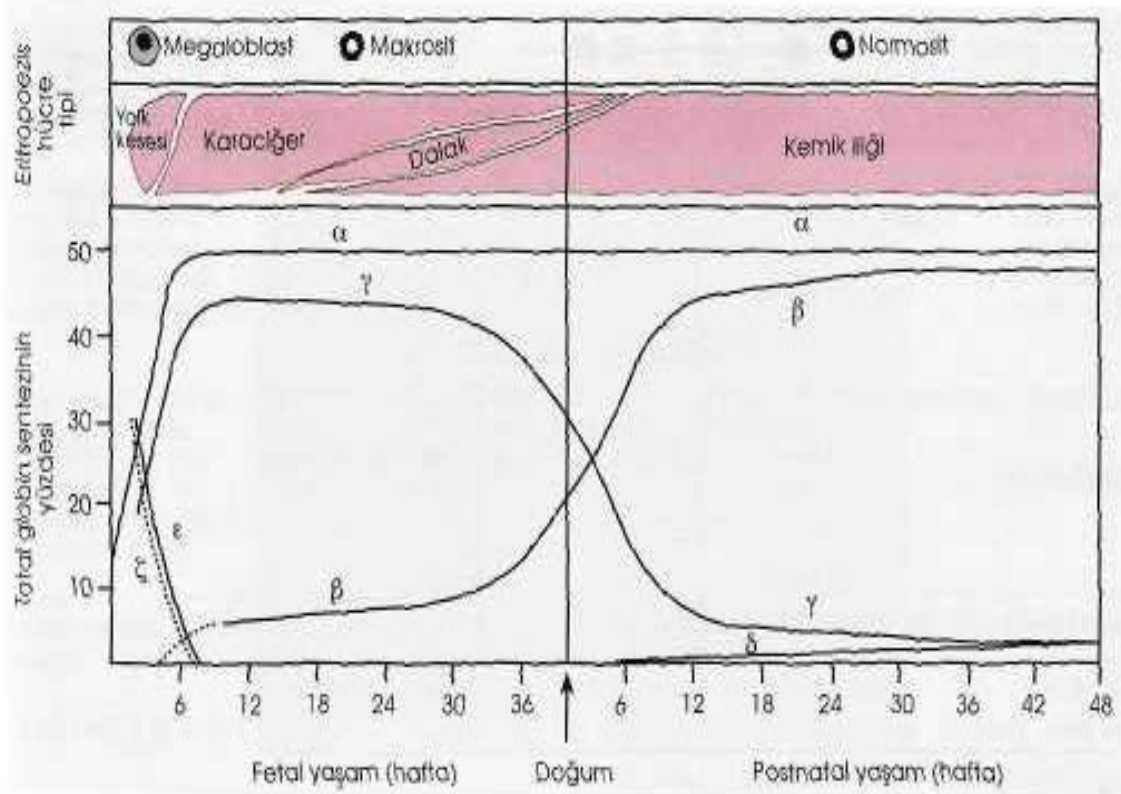
Hb molekülünün protein kısmı olan globinin yapısında 4 adet polipeptit zincir bulunmaktadır ve bu zincirlerin sentezi, iki farklı kromozom üzerinde iki ayrı gen bölgesinin kontrolündedir. Beta globin zinciri 11. kromozom üzerinde, alfa globin zinciri ise 16. kromozom üzerinde yerleşmiştir. Alfa gen ailesi iki gen taşır, embriyonik dönemde zeta geni ve bazı alfa globin benzer genlerde 16. kromozomda yer almaktadır. Beta gen ailesi tek bir genden oluşmakta ve 4 tane globin benzeri gen (2 gama, 1 epsilon ve 1 delta geni) yer almaktadır^{4, 17, 18}(Şekil 2).



Şekil 2: Globin gen ailesi

Dönemsel Globin Zincir Sentezi ve Hemoglobin Tipleri

Embriyolojik dönemin ilk 2 ayında Hb yolk kesesinde, sırasıyla Gower-I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower-II ($\alpha_2\epsilon_2$), Portland-I ($\zeta_2\gamma_2$) ve Portland-II ($\zeta_2\beta_2$) sentezlenir. Zeta zincirleri gebeliğin ilk trimestrından sonra sentezlenmez ve bu nedenle birinci trimestirden sonra Gower-I ve Gower-II Hb'leri görülmez. Embriyolojik dönemde Hb sentezinin karaciğer'de başlamasıyla birlikte fetal Hb'ler şekillenmeye başlar. Gebeliğin 13. haftasından itibaren embriyonik Hb'ler kaybolmaya başlar ve fetusta HbF ($\alpha_2\gamma_2$) sentezlenmeye başlar. Gama zincir yapımı gebeliğin sonlanmasına kadar fetusun esas hemoglobini görevini üstlenmesini sağlar. Beta zincir, gebeliğin 8 ile 12. haftalarından itibaren kemik iliğinin Hb sentezinde devreye girmesi ile birlikte fetal dolaşımda görülmeye başlar. Gebeliğin ilerleyen haftalarında gama zincir sentezinde azalma gözlenirken, beta zincir sentezinde artma gözlenir. HbA2 intrauterin dönemde görülmeye başlar ve doğumdan sonraki 4 ve 5. aylarda erişkin düzeyine ulaşır^{1, 16, 19-21}(Tablo 1) (Şekil 3).



Şekil 3: Globin zincir sentezi

Erişkin hemoglobininin %97'sini oluşturan HbA ($\alpha_2\beta_2$), iki alfa ve iki beta globin zincirinden meydana gelmektedir. Erişkin Hb'nin %2'sini HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) ve

yaklaşık olarak %1'ni HbF oluşturmaktadır. Hb yapısında bulunan alfa ve zeta globin zincirleri 141 amino asitten oluşurken, beta, gama, delta, epsilon zincirleri ise 146 aminoasitten oluşmaktadır^{1, 17, 21}.

Tablo 1: Hb tiplerinin globin zincir yapısı ve görüldüğü dönemler

Hb tipi	Globin zincir yapısı	Görüldüğü dönem
Gower-I	$\zeta_2\epsilon_2$	1. trimestir
Gower-II	$\alpha_2\epsilon_2$	1. trimestir
Portland-I	$\zeta_2\gamma_2$	Erken fetal dönem
Portland-II	$\zeta_2\beta_2$	Erken fetal dönem
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	Gebeliğin 13. haftasından-
HbA	$\alpha_2\beta_2$	Erişkin tip (% 97)
Hb A2	$\alpha_2\delta_2$	Erişkin hemoglobininin % 2'si

Hemoglobinin Fonksiyonları

Hb oksijeni akciğerlerden periferik dokulara, karbondioksit ve protonları periferik dokulardan akciğerlere taşır. Hb temel olarak oksijen taşınması ve tamponlama görevi vardır. Hb'nin oksijen taşınması işlevini yapmasında gergin ve gevşek formlarının çok önemli yeri vardır. Gergin formda oksijene olan ilgisi düşük, gevşek formda ise oksijene olan ilgisi yüksektir. Hb'nin yapısında yer alan dört hem grubu birer molekül oksijen bağlamaktadır. Bir Hb molekülü toplamda dört molekül oksijen bağlayabilmektedir. Hb'nin oksijene bağlanması geri dönüşümlü bir olaydır. Hb'nin bu bağlanma yeteneği ortamın parsiyel oksijen ve karbondioksit basıncına, ortamın pH'sına, ısı ve 2,3-bifosfogliserat

düzeylerine bağlıdır. Ortamdaki 2,3-bifosfogliserat düzeyleri en önemli düzenleyici mekanizmadır^{2, 16, 21, 22}.

Hemoglobin Bileşikleri

a. Karboksihemoglobin

Hb'nin oksijen yerine karbonmonoksit (CO) ile birleşmesine karboksihemoglobin (HbCO) adı verilir. CO Hb'deki hem demirinin 6. pozisyonuna bağlanır ve Hb'ye affinitesi oksijene göre yaklaşık olarak 220 kat daha fazladır. CO'in Hb'ye daha yüksek affinitesinden dolayı, oksijen ile eşit miktarda olsa bile CO Hb'ye bağlanıp hipoksiye neden olur^{1, 11, 16}.

b. Karbaminohemoglobin

Karbaminohemoglobin; Hb'nin oksijen yerine karbondiyoksit (CO₂) ile birleşmesiyle oluşur. CO₂'in Hb'ye bağlanması geri dönüşümlü bir olaydır. Normalde vücutta oluşan CO₂ ile birleşerek bikarbonat iyonu şeklinde taşınır, bir kısmı Hb'nin yüksüz α-amino gruplarına bağlanır, CO₂'in Hb'ye bağlanmasıyla Hb'nin oksijene olan ilgisi azalır. Kanda CO₂ %15 karbaminohemoglobin, %80'de bikarbonat şeklinde taşınır^{1, 2, 12, 16}.

c. Sulfohemoglobin

Sulfohemoglobin; Hb'deki porfirin halkasına hidrojen sülfür (H₂S) bağlanmasıyla oluşan Hb bileşiğidir. Hidrojen sülfürün Hb'ye bağlanması sonucu Hb'nin oksijene olan ilgisi azalır. Hidrojen sülfür renksiz bir bileşiktir, bu nedenle sulfohemoglobinin arttığı durumlarda siyanoz görülmemektedir. Nadiren görülen, bazı ilaçların sebep olabildiği genelde ölümcül bir durumdur^{1, 23, 24}.

d. Methemoglobin ve Siyanomethemoglobin

Demir, normalde Hb içerisinde indirgenmiş olarak, Fe⁺² halinde bulunur. Demirin elektron kaybederek Fe⁺³ hale gelmesi vucuttaki sitokrom b5 sistemi (methemoglobin redüktaz enzimi) ile engellenir ve normalde vücutta hemoglobinin sadece %1-2'si ferrik durumda bulunur. Hb'deki hem grubunun oksitlenmesiyle hem'in yapısındaki Fe⁺²'nin, Fe⁺³'e yükseltgenmesiyle oluşan methemoglobin oksijen bağlayamaz ve siyanozu neden olur. Siyanürün

vücuda oral alımı ile birlikte öncelikle Hb'yi methemoglobine dönüştürür, sonrasında siyanomethemoglobin oluşur. Sitokrom oksidaz ve birçok solunum enzimini inhibe eder^{1, 16, 23, 25}.

Hemoglobinin Glikozillenmesi

Glikoproteinler, karbonhidrat ve protein konjugatlarından oluşurlar. Glikoproteinlerin karbonhidrat kısımları kısa ve yapısal olarak farklılıklar gösterir. Glikozil transferazların katalizörlüğünde proteinlerin asparagin, serin, treonin ve hidrosilizin aminoasitlerine N- glikozid ve O-glikozid bağları ile glukoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, N-asetil glukozamin, N-asetil mannozamin ve sialik asitlerin bağlanması ile glikoproteinler oluşur. Karbonhidratlar proteinlere enzimatik ve non enzimatik reaksiyonlarla bağlanırlar^{16, 26, 27}.

Glikozile Hb, HbA_{1c} ve HbA1a ifadelerinin hepsi Hb'nin non enzimatik yol ile glikozillenmesini ifade etmektedir, ancak glikohemoglobin ifadesinde hem enzimatik hem de non enzimatik yol ile Hb'nin glikozillenmesini ifade ettiği için HbA_{1c} terimi yerine kullanımı yanlış olur. Glikasyon, proteinlerin amino gruplarına şeker kalıntısının non enzimatik yol ile eklenmesiyle oluşur. Hb, enzimatik olmayan glikozillenmeye uğrayan proteinlerden biridir. Erişkin Hb'nin %97'si HbA, %2,5'i HbA₂, yaklaşık %1'i HbF' dir. HbA molekülündeki potansiyel glikozillenme bölgeleri, 4 polipeptid zincirindeki N-terminal valin kalıntısının amino grupları ve lizin kalıntısının tüm serbest C- amino gruplarıdır^{1, 4-6, 28}.

HbA1a1'de beta zincirinin N-terminal ucuna fruktoz-1,6-difosfat, HbA1a2'de glukoz-6 fosfat, HbA1b'de pirüvik asit bağlanmıştır. HbA1c, Hb A1'in %80'nini oluşturan en önemli kısımdır ve glukoz HbA'nın bir ya da her iki beta zincirinin N terminal valin kalıntısına bağlanır^{29, 30} (Tablo 2).

Tablo 2: Glikozile Hb'ler ve yapıları

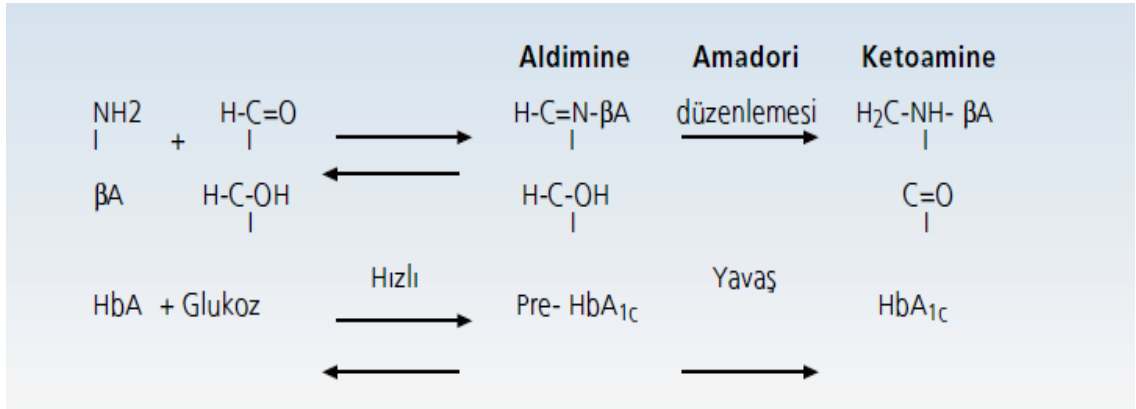
Glikozile Hb Türü	Glikolize Hb'nin Yapısı
Hb A1a1	$\alpha_2 (\beta -N\text{-Fruktoz } 1,6 \text{ difosfat})_2$
HbA1a2	$\alpha_2 (\beta -N\text{-Glukoz } 6 \text{ fosfat})_2$
HbA1b	$\alpha_2 (\beta -N\text{-Pirüvik asit})_2$
Labil HbA1c	$\alpha_2 (\beta -N\text{-Glukoz})_2$
Stabil HbA1c	$\alpha_2 (\beta -N\text{-Glukoz})_2$
Hb A- Glukoz	$\alpha_2 (\beta -\text{Lizin N-Glukoz})_2$ $(\alpha -\text{Lizin N-Glukoz})_2$ $\beta_2 (\alpha -N\text{-Glukoz})_2 \beta_2$

1955 yılında Kunkel ve Wallenius elektroforetik yöntemle uyguladıkları Hb örneklerinde yavaş ve hızlı hareket eden Hb varlıklarını gösterdiler³¹. 1958 yılında Allen ve arkadaşları katyon değiştirici kromatografisinde hızlı Hb'leri üç ayrı fraksiyona ayırdılar³². Bu hızlı Hb'lerin (HbA1a1, HbA1a2 ve HbA1c) klinik olarak ne önem arzettiği 1968 yılına kadar belirlenememiştir. 1968 yılında Rahbar, diyabetik hasta örneklerinde HbF deki elektroforetik mobiliteye benzer ve diyabetik hasta örneklerinde yaklaşık olarak 2 kat artmış glikozillenmiş Hb'lerin varlığını gösterdiler^{7, 33}.

Hb'nin glikasyonu sırasında lizin kalıntıları beta zinciri dışında başka yerlerde de oluşabilir, eritrositlerde glikolize HbA0 oluşur ancak eritrosit yaşam süresi boyunca düzeyi azalır. HbA0 yüke bağlı kromatografik yöntemlerle diğer glikolize Hb'lerden (HbA₁a, HbA₁b ve HbA₁c) ayıramaz, affinite kromatografisi ile ayrılabilir^{6, 26}.

HbA1, HbA'ya göre daha negatif yüklüdür ve katyon değişim kromatografisinde kolondan daha erken ayrılır. HbA1'de kolondan ayrılma sırasına göre HbA1a1, HbA1a2, HbA1b ve HbA1c olarak adlandırılır. Hb glikozilasyonu non enzimatik yol ile gerçekleştiği için diğer şekerler de HbA_{1c}'ye benzer şekilde bileşikler oluşturmaya eğilimlidirler²⁶.

Genel olarak aldozdan oluşmuş bileşikler ketozlardan daha etkilidirler. Fruktoz gibi, Hb ile kondanse olmuş çeşitli aldozların oranı, şekerin halka formuyla açık formu arasındaki orandan kaynaklanmaktadır. Reaksiyonun yavaş olmasındaki ana sebeplerden biri, çoğu aldozda ağırlıklı olarak halka yapısının tercih edilmiş olmasıdır. Hb'ye kondanse olmuş galaktoz ve mannozun glukozdan daha hızlı olması, moleküllerinin büyük bir kısmının yapılarını açık formda tutmalarından kaynaklanmaktadır. Proteinlerle aldehit fonksiyonlarının kondansasyonu non proteine amino gruplarını oluşturduğu için Hb glikozilasyon oranı fizyolojik sınırın üzerindeki pH düzeylerinde açık şekilde yükselmektedir²⁶.



Şekil 4: HbA_{1c} oluşumu; Amadori düzenlenmesi

HbA_{1c} oluşumunda başlangıçta pre HbA_{1c} (aldimin) oluşur. Pre HbA_{1c} ayrılabilir ya da geri dönüşümsüz Amadori düzenlemesine girer ve stabil ketoamine oluşur. Oluşan pre HbA_{1c} oldukça labildir⁶ (Şekil 4).

Glikozile Hb sentezi temel olarak, Hb ve glukoz konsantrasyonları ile ilişkilidir. Hb konsantrasyonunun sabit kaldığı kabul edilirse; HbA_{1c} oluşum hızı uzun süren glukoz konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir. Geçici ve ani glukoz yükselmeleri glikozillenmiş Hb seviyelerine ciddi bir etki yapmaz.

Glikozile Hb oluşumu yaklaşık 120 günlük eritrosit yaşam süresi boyunca gerçekleşir. Plazma glukoz seviyeleri ile yakından ilişkilidir. HbA₁a, HbA₁b ve HbA₁c'nin spesifik aktiviteleri eritrosit ömrü ile birlikte lineer biçimde artmaktadır. Hb'nin glikozilasyonu yavaş gerçekleşmekte ve eritrositlerin yaşam süreleri boyunca devam etmektedir. Yaşlı eritrositlerdeki HbA₁c seviyeleri genç olanlara göre anlamlı şekilde yüksektir^{6, 7, 11}.

İyi bir glisemik kontrole sahip diyabetik hasta örneklerinde ölçülen HbA₁c'lerin %50'si alınan örnekten önceki aya, %25'i alınan örnekten iki ay öncesine ve geriye kalan HbA₁c'nin %25'i ise 2-4 ay öncesi glisemik seviyelerle ilişkilidir¹¹.

Glikozile Hemoglobinin Klinik Kullanımı

HbA₁c, glukoz ve Hb'in eritrosit içerisinde kondansasyonu ile irreversibl ve yavaş olarak oluşmaktadır. Plazmadaki glukoz, eritrosit içerisine hızlandırılmış difüzyonla girer. Buna göre eritrosit içerisindeki HbA₁c yüzdesi plazma glukozunun "kümülatif" ortalamasını yansıtır³⁴.

Glikozillenmiş Hb parametresinin DM'nin tanısında, diyabetik hastaların kontrolünde ve komplikasyonlarının tanınmasında bir gösterge olması amacı ile çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırmaların bulguları kanın glikozillenmiş Hb değerinin saptanması ile diyabetiklerin metabolik durumlarının sağlıklı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Kanın glikozillenmiş Hb değerinin, kan glukozunun kısa süreli değişimlerinden etkilenmediği ve kanın alınmasından önceki yaklaşık 4-6 haftalık bir sürenin ortalama kan glukoz düzeyini yansıttığı kabul edilmektedir³⁴.

Diyabetik hastalarda glikozillenmiş Hb değerinin yükselmesi ile eritrosit ve trombosit agregasyonunun arttığı, lökosit adhezyonunun, eritrosit ömrünün azaldığı, damar hastalıkları için risk faktörleri olarak bilinen kanın kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile kan basıncı değerlerinin yükseldiğini bildiren çalışmalar vardır. Glikozillenmiş Hb düzeyi yüksek olan diyabetiklerde retinopati, kapiller bazal membranlarda kalınlaşma görüldüğü de bildirilmiştir³⁵.

HbA₁c; diyabetik hastaların hepsinde rutin olarak bakılması gereken ve hastaların uzun dönem glisemik kontrolünün derecesini gösteren bir parametre,

glikolize Hb yüzdesi, önceki 6-8 hafta, özellikle son ay boyunca bileşik glisemik kontrolün bir ölçüsüdür^{11, 12}.

Non-enzimatik olarak glukoz rezidülerinin erişkin Hb'ye bağlanmasıyla oluşur. Glukozun, Hb'in beta zincirinin N-terminal ucuna bağlanmasıyla meydana çıkar. HbA1c yüzdesi için referans aralık %4-6 arasındadır. ADA'nın önerisine göre diyabetik hastalarda tedavinin primer amacı HbA1c düzeyini %7'nin altında tutmak olmalıdır. HbA1c düzeyi %8'den fazlaysa tedavi rejimini tekrar değerlendirmek gerekir¹².

Diyabetes Mellitus

DM; pankreastan insülin salınımı ile ilgili eksiklik veya yokluğu ile birlikte, insülin etkisindeki defektler nedeniyle oluşan, temel olarak hiperglisemi ile karakterize, organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı kronik ilerleyici metabolik bir hastalıktır^{36, 37}.

Tüm dünyada ve Türkiye'de yaklaşık olarak %10 ve üzerinde görülen oranıyla, en sık görülen endokrin hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü 2000 yılı verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 170 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2030'da 366 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir^{36, 37}.

Diyabetes Mellitusun Tanısı

ADA 2011'de yayınladığı DM tanı kriterleri;

1. HbA1c %6,5 ve üstü
(HbA1C, ancak uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında tanı testi olarak kullanılabilir) veya,
2. AKG 126 mg/dL (7,0 mmol/L) ve üstü (Açlık, en az 8 saat kalori alımı olmamasını tanımlamaktadır.) veya,
3. OGTT sırasında 2 saatlik plazma glukozu 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üstü (OGTT, 75 g oral glukoz alımı ile yapılmalıdır.) veya,
4. Klasik hiperglisemi veya hiperglisemik krizli hastada rastgele kan glukozu 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üstü olarak kabul edilmiştir¹⁰.

Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Başlangıçta DM, OGTT ile sınıflandırılmaktaydı. Ulusal Diyabet Veri Grubu (National Diabetes Data Group)'nun bir alt çalışma grubu, 1979 yılında

modifiye tanı kriterlerini önermiştir. Bu sınıflandırma şemasında, Tip 1 DM (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus=IDDM) ve tip 2 DM (insuline bağımlı olmayan diabetes mellitus=NIDDM) olmak üzere iki ana form DM tanımlanmıştır. Juvenil başlangıçlı DM ve erişkin başlangıçlı DM terimleri iptal edilmiştir. 1995'te ADA sınıflandırmayı tedaviden çok etyolojiye dayandırmak için DM'nin sınıflandırılmasını ve tanısını tekrar incelemek üzere bir çalışma grubu kurmuştur. 1997 yılında gözden geçirilen sınıflandırma yayınlanmış, insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet terimlerini kaldırmıştır; sırasıyla tip 1 ve tip 2 DM isimleri verilmiştir³⁸ (Tablo 3).

Tablo 3: DM'nin sınıflandırılması ve glukoz tolerans bozukluğunun kategorileri

A- TİP 1 DM	1- İmmün Aracılı 2- İdiyopatik
B- TİP 2 DM	1-Non Obez 2- Obez 3- Mody
C- Diğer Spesifik DM Tipleri	1- Gebelik DM 2- Bozulmuş Glukoz Toleransı 3- Bozulmuş Açlık Glukozu

Diğer bir değişiklik anormal glukoz toleransı ve potansiyel glukoz tolerans anormalliği kategorilerinin kaldırılmasıdır. DM'nin daha geniş etyolojik sınıflandırması tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: DM'nin etyolojik sınıflaması

I. Tip 1 diyabet; Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan beta hücre yıkımı vardır. A. İmmün aracılıklı B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet; insülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir.	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM); gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. Beta hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) <ul style="list-style-type: none">• 20. Kromozom, HNF-4a (MODY1)• Kromozom, Glukokinaz (MODY2)• 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)• 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)• 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5)• Kromozom, NeuroD1 (MODY6)• 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)• 9. Kromozom, CEL (MODY8)• Kromozom, PAX4 (MODY9)• 11. Kromozom, INS (MODY10)• Mitokondriyal DNA• 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)• Diğerleri B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler <ul style="list-style-type: none">• Leprechaunism• Lipoatrofik diyabet• Rabson-Mendenhall sendromu• Tip A insülin direnci• Diğerleri C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları <ul style="list-style-type: none">• Fibrokalkülöz pankreatopati• Hemokromatoz• Kistik fibroz• Neoplazi• Pankreatit• Travma/pankreatektomi• Diğerleri D. Endokrinopatiler <ul style="list-style-type: none">• Akromegali• Aldosteronoma• Cushing sendromu• Feokromositoma,• Glukagonoma• Hipertiroidi• Somatostatinoma• Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar <ul style="list-style-type: none">• Atipik anti-psikotikler• Anti-viral ilaçlar (HIV tedavisi)• Beta adrenerjik agonistler• Diazoksid• Fenitoin• Glukokortikoidler• Alfa İnterferon• Nikotinic asit• Pentamidin• Proteaz inhibitörleri• Tiyazid grubu diüretikler• Tiroid hormonu• Vacor• Diğerleri (post transplant diyabet) F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları <ul style="list-style-type: none">• Anti-insülin reseptör antikoları• Stiff-man sendromu• Diğerleri G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar (Monogenik diyabet formları) <ul style="list-style-type: none">• Alström sendromu• Down sendromu• Friedreich tipi ataksi• Huntington korea• Klinefelter sendromu• Laurence-Moon-Biedl sendromu.• Miyotonik distrofi• Porfiria• Prader-Willi sendromu• Turner sendromu• Wolfram (DIDMOAD) sendromu• Diğerleri

HNF: Hepatosit nükleer faktör, MODY1-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10, IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1b: Hepatosit nükleer faktör-1b, NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase (bile salt-dependent lipase), PAX4: Paired box4, ABCC8: ATP-binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin.

Glisemik Kontrol ve Diyabetes Mellitus

DM'li hastalara eşlik eden, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve mikrovasküler bozukluklar (retinopati, nefropati, nöropati) oldukça sık görülmekle birlikte, en önemli morbidite ve mortalite nedeni kardiyovasküler komplikasyonlardır. DM'li hastaların %90-95'ini Tip 2 DM'li hastalar oluşturmaktadır. Tip 2 DM'li hastaların %60-75'i makrovasküler hastalık (koroner arter hastalığı, inme, periferik arter hastalığı) nedeniyle kaybedilmektedir. İnsülin ve oral antidiyabetik ilaçlarla birlikte gelişen tedavi stratejileri ile diyabetli hastaların yaşam sürelerinin artışı, kronik komplikasyonların artışı da neden olmaktadır^{4,11}.

Yıllarca glisemik kontrolün, DM'nin uzun dönem komplikasyonlarını azaltacağı teorik olarak bilinmesine rağmen ancak 1993 yılında yapılan Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları'nın Çalışması (Diabetes Control and Complications Trial, DCCT) yaptığı çalışma sonuçlanıncaya kadar bu teori doğrulanmamıştır. Çok merkezli ve randomize bir çalışma olan DCCT çalışmasında farklı tedavi stratejileri ile komplikasyon gelişimi izlenmiştir. 7 yıl süren bu çalışmada tip 1 DM'li hastalarda intensif tedavide düşük ortalama glikoz düzeyleri sağlanmıştır. Konvansiyonel tedavi ile kıyaslandığında retinopati, nefropati ve nöropati riskini %40 ile %75 oranında azalttığı gözlenmiştir. Retinopati riskinin artışı HbA1c düzeylerinin artışı ile paralellik göstermiş ve sadece HbA1c düzeyinin ölçümü ile 4 yıl sonra retinopatinin gelişeceği tahmin edilmişti. HbA1c düzeyinin %10 azalması retinopati riskini %45 azaltığı görülmüştür. Ortalama HbA1c düzeyi retinopati progresyonu konusunda ana parametredir^{39, 40}.

Tablo 5: HbA1c'yi %1 düşürmenin komplikasyon gelişme riskine etkisi

Tip 1 DM	Tip 2 DM
Retinopati riski %35,	Diyabete bağlı ölüm %25,
Nefropati riski %24- 44,	Tüm nedenlere bağlı mortalite %7,
Nöropati riski %30 azalır.	Miyokard infarktüsü riski %18,
	Mikrovasküler komplikasyon riski %35 azalır.

Tip 2 DM'li hastalarda komplikasyon gelişimi açısından glukoz kontrolü ile ilgili çalışmanın sonuçları 1998 yılının sonunda yayınlanmıştır. Bu çalışmada

intensiv tedavi; diyet, oral antidiyabetikler ve insülin ile kan glukoz düzeyinin düşürülmesi; retinopati, nefropati ve nöropati riskini azatlığı gösterilmiştir^{16, 18, 41}.

DCCT ve İngiltere Prospektif Diyabet Çalışması'nın (The UK Prospectus Diabetes, UKPDS) yaptığı çalışmalarda DM'nin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişme ve ilerleme riskinin doğrudan glisemik kontrolle ilişkili olduğu gösterilmiştir. DM'li hastaların glisemik kontrolünde de glikozile Hb kullanılmıştır^{5, 10, 36, 42}.

Tablo 6: Glisemi ve % HbA1c ilişkisi

HbA1c %	DCCT ortalama glukoz (mg/dl)	ADAG ortalama glukoz (mg/dl)
5	100	97
6	135	126
7	170	154
8	205	183
9	240	212
10	275	240
11	310	269
12	345	298

Tip 2 DM'de glisemik kontrolü sağlamada hedeflerden biri HbA1c değerinin ADA kılavuzunda önerildiği şekilde <%7'ye veya Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği (American Association of Clinical Endocrinologists, AACE) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation, IDF) kılavuzlarında önerildiği şekilde ≤%6,5'e düşürülmesidir. İngiltere'de yapılan prospektif bir araştırmada HbA1c düzeyinde %1'lik azalmanın miyokard infarktüsünde %14, DM'ye bağlı ölümlerde %21 ve mikrovasküler komplikasyonlarda %37 oranında azalmalara neden olduğu gözlenmiştir. DM'li hastalarda yapılan çalışmalar, özellikle mikrovasküler

komplasyonların gelişme riskinin glisemik kontrol derecesi ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 5). HbA1c normale ne kadar yakın ise komplasyon riski o derece düşüktür⁴²⁻⁴⁴.

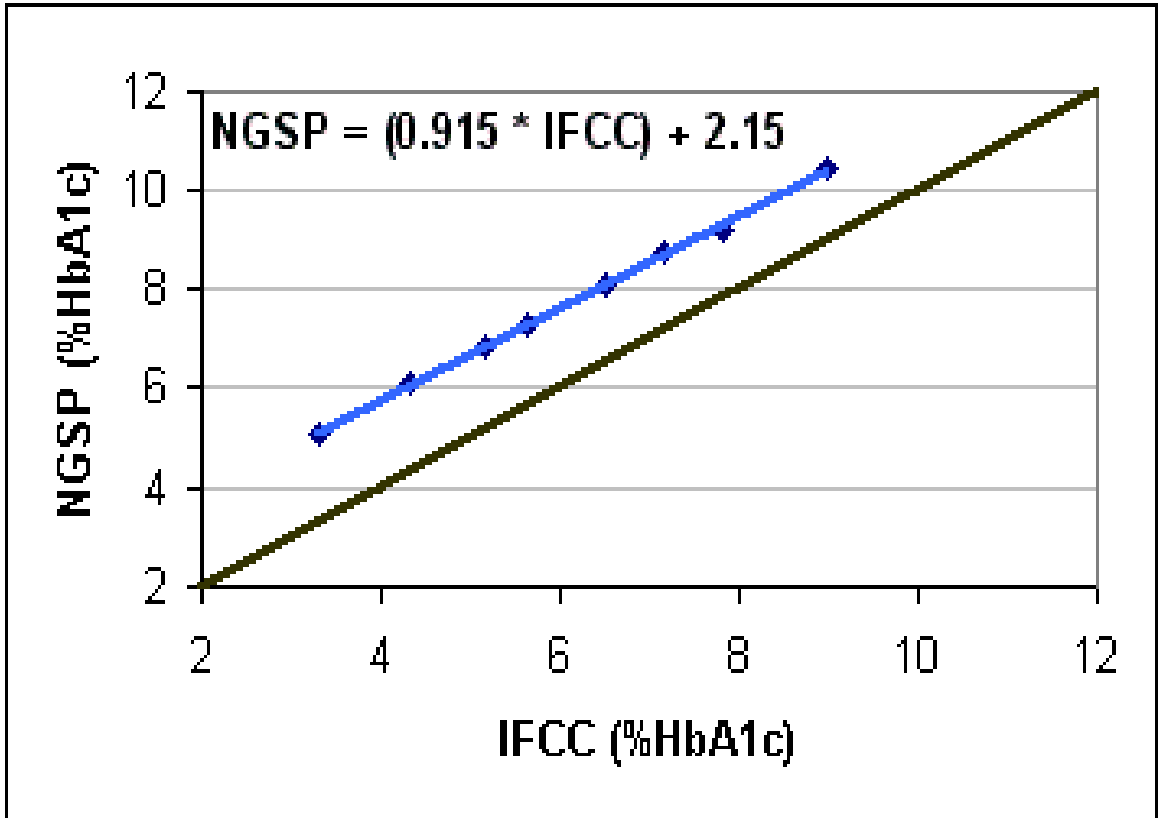
HbA1c seviyelerinin diyabetik hastalarda periyodik olarak izlenmesi glukoz metabolizmasının kontrolü hakkında önemli rol oynar. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), iyi metabolik kontrole sahip Tip 2 DM' liler için yılda bir kez, kötü metabolik kontrole sahip Tip 1 ve Tip 2 DM' liler için ise yılda 4 kez HbA1c ölçümü önermektedir. DM'si olmayan erişkinlerdeki HbA1c'nin değeri %4-6 arasındadır. ADA, 2011 DM klavuzunda HbA1c ölçümünü; tedavisi değiştirilen ya da glisemik hedeflere ulaşmayan hastalarda yılda dört kez, tedavi değişikliğine karar verildiği zaman ve tedavi hedeflenen düzeyde olan hastada, yılda en az iki kez HbA1c takibi önerilmektedir. ADA, tedavi hedefi olarak HbA1c konsantrasyonunun %7'nin altında tutulmasını, %8'in üzerinde ısrar eden HbA1c düzeylerinde ise tedavi rejiminin gözden geçirilmesini önermektedir. DCCT çalışması ile sonuçları 2008 yılında açıklanan HbA1c'den türetilen ortalama glukoz çalışmasına göre standardize edilmiş HPLC ile yapılan ölçümlerde HbA1c'ye karşılık gelen tahmini ortalama glukoz düzeyleri görülmektedir (Tablo 6). Ortalama glukoz seviyeleri; $28,7 \times \text{HbA1c} - 46,7$ formülü ile hesaplanabilir⁴⁵⁻⁴⁸.

Glikozile Hemoglobin Ölçümünün Standardizasyonu

1995 yılında IFCC ve 1996 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde NGSP tarafından HbA1c standardizasyonu için çalışma başlatılmıştır. NGSP'nin bu çalışmasında BioRex 70 HPLC cihazı kullanılmıştır. Aynı dönemde Japonya ve İsveç'te standardizasyon çalışmaları başlatılmıştır. İsveç yöntemi ulusal programlar arasında duyarlılığı en yüksek olan program olup, MonoS HPLC cihazı kullanılıp, ulusal referans laboratuvar ağı oluşturulmuştur. Japonya'da ulusal kalibratörler serisi oluşturulmuş ve tüm HbA1c ölçümleri aynı kalibratörler ile kalibre edilmiştir^{14, 40, 49-51}.

IFCC, 2001 yılında kabul edilen HbA1c'ye spesifik standartların kullanıldığı bir referans metod geliştirmiştir. İnsan kanından HbA1c ve HbA0 izole edilip primer referans materyal elde edilmiş ve referans metodun primer kalibrasyonunda kullanılmıştır. Referans metotta, örnek endoproteinaz Glu-C enzimi ile inkübasyon sonucu beta zincirin N-terminal heksapeptidler elde

edilirken, HPLC ile bu heksapeptidlerin ayrımı sağlanır ve kütle spektrometrisi veya kapiller elektroforez ile de kantitasyonu sağlanır. Sekonder Referans Materyaller üretici firma metotlarının kalibrasyonunda kullanılmaktadır. Bu metotta HbA1c ve HbA (mmol/mol) düzeylerinin oranlanması ile sonuç verilmektedir. IFCC ayrıca ulusal yöntemlerin karşılaştırma çalışmalarını da yürütmektedir. NGSP ve IFCC metodları arasında yapılan ve yedi yıl süren karşılaştırmalarda iki yöntemin korelasyonunun başarılı olduğu, ancak birimler arasında farklılık olduğu gözlenerek sonuçların dönüştürülmesinde kullanılacak en iyi eşitlik saptanmıştır. (NGSP %HbA1c = (0.915 x IFCC %HbA1c) + 2.15)^{14, 50, 51}(Şekil 5).



Şekil 5: IFCC ve NGSP'nin % HbA1c dönüşümü

IFCC'nin elde ettiği HbA1c sonuçlarının NGSP ile korelasyonunun çok iyi olmasına rağmen mutlak rakamlar açısından IFCC değerlerinin %1,5-2 daha düşük olduğu gözlenmektedir. Bu açıdan bakıldığında bugüne kadar DM tedavisinin faydaları ve komplikasyon derecelendirilmesi NGSP ve bağlı kurumlar tarafından raporlanmış olması nedeniyle, IFCC yöntemiyle elde edilen

test sonuçlarının NGSP değerlerine çevirimi sağlanmadan klinik fayda açısından kullanılmasının uygun olmayacağı görülmüştür^{39, 52} (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7: NGSP ve IFCC' nin % HbA1c ve HbA1c (mmol/mol) sonuçlarının dönüşümleri ve ortalama glukoz değerleri

NGSP HbA1c (%)	IFCC HbA1c (mmol/mol)	eAG (mg/dL)
5	31	97
6	42	126
7	53	154
8	64	183
9	75	212
10	86	240
11	97	269
12	108	298

Tablo 8: IFCC'nin belirlenmiş karşılaştırma yöntemlerine göre dönüşüm faktörleri

Belirlenmiş Karşılaştırma Yöntemleri	IFCC' den Belirlenmiş Karşılaştırma Yöntemlerine Dönüşüm	Belirlenmiş Karşılaştırma Yöntemlerinden IFCC'ye Dönüşüm
NGSP (ABD)	$NGSP = (0,09148 * IFCC) + 2,152$	$IFCC = (10,93 * NGSP) - 23,50$
JDS/JSCC (JAPONYA)	$JDS = (0,09274 * IFCC) + 1,724$	$IFCC = (10,78 * JDS) - 18,59$
Mono-S (İSVEÇ)	$Mono-S = (0,09890 * IFCC) + 0,884$	$IFCC = (10,11 * Mono-S) - 8,94$

Milano'da 2007 yılında IFCC ve diyabet cemiyetlerinin katılımıyla dünya çapında HbA1c sonuçlarının standardizasyonu için yapılan toplantıda alınan kararlar 2010'da güncellenmiştir. Bu kararlara göre:

1. HbA1c ölçümlerinin dünya çapında standardize edilmesi, geçerli referans yöntem olarak IFCC yönteminin kullanılması,

2. IFCC ve NGSP sonuçlarının birlikte rapor edilmesi ve birimlerin birbirine dönüşüm tablolarının ulaşılabilir olması,
3. Dergi editörlerince her iki birimi birlikte belirten makalelerin tercih edilmesi,
4. Rapor edilen terimin HbA1c olması önerilmiştir¹⁵.

Glikozile Hemoglobin Ölçüm Yöntemleri

Günümüzde çok sayıda glikozile Hb ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Rutin amaçlı kullanılan metotların çoğu analitin yük ve yapısal farklılığına dayalı ölçüm yapmaktadır. IFCC; HbA1c ve HbA0'ın beta-N-terminal heksapeptidini elde etmek için, Hb molekülünü endoproteinaz Glu-C enzimi ile molekülü enzimatik olarak parçalar, sonrasında HPLC/ESI/MS ve HPLC/CE metotları ile ölçüm sağlanır. Her iki metotta, IFCC tarafında referans metod olarak kabul edilmiştir¹³.

a. HPLC

HPLC; sıvı bir mobil fazın kullanıldığı, sahip olduğu gelişmiş pompa sistemiyle yüksek basınçlara çıkarak, istenilen akış hızında ayırma yapabilen bir kromatografi sistemidir. Ölçüm ilkesi olarak katyon değişim kromatografisidir. İyon değiştirici kromatografiden daha duyarlı bir yöntem olup rutinde kullanımı yaygındır. Ölçülecek örnekten hazırlanan bir miktar hemolizat katyon değiştirici reçineyle bir arada bulunan kolona enjekte edilir. 415 ve 690 nm'de absorbe olan hemoglobinler aşamalı olarak süzülür. Daha kolay süzülme için iyonik gücü artıran fosfat tamponu kullanılır. Yöntem hem HbA1c hem de HbA1 rapor edilebilir⁵³⁻⁵⁵.

Bu yöntemin dezavantajı; varyant Hb'lerin interferansa neden olmasıdır. HbF pozitif interferansa neden olurken, HbS ve HbC negatif interferansa neden olur. Hemolitik durumların negatif interferansa neden olduğu belirlenmiştir⁵³⁻⁵⁵.

b. İyon Değiştirici Kromatografi

İyon değiştirici kromatografi; Hb türlerini yük temeline göre ayırmaktadır. Pozitif yüklü Hb'nin iyon değiştirici kromatografide ölçümü için negatif yüklü katyon değiştirici reçine kullanılmaktadır. Ölçümü yapılacak örnek kolona uygulanmadan önce ön hazırlık aşamasına gereksinim duyar, bu aşamada

eritrositler hemolize edilerek hemolizat hazırlanır. Hemolizat kolona uygulanır, uygun tampon kullanılarak süzüntü elde edilir. Süzülen tamponun iyonik gücü, pH'sı, negatif yüklü katyon değiştirici reçine ve glikohemoglobinlerin erişkin Hb'den daha az pozitif yüklü olması, glikozile Hb'lerin ölçümünü sağlar. Kolondan elüe edilen fraksiyonların spektrofotometrede görünür dalga boyunda (415 nm) absorbanları okunarak glikozile Hb'lerin miktarı belirlenir. HbA1a + HbA1b + HbA1c toplamı HbA1 olarak kabul edilir. Farklı iyonik güce sahip ikinci bir tampon daha fazla pozitif yüklü asıl Hb (HbA) fraksiyonunun süzülmesi için kolona eklenir. Bu işlemde elde edilen eluatlar spektrofotometrede okunur (total hemoglobin). Glikozile Hb toplam Hb'nin bir yüzdesi olarak ifade edilir. Bu yöntemde en önemli sorun, eritrositlerin ön işlem sırasında iyi parçalanmaması, pre-HbA1c fraksiyonlarının kararlı olan ketoaminle birlikte süzülmesinden dolayı daha yüksek sonuçların elde edilmesidir. İyon değiştirici kromatografi yönteminde; HbF değeri yüksek olan örneklerde yüksek sonuçlar elde edilmektedir. HbF kolonu HbA1c ile birlikte terk etmesi bu soruna neden olmaktadır. Üremi, kurşun zehirlenmesi, alkol kullanımı, uzun süreli salisilat kullanımı Hb'ye bağlandığından, Hb'nin yükü değişecek ve pozitif interferansa neden olacaktır. Varyant Hb'lerin (HbS, HbC) varlığı ise negatif interferansa neden olmaktadır^{53, 54, 56}.

c. Affinite Kromatografisi

Bu yöntemde glikozile Hb'nin, glikozile olmayan fraksiyonlardan ayrılmasında affinite jel kolonları kullanılmaktadır. M-Aminofenilboronik asit, boncuklu agaroz veya cam fiberi gibi başka bir matrikse çapraz bağlar ile sabitlenmiştir. Boronik asit Hb'ye geri dönüşümsüz bir şekilde, Hb glukozunun cis-diol gruplarıyla bağlanmakta ve beş üyeli halka kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanma sayesinde glikozile Hb kolon üzerinde seçici olarak tutunabilmektedir^{53, 57}.

Bu yöntemde glikozile Hb'yi bağlı kompleksten çözmek ve süzmek için sorbitol kullanılmaktadır. Hb fraksiyonlarının (glikozile ve glikozile olmayan Hb) 415 nm dalga boyunda absorbanları okunarak glikozile Hb yüzde olarak hesaplanır. Affinite kromatografisinde labil ara ürün ihmal edilebilir seviyede interferansa neden olabilmektedir. Isı gibi çevre şartlarından etkilenmemektedir. Varyant Hb'ler (HbF, HbS, HbC) çok az etkileşim göstermektedir. Affinite

kromatografisi total glikozile Hb'yi ölçtüğünden dolayı diğer metotlara göre (HPLC) daha yüksek sonuçlar vermektedir^{53, 57}.

d. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi; bu yöntemde glikozile Hb ile Hb fraksiyonlarının elektriksel yük farklılıklarından faydalanarak ölçüm yapılır. Destek ortamı olarak agaroz jel kullanılır ve pH 6,3'te hazırlanan kan hemolizatları agaroz jel üzerine uygulanır. Hızlı Hb fraksiyonları elektriksel yüklerine göre HbA ve HbA1 fraksiyonlarının ayrışmasını sağlamış olur. Elde edilen sonuçlar kromatografik yöntemlerle uyumludur. Ortam pH'sı, ısı değişimleri ve iyonik güç çok az bir etkileşime neden olmaktadır. Varyant Hb'ler bu yöntemde interferansa neden olmaktadır. HbF, hemoglobin A1c ile aynı bölgeye göç ettiğinden pozitif interferansa neden olurken, HbS ve HbC ciddi etkileşime neden olmaz^{53, 58}.

e. HPLC/CE

Bu yöntemde içi silika ile kaplanmış 20-200 cm uzunluğunda küçük çaplı kapiller tüp kullanılır. Uç kısmı bir dedektöre bağlı olup yüksek voltaj uygulaması ile çalışır; Agaroz, selüloz ve asetat gibi klasik elektroferez destek ortamları kullanılmaz. Klasik elektrofereze göre çalışma süresi daha kısadır ve Hb fraksiyonlarını çok iyi ayırma yeteneğine sahiptir. HbA1c ölçümünde; HPLC/CE yöntemi, IFCC tarafından referans metod olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle yapılan ölçümde önce hemolizat elde edilir, sonrasında Hb molekülü Endoproteinaz Glu-c enzimi ile kesilir, HbA1c kantitasyonu HPLC/CE ile belirlenir^{13, 59}.

f. İzoelektrik Odaklanma

Destek ortamı üzerinde Hb varyantlarının izoelektrik noktalarına doğru göç etmeleri prensibine dayanır. İzoelektrik odaklanma; destek ortamı olarak kararlı bir pH gradiyenti gösteren poliakrilamid jel kullanılır. HbA1c; HbA1a, HbA1b, HbS ve HbF'den kolaylıkla ayrıştırılabilir. Ölçümde az miktarda analit kullanımı ve varyant Hb'lerle az miktarda interferans vermesi ölçüm metodunun avantajlarıdır. Dez avantajları ise; cihaz pahalılığı, yüksek maliyet, ön işlemlerin fazla oluşu ve otomasyona uygun olamamasıdır⁶⁰.

g. Kolorimetrik Yöntem

Bu yöntemde ölçüm öncesi ön işlemler gerekmektedir. HbA1c'ye bağlı glukoz kalıntısı 100°C'de ve oksalik asit varlığında dehidratasyona uğratarak 5-hidroksimetil furfural oluşturur. Bu yapıya tiyokarbitürük asit eklenerek renk reaksiyonu oluşturularak ölçüm yapılır. Bu yöntem HbA1 ve HbA1 olmayan tüm glikoproteinleri ölçer^{54, 61}.

h. İmmün Ölçüm

Bu yöntemle HbA1c ölçümünde, saflaştırılmış insan HbA1c'sine karşı geliştirilmiş koyun anti serumu kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise, hemoglobinin beta zincirinin N-terminal ucundaki ilk birkaç aminoasite (ilk 4-8 aminoasit) karşı geliştirilen antikolar kullanılmıştır. Poliklonal ve monoklonal antikor temeline dayalı birçok immün ölçüm metodu geliştirilmiştir. Lateks aglütinasyonunun immün aracılı inhibisyonu metodunda varyant Hb'ler ciddi bir interferansa neden olmazlar, ancak HbF yüksekliğinde sonuçlar daha düşük ölçülebilmektedir. Ölçüm için ön işlem gerektirmemesi ve otomasyona uygun oluşu birçok laboratuvarında kullanım sıklığını artırmaktadır. Bu ölçümlerin HPLC ile iyi bir korelasyon içinde oldukları fakat değerlerin HPLC sonuçlarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Düşük değerlerin farklı kalibrasyondan veya HPLC yönteminde HbA1c ile birlikte süzülen maddelerin interferansından kaynaklanabileceği belirtilmiştir^{61, 62}.

i. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri; kütle/yük (m/z) oranlarına göre, diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadırlar. Cihazda her iyonun göreceli bolluğunun kütle/yük oranı fonksiyonuna göre grafik haline getirildiği bir kütle spektrumu oluşturularak sonuçlar tayin edilir⁶³.

HPLC/ESI/MS yöntemi HbA1c ölçümünde IFCC tarafından referans metot olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle yapılan ölçümde önce hemolizat elde edilir, sonrasında hemoglobin molekülü Endoproteinaz Glu-c enzimi ile kesilerek heksapeptitler elde edilir. Hazırlanan örnekler HPLC/ESI/MS cihazına verilir. Bu metotta HPLC kısmı ile ayırıştırma, kütle spektrometrisi kısmı ile de kütle/yük

oranlarına göre heksapeptitler tayin edilir. Glikozile heksapeptidlerin toplam heksapeptidlere oranı HbA1c değerini vermektedir⁶⁴.

HbA1c Ölçümünde İnterferans Nedenleri

HbA1c düzeyi normal yaşam süresine sahip eritrositlerde daha değerlidir. Eritrosit; yaşam süresini kısaltan tüm durumlarda ölçüm metodundan bağımsız olarak HbA1c düzeyi azalır. Hemolitik anemiler ya da son dönemde ciddi kan kaybı geçiren hastalarda genç eritrositlerin artmasına bağlı olarak HbA1c düzeyi yanlış olarak düşük bulunur. Fe eksikliği anemisinde yaşlı eritrositlerin oranının artmasına bağlı olarak yüksek HbA1c düzeyleri bulunabilir. HbA1c düzeyi bu hastalarda da glisemi moniterizasyonunda kullanılabilir ancak sonuçlar referans aralığına göre değil, hastanın önceki düzeyine göre değerlendirilir⁶⁵.

Başka bir hata kaynağı, DM kaynaklı böbrek yetmezlikli hastalarda ürenin Hb'ye bağlanmasıyla oluşan karbamillenmiş Hb ya da fazla miktarda aspirin kullanan hastalarda oluşan asetillenmiş Hb'dir. Karbamillenmiş Hb, HbA1c'ye benzer bir izoelektrik noktaya sahiptir, bu nedenle yüke dayalı ölçüm yapan metodları (katyon değiştirici kromatografi, elektroforez ve izoelektrik odaklama gibi) daha yüksek oranda interfere eder. İmmünoassay ve boranat affinite kromatografisinin karbamillenmiş Hb'den ciddi olarak etkilenmediği, HPLC-MS ve HPLC-CE ile yapılan ölçümler üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir⁵⁸.

Vitamin C ve E'nin Hb'nin glikozillenmesini engelleyerek yanlış düşük sonuçlara neden olduğu düşünülür. Hipertrigliseridemi, hiperbilirubinemi, kronik alkolizm, opiat kullanımının bazı ölçüm metodlarını etkileyip yanlış yüksek sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir^{13, 54}.

Orak hücre hastalığı (HbSS), homozigot HbC hastalığı (HbCC), HbSC hastalığı, HbF yüksekliği ve Beta talaseminin de dahil olduğu pek çok hemoglobinopatide HbA1c ölçüm metodları farklı oranlarda interfere olur. HbS, ve HbC, HPLC gibi yüke bağlı ayırım yapan ölçüm tekniklerinde yanlış düşük sonuçlara neden olurken, HbF HPLC ile yanlış yüksek sonuçlara, immün assay yöntemlerinde ise yanlış düşük sonuçlara neden olabilmektedir. Bu tip hastalarda varyant Hb'nin yanında artmış transfüzyon gereksinimi, eritrosit yaşam süresinin etkilenmesi gibi etkenler de ölçümün değerini kısıtlar. HbA1c ölçümünün sorun

taşıdığı bu tür durumlarda ve diyabetik gebelerde daha sık takip yapılması gerektiğinden ortalama 2 hafta önceki glisemi düzeyini gösteren fruktozamin ölçümü gibi alternatif testlere gereksinim duyulur^{13, 66}.

Hiperlipidemi ve hiperbilürübinemi metoda spesifik olarak HbA1c ölçümünde interferansa neden olabilir. Bilürübin; tam kan kullanılan örneklerde Hb ile birlikte hızlı göç etmesi nedeniyle yük ayrımına göre ölçüm yapılan yöntemlerde yüksek HbA1 sonuçlarına neden olabilmektedir. Hiperlipidemi ise 415 nm dalga boyunda yapılan okumalarda interferansa neden olabilirler^{13,54}.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Grubu ve Örnek Alımı: Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Endokrinoloji Polikliniğine başvuru yapan DM tanısı almış 27 örnekten oluşan DM grubu ve hiperglisemi ve sistemik bir hastalığı olmayan 27 sağlıklı birey, normal grup olarak çalışmaya dahil edildi.

Çalışmada, gruplar belirlenirken kadın ve erkek ayrımı yapılmazken, 18 yaş altı bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

DM grubunda; anemik, ve varyant Hb'si olan bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

Normal grupta; sistemik hastalığı, anemik, üremik ve varyant Hb'si olan bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulun 20.09.2012 tarihli ve 2012/308 sayılı kararınca onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol gruplarına ait yaş, boy, kilo, sigara ve alkol kullanımı, ek bir kronik hastalık varlığı, aile öyküsü ve ilaç kullanımı ile ilgili bilgiler kaydedildi.

Tüm gruplara ait bireylerin venöz kanları EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri LC/MS, HPLC ve immün assay yöntemlerinin örnek hazırlama prosedürlerine göre ayrılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler çalışma gününe kadar uygun sıcaklıkta saklandı.

İmmün Assay Metod ile HbA1c'nin Çalışılması

Tüm gruplara ait bireylerin venöz kanları EDTA'lı tüplere alınıp örnekler günlük olarak Roche Cobas İntegra 800 analizöründe Tina-quant HbA1c Gen.2 kiti (Kat. No.04528123 190 Sistem-No 07 6850 2) ile çalışıldı. Antikoagüle edilmiş tam kan örneği Cobas Integra hemoliz edici reaktifi ile otomatik olarak hemolize edilir. Bu yöntemde, lökositlerin parçalanması sonucu neden olabileceği interferansı ortadan kaldırmak için hemoliz reaktifi içinde lökositleri parçalanmasını engelleyen deterjan olarak Tetradesiltrimetilamonyum bromür (TTAB) kullanılır. Kararsız HbA1c'nin uzaklaştırılması için numunede ön işlem gerekli değildir.

β -zinciri N-terminal kısmında glikolize olan ve HbA1c'ninkine özdeş antikor tanıyabilir bölgeleri olan tüm hemoglobin varyantları bu test çalışmasında tayin edilir. Sonuç olarak, üremi veya daha sıklıkla hemoglobinopati (HbAS, HbAC, HbAE) görülen diyabet hastalarının metabolik durumu bu testle tayin edilebilir. HbA1c tayini, hemolize tam kan için türbidimetrik inhibisyon immünolojik teste (TINIA) dayanmaktadır.

HPLC ile HbA1c'nin Çalışılması

Tüm gruplara ait bireylerin venöz kanları EDTA'lı tüplere alınıp örnekler çalışma gününe kadar -20 °C saklandı. Örnekler çalışma gününde oda ısısına getirilerek kullanıldı. Çalışmada; Biorad D10 (Bio-Rad laboratories. Inc. Hercules. United States) HPLC cihazı, D-10™ Dual program HbA2/HbF/HbA1c kalibratör seti (referans numarası: 220 -0201) ve seviyesi % 10,3 olan yüksek kontrol ile seviyesi % 5,4 olan düşük kontrol seviyeleri kullanıldı. Çalışmamızda yüksek kontrol seviyesi ve düşük kontrol seviyeleri firma tarafından kabul edilen aralıklardaydı.

Biorad D10 HPLC cihazı; bir iyon değişim kromatografisidir. HbA1c; kolonda süzülerek 415 nm'de absorbansı ölçülür. İlk örnek bir kromatogram oluşturulur, sonrasında HbA1c piki GAUSS logaritması kullanılarak ölçümü yapılır.

LC/ESI/MS Metodu ile HbA1c'nin Çalışılması:

Kullanılan Örnekler

HbA1c düzeyi ölçüm yönteminin LC/ESI/MS/MS yöntemi ile çalışılması için Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüp içerisine alınmış tam kan örnekleri kullanıldı.

a. Cihaz ve Kimyasal Maddeler

Cihazlar ve Ekipmanlar

- LC/MS Cihazı (MS kısmı 6460 Triple Quadropole Agilent, LC kısmı Agilent 1200 Series cihazı)
- ZORBAX SB-CN (2,1*150 mm, 5 µm) analitik kolon (AGİLLENT)
- Santrifüj (Nüve NF 800, Nüve Sanayi ve Ticaret AŞ, Ankara, Türkiye)
- Derin dondurucu (-80 °C, Lab -85 °C, Elcold)
- Derin dondurucu (-20 °C, Uğur Soğutma Makinaları San. Ve Tic. A.Ş.)
- Pipet ucu
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Pastör pipeti
- Cam tüpler
- Ependorf tüpü
- pH-metre
- Hassas terazi
- Vorteks
- Saf su cihazı

Kimyasal Maddeler

- Asetik Asit (HPLC grade) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Asetonitril (HPLC grade) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Amonyum Bikarbonat (Sigma-Aldrich, ABD)
- Amonyum Asetat (Sigma-Aldrich, ABD)
- Potasyum Siyanür (KCN) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Beta-Morfolino-Ethan Sülfonik Asit (MES) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Endoproteinaz Glu-C (Roche, Almanya)
- Etilendiamintetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Ortofosforik Asit (Sigma-Aldrich, ABD)
- Trifluoroasetik Asit (TFA) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich, ABD)
- HPLC Grade Deiyonize Su

b. Çözeltilerin Hazırlanması

Mobil fazların Hazırlanması

Mobil Faz A (0.25 mL/L TFA – HPLC grade su) 250 µL TFA üzerine HPLC grade deiyonize su eklenerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Mobil Faz B (0.23 mL/L TFA – Asetonitril) 230 µL TFA üzerine HPLC grade asetonitril eklenerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Tampon Çözeltiler

İnkübasyon Solüsyonu (Salin 0.15 mol/L) 8.776 g NaCl tartılarak 1000 mL HPLC grade deiyonize su içerisinde çözüldü.

Sindirim Tamponu (50 mmol/L) 3.854 g amonyum asetat tartılarak 1000 mL HPLC grade deiyonize su içerisinde çözüldü. Asetik asit kullanılarak pH'sı 4.3'e ayarlandı.

Saklama Tamponu

MES (50 mmol/L) : 9.760 g

KCN (10 mmol/L) : 0.651 g

EDTA (1 mmol/L) : 0.372 g, tartılarak HPLC grade deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 1 N NaOH kullanılarak pH'sı 6.2'ye ayarlandı.

Endoproteinaz Glu-C

50 µg liyofilize endoproteinaz Glu-C enzimi üzerine 250 µL HPLC grade deiyonize su eklenerek 250 µL olacak şekilde hazırlandı.

c. Örneklerin Hazırlanması

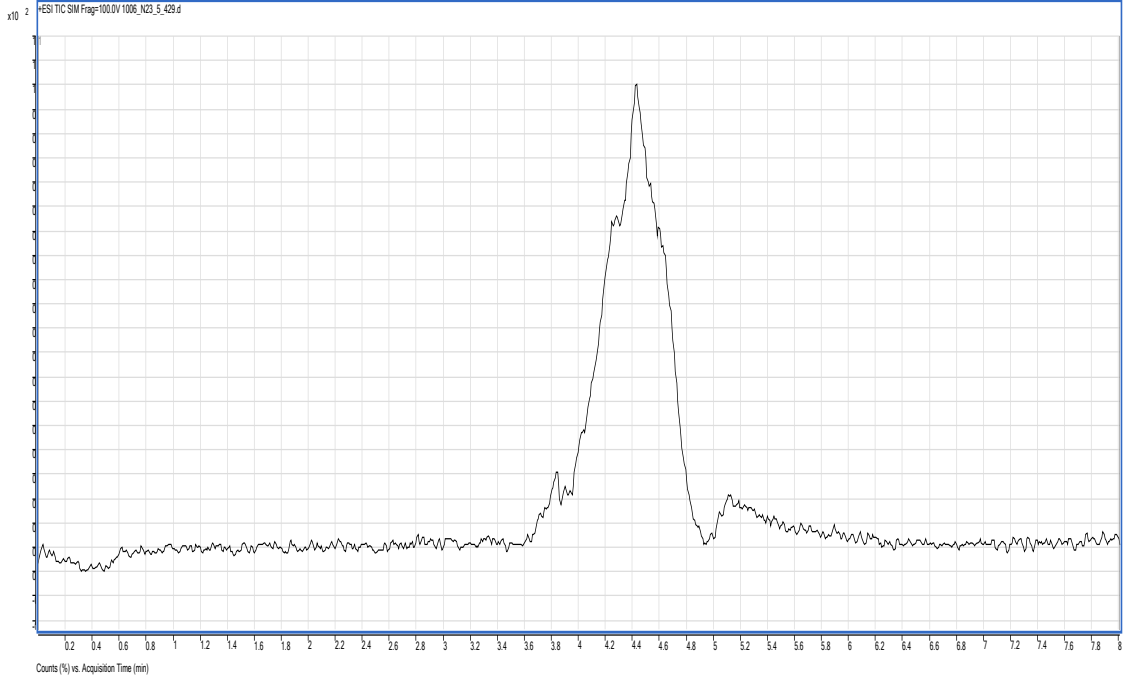
LC/ESI/MS Yöntemi İçin örnek Hazırlık Çalışmaları

Çalışmamıza ilk olarak ACE CN kolon (2.1 x 20 mm, 5 µm) ile Tablo 9'daki gradiyent⁶⁷ kullanarak denemelere başlandı.

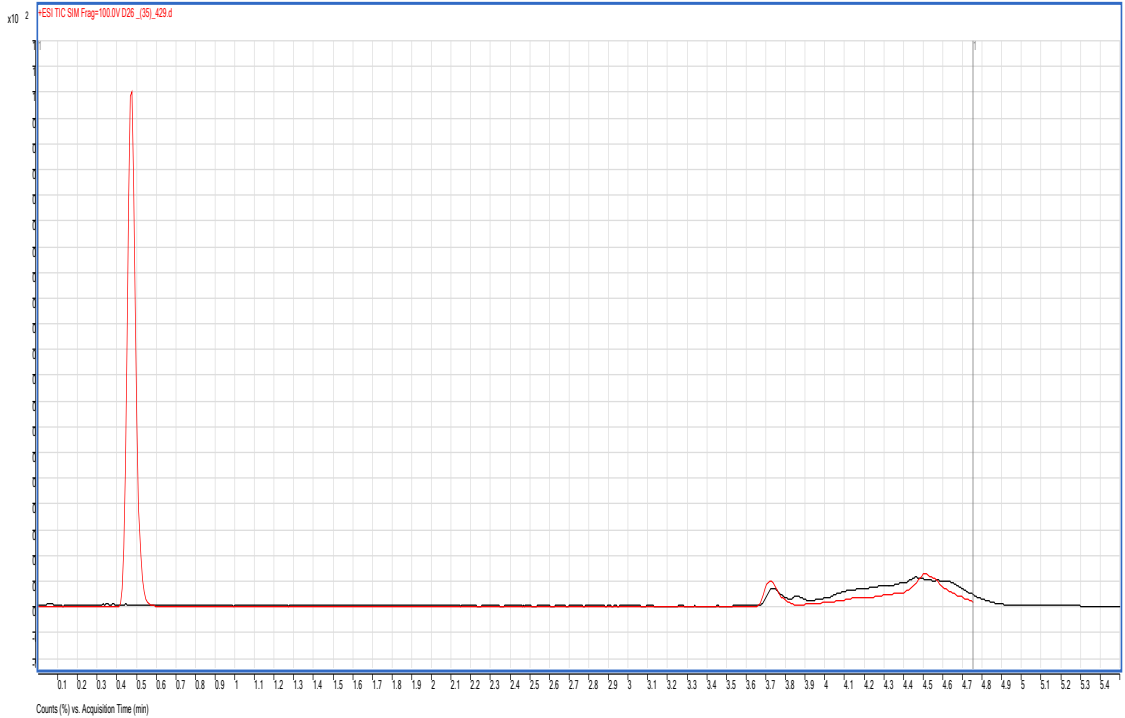
Tablo 9: ACE CN kolon ile yaptığımız modifiye örnek hazırlık çalışmalarında kullanılan mobil faz akım gradiyenti

Zaman (dk)	Mobil Faz A (%) 0,1 Formik Asit/Distile Su	Mobil Faz B (%) 0,1 Formik Asit/Asetonitril
0	100	0
1	0	0
1,5	95	5
2	95	5
2,01	0	100
3	0	100
3,01	100	0
8	stop	Stop

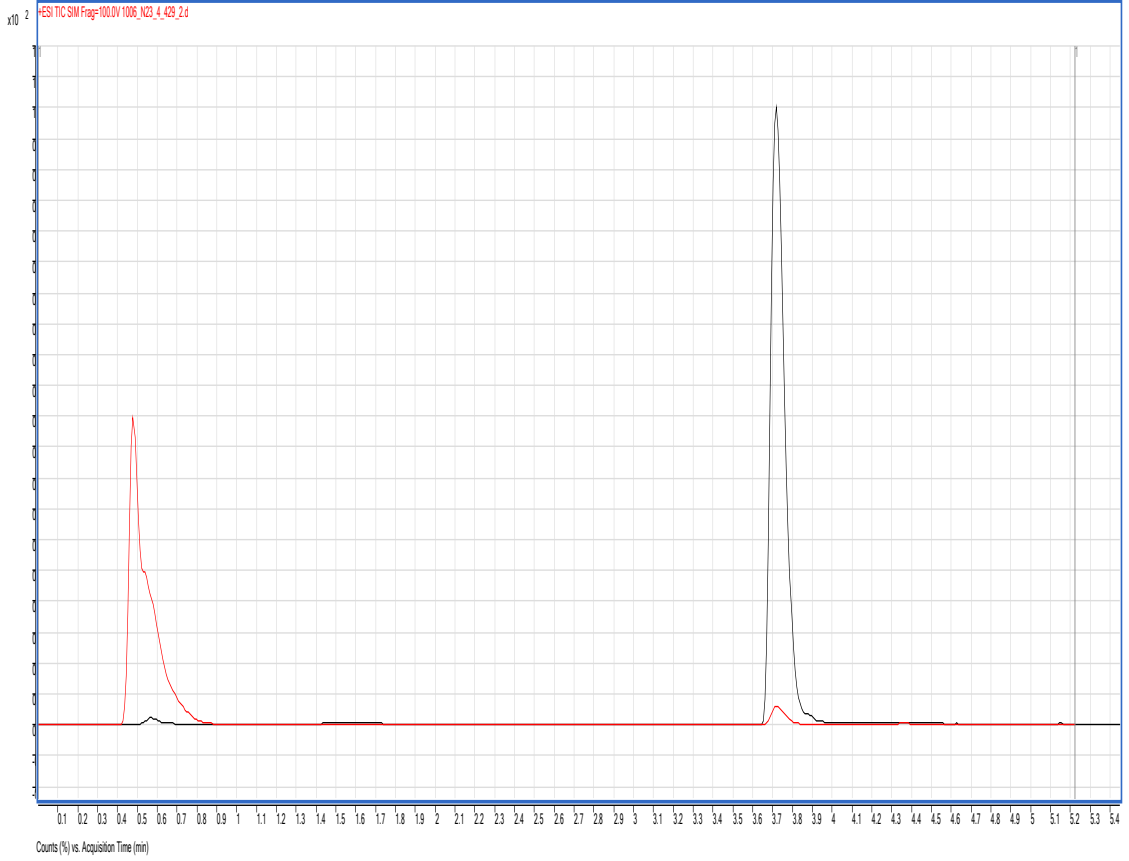
IFCC'nin tarafından önerilen, 30 µl saklama tamponu-hemolizat, 50 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 420 µl sindirim tamponu eklenerek hazırlanan prosedür denendi. Bu denemeler sonucunda istenilen kütle kromatogramları elde edilemedi. Takiben saklama tamponu-hemolizat oranlarını değiştirilip, enzim miktarları artırılarak hazırlanan değişik örneklerle çalışmalar tekrarlandı (Şekil 6, 7, 8).



Şekil 6: 5 µL saklama tamponu-hemolizat, 30 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 215 µL sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromatogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)

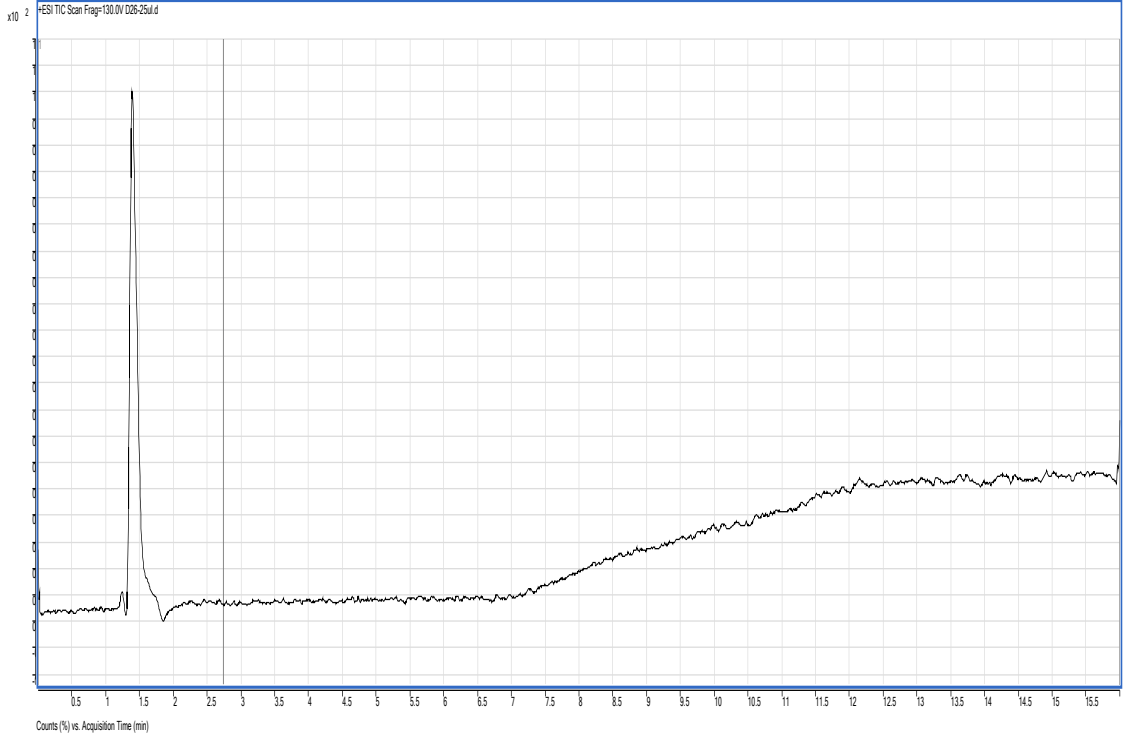


Şekil 7: 5 µL saklama tamponu-hemolizat, 35 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 210 µL sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromatogramı (SIM modu 429,3 m/z)



Şekil 8: 4 µL saklama tamponu-hemolizat, 30 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 216 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromotogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)

ACE kolon ile yaptığımız çalışmalar sonrasında 348,3 ve 429,3 m/z oranları için net kütle kromotogramları elde edilemediğinden takip eden denemelere, IFCC tarafından kullanılan ZORBAX SB-CN (2,1*150 mm, 5 µm) analitik kolon ile devam edildi. IFCC'nin tarafından önerilen, 30 µl saklama tamponu-hemolizat, 50 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 420 µl sindirim tamponu eklenerek hazırlanan prosedür denendi¹². Ardından tüm hacimler yarıya düşürülerek (15 µl saklama tamponu-hemolizat, 25 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 210 µl sindirim tamponu) çalışma tekrarlandı. Elde edilen kütle kromogramı Şekil 9'daki gibidir.



Şekil 9: 15 µL saklama tamponu-hemolizat, 25 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 210 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromatogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)

Sonrasında yapılan denemelerde en net piklerin elde edildiği 4 µl saklama tamponu-hemolizat, 30 µl Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 216 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örnekler için IFCC'nin belirlediği gradiyent ve ZORBAX SB-CN analitik kolon kullanılarak çalışmaya devam edildi.

Çalışmamızda Kullanılan Örnek Hazırlama Prosedürü

EDTA'lı tüpe alınan tam kan örneklerinden 1 ml alınarak cam tüp içerisine aktarıldı. Tam kan 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek lökositlerin ve trombositlerin bulunduğu "Buffy Coat" adı verilen üstte kalan süpernatant ayrıldı. Eritrosit pelleti üzerine 10 mL salin solüsyonu eklenerek alt üst edildi ve 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak eritrosit pelleti aynı şekilde tekrar yıkandı. Bu işlemden sonra elde edilen pellet üzerine 10 mL salin solüsyonu eklenerek 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında örnekler 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Kalan eritrosit pelleti üzerine 1 ml su eklenerek 5 dakika vorteksledi ve eritrositler hemoliz edildi.

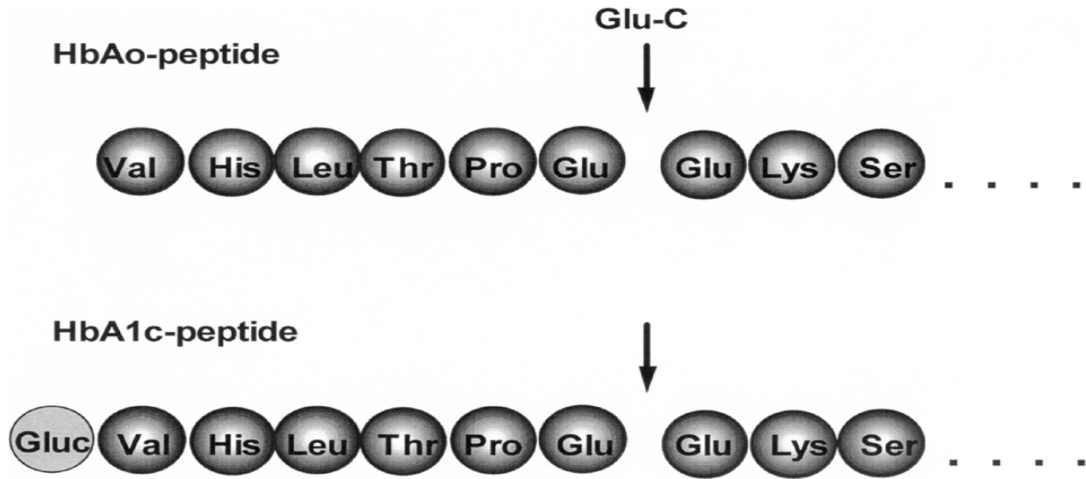
Hemolizat saklama tamponu ile 30 µL çözelti içinde 1 mg Hb oranı olacak şekilde hazırlandı ve 3000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.

Hb düzeyleri; SIEMENS XT 2000i cihazında, SLS-Hemoglobin metodu ile fotometrik olarak ölçüldü.

HbA1c ölçümü için üstteki plazma kısmı kullanıldı. Santrifüj edilerek hücre debrisini uzaklaştırılan örneklerden iki seri hazırlandı. 2. seri örnekler tedbir amaçlı saklanmak üzere hazırlandı. Saklama tamponu ile birlikte hazırlanan örnekler -20°C'de saklandı. Hazırlanan bu örneklerden 4 µL alınıp, üzerine 30 µL endoproteinaz Glu-C eklenerek, sindirim tamponu ile 250 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra -80°C'de dondurularak saklandı.

d. Endoproteinaz Glu-C enziminin çalışma prensibi

Endoproteinaz Glu-C; Hb molekülünü beta zincirinin amino terminal ucundan 6 amino asitlik bir peptidin (hekzapeptid) ayrılmasına neden olmaktadır (Şekil 10). Bunun sonucunda hekzapeptitler oluşmaktadır. Glikozile hekzapeptidlerin, toplam hekzapeptidlere oranı bize HbA1c değerini vermektedir.



Şekil 10: Hb Molekülünde Endoproteinaz Glu-C Enziminin Proteolitik Bölgesi

e. LC-MS Cihazının Koşullarının Hazırlanması

Sıvı Kromatografisi Koşulları

Analitik kolon	: ZORBAX SB-CN (2,1*150 mm, 5 µm)
Kolon ısısı	: 50°C (+/- 0,8)
Mobil faz A	: 0.25 ml/L TFA - HPLC grade su
Mobil faz B	: 0.23 ml/L TFA - Asetonitril
Akım hızı	: 0,3 ml/dakika
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL
Mobil faz akım gradienti	: (Tablo 10) (IFCC tarafından önerilen prosedür kullanıldı ¹³)

Tablo 10: Mobil Faz Akım Gradiyenti

Zaman (dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)
0	100	0
3	100	0
9	95	5
13,5	95	5
13,6	0	100
17	0	100
17,1	100	0
23	100	Stop

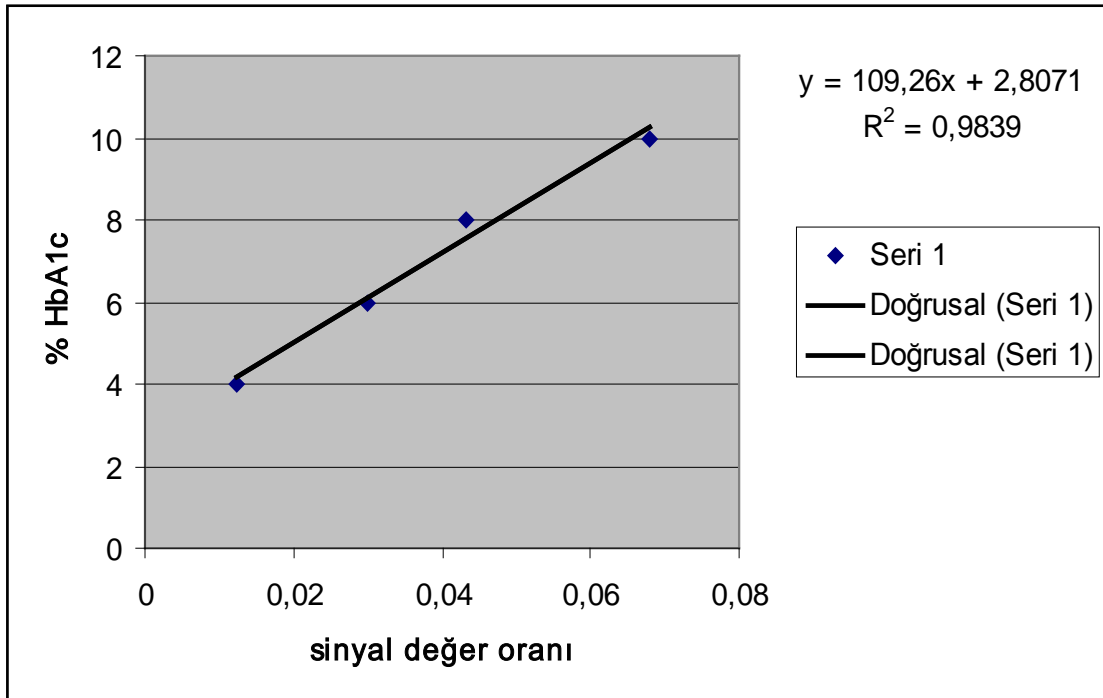
Kütle Spektrometresi Koşulları

İyonizasyon modu	: ESI
İyon tarama modu	: SIM modu (348,3 (HbA0) ve 429,3 m/z (HbA1c oranındaki iyonlar SIM modunda birlikte taranmıştır.)
Polarizasyon	: Pozitif polarizasyon
Gaz ısısı (°C)	: 200 °C
Gaz akış hızı (l/dakika)	: 10
Analiz süresi	: 23 dakika
Fragmantasyon voltajı	: 135

f. Kalibrasyon ve Hesaplama

HPLC cihazı ile HbA1c düzeyi % 10 olarak ölçülmüş bir tam kan örneğinden dilüsyonla % 4, 6, 8 ve 10 HbA1c konsantrasyonlarında örnekler hazırlandı. LC/ESI/MS cihazının koşulları sağlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen örnekler uygulanmadan önce vortekslenip sisteme verildi. Bekletilen örnekler vortekslenmeden verildiğinde, çökmeden kaynaklı olarak sonuçlarda hatalar meydana gelmektedir. HbA1c'yi temsil eden peptidlerin kütle/yük değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Bundan sonraki örneklerin HbA1c içerikleri standart olarak hesaplandı. Oluşturulan eğri örneklerin % HbA1c düzeylerinin hesaplanmasında kullanıldı.

Standart grafik oluşturulmasında ilk aşama; 429,3 kütle/yük değerinde sinyal veren glike heksapeptidin sinyal değeri ve 348,3 kütle/yük değerinde sinyal veren glike olmayan heksapeptidin sinyal değeri hesaplandı. Sonrasında 429,3 kütle/yük sinyal değeri, 348,3 ve 429,3 kütle/yük sinyal değerleri toplamına bölünür ve bu grafiğimizdeki X eksenini oluşturur. Grafikteki Y eksenini HPLC ile ölçülen % HbA1c değerlerini oluşturur¹³(Şekil 11).



Şekil 11: LC/ESI/MS Yöntemi İçin % HbA1c Kalibrasyon Eğrisi

İstatistiksel Değerlendirme

İmmün assay ve HPLC yöntemleriyle sağlıklı ve diyabetik gruplarda yapılan % HbA1c ölçümleri normal dağılıma sahip iken, LC/ESI/MS ile yapılan ölçümler normal olmayan dağılıma sahipti. Normal dağılıma uygunluk kontrolleri Shapiro Wilks testi ile bakıldı. Normal dağılıma sahip parametreler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilirken, normal dağılıma sahip olmayan parametre için medyan ve quartil değerleri verilmiştir. Normal dağılan parametrelerde iki grup ortalaması arasındaki farklılık kontrolüne student t testi ile bakılırken, normal dağılmayan parametre için Mann Whitnet U testi ile bakıldı. Gruplar arasındaki farklılığı görsel olarak sunmak için normal dağılan parametreler için Error Bar grafiği, normal dağılmayan parametre için BoxPlot grafiği çizildi. İki yöntem arasındaki uyumun görsel gösterimi için Bland Altman grafikleri çizildi.

Ayrıca üç yöntemin her iki grupta da uyumuna Sınıf İçi Korelasyon katsayısı analizi ile bakıldı. İstatistik değeri olarak katsayı değeri ve güven aralığı verildi. İstatistik analizlerde SPSS 11.5 ve MedCalc®v.10.3 paket programları kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamıza denek olarak 18 yaş üstü, 27 sağlıklı birey ve 27 diyabetik hasta dahil edilmiştir. Sağlıklı grupta; varyant Hb, anemi, hiperglisemi, kronik hastalıklar, C vitamini ve aspirin kullanımı gibi çalışmamızda karşılaştıma yaptığımız immün assay, HPLC ve LC/ESI/MS yöntemleriyle interferansa neden olacak durumlar ekarte edilmiştir. Diyabetik grupta; varyant Hb, anemi ve C vitamini kullanımı gibi çalışmamızda karşılaştıma yaptığımız immün assay, HPLC ve LC/ESI/MS yöntemleriyle interferansa neden olacak durumlar ekarte edilmiştir.

İmmün assay yöntemi için tekrarlanabilirlik

Roche Cobas İntegra 800 analizöründe precı kontrol norm (lot numarası; 658875, % HbA1c değeri 6,04) ve precı kontrol path (lot numarası; 658876, % HbA1c değeri 10) olan kontrolleri gün içi tekrarlanabilirlik için 10 defa ve günler arası tekrarlanabilirlik için 10 gün ardı ardına çalışılmış ve ortalama, SD ve CV değerleri hesaplanmıştır (Tablo 11 ve 12).

Tablo 11: % HbA1c hedef değeri 6,04 olan, Roche Cobas İntegra 800 cihazında kullanılan düşük kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması

Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	6,14	3,93	6,14	4,22
2	5,96		6,48	
3	6,43		6,33	
4	6		5,79	
5	5,76		5,95	
6	6,38		5,73	
7	6,22		6,24	
8	6,45		5,82	
9	5,91		6,38	
10	5,83		5,92	
Ort ± SD	6,108± 0,2406		6,078± 0,2565	

Tablo 12: % HbA1c hedef değeri 10 olan, Roche Cobas İntegra 800 cihazında kullanılan yüksek kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması

Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	10,32	3,34	10,32	3,82
2	10,54		10,58	
3	10,31		10,49	
4	9,78		10,36	
5	10,45		9,62	
6	9,68		9,68	
7	9,64		10,56	
8	10,37		10,6	
9	9,72		9,83	
10	10,36		9,73	
Ort ± SD	10,107± 0,3378		10,177±0,3895	

HPLC Yöntemi İçin Tekrarlanabilirlik

Biorad D10 HPLC cihazında hedef değerleri % 5,4 ve %10,3 olan kontroller ile gün içi tekrarlanabilirlik için 10 defa ve günler arası tekrarlanabilirlik için 10 gün ardı ardına çalışılmış ve ortalama, SD ve CV değerleri hesaplanmıştır (Tablo 13 ve 14).

Tablo 13: % HbA1c hedef değeri 5,3 olan, Biorad D10 HPLC cihazında cihazında kullanılan düşük kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması

Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	5,5	3,87	5,5	4,4
2	5,1		5,2	
3	5,2		5,3	
4	5		5,1	
5	4,9		5	
6	4,8		5	
7	4,9		4,9	
8	5,1		4,7	
9	5,2		4,8	
10	4,9		5,1	
Ort ± SD	5,05± 0,2061		5,01± 0,2624	

Tablo 14: % HbA1c hedef değeri 10,3 olan, Biorad D10 HPLC cihazında cihazında kullanılan yüksek kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması

Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	10,5	3,47	10,5	3,9
2	10,4		10,7	
3	10,3		10,4	
4	10,3		10,2	
5	9,7		9,8	
6	10,1		9,9	
7	9,8		9,5	
8	9,6		9,7	
9	9,7		9,6	
10	9,9		9,8	
Ort ± SD	10,06± 0,349		10,01± 0,337	

Çalışmamız ile IFCC'nin Örnek Hazırlama Farklılığı

Çalışmamızda referans yöntem olarak (IFCC tarafından HPLC/CE ile birlikte) kabul edilen LC/ESI/MS yöntemi IFCC'nin belirlediği prosedüre göre hazırlanmıştır. Örnek hazırlama prosedüründe saklama tamponu- hemolizat (Saklama tamponu hemolizat oranı aynı (1mgHb/30 µL saklama tamponu)), endoproteinaz Glu-C enzimi ve sindirim tamponu ekleme oranlarında farklılık vardır (Tablo 15).

Tablo 15: IFCC ve Çalışmamızdaki Örnek Hazırlama Farklılığı

	Saklama Tamponu - Hemolizat	Endoproteinaz Glu-C Enzimi	Sindirim Tamponu
IFCC	30 µL	50 µL	420 µL
Çalışmamız	4 µL	30 µL	216 µL

LC/ESI/MS Yöntemi İçin Tekrarlanabilirlik

Çalışmamızda LC/ESI/MS yöntemi için; gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Aynı örnekten gün içi ardışık 10 tekrar ve ardışık 10 günde, günde 1 defa olmak üzere tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Günler arası tekrarlanabilirlik için hazırlanan örnek 10 porsiyona ayrılıp, -80 °C' de saklandı. LC/ESI/MS yöntemiyle 5,1 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışmasında; gün içi tekrarlanabilirlik için % CV 2,33 (ortalama±SD= 5,09± 0,1187), günler arası tekrarlanabilirlik için %CV 3,12 (ortalama±SD= 4,998± 0,156) olarak bulunmuştur(Tablo 16).

Tablo 16: LC/ESI/MS yöntemiyle 5,1 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışması

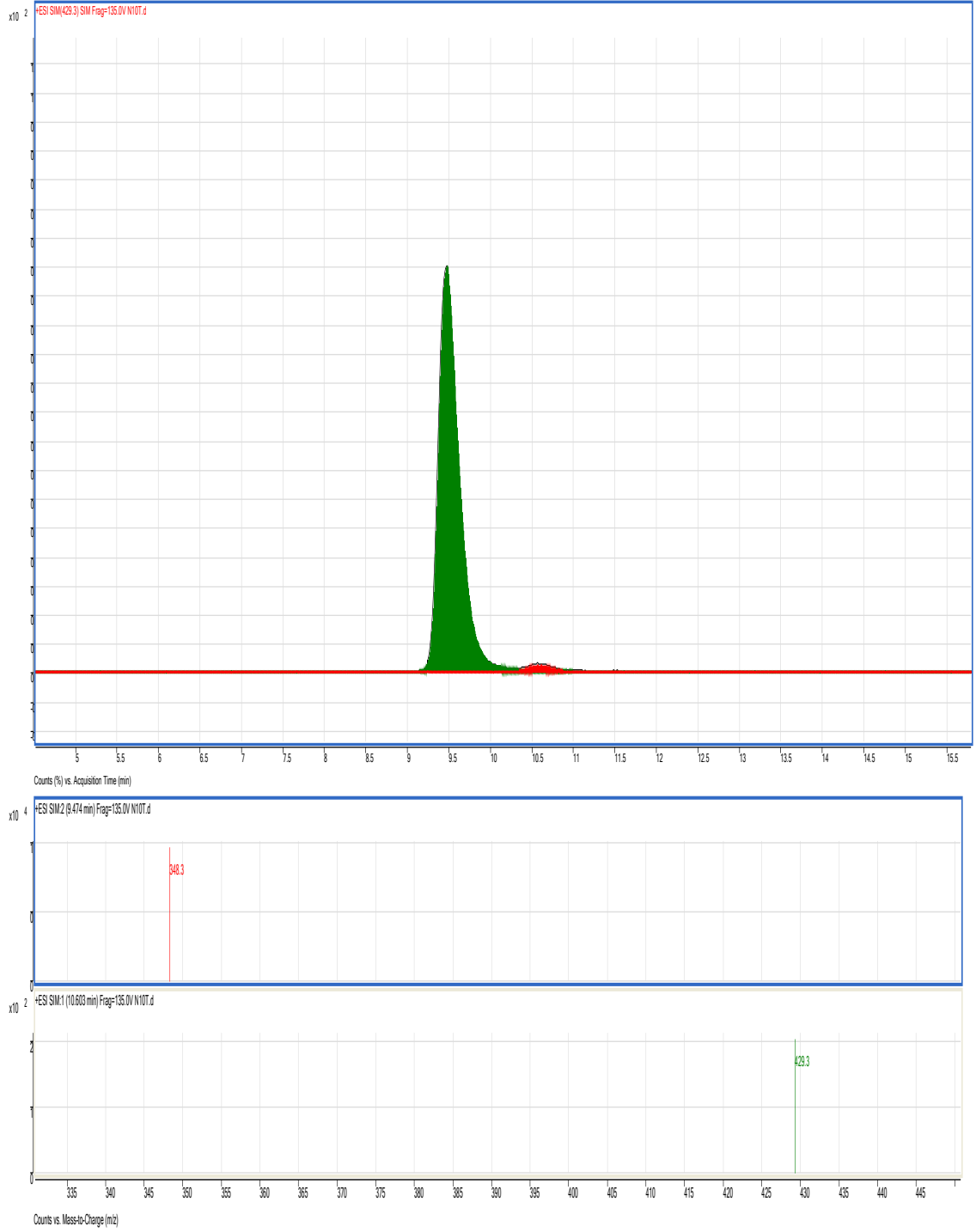
Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	5,1	2,07	5,1	2,3
2	5,16		5,24	
3	5,06		5,18	
4	4,9		5,02	
5	4,86		4,96	
6	5,2		4,84	
7	5,1		4,9	
8	5,16		4,98	
9	5,12		4,98	
10	5,1		5,04	
Ort ± SD	5,09± 0,1187		4,998± 0,156	

LC/ESI/MS yöntemiyle 8,1 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışmasında; gün içi tekrarlanabilirlik için % CV 2,61 (ortalama±SD= 8,08± 0,2115), günler arası tekrarlanabilirlik için %CV 3,04 (ortalama±SD= 8,058± 0,2456) olarak bulunmuştur(Tablo 17).

Tablo 17: LC/ESI/MS yöntemiyle 8,1 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışması

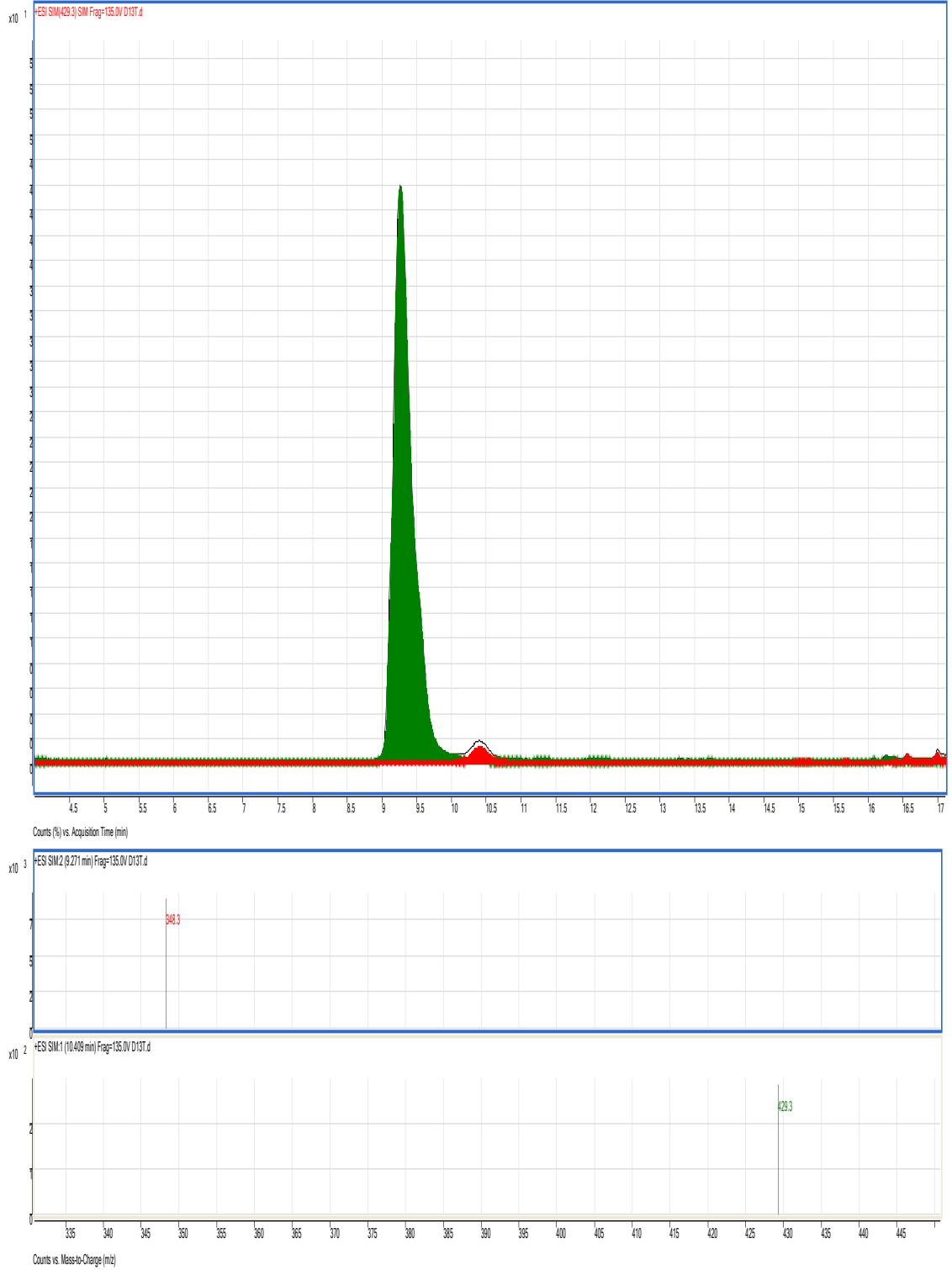
Ölçüm No	Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
	% HbA1c	% CV	% HbA1c	% CV
1	8,1	1,74	8,1	1,9
2	8,24		8,3	
3	8,02		8,24	
4	8,28		8,18	
5	8,14		8,12	
6	8,1		8,06	
7	8,2		8,22	
8	7,98		7,9	
9	7,9		7,84	
10	7,82		7,88	
Ort ± SD	8,082± 0,2115		8,058± 0,2456	

LC/ESI/MS yöntemi ile çalışılan sağlıklı grup 10 no'lu örneğin kütle kromatogramı ve elde edilen sinyal grafiği Şekil 12' de gösterilmiştir.



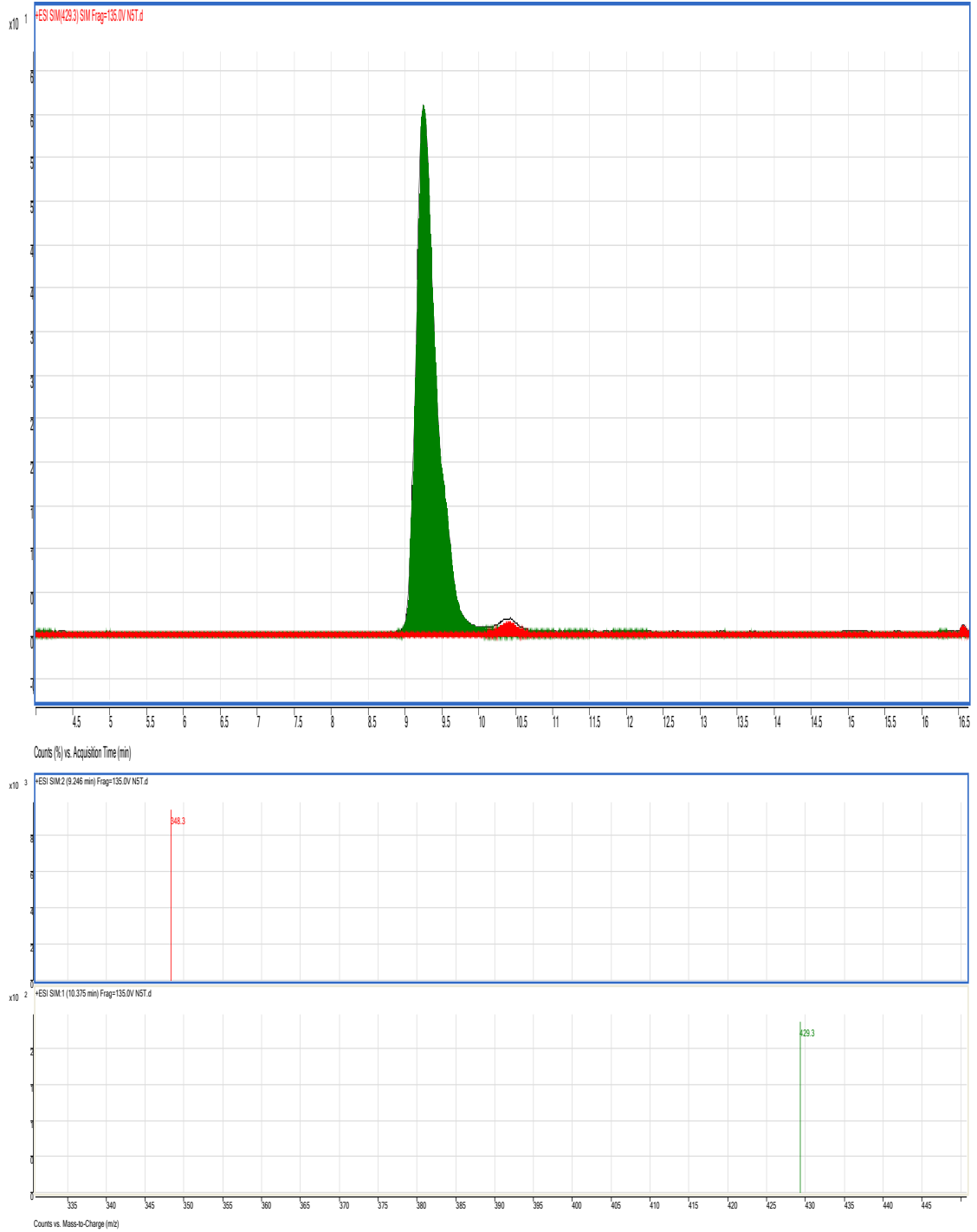
Şekil 12: Sağlıklı grup 10 no'lu örneğin kütle kromatogramı ve elde edilen sinyal değer grafiği

LC/ESI/MS yöntemi ile çalışılan Diyabetik grup 13 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği Şekil 13'de gösterilmiştir.



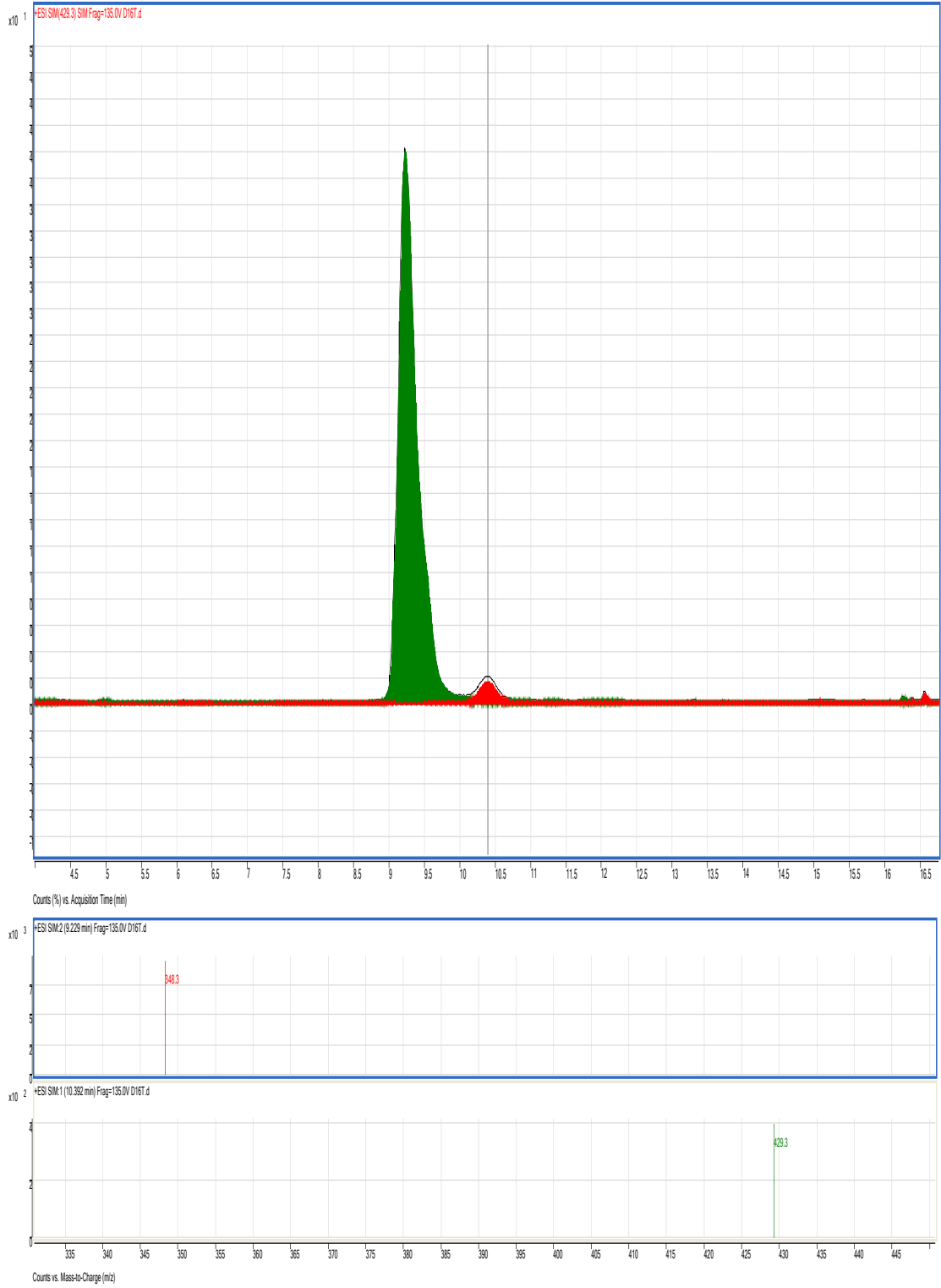
Şekil 13: Diyabetik grup 13 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği

LC/ESI/MS yöntemi ile çalışılan sağlıklı grup 5 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği Şekil 14' de gösterilmiştir.



Şekil 14: Sağlıklı grup 5 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal değer grafiği

LC/ESI/MS yöntemi ile çalışılan Diyabetik grup 16 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği Şekil 15' de gösterilmiştir.



Şekil 15: Diyabetik grup 16 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği

İmmün assay, HPLC, LC/ESI/MS ile çalışılan 27'şer örnekten oluşan sağlıklı ve Diyabetik gruplarda elde edilen % HbA1c değerleri, sırasıyla Tablo 18 ve 19'da verilmiştir.

Tablo 18: Sağlıklı grupta İmmün assay, HPLC, LC/ESI/MS ile elde edilen % Hba1c değerleri

Sağlıklı Grup	İMMÜN ASSAY	HPLC	LC/ESI/MS
1.	4,89	4,9	4,95
2.	5,2	5,1	5,41
3.	5,62	5,7	5,49
4.	5,57	5,6	5,46
5.	5,48	5,3	5,33
6.	4,91	4,8	5,08
7.	5,72	5,4	5,74
8.	4,98	4,8	4,95
9.	5,62	5,5	5,53
10.	5,06	4,9	5,15
11.	5,68	5,5	5,54
12.	4,9	4,8	5,15
13.	5,94	5,6	5,72
14.	5,48	5,3	5,29
15.	5,31	5	5,64
16.	5,63	5,4	5,69
17.	5,46	5,1	5,21
18.	5,18	5	5,36
19.	5,13	5	5,31
20.	4,99	5,1	5,36
21.	5,02	4,9	5,01
22.	4,52	4,2	4,29
23.	4,21	4	4,15
24.	5,3	5,3	5,36
25.	5,2	5	5,25
26.	5,05	4,9	4,95
27.	5,01	4,7	4,66

Tablo 19: Diyabetik grupta İmmün assay, HPLC, LC/ESI/MS ile elde edilen % Hba1c değerleri

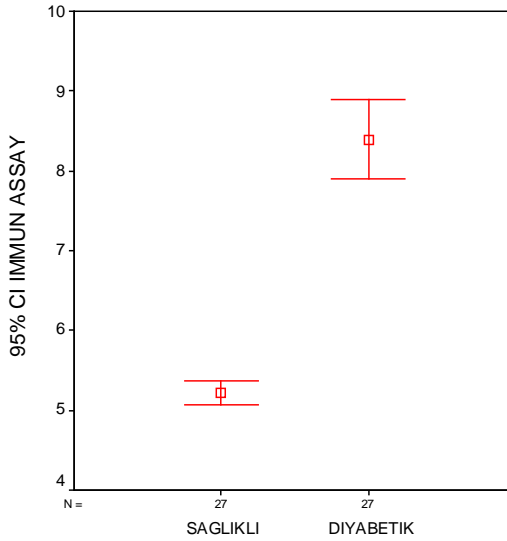
Diyabetik Grup	İMMÜN ASSAY	HPLC	LC/ESI/MS
1	7,29	7,1	7,26
2	10,69	9,6	9,14
3	10,9	10,5	10,35
4	6,9	6,7	6,59
5	8,36	8,7	8,84
6	10,45	10	10,24
7	8,4	8,3	8,75
8	8,95	8,1	8,67
9	8,27	8	8,59
10	8,03	7,5	7
11	8,14	7,6	6,92
12	7,57	7,4	6,87
13	7,25	6,9	6,6
14	7,58	7	6,54
15	9,23	8,8	8,48
16	8,98	8,1	7,35
17	9,51	8,3	7,57
18	9,95	9,3	8,63
19	7,39	7,2	7,09
20	6,8	6,7	6,59
21	7,1	6,9	6,78
22	8,38	8	7,09
23	8,88	8,4	7,54
24	7,53	7,6	7,05
25	6,87	6,5	6,77
26	10,17	9,1	9,11
27	6,9	6,7	6,72

İstatistiksel Analiz Sonuçları

İmmün assay yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin normal dağılıma sahip olduğu belirlendi. Tanımlayıcı istatistiki parametre olarak ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı (Tablo 20). İki grup ortalaması arasındaki farklılık kontrolüne student t testi ile bakılırken, gruplar arasındaki farklılığı görsel olarak sunmak için parametrelere ait Error Bar grafiği kullanıldı (Şekil 16).

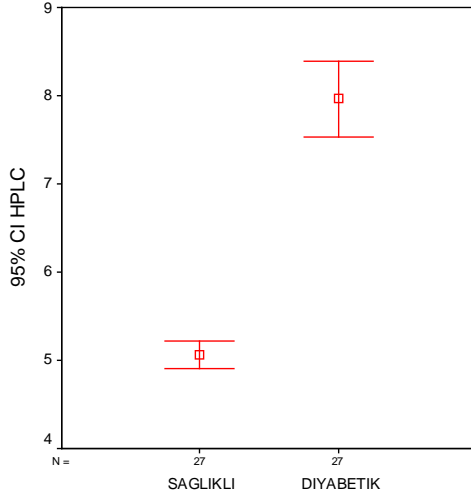
Tablo 20: İmmün assay ve HPLC yöntemleriyle % HbA1c ölçümleri grupların değerleri

	Sağlıklı (Ort±S.sapma)	Diyabetik (Ort±S.sapma)	p
İmmün assay	5.22±0.39	8.38±1.26	<0.001
HPLC	5.07±0.40	7.96±1.08	<0.001



Şekil 16: İmmün assay yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin sağlıklı ve diyabetik gruplarda Error Bar grafiği

HPLC yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin normal dağılıma sahip olduğu belirlendi. Tanımlayıcı istatistiki parametre olarak ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı (Tablo 20). İki grup ortalaması arasındaki farklılık kontrolüne student t testi ile bakılırken, gruplar arasındaki farklılığı görsel olarak sunmak için parametrelere ait Error Bar grafiği kullanıldı (Şekil 17).

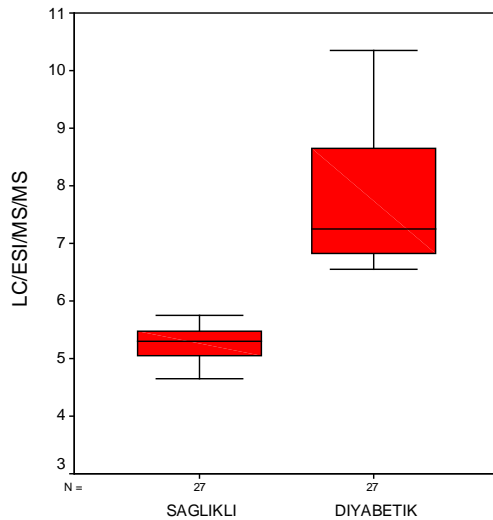


Şekil 17: HPLC yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin sağlıklı ve diyabetik gruplarda Error Bar grafiği

LC/ESI/MS yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin normal dağılıma sahip olduğu belirlendi. Tanımlayıcı istatistik parametre olarak medyan ve quartil değerleri kullanıldı (Tablo 21). İki grup ortalaması arasındaki farklılık kontrolüne Mann Whitnet U testi testi ile bakılırken, gruplar arasındaki farklılığı görsel olarak sunmak için BoxPlot grafiği kullanıldı (Şekil 18).

Tablo 21: LC/ESI/MS yöntemiyle % HbA1c ölçümleri yapılan sağlıklı ve diyabetik grupların Medyan, Quartil ve p Değerleri

	Sağlıklı Grup Medyan [Q1-Q2]	Diyabetik Grup Medyan [Q1-Q2]	P
LC/ESI/MS	5.31 [5,01 -5,49]	7.26 [6,78 -8,67]	<0.001



Şekil 18: LC/ESI/MS yöntemiyle ölçülen % HbA1c değerlerinin sağlıklı ve diyabetik grupların Boxplot grafiği

Kullanılan üç yöntemin birbirleri ile uyumlu olup olmadığının kontrolü sınıf içi korelasyon katsayısı ile bakıldı. Sağlıklı grupta 0,9110 sınıf içi korelasyon katsayısı ile yüksek uyum bulunurken, % 95 güven aralığı için değerlerin [0.8398-0.9551] olduğu belirlendi. Diyabetik grupta 0.9106 sınıf içi korelasyon katsayısı ile yüksek uyum bulunurken, % 95 güven aralığı için [0.8392-0.9549]'lık değerler bulundu (Tablo 22).

Tablo 22: Yöntemlerin birlikte uyum kat sayıları ve güven aralığı

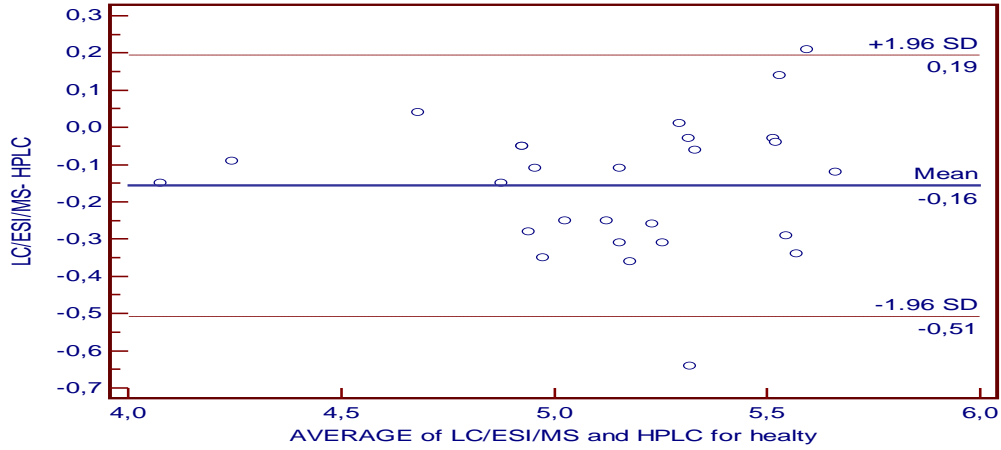
	Uyum katsayısı	% 95 Güven Aralığı
Sağlıklı Grup	0.9110	[0,8398 -0,9551]
Diyabetik Grup	0.9106	[0,8392 -0,9549]

HPLC yönteminin LC/ESI/MS yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı (0,8972 [0,7875 -0,9518]) ve Diyabetik (0,9243 [0,8411 -0,9648]) gruplar için güçlü bir uyumunun olduğu belirlenmiştir (Tablo 23).

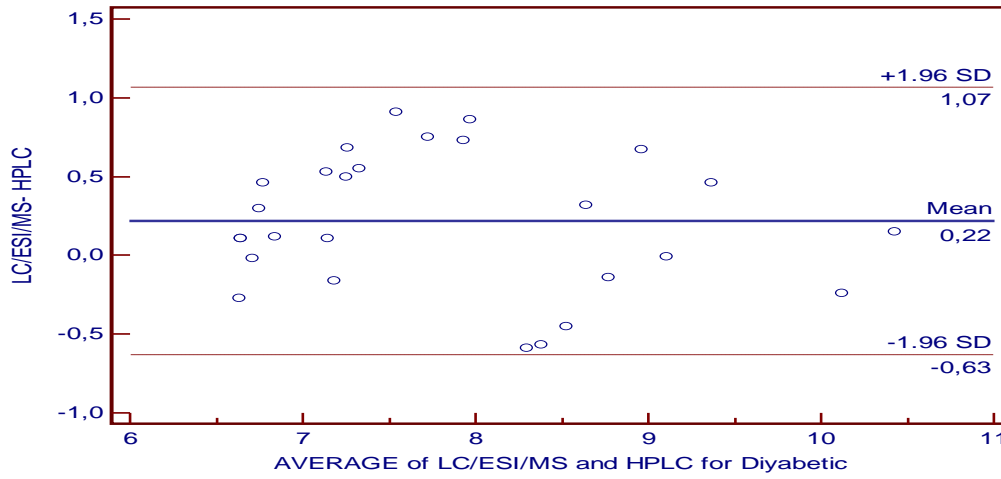
Tablo 23: HPLC Yöntemiyle LC/ESI/MS Yöntemlerinin Birbirleriyle Uyum Kat Sayıları ve Güven Aralığı

	Uyum katsayısı	% 95 Güven Aralığı
Sağlıklı Grup	0.8972	[0.7875 -0,9518]
Diyabetik Grup	0.9243	[0.8411 -0,9648]

HPLC yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, sağlıklı ve diyabetik gruplarda oluşturulan Bland Altman grafikleri Şekil 19 ve 20'deki gibidir.



Şekil 19: Sağlıklı grupta HPLC ve LC/ESI/MS yöntemlerinin Bland Altman grafiği



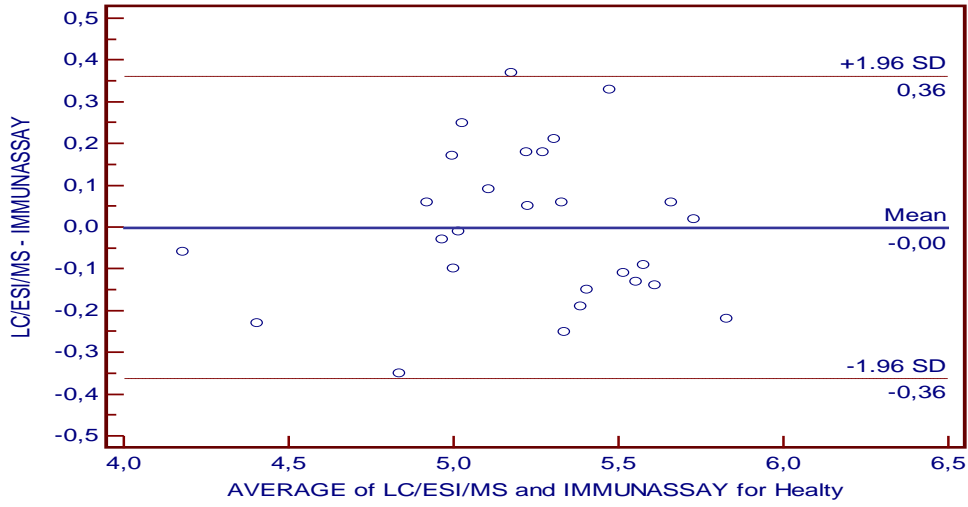
Şekil 20: Diyabetik grupta HPLC ve LC/ESI/MS yöntemlerinin Bland Altman grafiği

İmmün assay yönteminin LC/ESI/MS yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı (0,8875 [0,7687- 0,9471]) ve Diyabetik (0,8588 [0,7143 - 0,9331]) gruplar için güçlü bir uyumunun olduğu belirlenmiştir (Tablo 24).

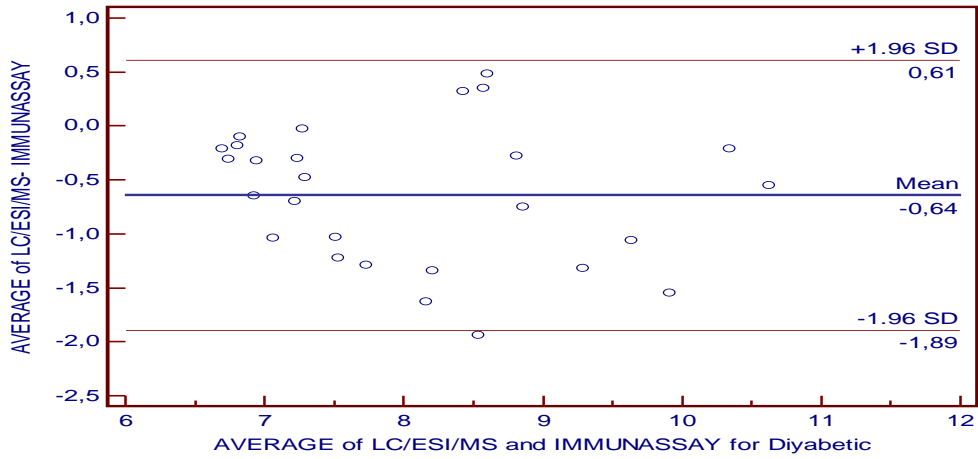
Tablo 24: İmmün assay yöntemiyle LC/ESI/MS yöntemlerinin birbirleriyle uyum kat sayıları ve güven aralığı

	Uyum katsayısı	% 95 Güven Aralığı
Sağlıklı grup	0,8875	[0,7687 -0,9471]
Diyabetik grup	0,8588	[0,7143 -0,9331]

İmmün assay yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, sağlıklı ve diyabetik gruplarda oluşturulan Bland Altman grafikleri Şekil 21 ve Şekil 22'deki gibidir.



Şekil 21: Sağlıklı grupta İmmün assay ve LC/ESI/MS yöntemlerinin Bland Altman grafiği



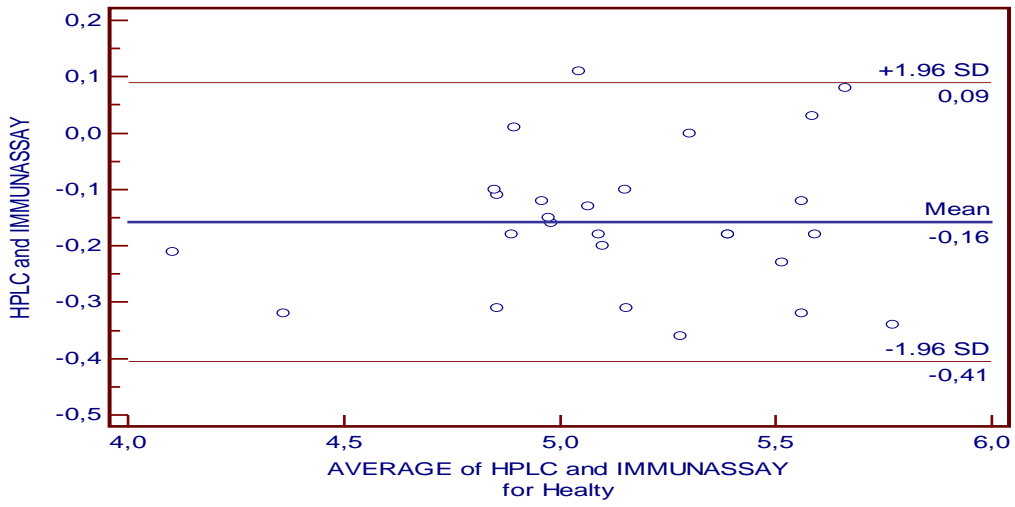
Şekil 22: Diyabetik grupta İmmün assay ve LC/ESI/MS yöntemlerinin Bland Altman grafiği

İmmün assay yönteminin HPLC yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı (0,9480 [0,8894 - 0,9760]) ve Diyabetik (0,9528 [0,8992-0,9782]) gruplar için güçlü bir uyumunun olduğu belirlenmiştir (Tablo 25).

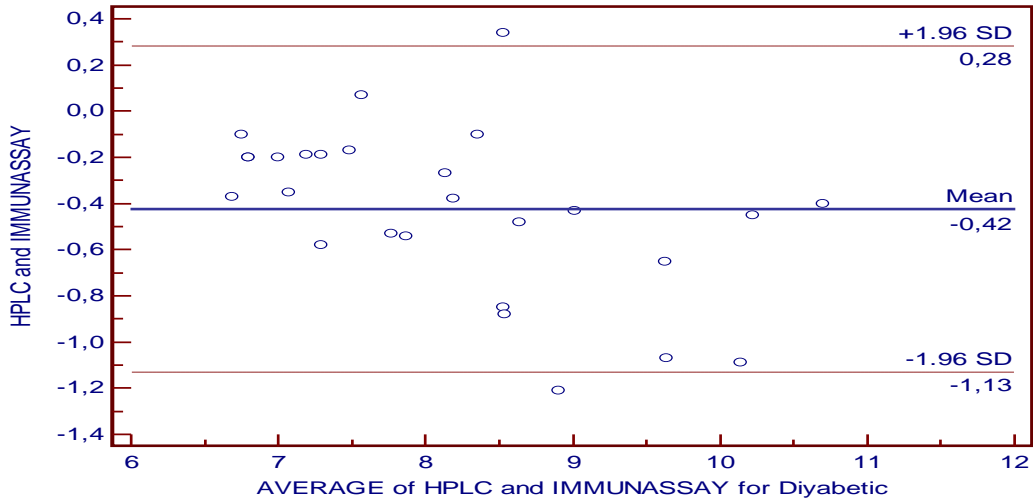
Tablo 25: İmmün assay ve HPLC yöntemlerinin birbirleriyle uyum kat sayıları ve güven aralığı

	Uyum Katsayısı	Güven Aralık
Sağlıklı Grup	0.9480	[0,8894 - 0,9760]
Diyabetik Grup	0.9528	[0,8992 -0,9782]

İmmün assay yöntemiyle HPLC yönteminin, sağlıklı ve diyabetik gruplarda oluşturulan Bland Altman grafikleri Şekil 23 ve Şekil 24'deki gibidir.



Şekil 23: Sağlıklı grupta İmmün assay ve HPLC yöntemlerinin Bland Altman grafiği



Şekil 24: Diyabetik grupta İmmün assay ve HPLC yöntemlerinin Bland Altman grafiği

TARTIŞMA

Hb, enzimatik olmayan glikozillenmeye uğrayan proteinlerden birisidir. Glikozile Hb, HbA_{1c} ve HbA_{1a} ifadelerinin hepsi hemoglobinin enzimatik olmayan yol ile glikozillenmesini ifade etmektedir. Kandaki asıl glikozile Hb, HbA_{1c} molekülüdür ve HbA₁'in yaklaşık %80 kadarını meydana getirmektedir¹³. IFCC tarafından HbA₁'in beta zincirinin amino terminal ucunda mevcut olan valin amino asitinin amino grubuna glukoz bağlanması sonucu oluşan dayanıklı moleküler yapı [N-(1-deoksifruktozil) hemoglobin] HbA_{1c} olarak tanımlanmıştır¹³.

Glikozile Hb sentezi temel olarak, Hb ve glukoz konsantrasyonları ile ilişkilidir. Hb konsantrasyonunun sabit kaldığı kabul edilir ise; HbA_{1c} oluşum hızı uzun süren plazma glukoz konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir. Glukoz düzeylerinde gözlenen geçici ve ani yükselmelerin glikozillenmiş Hb seviyelerine ciddi bir etki yapmadığı belirlenmiştir. Glikozile Hb oluşumu yaklaşık 120 günlük eritrosit yaşam süresi boyunca yavaş bir şekilde gerçekleşir ve plazma glukoz seviyeleri ile yakından ilişkilidir. HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c}'nin spesifik aktiviteleri eritrosit ömrü ile birlikte lineer biçimde artmaktadır. Gerçekleşen bu lineer artış dolayısıyla da yaşlı eritrositlerdeki HbA_{1c} seviyeleri genç olanlara göre anlamlı şekilde daha yüksektir⁶⁻¹⁰.

Toplam glisemik maruziyet ve uzun dönem komplikasyon riski arasında yüksek ilişki, preanalitik dayanıklılığının daha yüksek oluşu, biyolojik varyasyonunun daha az oluşu, açlık ve eş zamanlı örnek alımı gibi zorunluluklara ihtiyaç duyulmaması, tanı ve tedavi protokollerine ilişkin rehberlerin düzenlenmiş olması ve plazma glukoz düzeylerinde meydana gelen anlık değişimlerinden etkilenmesi HbA_{1c} için önemli avantajlardır⁶⁸. Bu avantajlar göz önüne alındığında HbA_{1c} ölçümünün, glukoz ölçümüne kıyasla DM tanı ve tedavisinin yönlendirilmesinde giderek daha fazla klinik önem kazandığı söylenebilir.

Geçmiş dönemlerde HbA_{1c} düzeylerinin tespit edilmesinin DM tanısı için yeterli olmayacağı fakat DM'li hastaların metabolik durumlarının sağlıklı olarak kontrolü konusunda destek sağlayabileceği kabul ediliyordu. Ancak 2009

Haziran ayındaki NGSP toplantısında HbA1c'nin DM tanısı için kan glukoz değerine kıyasla daha anlamlı olabileceği hatta DM tanısında öncelikli olarak kullanılması tavsiye edilmiştir. ADA tarafından 2011'de yayınlanan DM tanı kriterlerinde; HbA1c'nin %6,5 ve üstü olmasının ancak uluslararası kabul gören, standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında tanı testi olarak kullanılabilineceği ifade edilmiştir. Ülkemiz açısından bakıldığında henüz HbA1c ölçüm testleri yeterince standardize edilemediği için DM açısından tek başına tanı testi olarak kullanılmamakta ve kullanımı da önerilmemektedir³⁶.

Mevcut tüm karşılaştırma metodlarının nispeten non spesifik olmasından dolayı spesifik olarak Hb'nin beta-zincirindeki glikozillenmiş amino terminal valin kalıntısını ölçen bir referans yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Buna göre IFCC, uluslararası standardizasyon için rutin metodların sağlamasını yapabileceği bir referans sistem geliştirmeyi amaçlayan, sabit ve bilimsel donanımı iyi olan bir çalışma grubu oluşturmuştur. HPLC-ESI/MS ve HPLC/CE tekniklerinin bu konudaki analitik yeterlilikleri ilgili çalışma grubu tarafından etkin kanıtlarla ortaya konmuştur. Her iki yöntem de analiz açısından değerli sayılmakta ve istatistiksel olarak benzer sonuçlar elde edilebilmektedir⁶⁹. IFCC'nin oluşturduğu bu referans yöntem; ölçülen analitin moleküler yapısını temel alan net bir tanım, primer referans materyal olabilecek saf analit, insan örneklerindeki analiti kesin olarak ölçen geçerliliği kanıtlanmış referans yöntem, geçerli ve gerekli analitik kalitenin garanti altına alınması, matris temelli sekonder referans materyal ve kalibratörlerin değerlerinin saptanması için referans Laboratuvar ağı koşullarının sağlanması gibi uluslararası kabul gören metrolojik ilke esaslarına uygun yöntemdir. NGSP/DCCT, İsveç ve Japon programlarına göre kalibre yöntemlerle IFCC referans yöntemi arasında karşılaştırma programları yürütülmüştür^{52, 70}.

Biz bu çalışmada laboratuvarımızda HbA1c ölçümünde kullanılan immün assay ve HPLC yöntemleri ile IFCC tarafında referans metot olarak kabul edilen HPLC-ESI/MS yöntemlerini karşılaştırdık. Çalışmamızda HPLC-ESI/MS yöntemine yönelik olarak üretilen primer standartlar elde edilemediğinden, HPLC cihazında tekrarlı ölçümleri yapılan hasta örnekleri standart olarak kullanıldı.

Çalışmamızda; üç yöntemin kullanılmasıyla elde edilen değerlerin birbirleri ile uyumlu olup olmadığının kontrolüne sınıf içi korelasyon katsayısı ile

bakıldı. Sağlıklı grupta 0,9110 sınıf içi korelasyon katsayısı ile yüksek uyum bulunurken, % 95 güven aralığı için [0.8398-0.9551]'lik değerler bulundu. Yine benzer olarak Diyabetik grupta elde edilen 0.9106 sınıf içi korelasyon katsayısı ile yüksek uyum bulunurken, % 95 güven aralığı için [0.8392-0.9549]'lık değerler bulundu.

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre; immün assay yönteminin HPLC yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı grupta; 0,9480'lik [0,8894 - 0,9760] uyumunun olduğu bulundu. Diyabetik grup için bu analiz yapıldığında; 0,9528'lik [0,8992-0,9782] güçlü bir uyumunun olduğu bulundu. Çalışmamızda; İmmün assay ve HPLC ile çalışılan sağlıklı ve diyabetik gruplarda ortalama ve SD değerlerinin, sağlıklı grupta sırasıyla 5.22 ± 0.39 / 5.07 ± 0.40 olarak bulunurken, Diyabetik grupta sırasıyla 8.38 ± 1.26 / 7.96 ± 1.08 olduğu belirlendi. Sağlıklı ve diyabetik gruplar açısından, immün assay yöntemiyle elde edilen değerlerin, HPLC'ye göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek ortalamalara sahip olduğu bulundu.

Muşlu ve arkadaşları % HbA1c ölçümünü immüno türbidimetrik metot; (Cobas İntegra 800) ile HPLC yöntemleriyle (Agilent 1100 Series) yaptıkları karşılaştırmada, rastgele alınan 103 hasta örneği eş zamanlı olarak her iki yöntemle de ölçülmüştür. Karşılaştırma sonucunda yapılan analizde sınıf içi korelasyon katsayısı 0,9468 ve % 95 güven aralığı için 0,9223- 0,9668 değerlerini elde etmişlerdir⁷¹. Çalışmamızda ise; sağlıklı grupta; sınıf içi korelasyon katsayısı 0,9480 ve % 95 güven aralığı için 0,8894 - 0,9760 değerleri elde edildi. Diyabetik grup için bu analiz yapıldığında; sınıf içi korelasyon katsayısı 0,9528 ve % 95 güven aralığı için 0,8992 -0,9782 değerleri elde edildi. Çalışmamızda her iki yöntem arasında istatistiksel açıdan güçlü bir uyumunun olduğu bulundu. Diğer taraftan bu karşılaştırmayla benzer olarak Muşlu ve arkadaşları tarafından elde edilen değerlerin de bizim sonuçlarımızla oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

Coşkun ve arkadaşları % HbA1c ölçümünü immüno türbidimetrik metot (Olympus AU640) ile HPLC yöntemleriyle (Agilent 1100 Series) yaptıkları karşılaştırmada, denek olarak alınan 178 diyabetik hasta örneği her iki yöntemle ölçülmüş ve korelasyon analizinde karşılaştırılan iki yöntemin sonuçları arasında pozitif ve güçlü bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r= 0.934$, $p< 0.001$)⁷². Ayrıca Genç ve arkadaşları tarafından 103 örnek üzerinden immüno türbidimetrik

metot (Roche TINIA quant) ile HPLC (Adams HA-8160) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada da yöntemler arasında anlamlı korelasyon ($r=0,98$) olduğunu belirlemişlerdir⁶⁸.

Çalışmamızda; sağlıklı ve Diyabetik gruplar için bu analiz yapıldığında; elde edilen değerler açısından her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir korelasyon olduğu bulundu. Bu açıdan değerlendirildiğinde daha önceki çalışmaların sonuçlarının birbiri ile oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. Bu üç çalışma ve bizim sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde; analiz beraberinde diğer Hb alt tiplerinin de belirlenebiliyor olması HPLC yöntemi için bir avantaj oluştursa da; maliyet açısından daha uygun, iş gücü ve ekipman gerekliliği daha az olan immün assay yöntemin HPLC yöntemine göre daha fazla tercih edilebilir olduğu söylenebilir.

Avcı ve arkadaşları⁶⁷ tarafından rastgele alınan 34 kan örneğinde HPLC ve LC/ESI/MS yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada; ölçüm için LC/ESI/MS yönteminde IFCC tarafından önerilen yöntemden farklı olarak; Endoproteinaz Glu-C enzimi yerine tripsin enzimini, kullanılan 23 dakikalık gradiyent yerine 3 dakikalık farklı bir gradiyent ve farklı m/s değerlerinde iyonları kullanılmıştır. Bu çalışmada glikozile oktapeptid 557,8 m/s ve glikozile olmayan oktapeptitler ise 476,8 m/s'de tespit edilmiş ve elde edilen değerlere göre %HbA1c ölçümleri yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise IFCC tarafından tavsiye edilen ölçüm prosedürü uygulanmış, yöntemin modifikasyonu açısından sadece örnek hazırlama kısmında farklılık yapılmıştır (Tablo 14). Avcı ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada; her iki yöntemle elde edilen veriler arasındaki korelasyon; Deming regresyon analizi yapılarak belirlenmiş ve korelasyon katsayısı 0.980 olarak bulunmuş. Çalışmamızda ise; HPLC yönteminin LC/ESI/MS yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı grupta; sınıf içi korelasyon katsayısı 0,8972 ve % 95 güven aralığı için 0,7875-0,9518 değerleri elde edilmiş ve güçlü bir uyumunun olduğu bulunmuştur. Diyabetik grup için bu analiz yapıldığında; sınıf içi korelasyon katsayısı 0.9243 ve % 95 güven aralığı için 0.8411- 0.9648 değerleri elde edilirken benzer olarak güçlü bir uyumunun olduğu belirlenmiştir. Avcı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; LC/ESI/MS yönteminde gün içi tekrarlanabilirlik değeri %1,6 (ortalama \pm SD= 5,77 \pm 0,09) ve günler arası tekrarlanabilirlik değeri %3,8 (ortalama \pm SD= 5,83 \pm 0,22) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ise; LC/ESI/MS yönteminde gün içi tekrarlanabilirlik ve günler

arası tekrarlanabilirlik sağlıklı ve diyabetik grupta yapılmıştır. Sağlıklı grupta gün içi tekrarlanabilirlik değeri %2,07 (ortalama \pm SD= 5,076 \pm 0,1053) ve günler arası tekrarlanabilirlik değeri %2,3 (ortalama \pm SD= 5,024 \pm 0,1158) olarak bulundu. Diyabetik grupta gün içi tekrarlanabilirlik %1,74 (ortalama \pm SD= 8,078 \pm 0,1406) ve günler arası tekrarlanabilirlik %1,9 (ortalama \pm SD= 8,084 \pm 0,1535) olarak bulundu⁷³. Farklı enzim ve gradiyentler kullanılmasına rağmen LC/ESI/MS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen her iki çalışmada gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin uyumlu olduğu görülmektedir. Bu çalışmayla kıyaslandığında, DM tanısı için önerilen %6,5 HbA1c değerine göre düşük ve yüksek düzeylerde ölçüm yapılmış olması ve önerilen referans yöntemin kullanılmış olması bizim sonuçlarımızı daha değerli kılmaktadır.

Nakanish ve arkadaşları tarafından sağlıklı kontroller ve DM hastalar arasında 96 örnekle yapılan bir çalışmada HPLC, spesifik mouse monoklonal antikor kullanımı ile gerçekleştirilen lateks agglütinasyon metodu ve LC/ESI/MS yöntemleri karşılaştırılmıştır. LC/ESI/MS yönteminde; glikozile alfa ve beta zincirler 900-1500 m/z oranlarında taranmış ve oluşan pikler hesaplanarak sonuçlar verilmiştir. HPLC ve LC/ESI/MS yöntemleri arasında elde edilen korelasyon değeri 0,98 olarak bulunurken, lateks agglütinasyon metodu ve LC/ESI/MS yöntemleri arasında elde edilen korelasyon değerinin 0,961 olduğu belirlenmiştir⁷³. Bu çalışma LC/ESI/MS cihazı ile çalışılmış olmasına rağmen, IFCC tarafından referans olarak kabul edilen yöntemden oldukça farklı bir yöntemdir.

İmmün assay yönteminin LC/ESI/MS yöntemine göre uyumuna bakıldığında sağlıklı grupta; 0,8875'lik [0,7687- 0,9471], Diyabetik grup için bu analiz yapıldığında; 0,8588'lik [0,7143 -0,9331] bir korelasyonun olduğunu bulundu.

HPLC, immün assay ve LC/ESI/MS yöntemlerinin; gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlikleri hem sağlıklı grupta (sırasıyla gün içi - günler arası; 3.87, 4.4 / 3.93, 4.22 / 2.07, 2.3), hem de diyabetik grupta (sırasıyla gün içi -günler arası 3.47, 3.9/ 3.34, 3.82 / 1.74, 1.9) belirlendi. Her iki yöntemin de, HPLC/ESI/MS yöntemi ile uyumlu olduğu ancak; yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında HPLC ve İmmün assay yöntemlerinde, HPLC/ESI/MS yöntemine göre yüksek %CV değerleri elde edildiği belirlendi. HPLC/ESI/MS yöntemin tekrarlanabilirlik değerlerinin daha iyi olduğu gözlemlendi.

Kabul edilebilir CV değerleri % 2'nin altında olmalıdır⁷⁴. Çalışmamızda diyabetik grupta LC/ESI/MS yöntemi için % CV değerleri % 2'nin altında bulundu.

nemli bir sağlık sorunu olan ve olmaya da devam edecek olan DM, hem insan yaşam kalitesini etkilemekte, hem de ulusal sağlık harcamalarını önemli ölçüde artırmaktadır. HbA1c, DM'nin tanısında (referans metodlar ile), izlenmesinde ve özellikle komplikasyonların öngörülmesinde yararlılığı kanıtlanmış bir analittir. Ancak; HbA1c'nin diyabetin tanısında ve komplikasyonlarının izlenmesinde yarar sağlaması için laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası değişkenliğin ve biasın en az düzeyde tutulması gereklidir. Bunun için de laboratuvarlararası karşılaştırma çalışmaları ya da dış kalite değerlendirme programları yapılandırılmalı ve sonuçları hem eğitim, hem kaliteli diyabet bakımı, hem de ulusal sağlık harcamaları açısından yararlı bilgiler elde edilecek şekilde değerlendirilmelidir^{75, 76}.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda; HPLC ve İmmün assay yöntemlerinin, IFCC tarafından referans metod olarak kabul edilen LC/ESI/MS yöntemiyle karşılaştırdık. LC/ESI/MS yöntemi için standart temin edilemediğinden, HPLC ile ölçümü yapılan diyabetik hasta örneği standart olarak kullanıldı. Çalışma sonucunda; LC/ESI/MS yönteminin gün içi ve günler arası CV değerlerinin daha iyi olduğu belirlendi. Diyabetik hasta grubu için yapılan ölçümlerde; LC/ESI/MS yöntemiyle yapılan ölçümlerin, HPLC ve İmmün assay (sırasıyla ortalama 7,74/7,96/8,38) yöntemlere göre düşük olduğu belirlendi. Bunun nedeni olarak da asetilasyon ve karbamilasyonun HPLC ve immün assay yöntemlerinde pozitif interferansa neden olduğunu düşünmekteyiz.

Öneriler;

- Ülkemizde standardizasyon çalışmaları için referans metot ile HbA1c ölçümünün yapılabilirdiği referans laboratuvar oluşturulması,
- Ülkemize ait cihaz ve kit üretimi olmadığı için, laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan HbA1c ölçüm yöntemleri ile geniş kapsamlı çalışmalar yapılması; özellikle klinik karar düzeylerini içeren (HbA1c % 6/6,5/7/8) ve bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde yapılacak çalışmalar daha değerli sonuçlar elde edilmesi,
- Standardizasyon çalışmalarından önce, internal ve eksternal kalite kontrol programları ile sıkı takibin yapılması,
- Laboratuvar uzmanlarının interferanslar konusunda bilgilendirilmesi,
- % HbA1c raporlamasında; ölçümün yapıldığı cihaz ve yöntemin belirtilmesi (interferans durumlarında daha önemli),
- Laboratuvar ile klinisyen uyumunun artırılması; HbA1c ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi daha verimli olabilir ve klinik kullanımda önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Sözmen E. Normal Vücut Proteinleri ve Fonksiyonları. In: Onat T, Emerk K, (eds). İnsan Biyokimyası. 2.baskı. Ankara: Palme yayıncılık 2006: 150 -161.
2. Cox M M, Nelson D L. Nedret K (ed) Proteinlerin İşlevi Lehninger Biyokimyanın Temel İlkeleri. Palme yayıncılık Ankara 2004; 210 -220.
3. Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal hemoglobins. Br Clin Haematol. 1993; 6: 1 -30.
4. Krishnamurti U, Steffes M W. Glycohemoglobin: A Primary Predictor of the Development or Reversal of Complications of Diabetes Mellitus Clinical Chemistry. 2001: 47: 7. 1157–1165.
5. CD Saudek, Rita R Kalyani, RL Derr Assessment of Glycemia in Diabetes Mellitus: Hemoglobin A1c. 2005: Japı vol. 53.
6. Burtis A C, Ashwood E R. Aslan D.(eds). Karbonhidratlar. TİETZ Klinik Biyokimyada Temel İlkeler.5.baskı. Ankara: Palme yayıncılık 2005: 435 -457
7. Yeğın M M, Bakan N. Hemoglobin glikolizasyonu, glikozillenmiş hemoglobin (ghb, hba1c) ve klinik önemi. Atatrk Üniversitesi Tıp Blteni.1986: 18: 99 -103.
8. Ronald M, Goldenberg M D, Alice Y Y. et. al. Use of Glycated Hemoglobin (A1c) in the Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus in Adults. Canadian Journal of Diabetes 2011: 247 -249.
9. Uma K, Michael W. Steffes Glycohemoglobin: A Primary Predictor of the Development or Reversal of Complications of Diabetes Mellitus Clinical Chemistry. 2001: 47: 7 1157 –1165.
10. American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011; 34 (Suppl. 1): S 62 -9.
11. Kurt İ. Glikozile Hemoglobin (HbA1c) lçm ve Diabetes Mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. Glhane Tıp Dergisi.2003: 45 (4): 387 -395.
12. Sacks D B, Bruns D E, Maclaren N. K, McDonald J M, Parrott M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clinical Chemistriy. 2002: 48: 3, 436 -472.

13. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78–89.
14. Little RR, Rohlfing CL. Analytical goals for HbA1c: are HbA1c results good enough for optimal use? *J Diabetes* 2011; 3(1): 3 -6.
15. Hanas R, John G. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A(1c) measurement. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 90(2): 228 -30.
16. Champe PC, Harvey RA: Globuler ve Fibroz Proteinler. Lippincott Biyokimya. 3.baskı. Nobel Kitabevleri Ankara 2007: 25 -42
17. Dönbak L. İnsan Hemoglobin (Hb) Varyantları KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi.2005: 8(2).
18. Lauer J, Shon CKJ, Maniatis T: The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: sequence homology and δ globin gene deletion. *Cell* 1980: 20; 119 -125.
19. Karlsson S, Nienhuis AW: Developmental regulation of human globin genes. *Ann Rev Biochem* 1985: 54; 1071 -1108.
20. Lois RM, Russell JE, Julio CP ed. AI. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell.
21. Polat G, Tamer L, Eskandari G. Hemoglobin Yapısı ve İşlevi. Mersin Üniveristesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2000:1; 71 -77
22. Gökhan N. Oksijen Taşınmasında Hemoglobinin rolü ve Etkili Faktörler. *Solunum*. 1980: (3): 9.
23. Gladimir V. G, Baranoski, Tenn F. Chen, Bradley WK. In Silico Spectral Investigation of Methemoglobin and Sulfhemoglobin Effects on Human Skin Reflectance Technical Report CS- 2012 -09, June 1st.
24. Park C.M, Nagel R.L, Blumberg W.E.Sulfhemoglobin Properties of partially sulfured tetramers.
25. Arslan M.T, Arıca V, Tutanç M. Prilokaine bağlı methemoglobinemi. *Türk Ped Arş*.2012; 47: 305 -6.
26. Alıcı S, Dülger HH. Hemoglobinlerin Nonenzimatik Glikozilasyonu Van Tıp Dergisi, 2001: Cilt:8, Sayı:3.

27. Cox MM, Nelson DL. Nedret K(ed). Karbonhidratlar ve glikobiyoloji. Lehninger biyokimyanın temel ilkeleri. Palme yayıncılık Ankara 2004; 311 - 315.
28. David MN. Labile Glycosylated Hemoglobin Contributes to Hemoglobin A, as Measured by Liquid Chromatography or Electrophoresis. Clinchem.1981: 27/7, 1261 -1263.
29. Karen PP, James GP, Goldstein D, Randie L, England J, Charles M P. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clinical Chemistry, 1998; 44: 9 1951–1958.
30. Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of proteins: Its role in diabetes. In: Kahn CR, Weir GC, editors. Joslin' s Diabetes Mellitus, 13th edition. Philadelphia: A waverly Company,1994: 136 -45.
31. Kunkel HB, Wallenius G. New Hemoglobins İn Normal Adult Blood. Science.1955: 122,188.
32. Allen DV, Schroeder WA, Balog J. Observetion on the chrotomographic heterogenety of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effectis of crystalzation and chrotomography in the heterogenety and isolecucine content. 1958: J.AM. Chem. Soc.80: 1628 -1632.
33. Rahbar S: An Abnormal Hemoglobin İn Red Cells Of Diabetics. Clin chem. 1968: Acta.22; 296 -298.
34. Jovonovic L, Peterson CM. The clinical utility of glicosylated Hb. Am J Med. 1981: 70: 331 -8.
35. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of complications of diabetes mellitus. Ann Rev Biochem. 1981; 50:385 -432.
36. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus Abbreviated Report of a WHO Consultation.2011.
37. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27: 1047 -53
38. Araz M. Diabetes Mellitus. Brauwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL: Harrison's Principles of Internal Medicine, 2004; 15. basım çevrisi, çeviri editörü: Sağlıkker Y. s: 2109 -214, Nobel Tıp Kitabevi.

39. Mosca A, Branca MT, Carta M, Genna ML et al. Recommendations for the implementation of international standardization of glycated hemoglobin in Italy. Clin Chem Lab Med 2010; 48: 623–6.
40. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. Diabetes Care 2007;30: 2399–400.
41. Martin H, Steinberg L, Nagel RL. Posttranslational modification of normal adult, fetal, and embryonic hemoglobins: the “minor” hemoglobin disorders of hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management ikinci baskı 130 -135.
42. Brown JB, Nichols GA, Perry A. The burden of treatment failure in type 2 diabetes. Diabetes Care 2004; 27: 15, 35 -40.
43. İlkova H, Damcı T, Oşar Z, Özyazar M ve ark. Antidiyabetik İlaç Kullanım Paternlerindeki Değişim ile Tip 2 Diabetes Mellituslu Hastalarda HbA1c Düzeyi Arasındaki İlişki: Türkiye’de Son 20 Yılda Yapılan Çalışmaların Sistemik Analizi Turk Jem 2011; 15: 77 -105.
44. TEMD Diabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu 2011. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği.2011.
45. <http://professional.diabetes.org>.
46. <http://professional.diabetes.org/eAG>.
47. Christopher D, Saudek, MD, Jessica C, Brick BA. The Clinical Use of Hemoglobin A1c Journal of Diabetes Science and Technology Volume. 2009; 3, Issue 4.
48. David B. Sacks The Diagnosis of Diabetes Is Changing: How Implementation of Hemoglobin A1c Will Impact Clinical Laboratories Clinical Chemistry. 2009; 55: 9 1612–1614.
49. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. Diabetes Care 2008; 31(8): 1 473 -8.
50. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB; National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee. Status of hemoglobin

- A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem* 2011; 57(2): 205 -14.
51. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2010. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl) 1: 11 -61.
 52. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T ed al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54(2): 240 -8.
 53. Burtis A.C, Ashwood E.R. Aslan D.(eds) Karbonhidratlar. TİETZ Klinik Biyokimyada Temel İlkeler.5.baskı. Ankara: Palme yayıncılık 2005: 454 -455
 54. Wu AHB. Tietz Laboratuvar Testleri Klinik Klavuzu.4.baskı. Ankara: güneş tıp kitap evleri 2011: 480 -482
 55. Dan C, Dan LC, Fong FH, Frederik PL, Mitchell GS. Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1c İn an automated ion-exchange HPLC method *Clinical Chemistry*. 1998; 44: 6 1296–1301.
 56. Jeppsson JO, Jemtorp P, Sundkvist G, Englund K, Nylund V. Measurement of Hemoglobin A1ı by a New Liquid-Chromatographic Assay: Methodology, Clinical Utility, and Relation to Glucose Tolerance Evaluated. *Clinchem*. 1986; 32/10, 1867 -1872.
 57. Fiechtner M, Ramp J, England B ed. Al. Affinity Binding Assay of Glycohemoglobin by Two-Dimensional Centrifugation Referenced to Hemoglobin A1c. *Clinchem*. 1992; 38/12, 2372 -2379.
 58. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CWM. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay. *ClinChem* 1993; 39: 138–42.
 59. Cees JAD, Carla WM, Wim A ed. Al. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated *Clinical Chemistry*. 1997; 43: 4 644–648.
 60. Molteni S, Frischknecht H, Thormann W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. *Electrophoresis*. 1994; 15: 22–30.
 61. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RF, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: Comparison with colorimetric and

- ion-exchange methods, and effects of common interferences. Clinchem. 1982; 28: 2088 -2094.
62. Iwamoto H, Motomiya Y, Miura K ed. Al. Immunochemical Assay of Hemoglobin with Ne-(Carboxymethyl)lysine at Lysine 66 of the b Chain Clinical Chemistry. 2001; 47: 7 1249–1255.
63. Karlsson EB. The Nobel Prize in Physics. In: Levinovit AW and Ringertz N, eds. The Nobel Prize: The First 100 Years. Imperial College press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2001; 31.
64. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weycamp C, Jeppsson JO, Miedema K. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. Clinchem Lab Med 1998; 36: 299–308.
65. Acıcan T. Arter Kan Gazları. Yoğun Bakım Dergisi 2003;3(2):160 -175.
66. Roberts WL, Chiasera JM, Ward-Cook KM. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. Clin Chem 1999; 45: 906–9.
67. HbA1c'nin sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC/MS) ile saptanması ve optimizasyonu.2009.
68. Genc S, Omer B, Aycan-Ustyol E, Ince N, Bal F, Gurdol F. Evaluation of turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) and HPLC methods for glycated haemoglobin determination. J Clin Lab Anal. 2012 Nov;26(6): 481-5. doi: 10.1002/jcla.21550.
69. IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Working Group HbA1c. <http://www.ifcchba1c>.
70. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2009; 32(7): 1327 -34.
71. Muşlu N, Çimen B, Eskandari G. İyon Değiştirici Kromatografisi Ve İmmüno Türbidimetrik Yöntemlerle çalışılan HbA1c sonuçlarının karşılaştırılması. Mersin üniversitesi sağllık bilim dergisi.2009; 2 (2).
72. Coskun A, Yavuz Ö, Memisogulları R, Yüksel HK. HbA1c Ölçümünde HPLC ve Türbidimetrik İmmüno-inhibisyon Yöntemlerinin Karsilastirilmesi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2007; 1: 17 -21.

73. Nakanishi T, Miyazaki A, Kishikawa M, Yasuda M, Tokuchi Y, Kanada Y, Shimizu A. Quantification of glycated hemoglobin by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1997 Jul;32(7): 773-8.
74. <http://www.westgard.com/quality-hba1c-2011.htm>.
75. <http://www.diabetesatlas.org/>.
76. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB for National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee. (2011) Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem.* 57(2):205 -214.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AACE: Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği (American Association of Clinical Endocrinologists)

ADA: American Diabetes Association

CE: Kapiller Elektroforez

CN: Siyanopropil

CO₂: Karbondioksit

DCCT: The Diabetes Control and Complications Trial

DM: Diabetes Mellitus

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

ESI: Elektrospray İyonizasyon

Fe⁺²: Demir

H₂CO₃: Karbonik asit

Hb: Hemoglobin

HCN: Hidrojen Siyanür

HCO₃: Bikarbonat iyonu

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

KCN: Potasyum Siyanür

LC/MS: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

m/z: kütle/yük (mass-to-charge ratio)

MES: Morfolino Ethan Sülfonik asit

ml: Mili litre

NaCl: Sodyum Klorür

NaOH: Sodyum Hidroksite

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program

Nm: nano metre

µl: Mikro litre

O₂: Oksijen

SIM: Selected Ion Monitoring

TFA: Trifluoroasetik asit

UKPDS: The United Kingdom Prospective Diabetes Study

WHO: World Health Organization

α : Alfa

β : Beta

δ : Delta

ϵ : Epsilon

γ : Gama

ζ : Zeta

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 Hb Tiplerinin Globin Zincir Yapısı ve Görüldüğü Dönemler	13
Tablo 2 Glikozile Hb'ler ve Yapıları	16
Tablo 3 DM'nin Sınıflandırılması ve Glukoz Tolerans Bozukluğunun Kategorileri	20
Tablo 4 DM'nin Etyolojik Sınıflaması	21
Tablo 5 HbA1C'yi %1 düşürmenin komplikasyon gelişme riskine etkisi	22
Tablo 6 Glisemi ve % HbA1c İlişkisi	23
Tablo 7 NGSP ve IFCC' nin % HbA1c ve HbA1c (mmol/mol) sonuçlarının dönüşümleri ve ortalama glukoz değerleri	26
Tablo 8 IFCC' nin belirlenmiş karşılaştırma yöntemlerine göre dönüşüm faktörleri	26
Tablo 9 ACE CN kolon ile yaptığımız modifiye örnek hazırlık çalışmalarında kullanılan mobil faz akım gradiyenti	37
Tablo 10 Mobil faz akım gradiyenti (IFCC ile aynı prosedürü kullandık.)	42
Tablo 11 % HbA1c hedef değeri 6,04 olan, Roche Cobas İntegra 800 cihazında kullanılan düşük kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması	45
Tablo 12 % HbA1c hedef değeri 10 olan, Roche Cobas İntegra 800 cihazında kullanılan yüksek kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması	46
Tablo 13 % HbA1c hedef değeri 5,3 olan, Biorad D10 HPLC cihazında cihazında kullanılan düşük kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması	46
Tablo 14 % HbA1c hedef değeri 10,3 olan, Biorad D10 HPLC cihazında cihazında kullanılan yüksek kontrol ile tekrarlanabilirlik çalışması	47
Tablo 15 IFCC ve çalışmamızda ki örnek hazırlama farklılığı	47

Tablo 16 LC/ESI/MS yöntemiyle 5,06 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışması	48
Tablo 17 LC/ESI/MS yöntemiyle 8,1 olarak ölçülen % HbA1c değerinin tekrarlanabilirlik çalışması	48
Tablo 18 immün assay, HPLC, LC/ESI/MS ile çalışılan sağlıklı gruplarda elde edilen % HbA1c değerleri	53
Tablo 19 İmmün assay, HPLC, LC/ESI/MS ile çalışılan Diyabetik grupta elde edilen % HbA1c değerleri	54
Tablo 20 immün assay ve HPLC yöntemleriyle % HbA1c ölçümleri yapılan sağlıklı ve diyabetik grupların ortalama, standart sapma ve p değerleri	55
Tablo 21 LC/ESI/MS yöntemiyle % HbA1c ölçümleri yapılan sağlıklı ve diyabetik grupların medyan, quartil ve p değerleri	56
Tablo 22 Yöntemlerin Birlikte Uyum kat sayıları ve güven aralığı	57
Tablo 23 HPLC yöntemiyle LC/ESI/MS Yöntemlerinin birbirleriyle Uyum kat sayıları ve güven aralığı	57
Tablo 24 İmmün assay yöntemiyle LC/ESI/MS Yöntemlerinin birbirleriyle Uyum kat sayıları ve güven aralığı	58
Tablo 25 İmmün assay yöntemiyle HPLC Yöntemlerinin birbirleriyle Uyum kat sayıları ve güven aralığı	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 Hb molekülünün yapısı	10
Şekil 2 Globin Gen Ailesi	11
Şekil 3 Globin Zincir Sentezi	12
Şekil 4 HbA1c oluşumu (Amadori düzenlenmesi)	17
Şekil 5 IFCC ve NGSP'nin % HbA1c dönüşümü	25
Şekil 6 5 µL saklama tamponu-hemolizat, 30 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 215 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromotogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)	38
Şekil 7 5 µL saklama tamponu-hemolizat, 35 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 210 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromotogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)	38
Şekil 8 4 µL saklama tamponu-hemolizat, 30 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 216 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromotogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)	39
Şekil 9 15 µL saklama tamponu-hemolizat, 25 µL Endoproteinaz Glu-C enzimi ve 210 µl sindirim tamponu ile hazırlanan örneğin kütle kromotogramı (SIM modu 348,3 ve 429,3 m/z)	40
Şekil 10 Hb molekülünde Endoproteinaz Glu-C enziminin proteolitik bölgesi	41

Şekil 11 LC/ESI/MS yöntemi için % HbA1c kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 12 Sağlıklı grup 10 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal değer grafiği	49
Şekil 13 Diyabetik grup 13 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği	50
Şekil 14 Sağlıklı grup 5 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal değer grafiği	51
Şekil 15 Diyabetik grup 16 no'lu örneğin kütle kromotogramı ve elde edilen sinyal grafiği	52
Şekil 16 İmmün assay yöntemiyle ölçülen sağlıklı ve diyabetik grupların error bar grafiği	55
Şekil 17 HPLC yöntemiyle % HbA1c ölçümleri yapılan sağlıklı ve diyabetik grupların error bar grafiği	56
Şekil 18 LC/ESI/MS yöntemiyle % HbA1c ölçümleri yapılan sağlıklı ve diyabetik grupların BoxPlot grafiği	56
Şekil 19 HPLC yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, sağlıklı grupta Bland Altman grafiği	58
Şekil 20 HPLC yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, diyabetik grupta Bland Altman grafiği	58
Şekil 21 İmmün assay yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, sağlıklı grupta Bland Altman grafiği	59
Şekil 22 İmmün assay yöntemiyle LC/ESI/MS yönteminin, diyabetik grupta Bland Altman grafiği grupta elde edilen % HbA1c değerleri	59
Şekil 23 İmmün assay yöntemiyle HPLC yönteminin, sağlıklı grupta Bland Altman grafiği	60
Şekil 24 İmmün assay yöntemiyle HPLC yönteminin, Diyabetik grupta Bland Altman grafiği	60

