

# HbA1c Tayininde HPLC Yöntemlerinin Karşılaştırması

## Comparison of HPLC methods in HbA1c determination

Özlem Uğurlu Demirezen Nuriye Uzuncan Sibel Bilgili Murat Akşit  
Alperen Halil İhtiyar Özge Esenlik Giray Bozkaya

İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 07 Aralık 2015

**Kabul Tarihi:** 29 Mart 2016

### ÖZET

**Amaç:** Yöntem karşılaştırma deneyleri, örneklerin yeni test yöntemi ve daha önceden kabul edilmiş yöntemle analiz edilerek elde edilen sonuçların karşılaştırılması temeline dayanır. Bu çalışmada, laboratuvarımızda HbA1c ölçümünde kullanılan boronat afinite kromatografisi ile ters-faz katyon değişim kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Hastanemiz biyokimya laboratuvarına HbA1c ölçümü için gönderilen 131 hasta örneği, Adams HA-8180V (Arkray, KDK, Shiga, Japonya- ters-faz katyon değişim kromatografisi) ve Premier Hb9210 (Trinity Biotech, İrlanda- boronat afinite kromatografisi) HPLC cihazlarında çalışıldı. Yöntem karşılaştırma çalışmaları Clinical Laboratory Standards Institute tarafından yayımlanan National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'in EP9-A2 protokolüne göre yapıldı.

**Bulgular:** Yöntem karşılaştırma için 131 hastanın sonuçları SPSS 21.0'a kaydedildi. İki yöntem arasında bulunan korelasyon istatistiksel olarak anlamlıydı ( $r= 0.980$ ,  $p<0.001$ ) ve regresyon denklemi ( $y=0.27+0.95x$ ) olarak hesaplandı.

**Sonuç:** İki farklı yöntemle yaptığımız %HbA1c ölçümlerinin birbirleriyle uyumlu, doğru ve güvenilir olduğu belirlendi. Bunun yanında metod seçiminde laboratuvarların maliyet, hızlı sonuç alma gibi diğer faktörleri de göz önünde bulundurmasının uygun olacağı düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** HbA1c proteini; HPLC; Metodolojik çalışmalar

### ABSTRACT

**Objective:** Method comparison experiments are based on comparison of samples results analyzed by the new test method and previously accepted method. In this study is aimed to compare reversed-phase cation exchange chromatography with boronate affinity chromatography method which is currently used in HbA1c measurements in our laboratory.

**Materials and Methods:** One hundred and thirty one patient samples which were sent to biochemistry laboratory for HbA1c measurement were included in this study. HbA1c measurements were made in Adams HA-8180V (Arkray, KDK, Shiga, Japan- reversed-phase cation exchange chromatography) and Premier Hb9210 (Trinity Biotech, Ireland-boronate affinity chromatography) HPLC instruments. Method comparison studies were made according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) EP-9 A2 protocol which was published by Clinical Laboratory Standards Institute.

**Results:** Results of 131 patient samples were recorded to SPSS 21.0 for method comparison. The correlation between two methods was statistically significant ( $r= 0.980$ ,  $p< 0.05$ ) and the regression equation was found as ( $y= 0.27+0.95x$ ).

**Conclusion:** HbA1c measurements with two different methods were determined to be compatible, accurate and reliable. Besides, we thought that it will be appropriate to consider other factors such as speed and cost when selecting the methods for routine use.

**Key words:** HbA1c protein; HPLC; Methodological studies

## GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) dünyada halk sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biridir. Kan glikozile hemoglobin (GHb) ve özellikle bunun major bileşeni olan hemoglobin A1c (HbA1c) düzeylerinin ölçümü DM'li hastalarda retrospektif gliseminin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. HbA1c, HbA molekülünün beta zincirinin N- terminal valin kalıntısına glukoz moleküllerinin non-enzimatik eklenmesiyle meydana gelmektedir (1, 2).

Günümüzde DM'li hastalar için klinik önemi giderek artan HbA1c birçok farklı yöntemle çalışlabilmektedir. GHb ile non-GHb'in arasındaki yük farkına dayalı olanlar (katyon değişim kromatografisi, elektroforez ve izoelektrik odaklama), yapısal farka dayalı olanlar (boronat afinite kromatografisi ve immunoassay'ler) ya da kimyasal farka dayalı olanlar (elektrosprey kütle spektrometrisi) dahil olmak üzere 30'dan fazla ölçüm yöntemi kullanılmaktadır (3-5). Ölçüm metodları GHb fraksiyonlarını farklı yollarla ölçtüğünden, kullanılan metoda bağlı olarak farklı HbA1c değerleri elde edilebilmektedir (6-11). Ters-faz katyon değişim kromatografisi, GHb ile non-GHb'ler arasındaki yük farklarına göre GHb'i ölçerken, boronat afinite kromatografisi ise yapısal farklılığa dayalı bileşenleri ayırarak total glikozile hemoglobini ölçer (7, 11). HbA1c ölçüm metodlarının uluslararası düzeyde standardizasyon çalışmaları hala devam etmektedir (12).

Yöntem karşılaştırma deneyleri; gerçek hasta örneklerinin, yeni test yöntemi ve daha önceden güvenilirliği kanıtlanmış yöntemle analiz edilerek elde edilen sonuçların karşılaştırılması temeline dayanır. Klinik laboratuvarlarda cihaz değişimi sık karşılaşılan bir durumdur. Bu sırada hasta örneklerini kıyaslamak ve grafiklerle değerlendirmek, yeni cihazda olabilecek sistematik veya rastgele

hata kaynaklarının sıkıntı yaşamadan önce belirlenmesini sağlar (13, 14).

Bu çalışmada laboratuvarımızda, HbA1c ölçümünde kullanılan boronat afinite kromatografisi ile ters-faz katyon değişim kromatografisinin karşılaştırılması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

HbA1c ölçümleri hastanemiz biyokimya laboratuvarında Premier Hb9210 (Trinity Biotech, İrlanda / boronat afinite kromatografisi) ve Adams HA-8180V (Arkray, KDK, Shiga, Japonya / ters-faz katyon değişim kromatografisi) HPLC cihazlarında ardışık olarak yapıldı.

Yöntem karşılaştırma çalışmaları Clinical Laboratory Standards Institute tarafından yayımlanan National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'in EP9-A2 protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu protokole, yöntem karşılaştırma için en az 40 olgu toplanması, bunların bir kısmının referans aralığın dışında olması ve çalışmanın en az beş günde yapılması önerilmektedir (1, 7, 13-15).

Bu öneriler doğrultusunda, çalışmamız düşük ve yüksek düzey kontroller ile 131 hasta örneği kullanılarak 5 günde yapıldı. Her çalışma gününde dörder tekrar yapıldı.

Çalışmaya başlamadan önce her iki cihaz %0.0, %5.1 ve %11.1 standartları içeren, HbA1c kalibratörleri ile kalibre edildi.

Çalışmamızın birinci aşamasında, düşük (%4.1-6.1) ve yüksek (%8.2-12.2) düzey kontrol çalışmaları yapıldı. Toplam 40 adet veri üzerinden ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı (%CV) değerleri hesaplandı.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, hastanemiz biyokimya laboratuvarına HbA1c ölçümü için

gönderilen 131 hasta örneği çalışmaya dahil edildi. Hastaların 10-12 saat açlığı takiben K<sub>3</sub>-EDTA'lı tüplere (Vacuette, greiner bio one, Avusturya) alınan venöz kan örneklerinden HbA1c düzeyi hiç beklemeden her iki cihazla, çift olarak ölçüldü.

Elde edilen hasta sonuçları SPSS 21.0 paket programına kaydedildi. Elde edilen sonuçların dağılımının normal olduğu saptandı. İstatistiksel değerlendirme için student t-testi kullanıldı. Yöntemlerin ilişkisi, Pearson korelasyon analizi ve regresyon analizi ile belirlendi. Ayrıca MedCalc Programı yardımı ile Bland-Altman yöntemi uygulandı ve ölçüm değerlerinin ortalamadan sapmalarına ilişkin grafik elde edildi.

## BULGULAR

Adams HA-8180V ve Premier Hb9210 cihazının kontrol 1 ve 2 için ortalama ve %CV değerleri Tablo 1'de gösterildi.

Çalışmamızda hasta örneklerinin HbA1c konsantrasyonları %5-15.1 arasındaydı.

Hasta sonuçlarının her iki cihaz için sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri ise  $7.45 \pm 2.11$  ve  $7.35 \pm 2.04$  idi. Her iki yöntemle ölçülen hasta sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi ( $p > 0.05$ ).

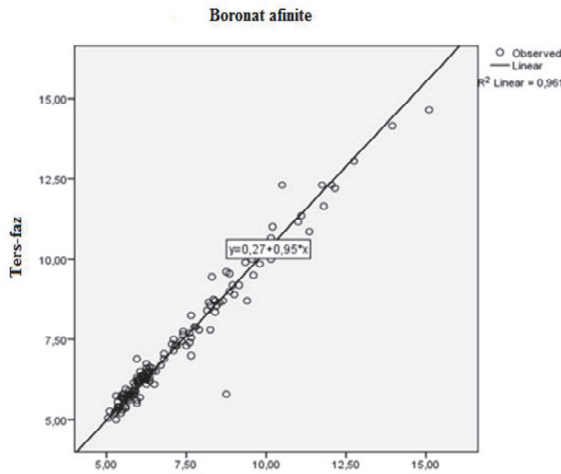
İki yöntem arasında korelasyon ( $r=0.980$ ,  $p < 0.001$ ) ve regresyon denklemi ( $y=0.27+0.95x$ ) hesaplandı. Korelasyon katsayısı  $r=0.980$  (ideal +1 veya -1). Regresyon denkleminde hesaplanan kesim 0.27 (ideal 0) ve eğim 0.95 (ideal 1) değerleri iki yöntem arasındaki doğrusal ilişki ve uyumu gösterdi (Şekil 1).

Bias değeri, HbA1c için tıbben önemli karar düzeyindeki (%6.5) x değerine göre, regresyon denkleminde 0.055 olarak hesaplandı.

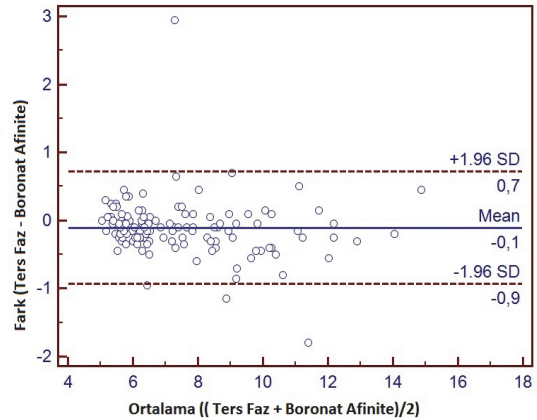
Bland-Altman yöntemine göre farkların ortalamasının sıfır etrafında yayılması nedeniyle bu iki yöntem arasında bir uyum olduğu ve birbirinin alternatifi olabileceği sonucuna varıldı (Şekil 2).

**Tablo 1.** Kontrol örneklerinin ortalamaları, standart sapma ve %CV sonuçları  
Table 1. Averages, standard deviations and %CV values for control samples

	ters-faz katyon değişim kromatografisi		boronat afinite kromatografisi	
	Ortalama±SD (%)	Günler arası %CV	Ortalama±SD (%)	Günler arası % CV
Kontrol 1	5.05±0.7	1.4	5.5±0.6	1.2
Kontrol 2	10.0±0.7	0.7	9.6±0.6	0.7



**Şekil 1.** İki yöntemin regresyon grafiği  
Figure 1. Regression graphics of the two methods



**ŞEKİL 2.** Bland-Altman grafiği  
Figure 2. Bland-Altman graphics

## TARTIŞMA

American Diabetes Association (ADA), stabil glisemik kontrolü olanlarda yılda en az 2, tedavisi değişen ya da glisemi hedefi sağlanamayanlarda yılda 4 kez HbA1c düzeyinin ölçülmesini önermektedir. ADA'ya göre, erişkinlerde HbA1c değeri diyabet tanı kriteri amacıyla kullanılacaksa  $\geq$ %6.5 değeri ve tedavi izleminde hedef ise  $<$ %7 olarak belirlenmiştir (4).

HbA1c değerinin diyabetin uzun dönem takibi yanında, artık diyabetin teşhisinde de kullanımının önerilmesi, HbA1c ölçüm metodunun yeterli tanıl keskinliğe ve doğruluğa sahip olmasını gerektirmektedir ve sonuçların diğer yöntemlerle karşılaştırılabilir olması önemlidir (4, 16-18).

Cihaz değişimleri sırasında hasta sonuçlarını karşılaştırmak, hata kaynaklarının saptanması ve önlem alınmasının sağlanması açısından önemlidir. Çalışmamızda laboratuvarımızda bulunan iki farklı yöntemle analiz ettiğimiz, HbA1c sonuçlarının uyumunu inceledik.

NCCLS'in EP9-A2 protokolüne göre, yöntemler arasındaki korelasyon için regresyon analizinin yapılması ve regresyon analizinin etrafındaki saçılmanın (Sy/x) hesaplanması önerilmektedir. Böylece yöntemler arası ilişki denklemle ifade edilir (1, 7, 13, 14).

Bu doğrultuda gerçekleştirdiğimiz çalışma sonuçlarına göre; regresyon analizinden elde edilen, regresyon standart hatası (Sy/x, ideali 0'a yakın olması) 0.48 ve korelasyon analizi yapılarak elde edilen  $r=0.980$  değeri, yöntemlerin birbiri ile uyumlu olduğunun göstergesidir. İncelenen iki yöntemden herhangi birisindeki değişimin, diğer yöntem tarafından açıklanabilir olması da, belirlilik katsayısı ( $R^2$ ) ile değerlendirilir. Bu katsayı 1'e yaklaştıkça uygunluk artar. Biz yapmış olduğumuz regresyon analizinde  $R^2$  değerini 0.961 olarak bulduk. Regresyon eşitliği  $y=0.27+0.95x$  olarak hesaplandı. Uyumu ifade etmede doğrusallık oranı da kullanılan bir ölçüttür. Doğrusallığın bir göstergesi eğim katsayısının mutlak değerinin 100 ile çarpımıdır. Bu durumda incelenen iki yöntem arasında %95 oranında bir doğrusallık olduğu ve bu sonuca dayanarak da mevcut iki yöntemin birbirinin alternatifi olabileceği söylenebilir.

Bias değerini, tanı kriteri olan %6.5 değerine göre, regresyon denkleminde 0.055 olarak hesapladık. National Glycohemoglobin Standardization Programme (NGSP) kriterine göre bias  $<$ %0.35 olmalıdır (4, 14). Buna göre, çalışmamızda bulunan bias değeri %0.055 olduğundan, NGSP kriterinin çok altındadır. Buradan hareketle, karşılaştırılan iki yöntemin birbirine çok yakın uyumlu sonuçlar verdiği söylenebilir.

HbA1c ölçüm değerlerinin kabul edilebilir olması için ADA tüm laboratuvarların NGSP tarafından sertifikalandırılmış, çalışma içi %CV değeri  $<$ %5 olan kitlerle çalışmasını önermiştir. HbA1c standardizasyonu için, International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) çalışma grubu ise referans laboratuvarları için kriter olarak %CV  $<$ %2.5 hedef değerini koymuştur (14, 19). EP15-A2 protokolüne göre her iki yöntem için bulduğumuz %CV değerleri, firma verileriyle ve bu kriterlerle uyumlu olduğundan, iki cihazın HbA1c ölçümünde elde edilen sonuçlarının, kabul edilebilir ve referans laboratuvar kriterlerine uygun olduğu düşünüldü (20, 21).

HbA1c için Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) veri tabanında kabul edilmiş üç tane referans yöntem bulunmaktadır. Bunlar NGSP-HPLC, IFCC-kütle spektrometrisi/kapiller elektroforez (MS/CE) ve sıvı kromatografisi-izotop dilüsyon-kütle spektrometrisi (LC-ID-MS) yöntemleridir (22, 23).

HPLC sisteminde HbA1c çalışılması, yöntemin yüksek spesifitesi ve sensitivitesi yanısıra anormal hemoglobinlerin belirlenmesine yararlı olması açısından önemlidir. Tran ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, immünölçüm ve HPLC sistemlerinin HbA1c ölçümleri karşılaştırılmış, hem immünölçüm yöntemlerin hem de HPLC sistemlerinin kabul edilir sistemler olduğu, fakat HPLC analizörlerin daha üstün analitik performansa sahip olduğu gösterilmiştir (17).

Bazı durumlarda HPLC yöntemlerinin dezavantajları söz konusu olabilir. Hipertrigliseridemi, hiperbilirubinemi, üremi, kronik alkolizm, kronik salisilat alınması ve opiyat bağımlılığı HPLC gibi bazı metodları etkileyebilir.

rek, yanlış düşük neticelere yol açabilir. Eritrosit ömrünü kısaltan veya ortalama eritrosit yaşını düşüren durumlar (örn, akut kan kaybından sonraki iyileşme dönemi, hemolitik anemi) metoda bakılmaksızın test sonuçlarında yanlış düşüklüğe neden olurlar. Çeşitli hemoglobinopatiler (S, C, D, Graz, Padova vb.) eritrosit yaşam sürelerini kısaltma etkilerinden bağımsız olarak ve kimyasal olarak modifiye edilmiş hemoglobin türevleri (örn, böbrek yetmezlikli hastalarda "karbamillenmiş" Hb, fazla aspirin alan hastalarda "asetilenmiş" Hb) bazı ölçüm metodlarını etkileyebilir (24-29).

NCCLS protokollerinde yöntem karşılaştırma için, interferans çalışması şart olmakla beraber, hemoglobin varyantları ve interferans çalışması yapamamamız, çalışmamızın eksik bir yönüdür. Buna rağmen, yöntemler arasında korelasyonu uygun bulmamız, interferansların az olduğunu düşündürmektedir.

Laboratuvar sorumlusu, HbA1c testi için kullanılan test tekniğinin, referans aralığının ve demir eksikliği anemisi, hemoglobinopatiler, hemolitik anemiler, üremi, kronik böbrek yetmezliği gibi potansiyel interferansların bilincinde olup, yöntemini seçerken, hız ve maliyet yanında, hasta popülasyonunun karakterini (örn, hemoglobinopatilere veya böbrek hastalıklarına sık rastlanması gibi) de göz önünde bulundurabilmelidir. Ayrıca, hasta sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında gerekirse çıkan sonuçların yorumlanarak raporlanması yapılarak, klinisyene bilgi verebilmelidir.

İki farklı yöntemin kullanıldığı, iki ayrı cihazla elde edilen HbA1c ölçümlerinin birbiri ile uyumlu, doğru ve güvenilir olduğu bulunmakla birlikte, laboratuvarların hız ve maliyet gibi faktörlerin yanında, rutin kullanım için, varyant Hb'ler gibi interferansları da göz önüne alarak HPLC yöntem seçimini yapmalarının uygun olacağı sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3 (3): 439-45.

2. Kurt İ. Glikozile Hemoglobin (HbA1c) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 2003; 45: 387-95.
3. Cohen MP, Witt J, Wu VY. Purified haemoglobin preparations in the evaluation of HbA1c determination by ion-exchange chromatography. *Ann Clin Biochem* 1993; 30 (3): 265-71.
4. Miedema K. Laboratory test in diagnosis and management of diabetes mellitus. Practical considerations. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (9): 1259-65.
5. Marshall SM, Barth JH. Standardization of HbA1c measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem* 2000; 37 (1): 45-6.
6. Bodor GS, Little RR, Garrett N, Brown W, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. *Clin Chem* 1992; 38 (12): 2414-8.
7. Wettre S, Von Schenck H. Batch to batch imprecision in the affinity chromatography assay of glycated hemoglobin. *Clin Biochem* 1986; 19 (6): 364-6.
8. Bruns DE. Standardization, calibration, and the care of diabetic patients. *Clin Chem* 1992; 38 (12): 2363-4.
9. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH Jr, et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. *Clin Chem* 1992; 38 (12): 2472-8.
10. John WG, Gray MR, Bates DL, Beacham JL. Enzyme immunoassay-a new technique for estimating hemoglobin A1c. *Clin Chem* 1993; 39 (4): 663-6.
11. Newman DJ, Henneberry H, Price CP. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1992; 29 (1): 22-42.
12. Palfrey S, Labib M. A rapid automated method for measuring glycated haemoglobin on the Beckman CX7 analyzer. *Ann Clin Biochem* 1994; 31 (3): 293-5.
13. Westgard Jo, Hunt MR. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem* 1973; 19 (1): 49-57.
14. Goodal I. HbA1c standardization destination-global IFCC Standardization. How, why, where and when-a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *Clin Biochem Rev* 2005; 26 (1): 5-19.
15. Roger Johnson Assessment of bias with emphasis on method comparison. *Clin Biochem Rev*. 2008; 29(Suppl 1): S37-S42.
16. Khuu HM, Robinson CA, Goolsby K, Hardy RW, Konrad RJ. Evaluation of a fully automated high-performance liquid chromatography assay for hemoglobin A1c. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123 (9): 763-7.
17. Tran DV, Lyon AW, Higgins TN, Wesenberg JC, Vandergouwe L, Wiley CL, et al. Use of serial patient hemoglobin A1c differences to determine

- long-term imprecision of immunoassay and high-performance liquid chromatography analyzers. *J Diabetes SCI Technol* 2009; 3 (3): 424-8.
18. Kapadia CR. Are the ADA hemoglobin A(1c) criteria relevant for the diagnosis of type 2 diabetes in youth? *Curr Diab Rep* 2013; 13(1): 51-5.
  19. Kharal M, Al-Hajjaj A, Al-Ammri M, Al-Mardawi G, Tamim HM, Salih SB, et al. Meeting the American Diabetic Association standards of diabetic care. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010; 21 (4): 678-85.
  20. Chesher D. Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29(Suppl 1): S23-6.
  21. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline. 2nd ed. CLSI document EP15-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
  22. Armbruster D, Miller RR. The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): a global approach to promote the standardization of clinical laboratory test results. *Clin Biochem Rev* 2007; 28 (3): 105-13.
  23. Kaiser P, Akerboom T, Ohlendorf R, Reinauer H. Liquid chromatography-isotope dilution-mass spectrometry as a new basis for the reference measurement procedure for hemoglobin A1c determination. *Clin Chem* 2010; 56 (5): 750-4.
  24. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C. TEMD Diabetes Mellitus çalışma grubu. TEMD Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu. 4.Baskı. Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın Tanıtım Ltd. Şti. Ankara, 2013.
  25. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48 (3): 456-72.
  26. Tarım O, Küçükdoğan A, Günay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999; 41 (4): 357-62.
  27. Nathan DM, Francis TB, Palmar JL. Effects of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29 (3): 466-9.
  28. Stevens VJ, Fantl WJ, Newma CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* 1981; 67 (2): 361-9.
  29. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. *Clin Chem* 1999; 45 (3): 438-40.
- 
- Yazışma adresi:**  
Özlem Uğurlu Demirezen  
İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Tıbbi Biyokimya, İzmir  
E-mail: ozlemdost@yahoo.com
-