



T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GLİKOZİLLENMİŞ TIRNAK PROTEİNLERİNİN
BİYOLOJİK VARYASYON VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MEMNUNE AYDINHAN

GİRESUN-2018



T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GLİKOZİLENMİŞ TIRNAK PROTEİNLERİNİN
BİYOLOJİK VARYASYON VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MEMNUNE AYDINHAN

DANIŞMAN
DOÇ.DR. MURAT USTA

GİRESUN-2018



T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ SAVUNMA KABUL FORMU

08/02/2018

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Öğrencinin**Adı ve Soyadı:** Memnune AYDINHAN**Öğrenci Numarası:** 20142201001**Anabilim Dalı:** Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**Programı:** Tıbbi Biyokimya Tezli Yüksek Lisans Programı**Telefon:** 0545 5793045**E-posta:** memnune_aydinhan15@hotmail.com

Yukarıda kimlik bilgileri verilen öğrenci tarafından Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin 36. maddesi gereğince hazırlanan GLİKOZİLLENMİŞ TIRNAK PROTEİNLERİNİN BİYOLOJİK VARYASYON VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ adlı tez tarafımdan kontrol edilmiş ve jüri önünde savunmak üzere kabul edilmiştir. Ek olarak bu tez Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından SAĞ-BAP-C-140316-08 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Danışmanın
Doç.Dr. Murat USTA

Ekler: 6 Adet Tez Çalışması (Spiralli)**Önerilen Jüri Üyeleri**

- (Asıl) 1) Prof.Dr. Sembol YILDIRMAK
2) Prof. Dr. Tevfik NOYAN
3) Doç.Dr. Murat USTA

- (Yedek) 1) Doç.Dr. Ayşegül ÇEBİ
2) Doç.Dr. Bahattin AVCI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr. Sembol YILDIRMAK

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Memnune AYDINHAN tarafından Doç.Dr. Murat USTA danışmalığında hazırlanan GLİKOZİLLENMİŞ TIRNAK PROTEİNLERİNİN BİYOLOJİK VARYASYON VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 13/03/2018 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. SEMBOL YILDIRMAK
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ



Üye: Prof.Dr. TEVFIK NOYAN
ORDU ÜNİVERSİTESİ



Üye: Doç.Dr. MURAT USTA
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ



ONAY

Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından SAĞ-BAP-C-140316-08 numaralı proje olarak desteklenen bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılan jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

13/03/2018

Doç.Dr. AYŞEGÜL ÇEBİ
Giresun Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Memnune AYDINHAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü bilimsel desteği sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Sembol YILDIRMAK, eğitimim süresince hoşgörü ve saygınlığı ile örnek aldığım bilgisi ve tecrübesi ile desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, tez oluşturmamda büyük emeği geçen değerli danışman hocam sayın Doç.Dr. Murat USTA ve çalışma süresince üzerime emeği geçen Yrd.Doç.Dr. Tuna SEMERCİ, Yrd.Doç.Dr. Şahin DİREKEL, Doç.Dr.Yelda BİNGÖL ALPASLAN, Yrd.Doç.Dr. Demet ŞENGÜL, Yrd.Doç.Dr. Egemen AKGÜN, ve Yrd.Doç.Dr. Ebru ALP hocalarıma yine yardımlarından dolayı Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane personeline en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım İlayda TAŞCI, Sermin YILDIRIM, Elvan AZAP, Saliha KESTİ, Gamze KAÇMAZ, Döndü MUTLU, Sevilay KABLAN ve kuzenim Yeşim AYDINHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam sırasında maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen başta sevgili annem Döndü AYDINHAN, babam Yüksel AYDINHAN, kardeşlerim Mustafa AYDINHAN, Duygu IŞIK, Nurdan AYDINHAN, İzzet AYDINHAN ve Hayrunnisa AYDINHAN olmak üzere tüm aileme ve arkadaşlarım sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Test Sonuçlarında Varyasyonlar.....	3
2.1.1. Total Analitik Varyasyon.....	3
2.1.1.1. Pre-Analitik Varyasyon	3
2.1.1.2. Analitik Varyasyon	4
2.1.2. Biyolojik Varyasyon	4
2.1.2.1. Biyolojik Varyasyonun Kaynakları	5
2.1.2.1.1. Farklı Yaş Evrelerinde Biyolojik Varyasyon.....	6
2.1.2.1.2. Günlük Biyolojik Ritimler	6
2.1.2.1.3. Aylık Devirler	6
2.1.2.1.4. Mevsimsel Ritimler.....	6
2.1.2.1.5. Random Biyolojik Varyasyon	7
2.1.2.2. Biyolojik Varyasyonun Komponentlerini Belirleme.....	7
2.1.2.2.1.Çalışmaya Dâhil Edilecek Bireylerin Seçimi	7
2.1.2.2.2. Numunelerin Toplanması, Saklanması ve Analizi	8

2.1.2.2.3.Verilerin Elde Edilmesi ve İstatistik Uygulamalar	9
2.1.2.3. Biyolojik Varyasyonun Referans Aralığa Etkileri.....	10
2.2. Tırnak Yapısı	10
2.2.1 Tırnağın Anatomik ve Histolojik Yapısı	10
2.2.2.Tırnağın Temel Proteini Olan Keratinin Yapısı ve Özellikleri.....	12
2.3. Proteinlerin Glikozillenmeleri	13
2.3.1. Enzimatik Glikozillenme Reaksiyonları.....	14
2.3.2.Non-Enzimatik glikozillenme Reaksiyonları.....	14
2.3.2.1. Non-Enzimatik Glikozillenmeyi Etkileyen Faktörler.....	16
2.3.2.2. Glikolize Hemoglobin (HbA1c)	16
2.3.2.3. Fruktozamin	17
2.3.2.4. Glikozillenmiş Tırnak Proteini	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Çalışma Popülasyonu ve Gönüllülerin Seçimi	19
3.2.Çalışma Tasarımı ve Metodu.....	19
3.3.Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçümü ve Metodun Analitik Performansının Değerlendirilmesi	20
3.3.1. Nitro-Blue Tetrazolium (NBT) Reaktif Çözeltisinin Hazırlama	20
3.3.2.Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçümü	20
3.3.3.Glikozillenmiş tırnak Proteini Ölçüm Metodunun Analitik Performansının Değerlendirilmesi.....	21
3.4. Ölçümü Yapılan Diğer Rutin Parametreler	22
3.5. Metabolik Sendrom Değerlendirilmesi.....	22
3.6. Biyolojik Varyasyon Değerlendirmesi	22
3.7. İstatistiksel Analiz.....	24
3.8. Proje Desteği ve Etik Kurul	24
4. BULGULAR.....	25

4.1. Çalışma Popülasyonunun Demografik ve Ölçüm Parametrelerinin Değerlendirme Bulguları	25
4.2. Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçüm Metodunun Analitik Performansının Değerlendirilme Bulguları	26
4.3.Glikozillenmiş Tırnak Proteininin Biyolojik Varyasyon ve Referans Değişim Değerleri Değerlendirme Bulguları	28
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37
ETİK KURUL.....	48
ÖZGEÇMİŞ	50

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1: Çalışma popülasyonunun (N=32) demografik ve ölçüm parametreleri ile IDF kriterlerine göre çalışma popülasyonunda metabolik sendrom frekansı ve komponentleri.....	25
Tablo 4.2: Hazırlanan serum, kontrol ve tırnak havuzlarından elde edilen numunelerde fotometrik NBT metoduyla ölçülen fruktozamin ($\mu\text{mol/L}$) ve glikozillenmiş tırnak proteini ($\mu\text{mol/g}$) için yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.....	28
Tablo 4.3: Katılımcılardan (N=32) numune alım zamanlarında (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10) her bir bireye ait sağ ve sol parmaklardan elde edilen tırnak numunelerinin glikozillenmiş tırnak proteini değerlerinin sağ ve sol parmaklar için karşılaştırmaları.....	29
Tablo 4.4: Sağ/sol parmaklar ile tüm parmaklardan elde edilen glikozillenmiş tırnak proteini verilerden belirlenen birey-içi biyolojik varyasyon ($\%CV_I$), bireyler-arası biyolojik varyasyon ($\%CV_G$), bireysellik indeksi (I.I.), referans değişim değeri (RCV) ve kalite gereksinimleri.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Normal insan tırnak ünitesi bileşenlerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.2: Tırnağın farklı lokasyonlarında keratin gen ekspresyonları.....	13
Şekil 2.3: Proteinlerin non-enzimatik glikozillenme sürecinde açığa çıkan Amadori ürünleri.....	15
Şekil 4.1: Fruktozamin standartları (precimat fructosamine, lot:181829 Ver.1, calibrator code: 00581, calibration value: 408 µmol/L, Roche Diagnostics, USA) ile analizlerin yapıldığı 7 günün ilk ve son günü yapılan kalibrasyon çalışma sonuçları.....	26
Şekil 4.2: Analizlerin yapıldığı 03 Ocak 2017-17 Ocak 2017 tarihleri arası 7 günde kalite kontrol materyali (precinorm fructosamine, lot: 126146 Ver.1, value: 279 µmol/L, range: 237-321 µmol/L, 1s: 14 µmol/L, Roche Diagnostics, USA) ile elde edilen günlük ölçüm sonuçları (ortalama: 276,9 µmol/L; SD: 20,3 µmol/L; %CV: %7,3).....	27

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ISO: Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization)

SD: Standart Sapma

CV: Varyasyon Katsayısı (Coefficient of Variation)

CV_I : Birey-İçi Biyolojik Varyasyon (within-subject biological variation)

CV_G: Bireyler-Arası Biyolojik Varyasyon (between-subject biological variation)

IFCC: Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry)

CV_{TI}: Birey-İçi Total Varyasyon.

CV_A : Analitik Varyasyon

NCCLS: Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

I.I: Bireysellik İndeksi (Individuality Index)

RCV: Referans Değişim Değerleri (Reference Change Values)

AGE: İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycation End Products)

NGSP: Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (National Glycohemoglobin Standardization Program)

HPLC: Yüksek Performanslı Likid Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)

HbA_{1c}: Glikozile Hemoglobin

NBT: Nitro-Blue Tetrazolium

IDF: Uluslararası Diabet Federasyonu (International Diabetes Federation)

DCCT: Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Testi (Diabetes Control and Complications Trial)

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ÖZET

GLİKOZİLLENMİŞ TIRNAK PROTEİNLERİNİN BİYOLOJİK VARYASYON VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Literatürde farklı çalışma grupları tarafından serum, plazma, idrar gibi vücut sıvılarında farklı analitlerin birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değerleri bildirilmiş olup, bu parametreler klinik tanı ve takipte kullanılan bir analite ait referans aralıklarının kullanımının yararlılığını ortaya koymada fayda sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda diyabetik hastalarda özellikle uzun dönem glisemik kontrolün izlenmesinde glikozillenmiş tırnak proteinlerinin kullanımına yönelik dikkate değer veriler bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı glikozillenmiş tırnak proteinlerinin birey - içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değerlerini, bireysellik indeksini ve referans değişim değerlerini belirleyerek, glikozillenmiş tırnak proteinleri analiz test sonuçlarının değerlendirilmesine katkı sağlamaktır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya 18-45 yaş aralığında ve her iki cinsiyette herhangi bir hastalık hikâyesi olmayan 32 sağlıklı gönüllü (18 kadın ve 14 erkek) dâhil edildi. Çalışmaya dâhil olan gönüllülerden elde edilen tırnak ve kan numuneleri seçilen 6 aylık bir zaman diliminde 10 farklı zamanda alındı. Glikozillenmiş tırnak proteinleri ölçümü modifiye edilmiş spektrofotometrik nitro-blue tetrazolyum (nitro-blue tetrazolium-NBT) metoduna göre yapıldı.

Bulgular: Glikozillenmiş tırnak proteinleri için birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değeri sırasıyla %17,59 ve %29,01 olarak belirlendi. Hesaplanan bireysellik indeksi değeri 0,606 olup; bir parametre için bireyin seri ölçümlerinde klinik açıdan anlamlı farklılığı gösteren referans değişim değeri glikozillenmiş tırnak proteinleri için %95 olasılık ile %55,1 olarak belirlendi.

Sonuç: Glikozillenmiş tırnak proteinleri için elde edilen bu sonuçlar bireyselliğin yüksek olduğunu ve bu nedenle referans aralıklarının kullanımına oranla bireyin önceki sonuçlarına göre yapılan değerlendirmelerde değişimlerdeki anlamlılığın saptanmasının klinik olarak daha yararlı olacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: bireysellik indeksi, biyolojik varyasyon, glikozillenmiş tırnak proteinleri, referans değişim değerleri.

Memnune AYDINHAN. Yüksek Lisans Tezi. Giresun Üniversitesi – Giresun, Mart-2018.

ABSTRACT
**DETERMINATION OF BIOLOGICAL VARIATION AND REFERENCE
CHANGE VALUES OF GLYCATED NAIL PROTEINS**

Aim: In the literature, the biological variation values of different analytes in the body fluids such as serum, plasma, and urine have been reported by different study groups. These parameters are useful in revealing the usefulness of the use of the reference intervals belonging to the clinical diagnosis and follow-up analysis. There are considerable data about the use of glycated nail proteins in especially long-term glycemetic control monitoring in previous studies. The aim of this study was to contribute to the evaluation of glycated nail proteins analysis test results by determining the within-subject biological variation, between-subject biological variation, individuality index, and reference change values of glycated nail proteins.

Materials and Methos: Thirty-two healthy volunteers in both genders (18 female and 14 male), aged 18-45 years and without any disease history, were included in the study. The nail and blood samples from the volunteers involved in the study were taken at 10 different times within a selected 6-monthly time period. The measurement of glycated nail proteins was performed according to the modified spectrophotometric nitro-blue tetrazolium (NBT) method.

Results: The within-subject biological variation and between-subject biological variation of glycated nail proteins were 17.59% and 29.01%, respectively. The calculated individuality index value was 0.606; the reference change value showing a clinically significant difference in the individual's serial measurements for a parameter was 55.1% with 95% probability for glycated nail proteins.

Conclusions: These results for glycated nail proteins show that the individuality is high and therefore it is clinically more useful to determine the significance of the changes in the assessments made according to the individual's previous results than the use of the reference intervals.

Key words: biological variation, glycated nail protein, individuality index, reference change values.

Memnune AYDINHAN. Master's Thesis. Giresun University – Giresun, March-2018.

1.GİRİŞ

Tıbbi laboratuarlarda çeşitlilik gösteren analizlerle elde edilen tıbbi veriler klinisyenlerin hastalık tanısı, tedavi izlemi ve takibinde sağlık organizasyonlarında büyük öneme sahiptir. Analizlerle doğru ve güvenilir bir test sonucunun elde edilmesinde test sonuçlarının varyasyon kaynaklarının etkilerinin bilinmesi ve kontrol altına alınması gerekir. Bu noktada üç temel varyasyon kaynağından bahsedebiliriz (Krintus ve ark. 2017). Bunlar hastanın hazırlanması ve numune elde edilme süreçlerini kapsayan pre-analitik varyasyonlar, analiz süreçlerindeki rastgele ve sistematik değişimleri içeren analitik varyasyonlar, bir bireyde veya bireyler arasında her analitin homeostatik ayar noktasında izlenen rastgele dalgalanmaları içeren biyolojik varyasyonlardır. Biyolojik varyasyon kaynakları olarak yaş, cinsiyet, diyet, fiziksel egzersiz, patolojik durum, alınan tedavi, gün içi değişimler, aylık-mevsimsel değişimler belirtilebilir (Fraser,2001).

Bir analite ait test sonuçlarının bir bireyde zamana bağlı değişimi klinik tanıda önemli olduğu gibi zamana bağlı değişim oranı prognozda da yararlı olabilir. Literatürde farklı çalışma grupları tarafından serum, plazma, idrar gibi vücut sıvılarında farklı analitlerin birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon değerleri bildirilmiş olup, bu parametreler klinik tanı ve takipte kullanılan bir analite ait referans aralıklarının kullanımının yararlılığını ortaya koymada fayda sağlamaktadır (Ricós ve ark.,2004;Westgard,2017). Analizlerle elde edilen bir laboratuvar test sonucu tıbbi teşhis, tedavi veya takipte kullanılmak istendiğinde daha önce belirli kriterlere göre belirlenmiş referans aralığı ile karşılaştırılır. Klinik uygulamalarda referans aralıklarının kullanımında yaşanan problemlerden biri test sonuçlarının kişiselleşmesidir. Bu durum bir testin bireyler-arası biyolojik varyasyonunun birey-içi biyolojik varyasyonundan büyük olması ile açıklanır. Bir testin biyolojik bireysellik indeksinin artması referans aralıklarının kullanımına oranla bireyin önceki sonuçlarına göre yapılan değerlendirmelerde değişimlerdeki anlamlılığın saptanmasının klinik olarak daha yararlı olacağını gösterir (Walton,2012; Ricós ve ark.,2007). Böyle bir durumda bir parametre için bireyin seri ölçümlerinde klinik açıdan anlamlı farklılığı gösteren referans değişim değerlerinin kullanımının önemini ortaya çıkmaktadır. Ancak analiz yapılan laboratuvarlarda kullanılan reaktif, ekipman ve personele bağlı değişkenlik gösteren analitik varyasyondan dolayı her laboratuvarın her bir teste ait referans değişim değerlerini belirleme gerekliliği bulunmaktadır (Fraser,2011). Yapılan çalışmalarla

glikozillenmiş tırnak proteinlerinin diyabetik hastalarda özellikle uzun dönem glisemik kontrolün izlenmesinde kullanımına dair dikkate değer veriler bulunmaktadır (Kishabongo ve ark.,2014;2015; Katchunga ve ark.,2015). Ancak literatürde glikozillenmiş tırnak proteinlerinin biyolojik varyasyonunun belirlenmesine yönelik çalışma bulunmamakta olup, bu parametrenin diyabetik hastaların tanı ve takibinde kullanılmasına yönelik kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı ise glikozillenmiş tırnak proteinlerinin birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değerlerini, bireysellik indeksini ve referans değişim değerlerini belirleyerek, glikozillenmiş tırnak proteinleri analiz test sonuçlarının değerlendirilmesine katkı sağlamaktır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Test Sonuçlarında Varyasyonlar

Analizlerle doğru ve güvenilir bir test sonucunun elde edilmesinde etkilerinin bilinmesi ve kontrol altına alınması gereken varyasyon kaynakları şunlardır (Fraser,2001):

- Pre-analitik varyasyon
- Analitik varyasyon
- Post-analitik varyasyon
- Biyolojik varyasyon

Pre-analitik ve analitik faktörlerden gelen varyasyonların oluşturduğu total analitik varyasyon ve birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyonların oluşturduğu biyolojik varyasyon total gözlemlenen varyasyonun komponentleridir (Karkalousos ve Evangelopoulos,2011).

2.1.1. Total Analitik Varyasyon

2.1.1.1. Pre-Analitik Varyasyon

Klinik laboratuvar uygulamalarında özellikle 1990'ların başında pre-analitik ve post-analitik hataların yüksek oranlarına dair elde edilen veriler toplam test sürecindeki hataların önemini ortaya koymuştur (Plebani, 2013). Özellikle, 1997 ve 2007 yıllarında iki önemli makaleden elde edilen sonuçlar hataların dağılımını pre-analitik olarak % 62-68, analitik olarak % 13-15 ve post-analitik olarak % 18- 23 olarak göstermiştir (Plebani ve Carraro,1997;2007). Bu durum bize laboratuvar uygulamalarında her gün pre-analitik hatalar sonucu ortaya çıkan verilerle karşı karşıya gelindiğini göstermektedir. Bu verileri tanıma kabiliyeti, toplam laboratuvar kalitesinin korunması için kritik önem taşımaktadır. Bu noktada pre-analitik değişkenleri, kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler şeklinde iki grup altında toplayabiliriz (Turhan ve ark.,2010). Yaş, cinsiyet, ırk gibi değişkenler kontrol edilemeyen faktörler iken; sigara-alkol kullanımı, ilaç kullanımı, diyet, egzersiz, gebelik, seyahat gibi değişkenler kontrol edilebilen değişkenlerdir (Sönmez,2013).

2.1.1.2. Analitik Varyasyon

Her analitik veya ölçüm tekniği değişken bazı içsel hata kaynaklarına sahiptir. Bunlar tamamen elimine edilemez olsalar da kalite kontrol laboratuvar uygulamaları, akıllıca seçilmiş iyi bir metodoloji ile minimize edilebilir. Analitik varyasyonun iki tipi vardır. Bunlar rastgele ve sistematik varyasyonlar olarak tanımlanıp, genelde metodun kesinliği (presizyon) ve doğruluktan sapması (bias) olarak ta tanımlanabilir (Fraser,2001). Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization-ISO) öngörülen koşullar altında elde edilen ölçümlerin bağımsız sonuçları arasındaki uyuşmanın yakınlığını “kesinlik (presizyon)” olarak tanımlar. Uygulamada, kesinlik aynı numunenin tekrarlı analizi ile ölçülür. Bulunan kesinlik değerinin analitik koşullardan etkilenmiş olabileceği unutulmamalıdır. Tekrarlı analizlerle elde edilen dağılımın merkezi eğilim ölçütü olarak ortalama ve yayılma ölçütü olarak standart sapma kullanılır. Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation-CV); (standart sapma / ortalama) x 100 olarak hesaplanır (Fraser,2001). ISO, Sistematik varyasyonu (bias) ölçüm sonuçlarının beklentisi ile ölçülen niceliğin gerçek değeri arasındaki fark" olarak tanımlar. Bir metot için sistematik varyasyonun düzeyi inteferans, recovery ve metot karşılaştırma çalışmalarından elde edilir.

Çevre değişiklikleri, malzemelerin tutarsız kullanımı, pipet veya seyreltici tarafından aktarılan örnek veya reaktif hacminde değişkenlik, sıcaklık dalgalanmaları gibi kaynaklardan ortaya çıkan rastgele varyasyon, kullanılan metodoloji ve analitik sistemin doğasında vardır. Eğer bir yöntemin kesinlik değeri kabul edilebilir düzeylere sahipse rastgele varyasyonu düşük olacaktır ve bu tür bir yöntem ile elde edilen sonuçlarda zaman içinde en azından analitik etkiler nedeniyle fazla bir değişiklik olmayacaktır. Aksine bir yöntem kötü kesinlik değerlerine sahipse, büyük analitik rastgele etkiler birçok önemli klinik kararları yanıltabilecektir (Sönmez,2013; Fraser 2001). Başlıca analitik hata kaynakları olarak cihazların hatalı kullanımı ve bakımlarının ihmal edilmesi, kalibrasyon ve kontrol işlemlerinin yapılmaması veya aksatılarak yapılması, numune veya reaktif hacmindeki değişiklikler, çevre şartlarındaki değişimler (sıcaklık, nem, havalandırma vs.), tarihi geçmiş ve tutarsız malzeme kullanılması ile personel kaynaklı hatalar sayılabilir (Wesgard ve Klee,2005).

2.1.2. Biyolojik Varyasyon

Varyasyon, ritmik biyolojik döngülerin ve yaşam süresi içindeki değişikliklerin bir sonucu olarak meydana gelmesine rağmen birçok analitin biyolojik varyasyonu en

basit şekilde homeostatik bir denge noktası etrafındaki ortalama rastgele dalgalanmalar olarak tanımlanabilir (Ricós ve ark.,2004). Her bireyin denge noktası etrafında rastgele dalgalanmadan oluşan analitlerin rastgele değişimleri, birey-içi biyolojik varyasyon olarak bilinir. Her bireyin denge noktası diğerlerinden farklı olabilir ve bu fark nedeniyle oluşan genel varyasyon, bireyler-arası biyolojik varyasyon olarak bilinir (Ricós ve ark.,2004; Öztürk ve ark.,2013). Biyolojik varyasyon genellikle varyasyon katsayıları cinsinden ifade edilir. Sırası ile birey-içi ve bireyler-arası varyasyon CV_i ve CV_e şeklinde gösterilir. Biyolojik varyasyon bileşenlerinin sayısal verileri bir kişinin seri sonuçlarında meydana gelen değişikliklerin önemini değerlendirmek için gereken referans değişim değerini hesaplamak ve bireysellik indeksi yoluyla populasyon temelli referans aralıklarının faydasını değerlendirmek için kullanılmıştır. (Corte ve Venta, 2010). Çok sayıda laboratuvar testi için biyolojik varyasyon ve analitik kalite gereksinimleri ile ilgili veriler mevcuttur. Klinik laboratuvarlarda değerlendirilen analitlerin test sonuçlarının biyolojik varyasyonu, analiz sürecinin tüm aşamaları boyunca birçok olası sorunu anlamak için kilit önem taşımaktadır. Pre-analitik aşamada, özellikle numune alma zamanları için öngörülebilir döngüsel biyolojik ritimlerin bilgisi gereklidir. Günlük, aylık ve mevsimsel ritimler birçok analit için tanımlanmış olup, döngüsel biyolojik ritimlerin bilinmesi sadece numune toplamak için değil aynı zamanda test sonuçlarının yorumlanması için de kritik rol oynamaktadır (Narayanan,2000). Analitik aşamada biyolojik varyasyonların değerlendirilmesi güvenilir kalite gereksinimlerinin belirlenmesi için değerli bilgiler sunmaktadır. Post-analitik aşamada ise tıbbi laboratuvarlarda analiz edilen analitlere ait temel biyolojik varyasyon bilgileri, geleneksel populasyona dayalı referans değerlerin elde edilmesi ve klinik uygulamalarda etkinliğinin anlaşılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Plebani ve Lippi,2012).

2.1.2.1. Biyolojik Varyasyonun Kaynakları

Laboratuvar tıbbında incelenen biyolojik varyasyonların kaynağı üç tip olarak tarif edilebilir. Bunlar; yaşam boyu varyasyon, günlük, aylık veya mevsimlik olarak öngörülen döngüsel varyasyon ve rastgele varyasyon (Öztürk ve ark.,2013). Birey-içi biyolojik varyasyonun ek kaynakları olarak, doğal yaşlanma süreci, cinsiyet, kilo, diyet, egzersiz, günlük mevsimlik ritimler ve patolojik süreçlerin neden olduğu değişikliklerin etkilerini dahil edebiliriz (Ricós ve ark.,2004).

2.1.2.1.1. Farklı Yaş Evrelerinde Biyolojik Varyasyon

Bazı analitler, bir bireyin yaşamı boyunca değişir ve bu durum rutin laboratuvar uygulamalarında kronolojik yaşa uygun olarak referans değerlerini belirleme ve değerlendirme ihtiyacını doğurmaktadır. Biyolojik varyasyonlarda yaş ile birlikte meydana gelen dikkate değer değişiklikler özellikle yaşamın yeni doğan, çocukluk, ergenlik, yetişkinlik ve yaşlılık dönemlerinde meydana gelir (Fraser,1993).

2.1.2.1.2. Günlük Biyolojik Ritimler

Yayınlanmış literatür bilgileri incelendiğinde günlük ritimlerin bazılarının saat/zaman boyutu ile bazılarının ise uyku/uyanıklık durumları ile ilgisi vardır. Ek olarak, bu günlük ritimler mutlaka yaşam boyunca sabit kalmaz (Kostić ve Secen, 1997). Uykudan sonra growth hormon konsantrasyonları ergenlik dönemi ve öncesi genellikle hemen yükselir ancak yaşlılık döneminde yüksek bulunmayabilir (Mullington ve ark.,1996). Aynı zamanda bu ritimler basitçe duruş değişiklikleri gibi faktörler nedeniyle de oluşabilir. Örneğin, proteinler ve protein bağlı bileşenler sırtüstü pozisyonda düşüş gösterir (Lippi ve ark., 2015). Ayrıca günlük biyolojik ritimler gıda alımını ve fiziksel aktivite gibi nedenlerden de etkilenir. Örneğin, gıda alımı glukoz ve trigliserid seviyelerini etkilerken; yoğun fiziksel aktivite kreatin kinaz aktivitesini yükseltir. Tıbbi laboratuvarlar kalite gereksinimleri kapsamında günlük ritimlerin etkilerini en aza indirmek için (özellikle pre-analitik varyasyonu azaltmak için) tüm numunelerin sabah alınmasına dikkat etmelidirler. Serum kortizol gibi bazı analitler için örnekler özel olarak belirlenen zamanlarda alınmalıdır (örneğin, saat 09:00 veya 24:00 gibi) (Young ve Bermes,2005).

2.1.2.1.3. Aylık Devirler

Bazı analitlerin bir dizi aylık döngüleri vardır. Bu ritmik döngüler test sonucunu yorumlamak için önemli faktörlerdir. Kadın cinsiyet hormonlarının çoğunun plazma konsantrasyonları menstürasyon döngüsünden etkilenir. Örneğin bir ovülasyonun meydana gelip gelmediği ve corpus luteum oluşup oluşmadığını değerlendirmek için progesteron döngününün 21. günde ölçülmelidir (Young ve Bermes, 2005).

2.1.2.1.4. Mevsimsel Ritimler

Mevsimsel ritimler diğer biyolojik döngülere oranla daha az dokümanite edilmiştir. Bu nedenle mevsimsel değişimleri incelenmesi oldukça zordur. Birçok pre-analitik faktörler test sonuçlarını etkileyebilir ve bu mevsimsel etkilerin oluşmasının ilk başlarda görünen ana nedeni olabilir (Fraser,2001). Örneğin;

- Serum laktat dehidrojenaz aktivitesi yaz aylarında kış aylarından daha yüksektir. Bu artış fiziksel aktivitenin artmasına atfedilmiştir.
- Serum kolesterol konsantrasyonu kış aylarında yaz aylarından daha yüksektir. Düşük fiziksel aktivite, alınan gıda artışı ve kış aylarında düşük güneş ışığı seviyeleri bu düşüşün nedenleri olarak öne sürülmüştür.
- Kan hacmi yüksek sıcaklıklar nedeniyle yaz aylarında artma eğilimindedir.
- Proteinler kış aylarında yaklaşık % 10 oranında artabilir.
- Glikozile hemoglobin yaz aylarında yükselir.

Bunlar genellikle küçük etkilerdir, akademik olarak ilgi çekici olsalar da gündelik pratikte laboratuvar test sonuçlarının klinik yorumlanması üzerinde önemli ölçüde etkisi görünmemektedir.

2.1.2.1.5. Random Biyolojik Varyasyon

Laboratuvar sonuçlarının zamanla değiştiği ve elde ettiğimiz sayıların sabit olmadığı ve bu durumun muhtemelen pre-analitik faktörler, analitik rastgele varyasyon ve sistematik hatalar nedeniyle homeostatik bir ayar noktası etrafında rastgele dalgalanmalar sonucu değiştiği söylenebilir (Walton,2012). Bir analitin bireysel homeostatik denge noktası etrafında rastgele değişimi olarak tanımlanan bireysel biyolojik varyasyon ve bireyler arasında oluşan biyolojik varyasyon değerleri rutin laboratuvar uygulamalarında analitik kalite hedeflerini belirlemek, analizlerde seri analizlerle beliren değişiklikleri değerlendirmek ve popülasyon temelli referans aralıklarının klinik yararlarını ölçmek için kullanılır (Lacher ve ark., 2010).

2.1.2.2. Biyolojik Varyasyonun Komponentlerini Belirleme

2.1.2.2.1. Çalışmaya Dâhil Edilecek Bireylerin Seçimi

Rastgele biyolojik varyasyonların yani birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon bileşenlerine ait veri elde etmek bazı yönlerden konvansiyonel popülasyon temelli referans değerlerin belirlenmesine benzemektedir. Aralarındaki fark analize dâhil edilen bireylerin ve her bir bireyden alınan örneklerin sayısıdır. Biyolojik varyasyon çalışmalarında büyük bir birey grubundan bir örnek almak yerine daha küçük bir birey grubundan farklı zamanlarda daha fazla örnek alınmaktadır. Literatürde analiz edilen analizlere ait spesifik hastalıkları olan gruplardan elde edilen veriler olmasına rağmen, bu tip çalışmalarda araştırma konusu olan çoğunlukla sağlıklı bireylerdir. Çalışma için seçilen bireyler Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu'nun (International

Federation of Clinical Chemistry-IFCC) referans aralıklarının belirlenmesinde tanımladığı "referans bireyler" olmalıdır (Solberg, 1987). Bu durum, çalışmaya dâhil edilmeden önce bireyler için bazı dışlama ve dâhil etme kriterlerinin uygulanma gerekliliğini ortaya koymaktadır. Referans bireylerin seçimi yapılırken dikkate alınan unsurlardan bazıları şöyledir (PetitClerc ve Solberg, 1987);

- Bir süre boyunca bir dizi numune vermeye gönüllü olan bireyler
- Görünüşte sağlıklı ve araştırılan analitlerin analizini etkileyebilecek herhangi bir ilaç almayan (kontraseptifler ve tezgâh üstü ilaçlar dâhil) bireyler
- Alışılmadık yaşam tarzları veya alışkanlıkları olmayan bireyler
- Önerilen alkol birimi miktarından fazlasını tüketmeyen (tütün ürünlerinin kullanılması da muhtemel bir dışlama kriteri olmalıdır) bireyler

Bireyler çalışmaya kabul edilmeden önce klinik, biyokimyasal ve hematolojik testler yapılabilir. Aynı zamanda cinsiyet laboratuvar test sonuçlarının yorumlanmasında önemli bir faktör olduğundan genellikle biyolojik varyasyon çalışmalarına erkek ve kadın bireyler benzer oranlarda dâhil edilirler. Referans aralığının belirlenmesinde en az kaç veri olmasıyla alakalı yapılan çalışmalarda analiz için en az 120 referans verisinin olma gerekliliği bildirilmesine rağmen (Reed ve ark., 1971), biyolojik varyasyon çalışmaları için belirlenmiş kesin bir denek sayısı yoktur. Ancak istatistiksel olarak daha fazla veri olması güven aralıklarını ve hata yapma olasılığını düşürür.

2.1.2.2.2. Numunelerin Toplanması, Saklanması ve Analizi

Analitlerin analiz sonuçları için total gözlemlenen varyasyonun bir komponenti olan pre-analitik varyasyonunun bileşenlerini kontrol altına almak için yapılması gereken uygulamalar şöyledir (Fraser, 2001; Solberg ve PetitClerc, 1988);

- Bireylerden numuneler günün aynı saatinde alınmalıdır (genellikle sabahın erken saatlerinde).
- Kişiler numune almadan önce yorucu bir egzersiz, yemek ya da kahvaltı yapmamalı ve numune alınmadan önce en az 30 dakika dinlendirilmelidir.
- Kan örneklerini standart bir flebotomi tekniği ile tercihen tek deneyimli bir flebotomist ile aynı lot numaralı toplama tüplerine alınmalıdır.
- Numunelerin aynı süre, sıcaklık ve koşullar altında laboratuvara taşınmalıdır.
- Numuneler aynı devirde ve sıcaklıkta santrifüj edilmelidir.
- Tüm örnekler dondurulmalı ya da toplanan numuneler hemen analiz edilmelidir.

- Eğer çalışma kan dışında bir vücut sıvısı ile yapılıyorsa benzer ilkeler takip edilmelidir.
- Numune toplama ve hazırlama saatleri standardize edilmelidir.
- Toplama kabındaki dengeleyici veya koruyucu maddelerin miktarı sabit tutulmalıdır.

Numunelerin analiz aşamasında oluşacak analitik varyasyonun mümkün olduğunca düşük seviyelerde tutulması gerekir. Bunun için tasarlanmış farklı deneysel yöntemler vardır. Bu deneysel yöntemlerden en ideal olanı her bir numunenin çift çalışılmasıdır. Tüm numuneyi toplamak ve saklamak, daha sonra bunları analitik olarak yalnızca bir ölçüm serisi içinde analiz etmek uygulanan bir diğer deneysel yöntemidir (Fraser, 2001). Bu tip çalışmalarda analitik varyasyon kalite kontrol numuneleri kullanılarak değerlendirilebilir. Ancak bu uygulamalar bazı dezavantajlara sahiptir. Bazı testler için kalite kontrol numuneleri ile elde edilen hassasiyet, hasta numuneleri ile elde edilenlerden farklı olabilir. Böyle bir durumda analizlerin hassasiyetinin her iki numune çeşidi için de deney-içi ve deneyler-arası tekrarlanabilirlik çalışmaları benzer olduğunun ortaya konması gerekir (Krouwer,2002).

2.1.2.2.3.Verilerin Elde Edilmesi ve İstatistik Uygulamalar

Analiz test sonuçlarına ait veri setinin homojenitesinden emin olunduktan sonra biyolojik varyasyon değerlerinin belirlenmesi için tanımlanmış istatistiksel metotlar kullanılır (Fraser, 2001; Fraser ve Harris, 1989). Ancak bu metotları uygulamadan önce grup dağılımından ayrılmış sapan (outliers) ve aşırı uç değerlerin (extreme values) saptanması ve bu değerlerin çalışma dışı bırakılması gerekir. Bu amaçla biyolojik varyasyon değerlerinin belirlenmesinde veri seti için her bir kişiye ait uç değerlerin atılmasında Cochran testi (Cochran,1941), her bir bireye ait ortalama değerlerin diğer bireylerden elde edilen ortalama değerlerden büyük farklılık gösterenlerin belirlenmesinde Reed kriteri kullanılır (Reed ve ark., 1971). Veri setinde grup dağılımlarından ayrılmış verilerin dışlanmasıdan sonra her bir bireyin farklı zamanlarda elde edilen verilerinden hesaplanan birey-içi total varyasyon (CV_{Ti}) ve analitik varyasyon (CV_A) değerleri kullanılarak birey-içi biyolojik varyasyon hesaplanır. Çalışmaya katılan tüm bireylerin tüm verileri kullanılarak elde edilen tüm sonuçlar arası varyasyon (CV_T), analitik varyasyon (CV_A) ve birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I) değerleri kullanılarak ise bireyler-arası biyolojik varyasyon (between-subject biological variation— CV_G) hesaplanır (Fraser, 2001; Fraser ve Harris, 1989).

2.1.2.3. Biyolojik Varyasyonun Referans Aralığa Etkileri

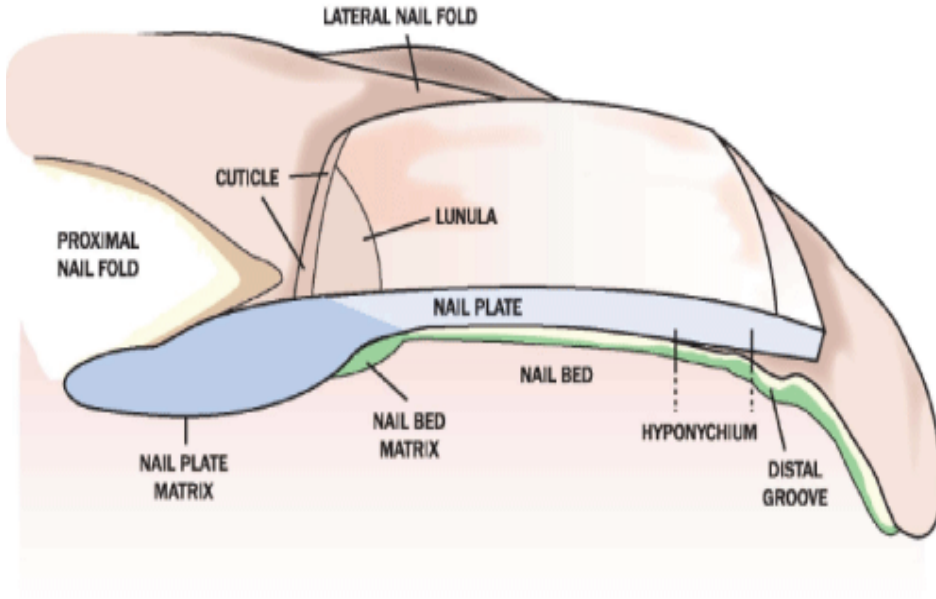
Klinik biyokimya laboratuvarlarında çalışılan biyokimya testlerinin yorumlanmasında rutin uygulamalarda referans aralıkları kullanılmaktadır. Referans aralığı Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS) ve Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu'nun (International Federation of Clinical Chemistry - IFCC) önerilerine göre parametrik ve non-parametrik yöntemlerle hesaplanmaktadır (İlçöl ve Aslan 2004;Solberg 1987). Referans aralıkları seçilen referans bireylerin açık ve net dâhil etme ve dışlama kriterlerine göre belirlendiği direk (priori veya posteriori) yöntemle belirlenebileceği gibi laboratuvara başvuran hastaların test sonuçları kullanılarak indirekt yöntemlerle de belirlenebilir (O'Halloran ve ark., 1970; Karisto ve ark., 1994; Baadenhuijsen ve Smit, 1985).

Birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değerleri test sonuçlarının değerlendirilmesinde popülasyona temelli referans aralıklarının etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Bireysellik indeksi olarak adlandırılan (individuality index-I.I.) bu değerler birey-içi biyolojik varyasyonun bireyler-arası biyolojik varyasyona oranı ile belirlenir ($I.I. = CV_i / CV_c$) (Fraser, 2001; Öztürk ve ark., 2013). Test sonuçlarının referans aralık ile karşılaştırılarak değerlendirilmesinin uygunluğu hakkında bilgi veren bireysellik indeks sonucu küçüldükçe bireyselliğin arttığı düşünüldüğünde bireyin seri test sonuçlarındaki anlamlı farklılığın belirlenmesi gerekmektedir. Bu noktada kritik fark olarak ta adlandırılan referans değişim değerleri (RCV) bir bireyin seri test sonuçları arasındaki farklılıkların önemini değerlendiren sayısal değerlerdir. Bir analit için analitik varyasyon (CV_A) ve birey-içi biyolojik varyasyon (CV_i) değerleri kullanılarak referans değişim değerlerini %95 olasılık ($p<0,05$) veya %99 olasılık ile ($p<0,01$) hesaplayabiliriz (Fraser,2011).

2.2. Tırnak Yapısı

2.2.1 Tırnağın Anatomik ve Histolojik Yapısı

Anatomik ve histolojik olarak tırnak yapısı ile yapısal tırnak terimlerinin bilgisi klinik ve bilimsel çalışmalar için önemlidir. Tırnak yapısını oluşturan anatomik birimlerin şekli ve tanımları aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.1: Normal insan tırnak ünitesi bileşenlerinin şematik gösterimi (Zaias,2014).

Nail plate (tırnak plağı) : Yaşam boyu büyümeye devam eden dayanıklı keratinize yapıdır.

Lateral nail folds (yan tırnak kıvrımları): Tırnağa yan sınırlar sağlayan kutanöz katlanmış yapılardır.

Proximal nail fold (yakın tırnak kıvrımı): Kütikül ile aralıksız devam eden, tırnağın görünür proksimal sınırını sağlayan, kutanöz katlanmış bir yapıdır. Alt yüzeyde dorsal matris haline gelir.

Cuticle (eponychium/epidermis) : Epidermis tabakası, proksimal tırnak kıvrımından uzanır ve tırnak plakasının dorsal yüzüne bağlanır.

Nail matrix (tırnak kökü): Genel olarak, bu kısım üç bölüme ayrılabilir. Sırt (dorsal) matris, proksimal tırnak kıvrımının ventral yönü ile eşanlamlıdır. Ara (intermediate) matris (germinatif matris), dorsal matrisin proksimal tırnağın altında kallabilmesi için kendisine geri katlandığı noktadan başlayan epitel yapısıdır. Ventral matris tırnak yatağıyla eşanlamlıdır ve ara matrisin sonlandığı lunula sınırından başlar. Hiponychium tarafından distal olarak sınırlıdır.

Lunula (half moon): Tırnak boyunca görülen ara matrisin konveks (dışbükey) kenar boşluğudur. Bitişğinde bulunan tırnak yatağından daha renksizdir. Çoğunlukla

başparmaklarda ve büyük parmaklarda görülebilir. Proksimal tırnak kıvrımı ile örtülmüş olabilir.

Nail bed (ventral matris, steril matris/tırnak yatağı): Lunula'dan hiponychium'a uzanan tırnağın dayandığı vasküler yataktır. Burası, tırnak plağı boyunca görülen ana bölgedir.

Onychodermal (Onikodermal) band: Tırnak yatağının distal kenarı, tırnak yatağının geri kalanıyla karşılaştırıldığında zıt renk tonuna sahiptir. Normalde, kahverengi (Afro-Caribbean) veya koyu pembe (Caucasian) 1-1,5 mm'lik enine bir banttır. Rengi veya varlığı, vasküler beslemeyi etkileyen hastalık veya sıkıştırma ile değişebilir.

Hyponychium (solenhorn içerir) : Distal oluk ile distalde sınırlanmış, serbest tırnağın altındaki kutanöz kenardır.

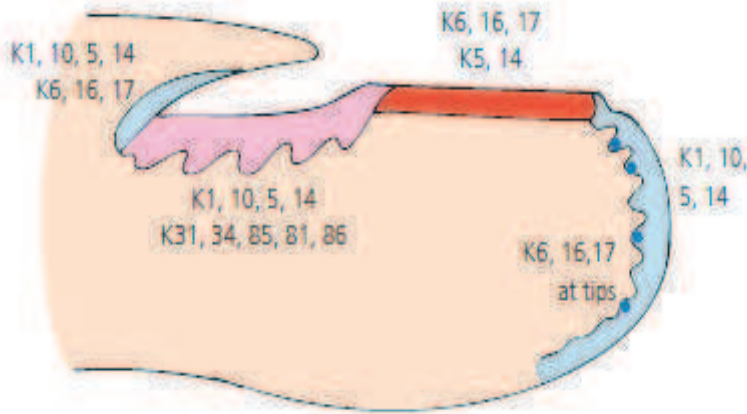
Distal groove (distal oluk): Parmak pulpası ve alt yapılar arasındaki sınırı belirleyen kutanöz bir sırttır (de Berker ve ark., 2007; de Berker ve Baran, 2012; Zaias, 2014).

2.2.2. Tırnağın Temel Proteini Olan Keratinin Yapısı ve Özellikleri

"Keratin" terimi ara filamentler olarak adlandırılan ve sitoplazmik epitelyum ve epidermal ek yapıları (saç, tırnak, toynak) oluşturan çözünmeyen proteinlerin geniş bir kategorisi olarak adlandırılmıştır (Rouse ve Van Dyke, 2010). Şu anda asidik tip I keratinler ve nötr-bazik tip II keratinler olmak üzere iki tür keratin proteini kavramı ortaya çıkmaya başlamıştır. Keratinlerin numaralandırılması, molekül ağırlığına ve izoelektrik noktasına göre iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezinden sonra her bir proteinin bulunduğu yere dayandırılarak yapılır. Nötr-bazik keratinler en büyükten küçüğüne K1-K8'e ve asidik keratinler benzer şekilde K9-K19'a kadar numaralandırılır (Porter, 2006). K11, kuyruk alanındaki farklı sayıda glisin tekrarları nedeniyle K10'un polimorfik bir varyantı olduğu ortaya çıkmıştır (Korge ve ark., 1992). Yapılan araştırmalar keratinleri işlevlerine, düzenleniş ve yapılarına göre hard (sert) ve soft (yumuşak) olmak üzere iki ayrı gruba ayırmıştır. Sert keratinler, sistin bakımından zengin proteinlerin matriksinde yer alan düzenli ara filamentlerden oluşur ve epidermal ek uzantıların (saç, tırnak) sağlam yapısına katkıda bulunur. Yumuşak keratinler tercihen sitoplazmik ara filamentlerin gevşek paketlenmiş demetlerinden oluşur ve epitel hücrelerine mekanik direnç kazandırır (Langbein ve ark., 1999; Lynch ve ark., 1986). Yakın zamanda yapılan bir çalışmayla önceki sistemlerle uyumlu bir şekilde keratinleri yeniden sınıflandıran bir sistem geliştirilmiştir (Schweizer ve ark., 2006). Bu sisteme göre yumuşak ve sert keratinlerinden oluşan 54 fonksiyonel keratin geni 3 kategoriye

ayrılır: (1) epitelyal keratin geni, (2) saç keratin geni ve (3) keratin pseudogenler (yalancı/fonksiyonel olmayan gen)

Yapılan çalışmalarda tırnak ünitelerinde keratinin farklı formlarına rastlanmıştır. Monospesifik antikorlar kullanılarak normal deride suprabazik olarak bulunan "soft" epitelyal keratinlerden keratin 1 ve 10'un tırnak yatağında bulunmadığı bildirilmiştir (de Berker ve ark., 2007). Keratin 7, saç folikülünün ve tırnak ünitesinin diğer yerlerinde bulunurken, monoklonal antikeratin antikorlu LH TRIC 1 tarafından saptanan Ha-1 (K31), tırnak matrisi ve saç folikülünün germinal matrisinde bulunur. Diğer sert saç/tırnak keratinlerinden K85 (hHb5), K34 (hHa4), K81 (hHb1) ve K86 (hHb6)'nın hepsinin matrisin konvansiyonel sınırları içerisinde sınırlı olarak bulunduğu vurgulanmıştır (de Berker ve Baran, 2012). SDS-PAGE kullanılarak yapılan bir çalışmada tırnak plağında epitelyal keratinler olan K1, K5, K6, K10, K14, K16 ve K17 eksprese edilirken, tırnak yatağında ise suprabazal keratinler olan K6, K16 ve K17 ve tırnak matris kreatinleri olan K1, K5, K10 ve K14 eksprese edildiği gösterilmiştir (Kishabongo ve ark., 2015).



Şekil 2.2: Tırnağın farklı lokasyonlarında keratin gen ekspresyonları (de Berker ve Baran, 2012).

2.3. Proteinlerin Glikozillenmeleri

Glikozillenme reaksiyonları olarak bilinen karbonhidrat moleküllerinin protein moleküllerine bağlanması enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar şeklinde oluşur. Karbonhidratların proteinlere bağlanması hücrede endoplazmik retikulum ile golgi

organellerinin zarlarında bulunan glikozil transferaz enzimleri tarafından katalizlenir ve karbohidratlar proteinlerin asparajin, serin veya treonin aminoasitlerinin yan zincirlerine glikozidik bağ ile bağlanırsa enzimatik glikozillenme, indirgeyici şekerler ile şekerlerin metabolik türevleri, herhangi bir enzim tarafından katalizlenmeden proteinler ile tepkimeye giriyorsa non-enzimatik glikozillenme şeklinde gerçekleşir (Kılınç, 2011).

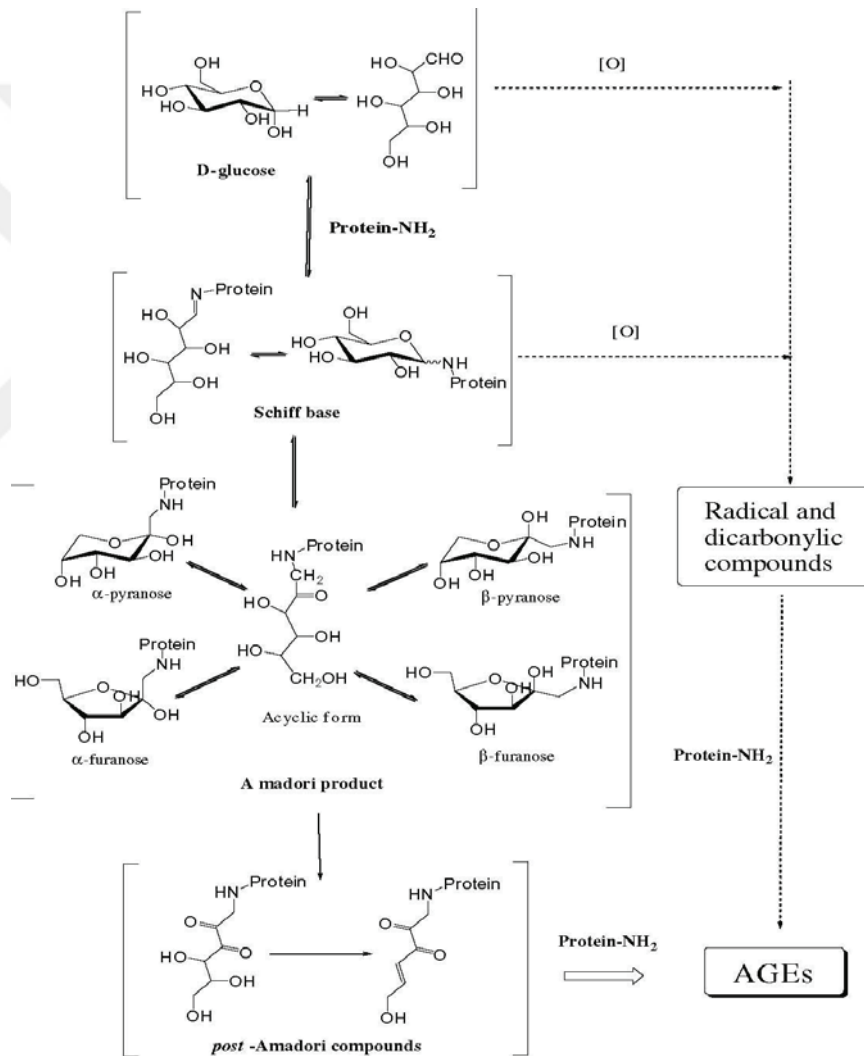
2.3.1. Enzimatik Glikozillenme Reaksiyonları

Enzimatik glikozillenme glikozil transferazların katalizörlüğünde proteinlerin asparajin, serin, treonin ve hidroksilizin amino asitlerine glukoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, N-asetil glukozamin, N-asetil mannozamin ve sialik asitlerin N- ve O-glikozid bağları ile bağlanması ile glikoproteinlerin oluşumu şeklinde meydana gelen reaksiyonlar dizisidir (Alıcı ve Dülger, 2001).

2.3.2. Non-enzimatik Glikozillenme Reaksiyonları

Günümüzde proteinlerin non-enzimatik glikasyonuna "Maillard reaksiyonu" adı verilmektedir. Louis Camille Maillard (1912) ilk olarak redüksiyon şekerlerinin çözeltideki amino asitlerle reaksiyona girerek koyu renkli ürünler (melanoidinler) ürettiğini bildirmiştir (Maillard, 1912). Ardışık ve paralel tepkimelerden oluşan karmaşık bir olay olan Maillard reaksiyonu erken, ara ve geç olmak üzere üç ana aşamaya ayrılır (Sadowska-Bartosz ve Bartosz, 2015). Erken aşamada, glukoz (veya fruktoz, pentozlar, galaktoz, mannoz, askorbat, ksilüloz gibi diğer indirgeyici şekerler) kararsız bir ara ürün olan Schiff bazını oluşturmak için proteinler, nükleik asitler ve lipidler de dâhil olmak üzere birkaç molekülün bir serbest amino grubu ile non-enzimatik bir şekilde reaksiyona girer (Lapolla ve ark., 2005). Schiff bazı oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyon olmakla birlikte, genellikle geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan Amadori düzenlemesine uğrar ve Amadori ürünleri adını verdiğimiz proteinler oluşur (Büyükgüzel, 2013). In vivo koşullarda Amadori ürünü yaklaşık 15-20 gün sonra dengeye ulaşır ve hem kısa ömürlü hem de uzun ömürlü proteinlere geri dönüşümsüz bağlanarak birikir. Ara aşamada, geçirdikleri oksidasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarına bağlı olarak Amadori ürünü, türetildikleri şekerlerden çok daha reaktif olan çeşitli karbonil (glioksal, metilglioksal, deoksiglukozonlar gibi) bileşiklere dönüşür (Lapolla ve ark., 2005). Geç aşamada, Amadori ürünü daha kararlı İleri Glikasyon Son Ürünlerini (Advanced Glycation End Products-AGE'ler) oluşturmak için siklizasyon, oksidasyon ve dehidrasyon gibi reaksiyonları izleyen yeniden düzenlemelerin ardından (moleculus) uzun ömürlü proteinlerde biriken ve hasara neden olan çözünmez, geri

dönüşümsüz bir reaksiyon olan, genellikle sarı-kahverengi ve floresan özelliklerde AGE'ler olarak adlandırılan bileşikleri oluştururlar (Severin ve ark., 2013). Bu bileşiklerin kimyasal niteliği henüz iyi tanımlanmamış olmasına rağmen son araştırmalar, Amadori ürünün oksidatif ve nonoksidatif düzenlemeler ile değişime uğrayarak veya parçalanarak başlıca furfuraler, redüktonlar, dikarboniller ile hidroksikarboniller sınıfından bileşikler kapsayan glikasyon ara ürünleri ve glikasyon son ürünlerine çevrildiğini göstermiştir (Kılınç,2011;Vistoli ve ark., 2013).



Şekil 2.3: Proteinlerin non-enzimatik glikozillenme sürecinde açığa çıkan Amadori ürünleri (Advanced Glycation End Products-AGE'ler) (Ansari ve Dash, 2013).

2.3.2.1. Non-enzimatik Glikozillenmeyi Etkileyen Faktörler

Non-enzimatik glikozillenme reaksiyonları enzimlerin katılımını gerektirmediğinden tepkimeler, indirgeyici şeker ve proteinin konsantrasyonları, serbest amino grupları bakımından reaktivitesi ve hücresel glukoz geçirgenliği ile proteinin yarı ömrü gibi in-vivo değişkenlere bağlı olarak düzenlenir (Garlick ve Mazer, 1983; Kılınç, 2011). Protein glikasyonu yavaş ilerleyen bir tepkime sürecidir ve aynı protein molekülü üzerindeki farklı amino gruplarının glikasyon tepkime hızları birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle yarı ömrü kısa olan proteinlerde protein glikasyonu düşük seviyelerde gerçekleşebilir. Fakat yarı ömrü uzun olan proteinlerde, protein üzerinde zamanla biriken şeker miktarı tayin edilebilir seviyelere ulaşmaktadır (Misciagna ve ark., 2007). Bu nedenle in-vivo koşullardaki protein glikasyonu çalışmaları daha çok yarı ömrü uzun olan proteinlere dayanmaktadır. Sonuç olarak protein glikasyonu hızı ve düzeyi kişinin yaşından bağımsız olarak proteinin yarı ömrü ve maruz kaldığı glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Kılınç,2011).

2.3.2.2. Glikozile Hemoglobin (HbA1c)

Non-enzimatik glikozillenme ile değişime uğradığı ilk belirlenen protein, hemoglobindir (Alıcı ve Dülger,2001). Yetişkin bireylerde total hemoglobinin yaklaşık %97'sini oluşturan HbA'nın karbohidrat (sadece glukoz değil) bağlanmış formları HbA1a1, HbA1a2, HbA1b, HbA1c olarak tanımlanır (Brownlee ve Cerami, 1981). HbA1a1, HbA1a2 ve HbA1b sırayla β -zincirlerinin N-terminal valinin amino gruplarına fruktoz 1,6-bisfosfat, glukoz 6-fosfat ve bilinmeyen karbohidratların HbA0'a bağlanması ile az miktarda oluşan ürünlerdir. HbA1'in β -zincirinin N-terminal valinin amino grubuna glukozun non-enzimatik bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı IFCC tarafından HbA1c olarak tanımlanmıştır (Geistanger ve ark., 2008). HbA1c kandaki ana glikozile hemoglobindir ve HbA1 'in yaklaşık %80'ni oluşturur. Başlangıçta kararsız amino ve aldehit grupları arasındaki aldimin bağı (Schiff bazı) oluşur. Schiff baz ayrılabilir yada geri dönüşümü olmayan Amadori düzenlemesine uğrayarak stabil ketoamin yapısındaki HbA1c oluşur (McDonalt ve ark., 1978).

HbA1c konsantrasyonları eritrositlerin maruz kaldığı plazma glukoz konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Eritrositlerde glukozun hücre içine girişi insülininden bağımsız olduğundan ortalama eritrosit yaşam süresi ile uyumlu olarak HbA1c 2-3 aylık dönemdeki glisemik kontrolü yansıtır (Bunn,1981). HbA1c

düzelelerinin ortalama eritrosit yaşam süresi ile ilişkili olduğu dikkate alındığında ortalama eritrosit yaşam sürelerinin kısaldığı klinik tablolarda (akut kan kaybı, hemolitik anemi, orak hücre anemisi, talesemi gibi) hatalı düşük sonuçlar saptanabilir (Jiao ve ark., 1998). Genç eritrositlere kıyasla olgun eritrositlerde HbA1c düzeyleri daha yüksek olduğundan kronik hastalık anemisi ve demir eksikliği anemisinde de HbA1c düzeyleri yüksek bulunabilir (Tarim ve ark., 1999).

Yapılan farklı çalışmalarda HbA1c'nin düzeylerinde %1'lik bir azalmanın diyabet ile ilişkili mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon risklerinde anlamlı azalmaya yol açtığı ortaya konmuştur (Nalysnyk ve ark., 2010). İyi bir metabolik kontrol için HbA1c düzeyinin %7'nin altında tutulması yeterli görülse de son yıllarda HbA1c'nin %6-6,5 sınırına çekilmesini öngören görüşler ağırlık kazanmaktadır. Tip 1 mellitusta yoğun insülin tedavisi sırasında 2-3 ayda 1 kez, stabil duruma geçildiğinde yılda 1 kez; Tip 2 diyabetes mellitusta ise tedavide değişiklik sırasında yılda 2-3 kez ölçülür (Bloomgarden, 2017).

Farklı ölçüm metotları glikozillenmiş hemoglobini farklı yollarla ölçtüğünden kullanılan metoda bağlı olarak laboratuvarlar arasında farklı sonuçlar ortaya çıkabilir. Metot standardizasyonu için Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm laboratuvarların kullandıkları HbA1c ölçüm metotları Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program) tarafından sertifikalandırılmış ve sonuçlar DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) çalışmasında kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen HPLC (yüksek performanslı likid kromatografi) yöntemine göre kalibre edilmiştir. DCCT çalışmasında kullanılan HPLC yöntemine göre normal sınırlar %4,0-6,0 arası kabul edilmiştir (Şahin ve Öncel, 2014).

2.3.2.3. Fruktozamin

Glikozile serum proteinleri veya fruktozamin serumda glukoz ile proteinlerin serbest amino grupları arasındaki non-enzimatik reaksiyonların ürünleridir (Furth,1988). Fruktozamin diğer adıyla glike albümin veya glike serum proteini, HbA1c testinin güvenilirliğini kısıtlayan durumlarda ve 2-3 haftalık kan glukoz konsantrasyonu değerlendirmede kullanılır. Fruktozamin terimi genel olarak glikasyona uğrayan bütün proteinler için kullanılmasına rağmen serum konsantrasyonunun fazla olması ve glikasyona yatkınlığı sebebiyle albümin, sağlıklı bir kişi de glike serum proteinlerinin %80'ini ifade etmektedir (Johnson ve ark., 1983). Fruktozamin analizlerinde tercih

edilen metot ketoamin bileşiklerin nitro-blue tetrazolium boyasını redükte ederek 525 nm'de absorban veren bir bileşimin oluşması temeline kuruludur. Ancak bu metot spesifik olmayıp, diğer redükleyici ajanlar ölçüm ile interferans verebilir (Mosca ve ark., 1987).

2.3.2.4. Glikozillenmiş Tırnak Proteini

Tırnak gibi keratinize yapılarda protein içeriği toplam kütlede yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (Baden ve ark., 1973). Sağlıklı kişilerde tırnak proteinleri glikasyona yavaş uğradığından glikozillenmiş protein konsantrasyonu düşük bulunmuştur. Ancak diyabetes mellitus olan kişilerde glikozillenmiş tırnak ve saç proteinlerinin konsantrasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Bakan ve Bakan, 1985). Ancak literatürde yapılan çalışmalar dikkate alındığında diyabetes mellitus tanısında glikozillenmiş proteinlere yoğun ilgi duyulmasına rağmen, tırnak proteinlerinin glikozillenmesine fazla ilgi gösterilmemiştir.

İnsan tırnak yapısı, tırnak yatağı, tırnak matrisi ve tırnak plakasından oluşan, deri ile kesintisiz ve entegre bir yapıdır. Tırnak yatağı, sinirler, lenf damarları ve kan damarları bulunan derin bir membrandır. Tırnak proteinleri, tırnak yatağı bölümünde kan ve ekstrasellüler sıvıda bulunan glukoza maruz kaldıkça, tırnak keratinlerinin glikozilasyonu gerçekleşir (de Berker ve ark., 2007; Zaias, 2014). Tırnak değişimi aşamalı olarak meydana geldiğinden insan tırnağının tam olarak yenilenmesi altı ile dokuz ay gibi bir zaman aralığında tamamlanır. Bu nedenle tırnak proteinlerinin glikasyon süresi altı ile dokuz ay sürmektedir. Bu durum glikozillenmiş tırnak proteinlerini uzun vadeli glisemik kontrol için daha değerli kılmaktadır (Kishabongo ve ark., 2014; Katchunga ve ark., 2015). Ek olarak diyabetik ayak yaralanmaları ve trofik bozukluklardan dolayı ayak parmak tırnaklarının kullanımı tavsiye edilmemektedir (Tantisiriwat ve Janchai, 2008).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Popülasyonu ve Gönüllülerin Seçimi

Çalışmaya 18-45 yaş aralığında ve her iki cinsiyette herhangi bir hastalık hikâyesi olmayan 18 kadın ve 14 erkek olmak üzere 32 sağlıklı gönüllü dâhil edilmiştir. Gönüllü bireylere NCCLS C28-A standartlarına uygun olarak hazırlanan anket formu doldurulmuş olup, bu anket bilgileri çalışmaya dâhil etme/ret etme kriterlerini uygulama amaçlı kullanılmıştır. Çalışma için ret etme kriterleri olarak tanımlanmış herhangi bir sistemik veya metabolik hastalığın varlığı, akut/kronik enfeksiyon varlığı, ilaç/alkol/sigara kullanımı kabul edildi.

3.2. Çalışma Tasarımı ve Metodu

Çalışma öncesinde gönüllü bireylerden anket formunu doldurmaları istendi ve bel çevresi, sistolik/diyastolik kan basıncı ölçümleri yapıldı. Gönüllülerden bir gece açlığı (10-12 saat) sonrası sabah 8:00-11:00 arası tırnak örnekleri ve beraberinde 1 adet jelli biyokimya ile 1 adet EDTA'lı tüp olmak üzere iki adet kan örneği alındı. Her gönüllüden alınan tırnak örnekleri dikkatli bir kesimden sonra ayrı ayrı 10 el parmak tırnağı şeklinde olmak üzere toplandı ve her bir tırnak ayrı poşetlerde uygun kotlamalar yapılarak -80°C de en çok 6 ay olmak üzere saklandı. Eş zamanlı olarak biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri santrifüj edilip serumları ayrıldıktan sonra uygun kotlamalar yapılarak -80°C muhafaza edildi. EDTA'lı tüplere alınan numunelerden 10 µL tam kan ve hemoliz edici reaktiften (hemolyzing reagent, Kat. No. 11488457 122, Roche Diagnostics, USA) 1000 µL alınarak elde edilen hemolizat numuneleri HbA1c çalışılması amaçlı -80°C de saklandı.

Çalışmaya dahil olan gönüllülerden elde edilen tırnak ve kan numuneleri seçilen 6 aylık bir zaman diliminde 15 günü geçmeyecek aralıklarla 10 farklı zamanda alındı. Her gönüllüden alınan ilk tırnak örneği başlangıç zamanı Z1 olarak kabul edildi ve gönüllünün ilk örnek verdiği gün esas alınarak belirlenen 6 ay içinde diğer örnek alma günleri Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10 şeklinde oluşturuldu. Tırnak örnekleri aynı standart koşullarda alındı ve bu örnekler -80°C muhafaza edildi.

3.3. Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçümü ve Metodun Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Glikozillenmiş tırnak proteinleri ölçümü Johnson ve arkadaşlarının modifiye edilmiş spektrofotometrik nitro-blue tetrazolyum (nitro-blue tetrazolium-NBT) metoduna göre yapıldı (Johnson ve ark., 1983; Kishabongo ve ark., 2014).

3.3.1. Nitro-Blue Tetrazolium (NBT) Reaktif Çözeltisinin Hazırlama

Öncelikle 7,4193gr Na₂CO₃ ve 2,5203gr NaHCO₃ distile suda çözülerek 1000 mL'lik pH'sı 10,3 olan 0,1 M karbonat/bikarbonat tamponu hazırlandı. 0,1 M sodyum karbonat/bikarbonat tamponu içerisinde 0,2044gr Nitrotetrazolium Blue chloride çözüldü ve 1 mL Triton X-100 eklenerek 1000 mL'lik 0,25 mM NBT reaktif çözelti hazırlandı.

3.3.2. Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçümü

Her bir katılımcıdan on farklı zamanda toplanan tırnak numuneleri her zaman birimi için sağ ve sol el parmak tırnağı şeklinde cam tüplere konuldu. Analiz öncesinde tüplere konulan tırnak numuneleri 60 dakika %0,5 (v/v)'lik Triton X-100 çözeltisinde bekletildi ve ardından numuneler distile su ile yıkandı. Yıkanan tırnak numuneleri doku takibi için kullanılan kasetlere aktarılarak etüvde (37°C,12 saat) bekletildi. Etüvden çıkarılan tırnak numuneleri küçük kırıntılar halinde dikkatli bir şekilde kesildi. Kesilen tırnak kırıntıları manuel çalışan kanca mengene ile çapı 2 cm'lik iki çelik levha arasında 1 dakikayı geçmeyecek şekilde presleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından hassas terazi ile tırnak kırıntılarının ağırlık ölçümleri yapıldı (elde edilen minimum değer 8,9 mg ve maksimum değer 569 mg olarak saptandı). Ardından tırnak kırıntıları analizin yapılacağı tüplere aktarıldı. 1 mL NBT reaktif (0,25 mM) çözelti tırnak kırıntılarına ilave edilip ardından su banyosunda (37°C, 60 dakika) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 530 nm dalga boyunda fotometrik okuma yapılarak absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerlerinden kantitatif sonuç elde etmek için fruktozamin standardı (precimat fructosamine, lot:181829 Ver.1, calibrator code: 00581, calibration value: 408 µmol/L, Roche Diagnostics, USA) kullanıldı. Sonuçlar gram tırnak başına düşen glikozillenmiş proteinin µmol miktarı olarak (µmol/g tırnak) ifade edildi.

3.3.3. Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçüm Metodunun Analitik Performansının Değerlendirilmesi

Glikozillenmiş tırnak proteini analizlerinin yapılacağı gün ölçüm öncesinde kalite kontrol materyali (precinorm fructosamine, lot: 126146 Ver.1, value: 279 $\mu\text{mol/L}$, range: 237-321 $\mu\text{mol/L}$, 1SD: 14 $\mu\text{mol/L}$, Roche Diagnostics, USA) ile elde edilen günlük ölçüm sonuçları değerlendirildi.

Glikozillenmiş tırnak proteinin ölçümünde kullanılan NBT metodunun analitik performansının değerlendirilmesi için farklı numune türlerinde tekrarlanabilirlik çalışmaları (within-run ve between-run) yapıldı. Öncelikle dört farklı bireyden alınan tırnak numuneleri küçük kırıntılar halinde dikkatli bir şekilde kesildi ve bir tüp içinde bu küçük tırnak kırıntıları karıştırıldı. Elde edilen bu karışımdaki numuneler aynı ölçüm serisi içinde 12 kez çalışarak gün içi tekrarlanabilirlik (within-run) çalışması yapıldı. Diğer 4 gün ise bu karışımdaki numuneler ile günde 3 kez çalışarak günler arası (between-run) tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı.

NBT metodunun analitik performansının değerlendirilmesi için tekrarlanabilirlik çalışmaları için farklı bir numune olarak precinorm fructosamine kalite kontrol materyali kullanıldı. Analiz glikozillenmiş tırnak proteini ölçümüne uygun olarak 100 μL kontrol numunesi 1000 μL NBT reaktif çözelti ile muamele edildi, ardından su banyosunda (37°C, 60 dakika) inkübasyona bırakıldı, son olarak ta 530 nm dalga boyunda fotometrik okuma yapıldı. Numune içersine bulunan askorbik asit ve ürik asit gibi küçük moleküler ağırlıklı bileşenler NBT düzeylerini azaltabildiğinden (Mashiba ve ark.,1992; Baker ve ark.,1991), birçok ticari kite ürikaz eklenerek ürik asidin etkisi giderilmeye çalışılır. Bu amaçla precinorm fructosamine kalite kontrol materyalinde ürik asit düzeyleri ölçüldü ve ölçüm sonucu ürik asit ölçüm metodunun alt saptama sınırı olan 0,2 mg/dL'nin altında olduğu saptandı. Bu kontrol materyali kullanılarak aynı ölçüm serisi içinde 20 kez çalışarak gün içi tekrarlanabilirlik (within-run) çalışması, diğer 4 gün ise bu karışımdaki numuneler ile günde 4 kez çalışarak günler arası (between-run) tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı.

Hazırlanan NBT reaktif çözeltisi kullanılarak metot ARCHITECT c8000 (Abbott, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) klinik kimya oto-analizörüne aşağıda gösterildiği gibi applike edildi:

Mod: Rate up

Reaktif volümü: 200 µL

Numune volümü: 10 µL

Primer dalga boyu (λ): 546 nm

Sekonder dalga boyu (λ): 700 nm

Okuma noktaları: 29-33

NBT metodunun analitik performansının değerlendirilmesi için tekrarlanabilirlik çalışmaları için son farklı numune türü olarak serum kullanıldı. Farklı bireylerden elde edilen serum numunelerinden havuz oluşturuldu ve serum numunelerinde fruktozamin düzeyleri metot için aplikasyonu yapılan yukarıda tanımlanan oto-analizörle belirlendi. Serum havuzu kullanılarak aynı ölçüm serisi içinde 20 kez çalışarak gün içi tekrarlanabilirlik (within-run) çalışması, diğer 4 gün ise bu karışımdaki numuneler ile günde 4 kez çalışarak günler arası (between-run) tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı.

3.4. Ölçümü Yapılan Diğer Rutin Parametreler

Çalışmaya dâhil edilen gönüllülerden alınan kan numuneleri için glukoz, total kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol, HbA1c ve insülin analizleri ticari kitler (Roche Diagnostics GmbH, USA) kullanılarak cobas® 8000 modüler analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) ile yapıldı.

3.5. Metabolik Sendrom Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen gönüllülerde metabolik sendrom değerlendirmesi Uluslararası Diabet Federasyonu (International Diabetes Federation-IDF) tarafından tanımlanan kriterlere göre yapılmıştır (Alberti ve ark., 2005). Metabolik sendrom varlığı santral obezite ile birlikte sayılan kriterlerden iki veya daha fazlası olarak tanımlanmaktadır: (1) Abdominal obezite (bel çevresi erkekler için ≥ 94 cm ve kadınlar için ≥ 80 cm); (2) hipertrigliseridemi (>150 mg/dL); (3) düşük serum HDL-kolesterol düzeyleri (erkekler için <40 mg/dL ve kadınlar için <50 mg/dL); (4) yüksek açlık kan glukozu (≥ 100 mg/dL); (5) artmış kan basıncı ($\geq 135/85$ mmHg).

3.6. Biyolojik Varyasyon Değerlendirmesi

Gönüllülerden elde edilmiş dataların analizi öncesinde her bir kişiye ait aşırı uç değerlerin atılmasında Cochran testi (Cochran,1941), her bir bireye ait ortalama

değerlerin diğer bireylerden elde edilen ortalama değerlerden büyük farklılık gösterenlerin belirlenmesinde Reed kriteri (Reed ve ark., 1971) kullanıldı. Birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyonlar varyasyon katsayıları (coefficients of variation-%CV) olarak ifade edildi.

Birey-içi biyolojik varyasyon (within-subject biological variation-CV_I) aynı kişiye ait sonuçların günler arası değişimini ifade eder. Biyolojik faktörler ve deney-içi analitik varyasyonun (within-run variation) katkısı sonucudur. Her bir bireyin 10 farklı zamanda elde edilen verileri kullanılarak elde edilen ortalama ve standart sapma değerlerinden tek tek CV_{TI} (birey-içi total varyasyon) hesaplandı ve ortalamaları alındı. Analitik varyasyon (CV_A) için within-run tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen değer (%CV_{AW}) kullanıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak CV_I hesaplandı (Fraser, 2001; Fraser ve Harris, 1989);

$$CV_I = (CV_{TI}^2 - CV_A^2)^{1/2}$$

Bireyler-arası biyolojik varyasyon (between-subject biological variation—CV_G) aynı analitin bireyler arası değişimini ifade eder. Çalışmaya katılan tüm bireylerin tüm verileri kullanılarak elde edilen ortalama ve standart sapma değerlerinden tüm sonuçlar arası varyasyon (CV_T) hesaplandı. Analitik varyasyon (CV_A) için between-run tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen değer (%CV_{AB}) kullanıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak CV_G hesaplandı ((Fraser, 2001; Fraser ve Harris, 1989););

$$CV_G = (CV_T^2 - CV_I^2 - CV_A^2)^{1/2}$$

Sonuçların değerlendirilmesinde referans aralıklarının kullanımının yararlı olup olmadığının incelenmesi için bireysellik indeksi (individuality index-I.I.) hesaplandı (Petersen ve ark., 1999);

$$I.I. = CV_I / CV_G$$

Eğer I.I. değerinin <0,6 olması durumunda bir bireyden elde edilen test sonucunun popülasyon temelli referans aralığı içerisinde küçük bir aralıkta olacağından, referans aralığının kullanımının yararı az olacaktır. Eğer I.I. değerinin >1,4 olması durumunda ise tanı için referans aralığı kullanımının faydalı olacağını göstermektedir (Fraser ve Harris, 1989; Ricós ve ark., 1994).

Biyolojik varyasyon değerleri kullanılarak yöntemin kalite gereksinimleri (spesifikasyonları) olarak analitik kesinlik (analytical imprecision, %CV), bias (rölatif sapma-relative deviation, %RD) ve kabul edilebilir toplam hata (total error allowable-%TEa) değerleri hesaplandı (Harris, 1979; Fraser ve ark., 1992);

$$\%CV = 1/2 \times CV_I$$

$$\%Bias = 1/4 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

$$\%TEa = \%Bias + 1,65 \times \%CV_A$$

Referans değişim değeri (reference change value-RCV) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Fraser,2001);

$$RCV = 2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

Z = 1,96 ise %95 olasılık ile (p<0,05) anlamlı bir değişiklik için ve Z = 2,58 ise %99 olasılık ile (p<0,01) anlamlı bir değişiklik için kullanılmaktadır.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler MedCalc (MedCalc Software, Broekstraat, Mariakerke, Belgium) programı ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile araştırıldı. Gaussian dağılım gösteren değişkenler ortalama±SD olarak gösterildi. Dağılımı normal olan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p< 0,05 (two-tailed) düzeyinde değerlendirildi.

3.8. Proje Desteği ve Etik Kurul

Bu proje Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından SAĞ-BAP-C-140316-08 numaralı proje olarak desteklendi.

Bu çalışma İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20/11/2015 tarih ve 733 nolu kararı uyarınca yürütüldü.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Popülasyonunun Demografik ve Ölçüm Parametrelerinin Değerlendirme Bulguları

Çalışma popülasyonunun demografik ve ölçüm parametreleri ile IDF kriterlerine göre çalışma popülasyonunda metabolik sendrom komponentlerin varlığı Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 32 sağlıklı gönüllünün tanımlanmış herhangi bir sistemik veya metabolik hastalığın varlığı, akut/kronik enfeksiyon varlığı, ilaç/alkol/sigara kullanımı olmadığı gibi IDF kriterlerine göre metabolik sendrom tanısı alan katılımcı bulunmamakta idi.

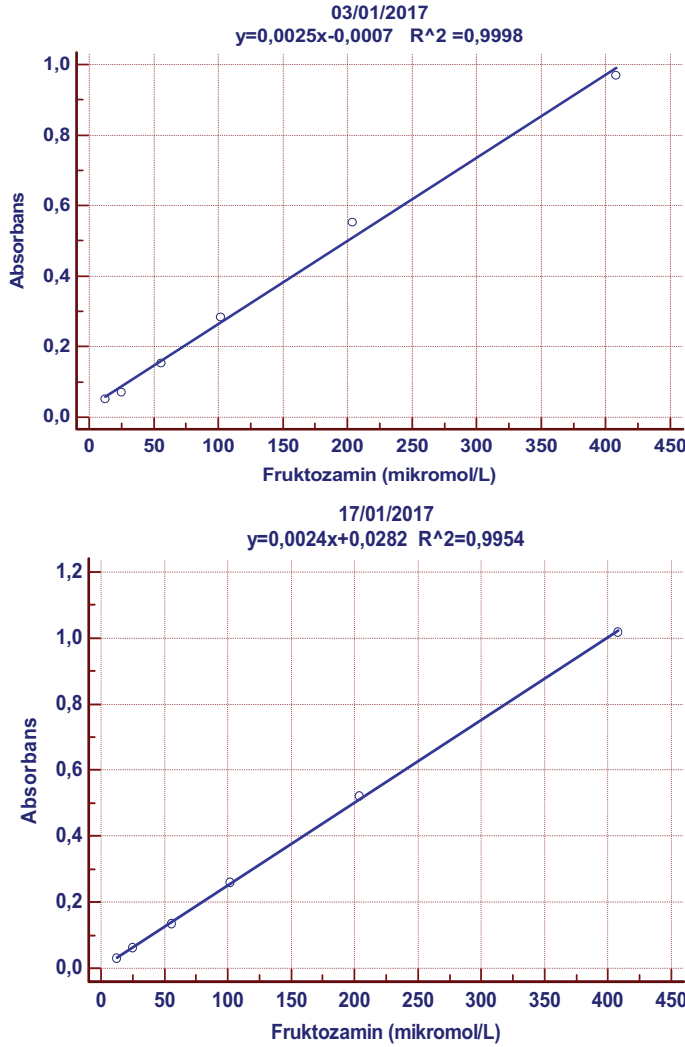
Tablo 4.1: Çalışma popülasyonunun (N=32) demografik ve ölçüm parametreleri ile IDF kriterlerine göre çalışma popülasyonunda metabolik sendrom frekansı ve komponentleri

Değişkenler	Ortalama±SD veya N/N	Komponentler*	% (N)
Cinsiyet (E/K)	14/18	Bel çevresi	%53,1 (N=17)
Yaş (yıl)	28,8 ± 7,0	Açlık kan glukozu	%6,3 (N=2)
Bel çevresi (cm)	86,5 ± 9,6	HDL-Kolesterol	%12,5 (N=4)
Sistolik kan basıncı (mmHg)	112,5 ± 13,7	Trigliserit	%3,1 (N=1)
Diastolik kan basıncı (mmHg)	70,0 ± 8,8	Kan basıncı	%0
Glukoz (mg/dL)	88,8 ± 7,4	Komponent sayısı	% (N)
İnsülin (µU/mL)	15,5 ± 1,4	0	%40,6 (N=13)
HOMA-IR	2,15 ± 0,96	1	%43,8 (N=14)
Total kolesterol (mg/dL)	175,4 ± 34,9	2	%15,6 (N=5)
Trigliserit (mg/dL)	81,0 ± 35,6	3	%0
HDL-kolesterol (mg/dL)	55,5 ± 13,1	4	%0
LDL-kolesterol (mg/dL)	103,7 ± 35,3	5	%0
HbA1c (%)	5,1 ± 0,2		

*Komponentlere ait yüzde değerler IDF kriterlerine göre metabolik sendrom tanısı için kullanılan cut-off değerlerin altında veya üstünde olmasına göre belirlenmiştir

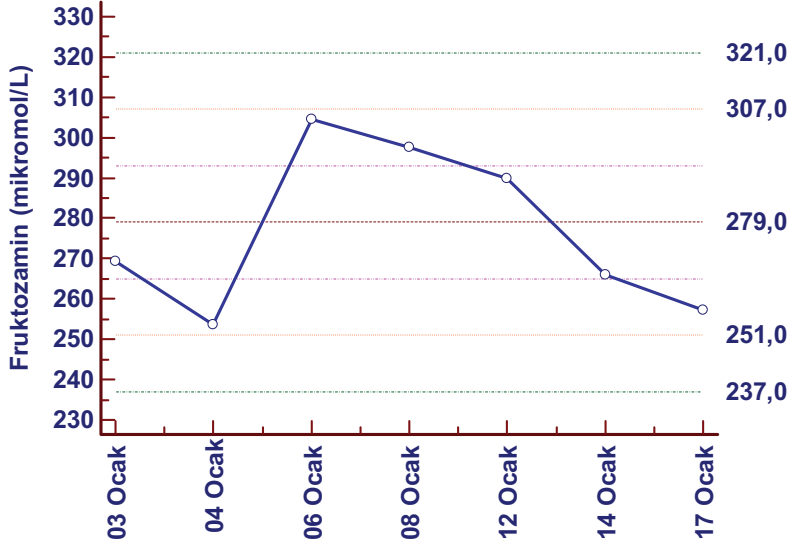
4.2. Glikozillenmiş Tırnak Proteini Ölçüm Metodun Analitik Performansının Değerlendirilme Bulguları

Çalışmaya katılan 32 gönüllüden 10 farklı zamanda her iki elden elde edilen yaklaşık 640 tırnak numuneleri için glikozillenmiş tırnak proteini ölçümleri ortalama 2 gün arayla 7 farklı günde yapıldı. Fruktozamin standardı (precimat fructosamine, Roche Diagnostics, USA) konsantrasyonlardan bir alt düşük konsantrasyonlara ulaşmak için seri seyreltmeler yapılarak 408 µmol/L, 204 µmol/L, 102 µmol/L, 56 µmol/L, 25,5 µmol/L ve 12,75 µmol/L konsantrasyon değerleri elde edildi. Elde edilen konsantrasyon değerleri için fruktozamin standartları ile analizlerin yapıldığı 7 günün ilk ve son günü yapılan kalibrasyon çalışma sonuçları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Fruktozamin standartları (precimat fructosamine, lot:181829 Ver.1, calibrator code: 00581, calibration value: 408 µmol/L, Roche Diagnostics, USA) ile analizlerin yapıldığı 7 günün ilk ve son günü yapılan kalibrasyon çalışma sonuçları.

Glikozillenmiş tırnak proteini analizlerinin yapılacağı gün ölçüm öncesinde kalite kontrol materyali ile elde edilen günlük ölçüm sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Analizlerin yapıldığı 03 Ocak 2017-17 Ocak 2017 tarihleri arası 7 günde kalite kontrol materyali (precinorm fructosamine, lot: 126146 Ver.1, value: 279 $\mu\text{mol/L}$, range: 237-321 $\mu\text{mol/L}$, 1SD: 14 $\mu\text{mol/L}$, Roche Diagnostics, USA) ile elde edilen günlük ölçüm sonuçları (ortalama: 276,9 $\mu\text{mol/L}$; SD: 20,3 $\mu\text{mol/L}$; %CV: %7,3)

Hazırlanan serum, kontrol (precinorm fructosamine) ve tırnak havuzlarından elde edilen numunelerde fotometrik NBT metoduyla ölçülen fruktozamin ($\mu\text{mol/L}$) ve glikozillenmiş tırnak proteini ($\mu\text{mol/g}$) için yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Kontrol ve tırnak numuneleri NBT metodu için tanımlanan manuel yöntemle, serum numuneleri ise verilen aplikasyon bilgilerine uyumlu olarak ARCHITECT c8000 klinik kimya oto-analizöründe çalışılmıştır.

Tablo 4.2: Hazırlanan serum, kontrol ve tırnak havuzlarından elde edilen numunelerde fotometrik NBT metoduyla ölçülen fruktozamin ($\mu\text{mol/L}$) ve glikozillenmiş tırnak proteini ($\mu\text{mol/g}$) için yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

	Gün İçi (within-run) Tekrarlanabilirlik				Günler Arası (between-run) Tekrarlanabilirlik			
	N	X_1	SD_1	$\%CV_{AW}$	N	X_2	SD_2	$\%CV_{AB}$
Serum havuzu	20	299,0 $\mu\text{mol/L}$	11,1 $\mu\text{mol/L}$	$\%3,7$	20	301,2 $\mu\text{mol/L}$	15,5 $\mu\text{mol/L}$	$\%5,1$
Kontrol havuzu	20	270,3 $\mu\text{mol/L}$	16,4 $\mu\text{mol/L}$	$\%6,1$	20	278,3 $\mu\text{mol/L}$	28,3 $\mu\text{mol/L}$	$\%10,2$
Tırnak havuzu	12	1,121 $\mu\text{mol/g}$	0,1045 $\mu\text{mol/g}$	$\%9,3$	15	1,210 $\mu\text{mol/g}$	0,146 $\mu\text{mol/g}$	$\%12,1$

Serum havuzu için saptanan ürik asit düzeyi 4,0 mg/dL idi.

4.3. Glikozillenmiş Tırnak Proteininin Biyolojik Varyasyon ve Referans Değişim Değerleri Değerlendirme Bulguları

Gönüllülerden elde edilmiş dataların analizi öncesinde her bir kişiye ait uç değerlerin belirlenmesinde kullanılan Cochran testi ile glikozillenmiş tırnak proteini verilerinden sağ parmaklara ait 24 veri ve sol parmaklara ait 23 veri analiz dışı bırakıldı. Her bir bireye ait ortalama değerlerin diğer bireylerden elde edilen ortalama değerlerden büyük farklılık gösterenlerin belirlenmesinde Reed kriteri ile 32 katılımcıdan 1'nin tüm glikozillenmiş tırnak proteini verileri analiz dışı bırakıldı. Katılımcılardan numune alım zamanlarında her bir bireye ait sağ ve sol parmaklardan elde edilen tırnak numunelerinin glikozillenmiş tırnak proteini değerleri sağ/sol parmaklar için karşılaştırıldı. 10 farklı zamanın her birinde sağ ve sol parmaklar için glikozillenmiş tırnak proteini değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadığından (Tablo 4.3), her bir numune alım zamanı için her bir bireye ait sağ ve sol parmaklardan elde edilen tırnak numunelerinin glikozillenmiş tırnak proteini değerlerinin ortalaması alınarak tüm parmaklar için biyolojik varyasyon değerlendirmesi yapıldı. Cochran testi ile tüm parmaklara ait glikozillenmiş tırnak proteini verilerinden 7 veri analiz dışı bırakılmış olup; Reed kriteri ile 32 katılımcıdan 1'nin tüm glikozillenmiş tırnak proteini verileri analiz dışı bırakıldı. Sağ/sol parmaklar ile tüm parmaklardan elde edilen glikozillenmiş tırnak proteini verilerden belirlenen biyolojik varyasyon değerleri, referans değişim değeri (RCV) ve kalite gereksinimleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir. RCV hesaplamalarında denklemde bulunan CV_A için Fraser CG analitin analizlerinin yapıldığı tüm zaman periyodu içinde internal kalite kontrol çalışmalarından elde edilen

verilerden hesaplanabileceğini bildirmişti. Precinorm fructosamine materyali ile internal kalite kontrol çalışmasından elde edilen CV_A %7,3 olarak belirlenmesine rağmen kontrol materyalinin matriksi analizleri yapılan tırnak numuneleri için uygun değildi (Fraser ve Harris 1989). Yine Fraser CG analitik presizyon için within-run analitik varyasyon (% CV_{AW}) değerlerinin de kullanılabileceğini bildirdiğinden (Fraser, 2001) %TEa ve RCV hesaplamalarında CV_A için tırnak havuzu ile within-run tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilmiş değer olan %9,3 kullanılmıştır.

Tablo 4.3: Katılımcılardan (N=32) numune alım zamanlarında (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10) her bir bireye ait sağ ve sol parmaklardan elde edilen tırnak numunelerinin glikozillenmiş tırnak proteini değerlerinin sağ ve sol parmaklar için karşılaştırmaları

Numune Alma Zamanları	Glikozillenmiş Tırnak Proteini ($\mu\text{mol/g}$ tırnak)		p*
	Sağ Parmaklar	Sol Parmaklar	
Z1	0,47 \pm 0,24 $\mu\text{mol/g}$	0,47 \pm 0,28 $\mu\text{mol/g}$	= 0,936
Z2	0,43 \pm 0,21 $\mu\text{mol/g}$	0,42 \pm 0,20 $\mu\text{mol/g}$	= 0,814
Z3	0,42 \pm 0,22 $\mu\text{mol/g}$	0,42 \pm 0,20 $\mu\text{mol/g}$	= 0,928
Z4	0,45 \pm 0,20 $\mu\text{mol/g}$	0,42 \pm 0,23 $\mu\text{mol/g}$	= 0,529
Z5	0,42 \pm 0,18 $\mu\text{mol/g}$	0,41 \pm 0,19 $\mu\text{mol/g}$	= 0,780
Z6	0,44 \pm 0,22 $\mu\text{mol/g}$	0,41 \pm 0,23 $\mu\text{mol/g}$	= 0,647
Z7	0,36 \pm 0,15 $\mu\text{mol/g}$	0,35 \pm 0,15 $\mu\text{mol/g}$	= 0,794
Z8	0,44 \pm 0,30 $\mu\text{mol/g}$	0,39 \pm 0,17 $\mu\text{mol/g}$	= 0,363
Z9	0,43 \pm 0,21 $\mu\text{mol/g}$	0,41 \pm 0,22 $\mu\text{mol/g}$	= 0,783
Z10	0,42 \pm 0,22 $\mu\text{mol/g}$	0,44 \pm 0,20 $\mu\text{mol/g}$	= 0,805

* p değeri Student's T testi ile hesaplanmıştır.

Tablo 4.4: Sağ/sol parmaklar ile tüm parmaklardan elde edilen glikozillenmiş tırnak proteini verilerden belirlenen birey-içi biyolojik varyasyon (%CV_I), bireyler-arası biyolojik varyasyon (%CV_G), bireysellik indeksi (I.I.), referans değişim değeri (RCV) ve kalite gereksinimleri

Biyolojik Varyasyon ve RCV Değerleri	Sağ parmaklar	Sol parmaklar	Tüm parmaklar
%CV _I	%20,48	%19,57	%17,59
%CV _G	%29,61	%28,97	%29,01
I.I.	0,692	0,676	0,606
RCV (Z=1,96 ve p<0,05)	%62,3	%60,0	%55,1
RCV (Z=2,58 ve p<0,01)	%82,1	%79,1	%72,6
Kalite Gereksinimleri			
Analitik Kesinlik (%CV)	%10,2	%9,8	%8,8
%Bias	%9,0	%8,7	%8,5
Kabul edilebilir toplam hata (%TEa)	%24,3	%24,0	%23,8

Within-run analitik varyasyon (%CV_{AW}) %9,3 olarak belirlenmiştir

Between-run analitik varyasyon (%CV_{AB}) %12,1 olarak belirlenmiştir

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda diyabetik hastalarda uzun dönem glisemik kontrol ve tedavi etkinliğinin izlenmesinde yaralı olabileceği öne sürülen glikozillenmiş tırnak proteinleri için sağlıklı gönüllüler ile yapılan bu çalışmada birey-içi biyolojik varyasyon değerine göre bireyler-arası biyolojik varyasyon değeri daha yüksek bulundu (sırasıyla %17,59 ve %29,01). Hesaplanan bireysellik indeksi değerine göre (I.I. : 0,606) glikozillenmiş tırnak proteinleri için belirlenen referans aralıkları kullanımının ileri derecede fayda sağlamamakla beraber zayıf-orta derece faydalı olabileceği anlaşıldı. Bir parametre için bireyin seri ölçümlerinde klinik açıdan anlamlı farklılığı gösteren referans değişim değeri glikozillenmiş tırnak proteinleri için %95 olasılık ile %55,1 olarak belirlendi. Ek olarak literatürde glikozillenmiş tırnak proteinlerinin biyolojik varyasyonunun belirlenmesine yönelik çalışma bulunmamakta olup, bu parametrenin diyabetik hastaların tanı ve takibinde kullanılmasına yönelik kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Glikozillenmiş tırnak proteinlerinin diyabetik hastalarda uzun dönem glisemik kontrolün izlenmesinde kullanımına yönelik kısıtlı çalışmalardan biri olan Kishabongo ile Katchunga ve ark.'nın yakın zamanda yaptıkları çalışmalarda bu parametrenin diagnostik özelliğinin de olabileceği gösterilmiştir (Kishabongo ve ark., 2014; Katchunga ve ark., 2015). El tırnaklarının ayda yaklaşık 2 mm uzadığı ve tırnakların tam yenilenmesinin yaklaşık 4-6 ayda olduğu (Cashman ve Sloan, 2010) dikkate alındığında glikozillenmiş tırnak proteinlerinin diyabetik hastalarda geçmiş 4-6 aylık dönemdeki glisemik kontrolü yansıtabileceği öne sürülmüştür (Katchunga ve ark., 2015; Bakan ve Bakan, 1985). Fruktozaminin geriye dönük 2-3 haftalık, HbA1c'nin ise geriye dönük 2-3 aylık dönemin glisemik kontrolünün izlenmesinde kullanıldığı (Hindle ve ark., 1986) düşünüldüğünde daha uzun dönemin değerlendirilmesinde glikozillenmiş tırnak proteinlerinin kullanımı avantaj sağlayabilir. Bu çalışmada numuneler altı aylık zaman diliminde on farklı zamanda toplanmasına rağmen, çalışmaya sadece sağlıklı gönüllüler katıldığından diyabetik hastalarda diğer çalışmalarda belirtilen glikozillenmiş tırnak proteinlerinin uzun dönem glisemik kontrolünün izlenmesindeki profili saptayamadık. Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllü bireylere NCCLS C28-A standartlarına uygun olarak hazırlanan anket formu doldurulmuş olup, bu anket bilgileri çalışmaya dâhil etme/ret etme kriterlerini uygulama amaçlı kullanılmıştır. Çalışma için ret etme kriterleri olarak tanımlanmış herhangi bir sistemik veya metabolik

hastalığın varlığı, akut/kronik enfeksiyon varlığı, ilaç/alkol/sigara kullanımı kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerde metabolik sendrom değerlendirmesi IDF tarafından tanımlanan kriterlere göre yapılmış olup (Alberti ve ark., 2005), metabolik sendromlu katılımcılar çalışmaya dâhil edilmemiştir.

Glikozillenmiş protein analizlerinde kullanılan numuneler dikkate alındığında protein ve su içerikleri plazma numunelerinin sırasıyla yaklaşık %7 ve %91'i iken, tırnak numunelerinin ise sırasıyla yaklaşık %85 ve %1'i kadardır (Baden ve ark., 1973). Tırnak numunelerinde interfere edici moleküllerin (ürik asit, askorbik asit gibi) yoğunluğunun daha az oluşu, daha saf bir protein varlığı ve bu protein fraksiyonun göreceli çokluğundan dolayı fruktozamin ve HbA1c'ye göre uzun dönem glisemik değişikliklere karşı daha duyarlı bir parametre olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Kishabongo ve ark., 2015; Katchunga ve ark., 2015). Ek olarak nitro-blue tetrazolyum metodunun reaktif maliyetinin göreceli olarak düşük olması ve tek aşamalı analiz basamağı içermesinden dolayı özellikle gelişmekte olan ülkeler için bu testin kullanımının önemli olabileceği ile ilgili literatürde belirli çıkartımlar da bulunmaktadır (Kishabongo ve ark., 2014).

Serum ve hemolize kan numunelerinde fruktozamin ve HbA1c gibi glikozillenmiş protein analizlerinde kullanılan kromatografik, elektroforetik ve spektrofotometrik prosedürler tanımlanmıştır (Davis ve ark., 1986; Dolhofer ve Wieland, 1981; Lloyd ve Marples, 1984; Johnson ve ark., 1983). Günümüz rutin laboratuvar uygulamalarında HbA1c analizleri için kromatografik metotlar ve türbidimetrik mikropartikül aglütinasyon inhibisyon metotlar ön planda iken (Wolf ve ark., 1984; Klingenberg ve ark., 2017); fruktozamin analizleri için alkali ortamda ketoaminlerin nitro-blue tetrazolyumu indirgenmesi esasına dayanan spektrofotometrik metot ön plandadır (Lloyd ve Marples, 1984; Johnson ve ark., 1983). Fruktozamin analizlerinde kullanılacak diğer metot olan hidrosimetilfurfural oluşumu esasında dayanan tiyobarbitürik asit prosedürünün inkübasyon sürelerinin uzun ve işlem basamaklarının fazla olmasından dolayı (Dolhofer ve Wieland, 1981) rutin uygulamalarda kullanılmamaktadır. Literatürde tırnak numunelerinde glikozillenmiş protein analizlerinde gerek nitro-blue tetrazolyum gerekse tiyobarbitürik asit metodunu kullanan çalışmalar olmakla beraber son yapılan çalışmalar serum fruktozamin analizlerinde rutin uygulamalara uygun olarak nitro-blue tetrazolyum metodu üzerine yoğunlaşmıştır (Katchunga ve ark., 2015; Bakan ve Bakan, 1985; Kishabongo ve ark.,

2014). Yaptığımız bu çalışmada glikozillenmiş protein analizlerinde rutin uygulamalarda serum fruktozamin analizleri için tanımlanan aplikasyon bilgilerine uygun olarak kesilen tırnak kırıntılarının presleme işlemi sonrasında Johnson RN ve arkadaşlarının tanımladığı (Johnson ve ark., 1983) ve Kishabongo AS ve arkadaşları tarafından (Kishabongo ve ark., 2014) tırnak numuneleri için modifiye edilmiş nitro-blue tetrazolyum metodu esas alınmıştır. Ancak serum fruktozamin analizlerinde ürik asit, askorbik asit ve glutatyon gibi serum matriksinde bulunan moleküllerin reaktifteki substratın indirgenmesinde interfere edici etkisi olduğu bilindiğinden (Johnson ve ark., 1983), bu reaktiflere ek olarak mikrobiyal ürikaz enzimi de eklenmektedir. Analizler için kullandığımız tırnak numunelerinde ürik asidin düzeyleri ihmal edildiğinden hazırladığımız reaktiflere ürikaz enzimi ekleme gereği duyulmamıştır.

Diyabetik ayak yaralanmaları, trofik bozukluklar ve mantar hastalıklarının (onikomikoz) sık rastlanması nedeniyle tırnak numunelerinin analizlerinde ayak parmak tırnaklarının kullanımı tavsiye edilmemektedir (Tantisiriwat ve Janchai, 2008). Saçlarda da glikozillenmiş proteinlerin analizleri yapılabilmekle beraber, insan saç uzunluğu varyasyonunun tırnak uzunluğundan daha büyük olması ve şampuan kullanımı nedeni ile kimyasal kontaminasyon saç numuneleri analizlerinde standartlaşma problemlerine neden olmaktadır (Kishabongo ve ark., 2014). Bu çalışmada analizlerde kullandığımız el parmak tırnakları yoğun keratinize sert bir doku olmasından dolayı, çoğu biyokimyasal analizlerde kullanılan vücut sıvılarından (serum, beyin omurilik sıvısı gibi) farklı olarak analize uygun tırnak numunelerin hazırlanmasında zorluklar yaşanmaktadır. Bu çalışmada tırnak numunelerinin hazırlanmasında tırnak protein ekstraksiyonu için saç proteinlerinin ekstraksiyonunda kullanılan Shindai metodu (Nakamura ve ark., 2002) kullanılmasına rağmen numune hazırlama aşamalarının ve sürelerinin uzun olması, kullanılan kimyasalların çok çeşitlilik göstermesi (kloroform, metanol, tiyoüre, 2-merkaptolanol gibi) nedeniyle analizler için kullanılan dalga boyunda belirlenen dikkate değer interferanslardan dolayı analizlerde bu metot esas alınmamıştır. Bu metodun yerine tırnak kırıntıları iki çelik levha arasında en az 1 dakika süre ile preslenerek analize uygun numuneler hazırlanmıştır. Metot için referans aldığımız Katchunga PB ve arkadaşları son yaptığı çalışmada non-diyabetik grupta glikozillenmiş tırnak proteini için belirlenen interkartil aralık 1,42-4,97 µmol/g tırnak saptanmıştır (Katchunga ve ark., 2015). Bu çalışmada sağlıklı popülasyondan tüm numune toplama zamanlarında elde edilmiş analiz sonuçlarından elde edilen aralık 2,48-

4,10 $\mu\text{mol/g}$ tırnak bulunmuştur. Ek olarak tırnak havuzu ile yapılan within-run tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen %CV değerleri %13,0 iken (Kishabongo ve ark., 2014), bu çalışmada %9,3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Kishabongo AS çalışma grubundan farklı olarak analiz öncesinde yaptığımız ön presleme işleminin metodun presizyonuna katkı sağladığını düşündürmüştür. Ancak bu metodu bir biyokimya oto-analizöründe applike ettiğimizde ise serum havuzu için within-run ve between-run tekrarlanabilirlik sonuçlarında anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında metoda interfere edici etkisi olmayan bir tırnak protein ekstraksiyon metodunun geliştirilmesi ve akabinde bir biyokimya oto-analizöründe metodun applike edilmesi halinde çok daha başarılı sonuçların alınabileceğini düşünmekteyiz.

Glikozillenmiş tırnak proteinleri için sağlıklı gönüllüler ile yapılan bu çalışmada birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değeri sırasıyla %17,59 ve %29,01 olarak bulundu. Literatürde glikozillenmiş tırnak proteinlerinin biyolojik varyasyonlarının belirlenmesine yönelik bir çalışma bulunmamakta olup, bu sonuçlar bu alanla ilgili ilk verilerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda diyabetik hastalarda glisemik kontrolün takibinde kullanılan diğer parametrelerden HbA1c için %CV_I ve %CV_G değerleri sırasıyla %1,9 ve %5,7 olarak, fruktozamin için ise bu değerler sırasıyla %3,4 ve % 5,9 olarak saptanmıştır (Ricós ve ark., 2004). Glikozillenmiş tırnak proteinleri için belirlenen biyolojik varyasyon değeri glisemik kontrolün takibinde kullanılan diğer iki parametreye göre yüksek olmakla beraber, klinik tanı ve tedavi takibinde kullanılan birçok parametreye göre daha kabul edilebilir düzeyde idi. Örneğin alanin aminotransferaz için %CV_I ve %CV_G değerleri sırasıyla %19,4 ve %41,6 olarak, kardiyak troponin T için bu değerler sırasıyla %30,5 ve %90,0 olarak bildirilmiştir (Westgard, 2017). Glikozillenmiş tırnak proteinleri için bireyler-arası biyolojik varyasyon değeri daha yüksek bulunmuştur. Bireyler-arası farklılıklarda genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünüldüğünde özellikle genetik faktörlerin total fenotipik varyasyonun yüzde kaçından sorumlu olduğuna dair çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bireysellik indeksi değerleri test sonuçlarının yorumlanmasında popülasyon temeli referans aralıklarının kullanımın yararlılığı hakkında bilgi veren bir parametre olup, indeks değerinin küçülmesi ile bireyselleşmenin arttığı yorumu yapılır (Fraser, 2001). Bu çalışmada glikozillenmiş tırnak proteinleri için elde edilen bireysellik indeksi

değeri 0,606 olarak belirlenmiş olup, bu değer referans aralıkları kullanımının ileri derecede fayda sağlamamakla beraber zayıf-orta derece faydalı olabileceğini göstermiştir. Ek olarak glikozillenmiş tırnak proteinleri için elde edilen bu değer bireyler arası farkın büyük olduğunu, bireyselliğin yüksek olduğunu ve bu nedenle referans aralıklarının kullanımına göre bireyin önceki sonuçlarına göre yapılan değerlendirmelerde değişimlerdeki anlamlılığın saptanmasının klinik olarak daha yararlı olacağını göstermektedir. Bireyselliğin yüksek olduğunu gösteren bu sonuçlar glikozillenmiş tırnak proteinleri için RCV değerlerinin kullanımının önemini ortaya koymuştur. Bu çalışmada bir parametre için bireyin seri ölçümlerinde klinik açıdan anlamlı farklılığı gösteren RCV değeri glikozillenmiş tırnak proteinleri için %95 olasılık ile %55,1 olarak belirlendi. Bunun anlamı ise bir birey için glikozillenmiş tırnak proteinleri için elde edilen değer ile 4-6 ay önceki değer arasındaki fark %55'in altında ise %95 olasılık ile elde edilen sonuç klinik olarak anlamlı değildir. Ancak biyolojik varyasyon değerlerinin literatürden dökümente edilmesine rağmen, analitik varyasyon analiz yapılan laboratuvarlarda kullanılan reaktif, ekipman ve personele bağlı olduğu için her laboratuvarın her bir teste ait RCV değerleri belirleme gerekliliği bulunmaktadır.

Bu çalışmanın bazı limitasyonları vardır. İlk olarak, bu çalışma sağlıklı gönüllülerle yapılan biyolojik varyasyon çalışması olduğundan, diyabetik hastalardaki glikozillenmiş tırnak proteinlerinin uzun dönem glisemik kontrolünün izlenmesindeki profilini saptayamadık. İkinci olarak, nitro-blue tetrazolyum metodu bir biyokimya oto-analizöründe aplike edilmesine rağmen tırnak protein ekstraksiyonu için kullandığımız metodun analizler için kullanılan dalga boyunda belirlenen dikkate değer interferanslardan dolayı numuneler metot presizyonu için daha uygun sonuçların alınabileceği otomatize bir sistemde çalışılmamıştır. Üçüncü olarak, tırnağın derin katmanlarında yüzeysel katmanına oranla daha yüksek glikozillenmenin olduğu bildirilmiş olup (Kishabongo ve ark., 2015), bizim çalışmamızda tırnağın yüzeysel ve derin katmanları arasındaki glikozillenmiş protein farkı için ek bir çalışma yapılmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glikozillenmiş tırnak proteinleri için sağlıklı gönüllüler ile yapılan bu çalışmada birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyon değeri sırasıyla %17,59 ve %29,01 olarak, bireysellik indeksi değeri 0,606 olarak belirlenmiştir. Glikozillenmiş tırnak proteinleri için elde edilen bu değer bireyler arası farkın büyük olduğunu, bireyselliğin yüksek olduğunu ve bu nedenle referans aralıklarının kullanımına göre bireyin önceki sonuçlarına göre yapılan değerlendirmelerde değişimlerdeki anlamlılığın saptanmasının klinik olarak daha yararlı olacağını göstermektedir. Bu durum dikkate alındığında bir parametre için bireyin seri ölçümlerinde klinik açıdan anlamlı farklılığı gösteren referans değişim değeri glikozillenmiş tırnak proteinleri için %95 olasılık ile %55,1 olarak belirlendi.

Bu çalışma sağlıklı gönüllülerle yapılan biyolojik varyasyon çalışması olduğundan, diyabetik hastalardaki glikozillenmiş tırnak proteinlerinin uzun dönem glisemik kontrolünün izlenmesindeki profilinin belirlenmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ek olarak metoda interfere edici etkisi olmayan bir tırnak protein ekstraksiyon metodunun geliştirilmesi ve akabinde bir biyokimya oto-analizöründe metodun apliedilmesi halinde metodun presizyonu için çok daha başarılı sonuçların alınabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Alberti, KG. Zimmet, P. Shaw, J; IDF Epidemiology Task Force Concensus Group.(2005). The metabolic syndrome-A new worldwide definition. *Lancet*, 366:1059-1062.

Alicı, S. Dülger, H. (2001). Hemoglobinlerin Nonenzimatik Glikozilasyonu. *Van Tıp Dergisi*, 8(3):105-110.

Ansari, NA, Dash, D. (2013). Amadori Glycated Proteins: Role in Production of Autoantibodies in Diabetes Mellitus and Effect of Inhibitors on Non-Enzymatic Glycation. *Aging and Disease*, Volume 4, Number 1.

Baadenhuijsen, H. Smit, JC. (1985). Indirect estimation of clinical chemical reference intervals from total hospital patient data: Application of a modified Bhattacharya procedure. *J Clin Chem Clin Biochem*, 23:829-839.

Baden, H.P. Goldsmith, L.A. Fleming, B. (1973). A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues. *Biochim Biophys Acta*, 322(2):269-78.

Bakan, E. Bakan, N. (1985). Glycosylation of nail in diabetics: possible marker of long-term hyperglycemia. *Clin Chim Acta*, 147(1):1-5.

Baker, J. Metcalf, P. Scragg, R. Johnson, R. (199). Fructosamine Test-Plus, a modified fructosamine assay evaluated. *Clin Chem*, 37(4):552-6.

Bloomgarden, Z. Beyond, (2017). HbA1c. *J Diabetes*, 9(12):1052-1053.

Bunn, H.F. (1981). Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes*. 30:613-7.

Büyükgüzel, E.(2013). Biochemical and Molecular Mechanism of Protein Oxidation. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3 (1), 40-51.

Brownlee, M. Cerami, A. (1981). The biochemistry of complications of diabetes mellitus. *Ann Rev Biochem*, 50:385-432.

Carraro, P. Plebani, M. (2007). Errors in a state laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem*, 53:1338–42.

Cashman, M.W. Sloan, S.B. (2010). Nutrition and nail disease. *Clin Dermatol*, 28(4):420-5.

Cochran, W.S. (1941). The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Eugen* 11:47-51.

Corte, Z. Venta, R. (2010). Biological variation of free plasma amino acids in healthy individuals. *Clin Chem Lab Med* , 48(1):99-104.

Davis, J.E. McDonald,J.M, Jarett,L. (1986). A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A1c. *Arch Dis Child*, 61(2):113-7.

de Berker, D.A. André, J. Baran, R. (2007). Nail Biology and Nail Science. *International Journal of Cosmetic Science, Int J Cosmet Sci*, 29(4):241-75.

de Berker, D.A. Baran, R.(2012). *Science of the Nail Apparatus*. Published 2012 by John Wiley & Sons, Ltd.

Dolhofer, R. Wieland, O.H. (1981).Improvement of the thiobarbituric acid assay for serum glycosylprotein determination. *Clin Chim Acta*, 112(2):197-204.

Fraser, C.G. (1993).Age-related changes in laboratory test results. Clinical implications. *Drugs Aging* 3(3):246-57.

Fraser, C.G.(2001). Changes in serial results. In: Biological variation: from principles to practice (Fraser, C.G., ED.), pp. 67-90, Washington, DC: AACC Press.

Fraser, C.G. Harris, E.K. (1989). Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 27: 409-437.

Fraser, C.G. Petersen, P.H. Ricos, C.Haeckel, R. (1992). Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 30(5):311-7.

Fraser, C.G.(2011).Reference change values. *Clin Chem Lab Med*, 50(5):807-12.

Fraser, C.G. (2001). The nature of biological variation. In: Biological variation: from principles to practice (Fraser, C.G., ED.), pp.1-27, Washington, DC: AACC Press.

Fraser, C.G. (2001) The utility of population-based reference values. In: Biological variation: from principles to practice (Fraser, C.G., ED.), pp. 91-116, Washington, DC: AACC Press.

Fraser, C.G. (2001). Quality specifications. In: Biological variation: from principles to practice (Fraser, C.G., ED.), pp. 29-66, Washington, DC: AACC Press.

Furth, A.J. (1988). Methods for assaying nonenzymatic glycosylation. *Anal Biochem*, 175(2):347-60.

Garlick, R.L. Mazer, J.S. (1983) The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J Biol Chem*, 258:6142-6.

Geistanger, A, Arends, S.,Berding, C.Hoshino, T. Jeppsson, J.O. Little ,R. Siebelder, C. Weykamp, C. (2008). IFCC Working Group on Standardization of Hemoglobin A1c. Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for hemoglobin A1c and the designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clin Chem*, 54(8):1379-85.

Harris, E.K. (1979). Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol*, 72(2 Suppl):374-8.

Hindle, E.J. Rostron, G.M. Clark, S.A. Gatt, J.A. (1986). Serum fructosamine and glycatedhaemoglobin measurements in diabetic control. *Clin Chim Acta*, 156(3):329-35.

İlçöl, Y. Aslan, D. (2004;).Determining Reference Value of Blood Chemistry Profile in Healthy Subjects in Bursa. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29 (2); 183-192.

Jiao, Y. Okumiya, T. Saibara, T, Park, K, Sasaki, M.(1998). Abnormally decreased HbA1c can be assessed with erythrocyte creatine in patients with a shortened erythrocyte age. *Diabetes Care*, 21(10):1732-5.

Johnson, R.N. Metcalf, P.A. Baker, J.R. (1983). Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta*, 127(1):87-95.

Karisto V, Hanninen KP, Leino A, Pulkki K, Peltola O, Nanto V, et al. (1994). Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 32:789-96.

Karkalousos P, Evangelopoulos A. (2011). Quality Control in Clinical Laboratories. In Applications and Experiences of Quality Control. (Ivanov, O., ED), pp. 331-360. Technology & Medicine Open Access book Publisher.

Katchunga, P.B. Mirindi, P.N. Kishabongo, A.S. Cikomola, J.C. Bwanamdogo, S. Philippé, J. Speeckaert, M.M. Delanghe ,J.R. (2015). Glycated nail proteins as a new biomarker in management of the South Kivu Congolese diabetics. *Biochem Med (Zagreb)*, 25(3):469-73.

Kılınç, K.(2011).Protein glikasyonu. *Hacettepe Tıp Dergisi* 42:95-104.

Kishabongo, A.S. Katchunga, P. Van Aken, E.H. Speeckaert, M.M. Lagniau, S. Husein, D. Taes, Y.E. Delanghe, J.R. (2014). Glycated nail proteins: a new approach for detecting diabetes in developing countries. *Trop Med Int Health* 19(1):58-64.

Kishabongo, A.S. Katchunga, P. Van Aken, E.H. Speeckaert, R. Lagniau, S. Coopman, R. Speeckaert, M.M. Delanghe, J.R. (2015). Glycation of nail proteins: from basic biochemical findings to a representative marker for diabetic glycation-associated target organ damage. *PLoS One*, 10(3):e0120112.

Klingenberg, O. Furuset, T. Hestbråten, C.R. Hallberg, M.H. Steiro, A. Orset, I.R, Berg, J.P. (2017). HbA1c analysis by capillary electrophoresis comparison with chromatography and an immunological method. *Scand J Clin Lab Invest*, 77(6):458-464.

Korge, B.P. Gan, S.Q. McBride, O.W. Mischke, D. Steinert, P.M. (1992). Extensive size polymorphism of the human keratin 10 chain resides in the C-terminal V2 subdomain due to variable numbers and sizes of glycine loops. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:910–14.

Kostić, N. Secen, S. (1997). Circadian rhythm of blood pressure and daily hormonal variations. *Med Pregl*, 50(1-2):37-40.

Krintus, M. Plebani, M. Panteghini, M. (2017). Improving clinical laboratory performance through quality indicators. *Clin Biochem*, 50(10-11):547-549.

Krouwer, J.S. (2002). Setting performance goals and evaluating total analytical error for diagnostic assays. *Clin Chem*, 48(6 Pt 1):919-27.

Lacher, D.A, Hughes, J.P. Carroll, M.D. (2010). Biological variation of laboratory analyte based on the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Natl Health Stat Report*, (21):1-7.

Langbein, L. Rogers, M.A. Winter, H. Praetzel, S. Beckhaus, U. Rackwitz, H.R. et al. (1999). The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem*, 274:19874–84.

Lapolla, A. Traldi, P. Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem*, 38(2):103-15

Lippi, G. Salvagno, G.L Lima-Oliveira, G. Brocco, G. Danese, E. Guidi, G.C. (2015). Postural change during venous blood collection is a major source of bias in clinical chemistry testing. *Clin Chim, Acta* 440:164-8.

Lloyd, D. Marples, J. (1984). Simple colorimetry of glycated serum protein in a centrifugal analyzer. *Clin Chem*, 30(10):1686-8.

Lynch, M.H. O'Guin, W.M. Hardy, C. Mak, L. Sun ,T.T. (1986). Acidic and basic hair/nail (“hard”) keratins: their colocalisation in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to “soft” keratins. *J Cell Biol*, 103:2593–606.

Maillard, L.C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres: Formation des mélanoidines par voie méthodique. Réaction de Maillard. *C. R. Acad. Sci*, 154: 66–68.

Mashiba, S. Uchida, K. Okuda, S. Tomita, S. (1992). Measurement of glycated albumin by the nitroblue tetrazolium colorimetric method. *Clin Chim Acta*, 212(1-2):3-15.

McDonalt, M.S. Snapiro, R. Bleichman, M, Bunn, H.F. (1978). Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J Biol Chem*, 253: 2327-32.

Misciagna, G. De Michele, G, Trevisan, M.(2007). Non-enzymatic glycated proteins in the blood and cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*, 13:3688-95.

Mullington, J. Hermann, D. Holsboer, F. Pollmächer, T. (1996). Age-dependent suppression of nocturnal growth hormone levels during sleep deprivation. *Neuroendocrinology* 64(3):233-41.

Mosca, A. Carenini, A. Zoppi, F. Carpinelli, A., Banfi, G, Ceriotti, F, Bonini, P. Pozza, G. (1987). Plasma protein glycation as measured by fructosamine assay. *Clin Chem*, 33(7):1141-6.

Nakamura, A. Arimoto, M. Takeuchi, K. Fujii, T. (2002). A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biol Pharm Bull*, 25(5):569-72.

Nalysnyk, L, Hernandez-Medina, M, Krishnarajah, G. (2010). Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab*, 12(4):288-98

Narayanan, S. (2000). The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol*, 113(3):429-52.

O'Halloran, M.W. Studley-Ruxton, J, Wellby, M.L. (1970). A comparison of conventionally derived normal ranges with those obtained from patients' results. *Clin Chim Acta*, 27:35-46.

Öztürk, Ö.G. Karaçor, D. Şahin, G. (2013). Laboratuvar Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Analitlerin Biyolojik Varyasyon Verilerinin Önemi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 22(2):252-258

Petersen, P.H. Fraser, C.G. Sandberg, S. Goldschmidt, H. (1999). The index of individuality is often a misinterpreted quantity characteristic. *Clin Chem Lab Med*, 37(6):655-61.

PetitClerc, C. Solberg, H.E.(1987). Approved recommendation on the theory of reference values: Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem*, 25:639-44.

Plebani, M. Carraro, P. (1997). Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 43:1348–51.

Plebani, M. Lippi, G. (2012). Biological variation and reference change values: an essential piece of the puzzle of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*, 50(2):189-90.

Plebani, M. (2013). The CCLM contribution to improvements in quality and patient safety. *Clin Chem Lab Med* 51(1):39-46.

Porter, R.M. (2006). The New Keratin Nomenclature. *J Invest Dermatol*, 126(11):2366-8.

Reed, All. Henry, R.J. Mason, W.B. (1971). Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem*, 17:275-9.

Reed, A.H. Henry, R.J. Mason, W.B. (1971). Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem*, 17(4):275-84.

Rico's, C. Cava, F. Garcí'a-Lario, J.V. Herna'ndez, A. Iglesias, N. Jime'nez, C.V.,Minchinela, J. Perich, C. Simo'n, M. Domenech, M.V. A' lvarez, V. (2004). The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Clin Lab Invest*, 64: 175–184.

Ricós, C, Iglesias, N, García-Lario, JV, Simón, M, Cava, F, Hernández, A, Perich, C, Minchinela, J, Alvarez, V, Doménech, M.V, Jiménez, C.V, Biosca, C, Tena, R. (2007). Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem*, 44(Pt 4):343-52.

Ricós, C, Jiménez, C.V. Hernández, A. Simón, M. Perich, C. Alvarez ,V. Minchinela, J. Maciá, M. (1994). Biological variation in urine samples used for analyte measurements. *Clin Chem*, .40(3):472-7.

Rouse, J.G, Van Dyke, M.E. A (2010). Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*, 3: 999-1014.

Sadowska-Bartosz, Bartosz, G. (2015). Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecules*, 20(2):3309-34.

Severin, F.F.; Feniouk, B.A.; Skulachev, V.P. (2013). Advanced glycation of cellular proteins as a possible basic component of the “master biological clock”. *Biochemistry (Mosc.)*, 78: 1043–1047.

Schweizer, J. Bowden, P.E. Coulombe, P.A. Langbein, L. Lane, E.B. Magin, T.M. Maltais, L. Omary, M.B. Parry, D.A. Rogers, M.A. Wright, M.W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174(2):169-74.

Solberg ,H.E.(1987) Approved recommendation on the theory of reference values: Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem*, 25:337-42.

Solberg, H.E, PetitClerc, C. (1988). Approved recommendation on the theory of reference values: Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem*, 26:593-8.

Solberg, H.E. (1987) Approved recommendation on the theory of reference values: Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J ClinChem Clin Biochem*, 25:645-56.

Sönmez, H.A.(2013). Hastalıkların Tanı ve İzlenmesinde Biyokimya Laboratuvarı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi:81. İstanbul, Türkiye.

Şahin, E. Öncel, M. (2014). Diyabet Tanı ve Takibinde Geleneksel ve Yeni Biyokimyasal Belirteçler. *Eur J Basic Med Sci*, 4(3): 66-73.

Tantisiriwat, N. Janchai, S. (2008). Common foot problems in diabetic foot clinic. *J Med Assoc Thai*, 91(7):1097-101.

Tarim, O. Küçükerdoğan, A, Günay, U, Eralp, O, Ercan, I. (1999). Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int*, 41(4):357-62.

Turhan, B. Çalık, B.T. Demirin, H. (2010). Kanıta Dayalı Tıp Laboratuvar Testleri ve Preanalitik Değişkenler. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(3):29-33.

Vistoli, G. de Maddis, D. Cipak, A. Zarkovic, N. Carini, M. Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*, 47 (Suppl. 1): 3–27.

Walton,R.M. (2012). Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Send to Vet Clin Pathol*, 41(2):175-81.

Wesgard, J.O. “Desirable Biological Variation Database specifications.” Erişim: Kasım 2017, from <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.

Wesgard, J.O, Klee, G.G. (2005). Kalite yönetimi. In :Tietz Klinik kimyada temel ilkeler (Burtis, C.A., Ashwood, ER). pp. 285-297. Palme Yayıncılık.

Wolf, H.U. Lang, W. Zander, R. (1984). Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. *Clin Chim Acta*, 136(1):95-104.

Young, D.S. Bermes, E.W. (2005). Örnek toplama ve analiz öncesi değişkenler. In: Tietz Klinik kimyada temel ilkeler (Burtis, C.A., Ashwood, ER). pp.30-54.Palme Yayıncılık.

Zaias, N. The Nail Bed, Part I. (2014). The Normal Nail Bed Matrix, Stem Cells, Distal Motion and Anatomy. *J Dermatolog Clin Res*, 2(1): 1008.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
(2011-KAEK-50)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glikozillenmiş trnak proteinlerinin biyolojik varyasyon ve referans değişim değerlerinin belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Abdurrahman Nafiz Gürman Cad. Kocamustafapaşa - Fatih 34098 İST.
	TELEFON	0 (212) 459 60 00 Dahili;(6225)-(6841)-(6220)
	FAKS	0 (212) 459 62 30
	E-POSTA	ieahetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Murat USTA			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya Kliniği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VEYA PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>			
	Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>			
	İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: Tetkik ile yapılan araştırma.				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		VI	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BİY. MAT.TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Uzman Dr.Muzaffer FİNCANCI
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
(2011-KAEK-50)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glikozillenmiş trnak proteinlerinin biyolojik varyasyon ve referans değişim değerlerinin belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 733	Tarih: 20/11/2015
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Uzman Dr.Muzaffer FİNCANCI

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Uz.Dr.Muzaffer FİNCANCI	Enf. Hast. ve Klin. Mik.	İstanbul EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.M.Emin PİŞKİNPASA	İç Hastalıkları	İstanbul EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ufuk EMRE	Nöroloji	İstanbul EAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.N.Özgür KILIÇKESMEZ	Radyoloji	İstanbul EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Ç.Gökçe GERÇEK	Halk Sağlığı	Halk Sağ.Müd.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Feyzullah ERSÖZ	Genel Cerrahi	İstanbul EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Bülent ÖZALTAY	Deontoloji	İst.Üni.Tıp.Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.A.Pınar YAMANTÜRK ÇELİK	Farmakoloji	İst.Üni.Tıp.Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Müh.Ertuğrul Çağdaş URANLI	Biyomedikal	İstanbul Fatih KHB	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av.Şahin ÇARŞANBALI	Avukat	İstanbul Barosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av.Derya ÖZYURT	Sağlık Mensubu Olmayan Kişi	İstanbul Barosu	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Uzman Dr.Muzaffer FİNCANCI
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Memnune AYDINHAN

Doğum Tarihi: 15.03.1990

Doğum Yeri: Ordu/ Merkez

Mezun Olduğu Üniversite/Fakülte/Bölüm: Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü

e-posta Adresi: memnune_aydinhan15@hotmail.com

Telefon Numarası: 0545 579 30 45

