

30 009

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OBEZ KİŞİLERİN GLİKOZİLE HEMOGLOBİN ve
FRUKTOZAMİN DÜZEYLERİNİN FARKLI
YÖNTEMLERLE İRDELENMESİ**

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Handan AK

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Oya BAYINDIR

İZMİR - 1993

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
Obezite ve BMI	4
Obezite ve Cinsiyet	5
Obezitede Diabet ve Ateroskleroz	6
Glikozile Hemoglobin	7
Fruktozamin	15
Serbest Yağ Asitleri ve Yağ Dokusu Metabolizması	18
ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER	20
Araç-Gereç	20
Kimyasal Madde ve Reaktifler	20
Çalışma Materyeli	22
Yöntemler	23
BULGULAR	28
TARTIŞMA ve SONUÇ	48
Yöntem Tartışması	48
Bulgu Tartışması	59
ÖZET	69
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

Tablo-1: Yöntem Geliştirmede Yararlanılan Olgulara Ait Bulgular	29
Tablo-2: Yöntem Geliştirmede Yararlanılan Olgulara Ait Bulgular	30
Tablo-3: Yöntem Geliştirmede Yararlanılan Olgulara Ait Bulgular	30
Tablo-4: Yöntem Geliştirmede Yararlanılan Olgulara Ait Bulgular	31
Tablo-5: Yöntem Geliştirmede Yararlanılan Olgulara Ait Bulgular	32
Tablo-6: Kontrol Grubu (Nonobez) Olgularına Ait Bulgular	33
Tablo-7: Hasta Grubu (Obez) Olgularına Ait Bulgular	34
Tablo-8: Serbest Yağ Asitleri Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırıldığı Olgulara Ait Bulgular	35
Tablo-9: Açlık Kan Glukozu Korelasyonları	36
Tablo-10: Fruktozamin Korelasyonları	36
Tablo-11: Gliko-Hb Ölçüm Yöntemlerinin Korelasyonları	36
Tablo-12: Serbest Yağ Asitleri Ölçüm Yöntemlerinin Korelasyonu	37
Tablo-13: Kolon Kromatografi ile Ölçülen Normal ve Abnormal Kontrol Serumlarına Ait Değerler	37
Tablo-14: Açlık Kan Glukozu Korelasyonları	38
Tablo-15: Glikozile Hb (HMF Yöntemi ile Ölçülen) Korelasyonları	39
Tablo-16: Glikozile Hb (Kolon Yöntemi ile Ölçülen) Korelasyonları	40
Tablo-17: FFA Korelasyonları	41
Tablo-18: TKol/HDL.Kol Korelasyonu	42
Grafik-1: Obez ve Nonobez Çalışma Gruplarında Ölçülen Gliko Hemogloblin Değerleri	43
Grafik-2: Obez ve Nonobez Çalışma Gruplarında Serum Fruktozamin Değerleri	44
Grafik-3: Obez Grupta BMI ile Serum Fruktozamin Konsantrasyonu Arasındaki İlişki	45

Grafik-4: Obez ve Nonobez Çalışma Gruplarında Açlık ve Tokluktaki Serbest Yağ Asitleri Değerleri 46

Grafik-5: Obez ve Nonobez Çalışma Gruplarında Glukoza Karşı Serbest Yağ Asitlerinin Yanıtı 47



ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimi yapmama olanak sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Sermet ERLAÇIN' e ve eğitimim boyunca, tezimin hazırlanmasında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Oya BAYINDIR' a öncelikle teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans eğitimim başlangıcından, sonuna dek bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yetişmemde büyük katkıları olan Sayın Hocalarım Prof. Dr. Gülriz MENTEŞ, Prof. Dr. Biltan ERSÖZ, Prof. Dr. Fatma KUTAY, Prof. Dr. Taner ONAT ve Prof. Dr. Necla NİŞLİ' ye ayrıca çalışmalarımda büyük bir anlayış gösteren ve emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı uzmanlarına, asistanlarına ve laboratuvar teknisyenlerine teşekkürlerimi sunarım.

Kimy. Handan AK



GİRİŞ

Obezite, vücutta aşırı yağ depolanması sonucu ortaya çıkan ve günümüzde Türkiye dahil birçok ülkenin en önemli besinsel hastalıklarından biridir. Gelişmiş ülkelerin orta ve az gelirli kesimlerinde, orta gelişmişlik derecesinde olan ülkelerin ise ekonomik geliri orta ve yüksek olan tabakalarında yaygın olarak görülmektedir. Yaş ilerledikçe sıklığı artmakta ve kadınlarda erkeklerden daha sıkça gözlenmektedir. Kısa ve orta boylu olanlar, uzun boylu olanlardan daha fazla şişmanlama eğilimindedir. Obezite, sadece bir görünüş kusuruna ve bedensel faaliyet yeteneklerini kısıtlamaya yol açmakla kalmayıp, ömrü kısaltan en önemli faktörlerden biridir (13, 20, 22, 24, 56).

Kişinin fazla kilolu olduğuna karar verirken, genellikle iki ölçüt kullanılmaktadır (56). Bunlardan birisi A.B.D. Metropolitan Hayat Sigortası Şirketinin en uzun ömür beklentisine göre hazırlanmış yaşa, boya, cinse, vücut yapısına göre ideal vücut ağırlığını gösteren tablolar, ikincisi ise deri kıvrımı kalınlığına göre hazırlanmış listelerdir. Bunlar dışında birçok indeksler (şişmanlık indeksi, ponderal indeks gibi) önerilmiş ama kullanıma alanı bulamamıştır. Örneğin kaslarını çok geliştirmiş bir sporcu ile spor yapmayan bir kimseyi boy-kilo cetvellerine göre değerlendirmek zor olabilmektedir. Sporcularda da yağ depolarının durumunun deri kıvrımı kalınlığı ölçülerek değerlendirilmesi önerilmektedir. Bunun dışında kişinin vücut ağırlığı indeksi (BMI) belirli bir yüzdeyi aşarsa obes olarak kabul edilmektedir (13, 56).

Erken çocukluktaki obesite çoğu zaman geçici olmakta, çocukluk ve ergenlik çağındaki şişmanlıkların bir kısmı erişkin yaşta da sürmektedir. Kadınlarda obeziteye sık rastlanmasının en önemli nedeni; gebelikte alınan aşırı kiloların doğumdan sonra verilememesi ve kadınlık hormonu östrojenin yağ dokusunu artırıcı doğal etkisinin olmasıdır. Ev kadınlarının ev dışı yaşamlarının azlığı ve bedensel faaliyetlerinin kısıtlı olması da rol oynamaktadır (13, 24, 56, 65).

Ayrıca iş adamları, yöneticiler, yüksek düzey memurlar arasında da obezite

sıkça görülmektedir. Bu kişilerin sedanter yaşamı, sürekli karar verme durumunda olmanın yarattığı gerginlik ve sık alkol alma obezite nedenlerindedir.

Obezitenin etyolojik sınıflandırması; genetik, hipotalamik, endokrin kaynaklı faktörler ve alışılmış obezite şeklinde yapılmaktadır (13, 56). Genetik faktörler; doğmalık makrosomia adipositas, Laurence-Moon Biedl sendromu, Hiperostosis frontalis interne ve Von-Gierke hastalığı ile birlikte olan şişmanlık, Prader-Willi sendromu, Ailevi hipoglisemi sendromu, alfa hücrelerinin yokluğu, Rothmund sendromundaki şişmanlık vb. gibi faktörlerdir (56).

Hipotalamik kaynaklı faktörler; Adipozo-genital distrofi, Eröhlich sendromu, Kleine-Levin sendromu gibi faktörlerdir.

Endokrin kaynaklı faktörler; İnsülinomada, Stein-Leventhal sendromunda ve menapoz sonrasında görülen şişmanlık, Hipotiroidi, Erkek hipogonadizmi, Hipotalamo, Hipofizer cücelik ve Cushing sendromu gibi faktörlerdir.

Alışılmış obezite de ise toplumsal ve ailevi gelenek-görenekler, psişik faktörler, hareket azlığı, beslenme bozukluğu, eğitim eksikliği, gebelik ve doğumlar gibi faktörler etken olmaktadır.

Obezitenin komplikasyonları ve riskleri olarak şunları sıralıyabiliriz: Psikolojik bozukluklar ve toplumsal uyumsuzluklar, solunum sıkıntısı, mekanik güçlükler, endokrin ve metabolik komplikasyonlar, kardiovasküler komplikasyonlar, deri altı yağ dokusunun artmasıyla deri enfeksiyonlarının kolaylaşması, safra taşları ve taşlı kolesistit, glukoz intoleransı' dır (56).

Diabetli olgularda yağ dokusu hücrelerinin genişlemesi; insülin reseptörlerinin yoğunluğunun azalmasına ve dolayısı ile zamanla glukoz intoleransına yol açabilmektedir. Glukoz intoleransının araştırılmasında bilinen analizler glukoz, OGTT, Glikozil hemoglobin ve Fruktozamin düzeylerinin ölçülebildiği analizlerdir. Ancak glukoz intoleransının çok erken evrelerinde bu testler, tanı koydurmada yeterli olmayabilmektedirler. Glukoz intoleransının erken dönemlerinde glukozu karşı (FFA)

serbest yağ asitlerinin yanıtı, intolerans tanısı açısından çok daha yararlı olabilmektedir. Obezite tek başına kardiovasküler risk faktörü oluşturabildiği gibi ayrıca glukoz intoleransı oluşturarak da bu risk faktöründe etkili olabilmektedir.

Bu ön bilgilerin ışığı altında amacımız; obez olgulardaki glukoz intolerans riskini ve kardiovasküler riski araştırmak olmuştur. Çalışmamızda bu amaçla obez ve nonobez olgularda glukoz, OGTT (Oral glukoz tolerans testi), glikozil hemoglobin, fruktozamin, serbest yağ asitleri, T-Kolesterol, HDL-Kolesterol düzeylerini araştırdık.



GENEL BİLGİLER

OBEZİTE ve BMI (4, 13, 20, 56)

Vücut kitle indeksi (BMI) normal olan birçok bireyin uzun ve sağlıklı bir ömür sürdüğü bilinmektedir. Bu bireylerde hemen hemen hiç metabolik ya da damar hastalıkları gözlenmemektedir.

Buna karşın şişman bireylerde metabolik ve vasküler komplikasyonların belirtileri izlenmektedir. Genellikle bireylerin normal ya da kilolu olduklarına karar verirken, onların vücut kitle indekslerine bakılmaktadır.

Yüzyıldan fazla bir süre önce Belçikalı astronom Quetelet normal erişkinlerde, ağırlığın boyun karesine bölümünün (W/H^2) kabaca sabit olduğunu ve bu oran yükseldikçe kişinin şişman sayılabileceği ileri sürmüştür (Quetelet indeksi-QI).

Keys ve ark. 1972' de bu oranı vücut kitle indeksi olarak (body mass index-BMI) tekrar tanımlamışlardır. Obezite derecelendirmesinde obezitenin yol açtığı sağlık sorunları göz önüne alınarak QI veya BMI için 1981' de Garrow aşağıdaki sınıflandırmayı yapmıştır.

0. derece BMI 20-24.9
1. derece BMI 25-25.9
2. derece BMI 30-40
3. derece BMI > 40

Bu indeks hastaya şişman olduğunu ve kaybetmesi gereken kiloları tanımlamada da yararlı olmaktadır. W kilogram olarak ağırlığı, H ise metre olarak boyu belirtmektedir. QI veya BMI 30 olduğunda yaklaşık % 30' luk bir kilogram fazlalığı söz konusudur. Bu o kişinin sağlığına % 25-30' luk bir risk artışı yüklemektedir. BMI>40 olanlar çok yüksek riske sahip olmakla birlikte normal kilolarına göre 11 misli ekstra risk taşımaktadırlar. Genelde BMI' in, vücut yağ oranı ile en uygun korelasyona sahip formül olduğu kabul edilmektedir. Bu indeks; yaş, cinsiyet ve kemik yapısından etkilenmemektedir. Tedavide iyi bir rehber olmaktadır.

Yaş ilerledikçe mortaliteyi etkileyecek BMI düzeyi artmaktadır. Örneğin, 20-29 yaşlarında erkekler için 21.4 minimum mortalite düzeyi iken bu değer 60-69 yaşlarında 26.6 ya kadar çıkabilmektedir. Kadında ise bu sayılar sırasıyla 19.5 ve 27.3' tür. Sigara içen ve içmeyenler karşılaştırıldığında içenlerde genel indeksler daha düşük, ancak her indekste mortalite oranı içmeyenlerden daha yüksek bulunmaktadır.

40 yaş üzeri kadınlarda 20' nin altında BMI çok nadiren gözlenmiştir. Oysa 16-20 yaşlarında erkek ve kadınların üçte birinde indeks 20' nin altında olmaktadır. Birinci derece obezite, kadında 16 yaşından 64 yaşına kadar linear artmakta, erkekte ise tam açıklanamayan bir nedenle 40 yaşına kadar hızlı daha sonra yavaşlamakta olduğu öne sürülmektedir.

İkinci-üçüncü derecedeki obezite kadınlarda daha sık görülmektedir. BMI 30' un üzerine çıktığında özellikle hipertansiyon, kardiovasküler sistem hastalıkları, iskelet kas hastalıkları ile morbidite artmaktadır.

BMI 20-25 düzeylerinde ise kişinin hiperkolesterolemi, hipertansiyon, DM ve safra kesesi hastalığı riskleri söz konusu olurken, sigara kullanması da BMI kadar hatta daha yüksek oranda kardiovasküler hastalık ve erken ölümden rol oynamaktadır.

OBEZİTE ve CİNSİYET (7, 13, 20, 65)

Yağ dokusunun cinsel farklılaşması birçok hayvan cinsinde gözlenmemekle birlikte, insana en yakın antropomorfelerde bile çok belirgin değildir. Yaklaşık 2 milyon yıl önce başlayarak gerek erkek gerekse kadın cinslerinde insanlara özgü deri altı yağ tabakası belirmeye başlamıştır. İnsanlarda yağ dokusunun cinsel farklılaşması 5 yaşından itibaren başlamaktadır. Cinsel farklılaşma aynı zamanda deri altı yağ dokusunun dağılımında da belirgin hale gelmektedir. Ergenlik öncesi genç kız ve erkek çocuklarda, yağ dokusu vücudun alt bölümlerinde daha belirgin olmaktadır.

Kadınlarda gebeliğin mekanik gereksinimleri ve de fetal gelişim için gerekli rezervler nedeniyle yağ dokusu, hareket yeteneğini en az sınırlayacak şekilde vücudun alt tarafında pelvik bölgede toplanmış durumdadır. Kadınlar erkeklere göre iki kat

daha fazla yağ kitlesine sahiptirler. Şişman kadınlarda yağ dokusunun dağılımı jinoid niteliğini koruduğu sürece risksiz olup, android hale geçtiğinde ise risk teşkil etmektedir.

Erkeklerde yağ dokusunun daha az gerekli olması nedeniyle miktarı yarı yarıya azalmıştır. Hareket yetersizliğini ve fiziksel mücadeleyi engellemeyecek şekilde vücudun üst bölümlerinde birikim göstermektedir. Bu fiziksel hareket yetenekleri de testesteron etkisi ile omuzların genişlemesi, pelvisin daralması sonucu daha da belirginleşmektedir. Testesteron ve kortizol yağ hücrelerinin sayı ve hacimlerini etkileyerek yağ dokusunun vücudun üst bölümlerinde yerleşmesini sağlamaktadır. Artmış kortizol düzeyleri ise her şişmanlıkta söz konusu olmaktadır.

Şişmanlıkta adrenal korteksin ACTH' a artmış yanıtı yağ kitlesinin fazlalığı ile değil, yağ dokusunun vücudun üst bölümlerinde toplanmış olmasıyla ilgili bulunmaktadır.

Güncel klinik deneyimler diabetojenik ve aterojenik nitelikteki android şişmanlığın kalıtsal bir nitelik taşıdığı yönünde olup, genlerdeki çalışmalarda sürmektedir.

OBEZİTEDE DİABET ve ATEROSKLEROZ (7, 13, 18, 20, 22, 46, 47, 56, 64)

Obezite, son yıllarda endokrinoloji ve kardiovasküler hastalıklar alanında doğurduğu komplikasyonlar nedeniyle estetik olmaktan çok klinik bir konu olarak ağırlığını duyurmaya başlamıştır. Obezite eğer bir hastalığa eşlik eden tipte değil ise primer sorun olarak ele alınmaktadır. Obezite tedavisi estetik amaçlar dışında en fazla koroner hastalığı ve diabet riskini azaltmak için yapılmaktadır.

20-40 yaş arasındaki obezlerde azalmış glukoz toleransı (latent diabet) % 8.7 oranında iken 40 yaş üzerindeki obezlerde latent diabet görülme oranı % 24.4 olmaktadır. Şişmanlığın artması ile diabet insidensi paralel gitmektedir. Vücut ağırlığı % 10. fazla olanlardadiabet insidensi normallerden 1.5 misli, % 20 fazla olanlarda 3.2 misli ve % 25' den fazla olanlarda 8.3 misli olmaktadır. Vücut ağırlığı

% 25' den fazla olan diabetiklerde ölüm, normal ağırlıkta olan diabetiklerden 8 misli fazla olmaktadır.

Şişman diabetikler insüline karşı az hassas olup, direnç göstermektedirler. Glukoz ile uyarıldığı zaman insülin salınımı, normal bireylere göre çok yüksek olmaktadır. Fazla insülin, yağ dokusunda trigliserid sentezini arttırmakta, bu yolla yağ dokusunda aşırı yağ birikimi olmaktadır.

Bozulmuş glukoz toleransı ateroskleroza hızlandıran bir etken olmaktadır. Diabet, tüm arter yatağı boyunca vasküler komplikasyonlara yol açmaktadır. Büyük damarların tutulması (makroanjyopati) spesifik olmayan fakat kalpte (koroner kalp hastalığı), beyinde (serebrovasküler) ve alt ekstremitelerde (kesik topallama) önemli etkileriyle erken ateroskleroza neden olmaktadır. Ateroma diabet için spesifik olmasada diabetiklerde kardiovasküler olaylar iki kat daha sık görülmektedir. Diabetik nüfusta ölümlerin % 75' ini oluşturmaktadır.

Obezite de diabetin bir sonucu olarak görülen lipid metabolizmasındaki değişiklikler kardiovasküler hastalık riskini artırmaktadır. Obezite durumunda kanda esterleşmemiş (serbest) yağ asitleri (FFA), kolesterol ve trigliserid düzeyi de yükselmektedir. VLDL düzeyleri artmakta, bu artış anormal oksidasyon nedeniyle özellikle endotel hücreleri için sitotoksik olmaktadır. Damar duvarında lipid birikimine neden olduklarına dair bilgiler bulunmaktadır.

Diabette LDL glikozilasyonu ve birleşimi değişmektedir. HDL' nin kolesterolü temizleme fonksiyonunun diabette bozulduğu ve glikozile-HDL' nin daha çabuk metabolize olduğu öne sürülmektedir.

GLİKOZİLE HEMOGLOBİN

Yapısı ve Biyosentezi:

1958 yılında Allen, hemoglobin yapısının homojen olmadığını total hemoglobinin % 90' nını oluşturan hemoglobin A₁' in yanı sıra farklı elektroforetik nitelikler gösteren hemoglobinlerin de var olduğunu göstermiştir (33, 41, 42, 43, 59).

Aralarındaki farklılığın ise zincirlerinin amino uçlarına (valin) bağlı bloke edici gruplardan kaynaklandığını, bu grupların hemoglobinin cinsine göre değiştiğini bildirmişlerdir (33, 41, 42, 43, 59).

HbA_{1a1}' in bloke edici grubu Fruktoz-1, 6 bolifosfat, HbA_{1a2}' nin Glukoz-6-fosfat, HbA_{1c}' nin ise Glukozdur. Bloke edici grupların hepsi bir -oz yapısındadır. HbA_{1b}' nin ise yapısı henüz aydınlatılmamış olup HbA₁' in deaminasyona uğramış bir türevi olduğu kabul edilmektedir (33, 41, 42, 43, 59).

Eritrositlerde hemoglobin A₁' in invivo biyosentezi eritrositin yaşamı boyunca süren oldukça yavaş bir reaksiyonla oluşmaktadır. Bu sentez hemoglobin A₁ sentezinin enzimden arındırılmış invitro ortamlarında oluşabileceğinin gösterilmesiyle kanıtlanmış nonenzimatik bir reaksiyondur. Bu biyosentez belli bir düzeyde gerçekleşip, hiçbir koşulda HbA₁ düzeyleri total hemoglobinin % 23' ünü aşmamaktadır (33, 41, 42, 43, 59).

HbA₁' in zincir yapısı 2 α -2 β , HbA₂' nin 2 α -2 δ , HbF' nin ise 2 α - δ şeklindedir. Bu polipeptid zincirlerinin sentezi ayrı ayrı genlerin kontrolü altında olmaktadır. Normal erişkin hemoglobini % 97-99 HbA₁ içermektedir (33, 41, 42, 43, 59).

Holmquist ve Schroeder hemoglobin A_{1c}' nin belirlenemeyen bir grubu dışında hemoglobin A' nin bir benzeri olduğunu ve bu grubun bağlanması sodyumbrohidrit ile engellenebildiğini, bu bağın ise muhtemelen bir Schiff bazı olduğunu göstermişlerdir (5, 6).

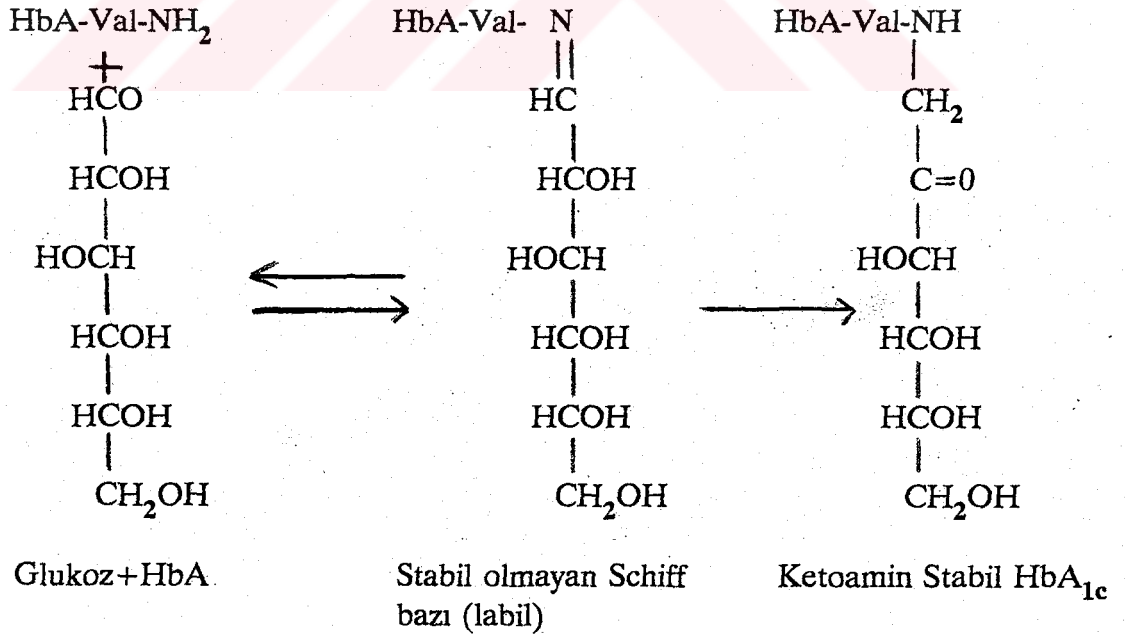
Bookchin ve Gallop hemoglobin A_{1c}' nin her iki β zincirinin NH₂ terminal grubunun bir hegzos molekülüne bağlanmadığını açıklamışlardır. Daha sonraları Bunn ve ark. hemoglobin A_{1c} de beta zincirinin NH₂ terminalindeki Valin kalıntısına bir glikoz molekülünün Schiff bazı şeklinde bağlandığını ortaya çıkarmışlardır (5, 6).

Koenig ve ark. hemoglobin A_{1c}' nin yapısını proton nükleer magnetik rezonans ile incelemişlerdir. Hemoglobin A_{1c}' yi sodyumbrohidrit ile reaksiyona sokarak NH₂

terminal dipeptidin (R-Glikovalil-Histidin) izole edildiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar daha ileri çalışmalarında sorbitol ve Mannitol-Valil-Histidin bileşiklerini elde etmişlerdir. Sonuçta ise zincirin serbest NH_2 grubu bulunan ucundaki maddenin 1-deoksi (N-Valil) Fruktoz olduğunu göstermişlerdir (5, 6).

Enzimatik olmayan glikozillenme depolanmış besin maddelerinde gıda kimyacıları tarafından gözlenmiş bir olaydır (10). Bu olay hemoglobin yapısında iki aşamada oluşmaktadır. İlk aşamada glikoz ile polipeptidin serbest amino grubu arasında enzimatik olmayan hızlı bir reaksiyon olmaktadır. Bu reaksiyonun ilk ürünü labil aldimin bileşiğidir. Reaksiyonun ikinci basamağı ise daha yavaş gelişmekte; sabit, dayanıklı, stabil ve proteine bağlı bir ketoamin bileşiği oluşmaktadır (5, 6, 33, 41, 44).

Protein redükleyici şeker sistemleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, ketoaminin ileride dehidrasyona uğrayıp, amadori reaksiyonu olarak isimlendirilen yeniden düzenleme reaksiyonlarına girmekte olduğu bilinmektedir. Bu reaksiyonlar Browning reaksiyonu olarak adlandırılmıştır. Reaksiyon ürünlerinin *in vivo* olarak oluşup oluşmadığı henüz bilinmemektedir.



tek başına olmadığı ve nonenzimatik glikozilasyonun aslında birçok vücut proteininde olduğu ortaya çıkmıştır. Glikozilasyon glukoz ile proteindeki amino grupları arasında oluşan direkt bir kimyasal reaksiyondan kaynaklanmaktadır (5, 6, 33, 41, 44).

Hemoglobinin glikozillenmesi ve glikoproteinler:

Proteinler amino asitlerin kondenzasyonu ile oluşmuş büyük moleküllerdir. Miktar yönünden organizmanın en büyük organik bileşikleridir. Binlerce protein bileşiği olup, glikoproteinler bu protein bileşikleri arasında Bileşik Proteinler grubunda yer almaktadır (16). Genel olarak proteinlerin biosentezlerinden sonra yapılarında meydana gelen farklılaşmalar bazı değişik türevlerin oluşumuna neden olmaktadır. Proteinlerin bu şekilde türevlerine dönüşebilmeleri daha çok karbonhidratların bağlanması sonucu olmaktadır. Oluşan bu değişiklikler proteinlerin çözünürlük ve stabilitelerinde de değişime neden olmaktadır (6, 16, 41). Bazı proteinler ortamda yüksek düzeyde glukoz bulunması halinde veya fizyolojik olmayan enkübasyon şartlarında enzimatik olmayan bir glikozilasyona uğramaktadırlar. Non-enzimatik glikolizasyon sonucu oluşan glikozile proteinlerin fiziksel ve biyokimyasal özellikleri değişkendir (8, 30, 35, 36, 41). Bu özellikler yapısının büyük bir kısmı protein olan hemoglobin içinde söz konusudur. Normal şartlarda insan eritrositlerinde bulunan hemoglobinin % 5 kadarı kovalent bağlar ile bağlı glikoz moleküllerini taşımaktadır. Bu yapılar normal HbA₁' in posttranslasyonel glikozilasyonu sonucu oluşan glikohemoglobinlerdir (5, 41).

İlk olarak 1961 yılında Schnek ve Schroeder hemoglobin A₁' in minör fraksiyonlarını kolon kromatografi ile ayırmışlardır. Bu minör hemoglobinler major hemoglobine oranla daha negatif yüklüdürler. Bu nedenle insan hemolizati katyon değiştirici resin kromatografisine tabi tutulduğunda minörhemoglobinlerin daha önce ayrıldığı gözlenmektedir. Ayrılan en önemli ve en yüksek düzeyde bulunan glikozile fraksiyonun hemoglobin A_{1c} olduğunu ifade etmişlerdir. HbA_{1a1} minör komponenti total hemoglobinin % 0.2' sini, HbA_{1a2} % 0.2' sini, HbA_{1b} % 0.4' ünü, HbA_{1c} % 3' ünü

oluşturmaktadırlar (5, 37, 59).

Glikozillenmiş hemoglobinlerin labil ve labil olmayan fraksiyonları bulunup; labil fraksiyonlar kan glukoz miktarının ani değişimlerine göre hızlı değişiklik gösterirken labil olmayan fraksiyonlar ise çok yavaş değişmektedir (5, 6, 17, 33, 41).

Diabet kontrolünde glikozillenmiş hemoglobin miktarının tayin edilmesi, bir yandan özellikle deneysel şartlarda ve deney hayvanlarında bir antidiabetik ilaçla tedavinin başarı göstergesi olarak da yararlı olabilmektedir.

Glikozilasyonun hemoglobin fonksiyonlarına etkisi

Hemoglobinin spesifik bir bölgede glikozillendiğinin saptanması hemoglobin türevlerinin yapı-fonksiyon ilişkilerinin açıklanması için iyi bir olanak sağlanmıştır. Daha önce belirtildiği gibi minör hemoglobinlerde beta zincirinin NH_2 terminal grubu, normal hemoglobine göre değişikliğe uğramıştır. Normalde bu bölge organik fosfat bağlarıyla ilişkilidir. Yine bilindiği gibi 2-3 difosfogliserat, eritrosit içinde hemoglobin fonksiyonları için önemli bir düzenleyicidir. İnsan ve memeli eritrositlerinde 2-3 DPG deoksihemoglobine, oksihemoglobine oranla daha kuvvetle bağlanmaktadır. Sonuçta 2-3 DPG artarsa hemoglobinin oksijene affinitesi azalmaktadır. 2-3 DPG' in negatif yüklü grupları hemoglobinin merkezine girdiklerinde 2 beta zinciri üzerindeki pozitif yüklü artıklar ile amino terminal gruplarını içine alan tuz bağlarını oluşturmaktadırlar. Eğer bu bağlanma hegzos, asetil, karbonil gibi herhangi bir grup ile bloke edilmişse 2-3 DPG ile hemoglobin arasındaki reaksiyonda azalma görülmektedir (5, 14, 35, 41, 42, 54).

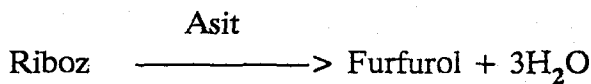
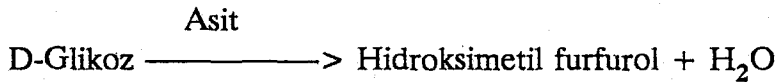
Mc Donald ve arkadaşları hemoglobin A_1 , hemoglobin A_{1a1} , hemoglobin A_{1a2} , hemoglobin A_{1b} ve hemoglobin A_{1c} ' nin oksijen affinite eğrilerini incelediklerinde; HbA_{1a1} ve HbA_{1a2} ' nin düşük bir affinite gösterdiğini bulmuşlardır (42). Ayrıca HbA_{1c} ' de olduğu gibi bu fraksiyonlarında organik fosfatlarla etkileşiminin zayıf olduğu gözlenmiştir. In vitro olarak HbA_{1c} ' nin değişken oksijen saturasyon eğrilerine sahip olduğu ve organik fosfatın allosterik etkilerine karşı azalmış sensitivite

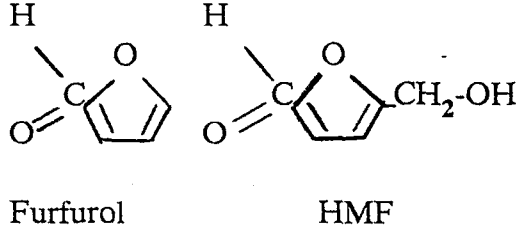
gösterdiği ortaya koyulmuştur. HbA_{1c}' nin primer glikozilasyon yeri olan β zincir terminalindeki valin kalıntısı, aynı zamanda Hb-oksijen affinitesinin fizyolojik regülatörü olan 2-3 DPG' ında bağlanma bölgesidir. Buna karşın in viva olarak Hb' nin diabetik hastalarda yüksek oksijen affinitesine sahip olması, Hb glikozilasyonundan bağımsız gibi görünmektedir. Diabetik ve normal popülasyonlarda tüm vücut oksijen saturasyon eğrileri birbirine eştir. Yani hemoglobin glikozilasyonunun herhangi bir patolojik etkisi olmamaktadır. Diğer taraftan, vücuttaki en uzun ömürlü plazma membran proteini olan alyuvar membran proteinlerinin de nonenzimatik glikozilasyona bağlı olarak anormallikler gösterdiğine dair bir kanıt bulunmamaktadır (35, 41, 42).

Glikozil Hemoglobin Ölçüm Yöntemleri (2,12,16,23,33,34,36,41,45,48,49,53):

1. Kolorimetrik Yöntemler
2. Kolon Kromatografik Yöntemler
3. Agar jel Elektroforezi
4. HPLC
5. Isoelektrik focusing
6. Immunassay
7. Affinity separation
8. Immünotürbidimetrik

Glikozil hemoglobin düzeylerinin **kolorimetrik** olarak tayininde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Fluckiger ve Winterhalter' in geliştirdikleri yöntemde hemoglobine bağlı hegzoslar kuvvetli ısı ve asit etkisi ile furfurol ve türevlerine dönüşmektedir. Bu furfuroler çeşitli organik reaktiflerle renk tepkimesi vermektedirler. Bu yöntemin esası; 2-TBA ile oluşan renkli ürünün absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.





Kolon Kromatografisi iyon değiştirici reğinelerle özellikle Bio-Rex 70 katyon değiştirici kullanıldığı yontemin esasını Trivelli ve ark. nın geliştirdiği yontem oluşturmaktadır. Bu yonteme gore hemoglobin A_{1a} , A_{1b} , A_{1c} , hemoglobin A' dan daha az pozitif yuık taşıdıklarından negatif yuıklu reğine içinde daha kolay elue olmaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar bunlara **fast** (abuk hemoglobinler) adını vermişlerdir. Günümüzde birçok firma tarafından temelini bu yontemin oluşturduğu mini-kolon kitleri üretilmiştir. HbA_1 ölçümünde hızlı, ucuz bir yontem olan kromatografik yontem tampon ve ısı gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir. Isı yükseldikçe iyon değişimi yavaşlamaktadır. Buna engel olmak için kromatografi yapılan ortamın ve kullanılan tamponların 20-22°C arasında sabit olması gerekmektedir.

Elektroforetik yontemde ilke; agar-jel üzerine uygulanan hemolizatta süratli hemoglobin fraksiyonlarının elektroendoosmosis ile ayrılmasıdır.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olan HPLC yontemi üç ayrı bölümden oluşan bir sistem gerektirmektedir. Bu yontemde örnekler kolona uygulandıktan sonra üzerlerinden peristaltik pompa yardımı ile elüsyon tamponu geçirilir. Sonuçlar bir kaydedici yardımıyla grafik haline getirilir. Bu yontem rutin olarak kullanılabilcek bir yontem değildir.

İsoelectrofocusing yontemi; hemoglobin komponentlerinin poliakrilamid jel üzerinde isoelektrik pH' larına göre ayrılması ilkesine dayanmaktadır. Bu yontemde ince tabaka veya disk elektroforezi teknikleri kullanılır. Hemoglobin A_{1a} , A_{1b} , A_{1c} ana hemoglobin fraksiyonundan daha asidik pH' da toplanırlar. Bu yontemin az zaman

gerektirme, küçük miktarda kan örneği ile çalışma ve jel üzerinde hemoglobin F bandı ile karışmama gibi üstünlükleri vardır. Ancak rutin kullanımda özel alet, yetişmiş eleman ve parasal kaynak gerektirdiğinden ülkemiz koşullarında kullanımı güç bir yöntemdir.

Immunoassay yöntemi glikokemoglobinler üzerinde yapılan immünolojik çalışmalar ve HbA_{1c} ölçümü için geliştirilmiştir. Bu yöntem ile insan hemoglobinin yapısında tek bir amino asid değişikliğini bile tanıyan yüksek spesifik antiserumlar hazırlanabilmektedir.

Affinite Kromatografi yöntemi son zamanlarda pek çok araştırmacı tarafından glikohemoglobin ölçümünde uygulanmaktadır. Bu yöntem, boronik asitlerin HbA_{1c} gibi glukozla değişikliğe uğramış cisglikolleriyile etkileşimine dayanmaktadır. Affinite yönteminin orta derecede ısı ve pH dalgalanmalarının sonuçlarda anlamlı değişikliklere neden olmadan tolere edebildiği de saptanmıştır.

Immünotürbidimetrik yöntemde, HbA_{1c} EDTA'lı, heparinli veya kapiller kanda TINIA teknolojisi ile saptanmaktadır. Hemoglobin A_{1c}'ye spesifik olan antikor polyhaptent içeren dekstranın bulunduğu ortamda bir immünkompleks oluşturur. Antikorum polihaptene bağlanması ise agregatları meydana getirir. Bu agregatlar 340 nm de turbiditeyi arttırdıkları için ölçülebilmektedirler. Böylelikle çizilen kalibrasyon kurbu, HbA_{1c} saptanması için tipik bir kompetitiv ölçüm kurbunu göstermektedir. Total hemoglobin ölçümleri yapıldıktan sonra HbA_{1c} içeriği THb' nin %' si olarak hesaplanır. THb ölçümü bir CN gree metod ile yapılır.

FRUKTOZAMİN (3, 8, 9, 19, 30)

Fruktozamin, Diabetes Mellitus' un kısa dönem kontrolünde bir belirteç olup, albumin ve diğer proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu ile oluşmaktadır. Bu proteinlerin glikozilasyonu başlıca lizin aminoasidinin Σ-amino yan zincirinde olmaktadır.

Serum fruktozamin konsantrasyonları, son 2-3 haftada oluşan kan glikoz

değişimlerinin ortalamasını yansıtmakta ve konsantrasyonlar kan glikoz yükselişinin derecesine bağlı olmaktadır. Diabetik hastalarda, fruktozamin düzeyleri daha yüksek olduğundan, nondiabetik kontrol grubuna göre daha iyi tayin edilmektedir. Yine diabetik hastalarda fruktozaminin, açlık glikoz konsantrasyonu ve glikozile hemoglobin düzeyleri ile korele olduğu görülmektedir. Ancak glikozile hemoglobin 2 aylık glisemi düzeyini belirtirken Fruktozamin ölçümleri çok daha kısa süreli glikoz düzeyleri hakkında fikir vermektedir. Çünkü serum albumini 2-3 haftalık bir yarı ömre sahip iken hemoglobin 2 aylık yarı ömre sahip olmaktadır. Proteinlerin daha hızlı turnoveri, daha kısa bir periyodun kontrolünü sağlamakta ve kan glukoz konsantrasyonunun normal düzeylerde devam etmesi için tedavinin daha hızlı düzenlenmesine olanak vermektedir. Kısa yarı ömürlü proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu, Schiff bazı oluşumu ile glikozun amino gruplarına bağlanmasıyla başlamaktadır. Labil Schiff bazı, hızla yeniden yapılanma ile stabil ama kimyasal olarak reversibl bir şeker-protein bileşimi olan Amodori ürününe dönüştürmektedir.

Bazı araştırmacılara göre fruktozamin tayinini etkileyen önemli faktörlerden biri de protein konsantrasyonudur. Örneklerin günün değişik zamanlarda alınmasının, fruktozamin konsantrasyonlarını değiştirebileceği ve protein konsantrasyonundaki düzeltmelerin bu değişimleri azalttığı gösterilmiştir. Fruktozamin konsantrasyonundaki değişimler, serum proteinlerindeki modifikasyonlardan sorumlu bazı klinik durumlarda tanımlanmıştır. Nefrotik sendromlu ve ağır hipoalbuminemi' li hastalarda fruktozamin değerleri önemli ölçüde düşmektedir. Benzer şekilde fruktozamin, hemodilüsyon'a bağlı olarak hamilelikte de düşmektedir. Yine bazı çalışmalarla; hipotiroidizmde serum fruktozamin konsantrasyonlarının yükseldiği bulunmuştur. Bu durum serum albumin turnoverindeki bir azalma ile açıklanmaktadır. Diğer taraftan, hipertiroidizm' de albumin turnover' inin artması ile plazma konsantrasyonunda meydana gelen düşüşün fruktozamin konsantrasyonunda bir düşüş meydana getirdiği kanıtlanmıştır.

Fruktozamin Ölçüm Yöntemleri ve Standardizasyonu(3,26,30,31,39,52,55,57,60,62)

Günümüzde diabetik kontrolün bir göstergesi olarak, serum glikozil proteinlerinin yani fruktozaminin ölçümleri yapılmaktadır.

Johnson fruktozaminlerin bazik çözeltide indirgeyici ajan rolü oynama özelliklerine dayalı basit, hızlı ve ucuz bir kolorimetrik yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde glikozile proteinlerin ketoamin grupları alkali pH' da, NBT (nitrobluetetrazolium)' u indirgemektedir. Bu yöntemin farklı tiplerdeki analiz aygıtlarına kolayca transfer edilebilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Eğer santrifüsel analiz aygıtıyla ölçüm yapılırsa saatte 75 örneğin incelenebildiğini ve miyar giderinin maliyetinin düşük olduğunu öne sürmüşlerdir. Miyarın stabilitesi bozulmayıp, örnekler dondurulmuş olarak 4 ay boyunca saklanabilmektedir. Yalnız bu yöntemi albuminin etkilediğini, klinik olarak fruktozamin değerlerinde yanlışlık olmaması için bir tür albumin düzeltmesi gerekebileceğini vurgulamışlardır.

Yakın zamanda Shima ve ark. Boronat kolonunun kullanıldığı karmaşık bir HPLC işlemi bildirmişlerdir. Nondiabetik bir grup hasta için ortalama % 20.2' lik bir glikozilasyon değeri bulmuşlardır. Bu bulgu klasik mini kolon yöntemlerinde glikozile serum proteinlerinin bağlanmasının yetersiz olduğunu göstermektedir. İnsan serum örneklerindeki proteine bağlı ketoaminler için gerçek değerler sunmamaktadır.

Farklı yöntemlerle fruktozamin ölçümünde farklı değerler elde edildiği için bir standardizasyona gidilme gereği duyulmuştur.

Johnson ve ark. Amadori tepkime ürünlerinin indirgeyici etkinliğine dayalı fruktozamin ölçüm yöntemleri için standart olarak 1-deoksimorfolino fruktozu (DMF) tanıtmışlardır. Bir glikozile segonderamin olan bu düşük kütleli standart aynı zamanda indirgeyici özelliğe sahiptir.

Diğer bir yaklaşımda standardizasyon için Σ -aminofruktozlizin kullanılmıştır. Bu düşük moleküller kütleli sentetik bileşiğin kimyasal yapısının, proteinlerdeki nonenzimatik olarak glikozile olmuş lizinlerin kimyasal yapısıyla aynı olduğu

bildirilmiştir.

SERBEST YAĞ ASİTLERİ ve YAĞ DOKUSU METABOLİZMASI (25,29,40,47,64)

Serbest yağ asitleri (esterleşmemiş yağ asitleri, esterifiye olmamış yağ asitleri) çok önemli bir enerji kaynağıdır. Total plazma lipidinin çok küçük bir fraksiyonunu oluşturup, plazmaya albumin ile kompleks bir şekilde transport olmaktadır.

Yağ dokularında bulunan lipidler, trigliserid şeklindedirler. Bu trigliserid depoları devamlı bir şekilde lipoliz ve esterleşmeye uğramaktadırlar. Lipoliz ve esterleşme olayları besinsel, hormonal ve metabolik faktörlerin etkisi altındadırlar.

Yağ dokusunda acil koA ile α -gliserofosfat birleşerek trigliseridleri meydana getirirler. Bu trigliserid de hormona duyarlı trigliserid lipazının etkisi ile gliserol ve serbest yağ asitlerine (FFA) parçalanmaktadır. Açığa çıkan gliserol, yağ dokularında gliserokinaz aktivitesi düşük olduğu için acil koA ile esterleşmede tekrar kullanılmaz. Eski gliserol plazmaya salınmakta ve aktif gliserokinaz aktivitesine sahip olan karaciğer, böbrek, bağırsak ve süt veren meme bezleri tarafından alınıp kullanılmaktadır. Lipoliz ile açığa çıkan serbest yağ asitleri metabolize olmaktadır. Esterleşme olayı lipolize kıyasla daha az oranda meydana geliyorsa, plazma FFA düzeyi artmakta, yeterli besin alındığında glukoz yağ dokusu tarafından yeterince kullanılıyorsa plazma FFA düzeyi azalmaktadır. Bu temel bilgilere göre açlık, diabet ve yağlı diyet fazla miktarda alındığında plazma FFA' sı artmaktadır.

Plazma şilomikronlarının ve VLDL' nin yapısındaki trigliseridler; kapiller duvarının lipoprotein lipaz bölgesinde bulunan LPL enzimi ile gliserol ve FFA' ya parçalanmaktadır. Plazmaya salınan serbest yağ asitleri ise ekstra hepatik dokularda kullanılmaktadır.

ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER

I- ARAÇ-GEREÇ

- A. Hettich soğutuculu santrifüj
- B. Heidolph manyetik karıştırıcı
- C. Mettler hassas terazi
- D. Gİlson otomatik pipet (20 μ lt, 50 μ lt, 100 μ lt, 1000 μ lt)
- E. Hitachi 704 otoanalizör
- F. LKB II Novaspec spektrofotometre
- G. Kotterman su banyosu
- H. pHM 63 Digital pH metre
- I. Heildolph-Heizbad/51702 kaynatma cihazı

II. KİMYASAL MADDE ve REAKTİFLER

A. Glikohemoglobin ölçümünde kullanılan madde ve reaktifler

1. Kolorimetrik yöntemde:

- a. Orto-fosforik asit (15 mol/L): 43.23 ml o-fosforik asit alınıp, distile su ile 50 ml' ye tamamlanır.
- b. Triklor asetik asit (2.5 mol/L): % 100' lük TCA' dan 40.84 cc alınıp, distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.
- c. 2-Tiobarbitürik asit (60 mmol/L): 0.8649 gr 2-tiobarbitürik asit tartılıp, 100 ml distile suda çözülür.
- d. Sodyum klorür (9 gr/L): 9 gr sodyum klorür bir miktar suda çözüldükten sonra 1000 ml' ye tamamlanır.
- e. Standart (0.050 mmol/L): 0.0063 gr 5-HMF tartılıp, 1 lt % 0.9' luk sodyum klorür içinde çözülür.
- f. Drabkin solüsyonu: 50 mg potasyum siyanür, 200 mg Ferrisiyonür, 1 gr sodyum bikarbonat 1000 ml distile suda eritilir.
- g. Hemoglobin standartı (Gibson ve Harrison' un): 11.61 gr

Krompotasyumsülfat, 13.1 gr Kobaltsülfat anhidraz, 0.69 gr potasyumdikromat tartılıp, 500 ml distile su ile çözülüp hazırlanır.

Kimyasal maddeler Merck ve Sigma' dan temin edilmiştir.

2. Kolon kromatografik yöndemde G-Hb Quick Column 5344 Helena kitinden yararlanılmıştır.

B. Fruktozamin ölçümünde kullanılan madde ve reaktifler:

1. NBT reaktifi (0.25 mmol/L): 0.2044 gr nitrobluetetrazolium tartılıp 100 cc Na_2CO_3 tamponu içinde çözülür.

2. Sodyum karbonat tamponu (0.1 mol/L, pH=10.35, 25°C): 10.8 gr sodyum karbonat 1 lt distile suda çözülür. pH ayarlanmasında 1N HCl kullanılır.

3. Standart (8 mmol/L): 0.19944 gr DMF tartılıp, 100 cc distile suda eritilir.

Kimyasal maddeler Merck ve Sigma' dan temin edilmiştir.

C. Serbest Yağ Asitleri ölçümünde kullanılan madde ve reaktifler:

1. Titrimetrik yöntemde:

a. Ekstraksiyon karışımı: 40 volüm izopropil alkol, 10 volüm heptan, 1 volüm (1N) H_2SO_4 karışımından oluşur. Bu karışım hepsinin ayrı ayrı distile edilmesinden sonra hazırlanır.

b. Titrasyon karışımı: % 0.1' lik Timolblue ve % 90' lık etil alkolden oluşur. 0.1 gr timöblö 100 ml distile suda eritilir. 1 kısım timolblue, 9 kısım etil alkol ile karıştırılır.

c. Titrasyon alkalisi (0.018 N/L): 0.72 gr sodyum hidroksit bir miktar distile suda eritildikten sonra 1 lt' ye tamamlanır. Titrasyon yapılacağı zaman 0.018 N NaOH on kez sulandırılıp kullanılır.

d. Standart (1 mEq/L): 12.8 mg palmitik asit, 50 ml heptanda eritilir.

Kimyasal maddeler Merck, Sigma ve BDH' dan temin edilmiştir.

2. Kolorimetrik Yöntemde:

a. Bakır nitrat (% 6.45 gr): 6.450 bakır nitrat, 100 ml distile suda eritilir.

- b. Ttietanolamin: 14.920 gr trietanolamin, 100 ml distile suda eritilir.
- c. Asetik Asit (1N): 5.9 glesiyal asetik asit, 100 ml' ye distile su ile tamamlanır.
- d. Dietil-ditiyokarbamat (Tiyokarbamat): 20 mg tartılıp, 20 ml segonder bütül alkolde çözülür.
- e. Standart (% 25.6): 25.640 mg palmitik asit tartılıp, 100 ml kloroformda çözülür.

Kimyasal maddeler Merck ve Sigma' dan temin edilmiştir.

III. ÇALIŞMA MATERYELİ

Çalışmamızın ilk bölümünde Glikolize Hemoglobin, Fruktozamin, Serbest Yağ Asitleri ölçüm yöntemlerini kıyaslamak ve Laboratuvarımıza uyarlamak amacıyla laboratuvara başvuran, rastgele seçilen olgular arasından toplam 67 hasta değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dahiliye bölümü Obez polikliniğine başvuran 17-68 yaşları arasında 18' i kadın 1' i erkek obez nondiabetik bireyleri hasta grubu olarak; laboratuvarımıza gelen 22-52 yaşları arasında 8' i kadın 2' si erkek nonobez-nondiabetik bireyler ise kontrol grubu olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Olgulardan, kan örnekleri bir gecelik açlıktan sonra (12-14 saat) alınmıştır. Kan örneklerinden elde edilen serumda glikoz, fruktozamin, FFA (kolorimetrik yöntem ile), kolesterol ve HDL kolesterol, plazmada FFA (Titrimetrik yöntem ile) ve hemolizatta da glikohemoglobin ölçümleri yapılmıştır.

Çalışmaya alınan olguların boy ve kilolarına göre aşağıda bildirilen formül uygulanarak BMI (vücut kitle indeksi)' leri hesaplanmıştır. BMI' i 25' in üzerinde olan olgular obez, altındaki olgular ise nonobez olarak değerlendirmeye alınmıştır.

$$\text{BMI} = W / H^2$$

$$\text{Vücut kitle indeksi} = \text{Ağırlık (kg)} / \text{Boy (m)}^2$$

IV. YÖNTEMLER

A. Serum glukoz değerleri, Glukoz-Oksidaz Kolorimetrik yöntemi kullanılarak otoanalizörde tayin edilmiştir.

B. Glikozile hemoglobin değerleri, kolorimetrik ve kolon kromatografik yöntemler ile tayin edilmiştir.

1. Kolorimetrik yöntem olarak **Hemoglobine Glycosylee A_{1c} Colorimetrik Manual Method** yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, glikozile hemoglobinin β -globin zincirlerinin N-terminal kalıntısına bağlı glikozun, zayıf asidik ortamda kuvvetli ısı etkisi ile 5-HMF formuna dönüşmesi ve bu ürünün 2-TBA ile verdiği rengin optik dansitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde çalışma materyali olarak kullanılacak olan hemolizat, aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır:

EDTA' lı kan örneği 1500 devirde 10 dakika santrifüje edildikten sonra plazma kısmı pipet yardımıyla atılmıştır. Kalan şekilli elemanlardan 1 ml alınarak 4 ml distile suda hemoliz edilmiş ve elde edilen hemolizat buzdolabında (2-8°C) en çok 7 gün olmak üzere saklanmıştır.

Kolorimetrik yöntemin tekniği: Analiz tüpüne 1.5 ml hemolizat, standart tüpüne 1.5 5-HMF çözültisi, kör tüpüne ise 1.5 ml distile su konulduktan sonra her birine 0.25 ml ortofosforik asit ilave edilmiştir. Tüpler kaynar su banyosunda 30 dakika hidrolize bırakılmıştır. Kaynar su banyosunun çıkarılan tüpler çeşme suyunun altında soğutulmuştur. Her tüpe 0.5 ml triklorasetik asit reaktifi ilave edilerek, bu karışımlar 3500 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Her birinin süpernatantından 1' er ml analiz, standart ve kör tüplerine alınarak üzerlerine 0.5 ml 2-tiobarbitürik asit renk reaktifi eklenmiştir. Tüpler 40°C deki su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 443 nm dalga boyunda köre karşı analiz ve standartın absorbansları okunmuştur. Aşağıdaki formüle göre % HbA_{1c} değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{HbA}_{1c} = \frac{\text{O.D.Analiz}}{\text{O.D.Standart}} \times \frac{14}{\text{THb (mmol/L)}}$$

Hesaplama gereklili olan total hemoglobin değerleri, siyanamethemoglobin yöntemiyle hemolizatta llmstr.

2. Kolon Kromatografi yönteminde **Helena G-Hb Quick Column 5344** kitinden yararlanılmıştır. Bu yöntemdeki metod; katyon değiştirici kromatografi metodudur. Kolondaki negatif yüklü reçinede Hb komponentleri tutulurken, HbA₁ süzüntüye geçmekte ve spektrofotometrik okumadan sonra HbA₁' in total fraksiyona oranından % HbA₁ hesaplanmaktadır.

Bu yöntemde çalışma materyeli olarak kullanılacak olan hemolizat, aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır:

EDTA' lı kan örneğinden 50 µlt alınıp 200 µlt hemozilat reagentinde hemoliz edildikten sonra 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. EDTA' lı kan rneği (+4°C) buzdolabında en çok 5 gün saklanmıştır.

Kolon Kromatografi yönteminin tekniği: Her analiz için ayrı ayrı kullanılacak olan kolonların ağızları açılıp, kolonda bulunan süpernatant reine içeriği pastör pipeti yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Kolonlar temiz tüplere oturtulup, alt kapakları açılarak içeriğinin tüplere boşalması sağlanmıştır. Bundan sonra kolonlar başka tüplere alınarak ilerine, hazırlanan hemolizattan 50 µlt pipetlenmiştir. 2 dakika beklemeden sonra kolonların ilerine 4' er ml developer reagenti konmuştur. Kolondan geçirilme işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen süzüntünün optik dansitesi 415 nm' de spektrofotometrede llmstr.

Aşağıdaki formülden yararlanılarak % HbA₁ hesaplanmıştır.

$$\frac{\text{O.D.Analiz}}{\text{O.D.THbx5}} = \% \text{HbA}_1$$

Hesaplama gereklili olan total hemoglobin değerleri řu şekilde tespit edilmiştir:

Tüplere 10' ar cc distile su konulup, üzerlerine 25' er μ lt hemozilat pipetlendikten sonra karıştırılıp, bu karışımların 5-10 dakika içinde optik dansiteleri 415 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

C. Fruktozamin değerleri kolorimetrik yöntem ile tayin edilmiştir. Bu yöntem, alkali ortamda fruktozaminlerin NBT' a karşı indirgeyici bir rol oynama özelliklerine dayanmaktadır. Deney temperaturünde formazan oluşum oranı, glikozillenmiş proteinlerin (fruktozaminlerin) konsantrasyonları ile orantılı olmaktadır.

Bu yöntemde çalışma materyali olarak serum kullanılmıştır.

Kolorimetrik yöntemin tekniği: Analiz tüpüne 100 μ lt serum, standart tüpüne 100 μ lt DMF çözeltisi pipetlendikten sonra her birine 1' er ml NBT çözeltisi konulmuştur. Tüpler, 37°C deki su banyosuna bırakıldıktan sonra 10. ve 15. dakikalarda analiz ve standartın optik dansiteleri spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda distile suya karşı okunmuştur. Sonuçlar, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$[\text{mmol/L}] = \frac{\Delta A_{\text{test}}}{\Delta A_{\text{std}}} \times \text{Std konsantrasyonu}$$

$$\Delta A_{\text{test}} = A_{2\text{test}} - A_{1\text{test}}$$

$$\Delta A_{\text{std}} = A_{2\text{std}} - A_{1\text{std}}$$

D. Serbest Yağ Asitlerinin değerleri Titrimetrik ve Kolorimetrik Yöntemler ile tayin edilmiştir.

1. Titrasyon yöntemi olarak, Dole Metodunun Trout tarafından modifiye edilen yöntemi kullanılmıştır. Yöntem, ekstraksiyon ve titrasyon esasına dayanmaktadır.

Bu yöntemde çalışma materyali olarak 5-6 ml heparinli kan alınıp, santrifüj edildikten sonra ayrılan plazma kullanılmıştır. Analizler bekletilmeden çalışılmıştır.

Yöntemin tekniği:

Çalışmada kapaklı tüpler kullanılıp, analiz tüpüne 1 ml plazma, standart tüpüne 1 ml palmitik asit çözeltisi ve kör tüpüne 1 ml distile su konmuştur. Her birine

5' er ml ekstraksiyon karışımından konulup, kapakları iyice kapatılıp karıştırıldıktan sonra 10 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 3' er ml heptan ve 2' şer ml distile su ilave edilip 2 dakika daha beklenmiştir. Temiz tüplere 3 ml üstte oluşan berrak (heptan) fazdan alınıp, herbirine 1 ml titrasyon karışımı pipetlenmiştir. Titrasyon esnasında karışımdan kılcal pipet yardımıyla N₂ gazı geçirilmiştir. Yeşil-sarı (limon küfü veya yağ yeşili) renk gözleninceye dek titrasyona devam edilip, her analiz için sarfedilen NaOH miktarı saptanmıştır. Aşağıdaki formül yardımı ile sonuçlar hesaplanmıştır.

$$A - B / C - B = \text{mEq/L}$$

A: Analiz için sarfedilen NaOH miktarı (cc)

B: Kör için sarfedilen NaOH miktarı (cc)

C: Standart için sarfedilen NaOH miktarı (cc)

2. Kolorimetrik yöntem olarak Haury' nin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, serumdaki serbest yağ asitlerinin bakır nitrat ile kloroformda çözülebilen bakır tuzları haline çevrilmesi ve kloroform ekstraksiyonundaki bakırın tayin edilmesiyle serumdaki FFA ekivalanlarının saptanması esasına dayanmaktadır.

Bu yöntemin tekniği: Analiz tüpüne 0.2 ml serum, standart tüpüne 2 ml palmitik asit çözeltisi, kör tüpüne ise 3 ml kloroform konulmuştur. Analiz ve standart tüplerine 3' er ml kloroform konulduktan sonra Cu(NO₃)₂ çözeltisinden tüm tüplere 1' er ml pipetlenmiştir (Bakır nitrat çözeltisi taze hazırlanıp, 9 kısım trietanolamin, 1 kısım 1N asetik asit, 10 kısım bakır nitrat şeklinde karıştırılmıştır). Tüplerin kapakları kapatılıp, 2 dakika çalkalandıktan sonra 3-5 dakika santrifüj edilip, üstteki yeşil-mavi kısım atılmıştır. Kalan kloroform fazından 1.5 ml temiz tüplere alınıp, üzerlerine 0.5 ml tiokarbomat solüsyonu konulup karıştırılmıştır. Oda temperaturünde 15 dakika bekletildikten sonra optik dansiteler, 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Renk, bir saat stabil kalabilmektedir. Sonuçlar, $A/Std \times 25.6 = \% \text{ mg}$ formülü ile hesaplanmıştır.

E. Kolesterol ölçümü, Kolesterol-Oksidaz Kolorimetrik yöntemi ile otoanalizörde yapılmıştır.

F. HDL-Kolesterol ölçümü, Kolesterol-Oksidaz kolorimetrik yöntemi ile otoanalizörde yapılmıştır. Yöntem; fosfotungstik asit ve magnezyum iyonlarından oluşan bir çözeltinin eklenmesi ile serumda mevcut şilomikron, VLDL ve LDL'lerin çöktürülmesi ve bunun santrifügasyonunun ardından süpernatantda kalan HDL' nin kolesterol içeriğinin saptanması esasına dayanmaktadır.



BULGULAR

Çalışmamızın ilk bölümünde; Glisemi düzeylerinin uzun süreli izlenmesinde yararlanılan Glikozile hemoglobin ve Fruktozamin ölçüm yöntemlerini laboratuvarımıza uyarlamayı ve diğer yöntemlerle kıyaslamayı amaçladık. Bu nedenle Tablo-1, 2, 3, 4 ve 5' de belirtilen olgularda parametreleri kıyasladık. Ayrıca FFA (serbest yağ asitleri) tayin yöntemlerinden olan kolorimetrik ve titrimetrik yöntemleri karşılaştırdık (Tablo-8).

I. Tablo-1, 2 ve 4' deki toplam 27 olgudaki Glukoz, Fruktozamin ve ayrıca Hidroksi metil furfurol (HMF) ve kolon kromatografi yöntemleri ile ölçülen glikozile hemoglobin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırdık.

a. Açlık glukoz düzeyi ile fruktozamin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.390$, $p<0.05$ olarak bulundu.

b. Açlık glukoz düzeyi ile Hidroksimetilfurfurol yönteminden elde edilen glikozile Hb düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.568$, $p<0.01$ bulundu.

c. Açlık glukoz düzeyi ile kolon kromatografisi yöntemiyle elde edilen glikozile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.518$, $p<0.01$ olarak bulundu.

d. Hidroksimetilfurfurol ve kolon kromatografi yöntemlerinden yararlanılarak tayin edilen glikozile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.620$, $p<0.001$ bulundu.

e. (Hidroksimetilfurfurol yöntemi ile ölçülen) glikozile hemoglobin düzeyleri ile fruktozamin arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.709$, $p<0.001$ bulundu.

f. (Kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen) glikozile hemoglobin düzeyleri ile fruktozamin arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.905$, $p<0.001$ olarak saptandı.

II. Tablo-1, 2 ve 3' deki toplam 27 olgudaki glukoz, fruktozamin ve hidroksimetilfurfurol yöntemi ile ölçülen glikozile hemoglobin düzeyleri arasında ilişkiyi araştırdık.

a. Açlık glukoz düzeyi ile hidroksimetilfurfurol yöntemi kullanılarak ölçülen

glüközile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.696$, $p<0.001$ bulundu.

b. Açlık glukoz düzeyi ile fruktozamin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı ise $r=0.722$, $p<0.001$ olarak saptandı.

c. Fruktozamin ve (HMF yöntemi ile ölçülen) glüközile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.544$, $p<0.01$ bulundu.

III. Tablo-1, 2, 4 ve 5' de toplam 52 olgudaki hidrosimetilfurfurol (HMF) ve kolon kromatografi yöntemleri ile ölçülen glüközile hemoglobin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırdık. Korelasyon katsayısı $r=0.579$, $p<0.001$ bulundu.

IV. Tablo-8' de toplam 15 olguda, serbest yağ asitleri tayin yöntemlerinden olan kolorimetrik ve titrimetrik yöntemler arasındaki ilişkiyi araştırdık. Korelasyon katsayısı olarak; $r=0.803$, $p<0.001$ bulundu. İstatistiksel açıdan bu korelasyon önemli idi.

Tablo-1: Yöntem geliştirmede yararlanılan olgulara ait bulgular:

Vaka No	AKŞ %mgr	%HbA _{1c}		mmol/L Fruktozamin
		Kolon	HMF	
1	71	5.5	6.5	1.41
2	78	6.8	5.8	1.23
3	74	6.4	4.7	1.29
4	92	7.1	4.8	1.98
5	87	6.1	4.9	1.21
MV	80.40	6.380	5.340	1.424
SD	8.85	0.622	0.783	0.320

Tablo-2: Yöntem geliştirmede yararlanılan olgulara ait bulgular:

Vaka No	AKŞ %mgr	%HbA _{1c}		mmol/L Fruktozamin
		Kolon	HMF	
1	214	8.1	10.2	2.98
2	137	8.7	9.7	2.92
3	176	7.4	9.0	2.38
4	235	8.8	8.7	2.10
5	156	7.9	8.9	2.55
6	174	16.0	11.1	4.15
7	151	14.3	10.4	4.15
MV	177.6	10.17	9.714	3.033
SD	35.3	3.47	0.897	0.821

Tablo-3: Yöntem geliştirmede yararlanılan olgulara ait bulgular:

Vaka No	AKŞ % mgr	HMF (% HbA _{1c})	mmol/L Fruktozamin
1	60	4.1	1.688
2	91	4.2	2.075
3	74	3.9	1.980
4	74	4.3	2.232
5	86	4.5	1.461
6	187	4.9	3.710
7	231	7.1	4.180
8	158	4.5	3.710
9	284	9.9	3.94
10	95	5.0	2.86
11	90	6.1	1.61
12	93	6.2	1.94
13	129	7.0	2.02
14	86	5.6	2.55
15	92	4.7	1.98
MV	122.0	5.497	2.530
SD	65.0	1.592	0.917

Tablo-4: Yöntem geliştirmede yararlanılan olgulara ait bulgular

Vaka No	AKŞ % mgr	% HbA _{1c}		mmol/L Fruktozamin
		Kolon	HMF	
1	174	16.0	9.19	4.150
2	151	14.3	9.42	4.150
3	92	7.1	4.82	1.982
4	87	6.1	4.96	1.211
5	71	5.5	6.50	1.410
6	214	8.1	9.20	1.980
7	156	9.0	8.90	2.550
8	137	8.7	9.70	1.920
9	78	6.8	5.80	1.230
10	74	6.4	4.70	1.290
11	121	9.4	5.20	1.980
12	176	7.4	9.00	1.380
13	235	8.8	8.70	2.100
14	384	6.0	7.59	2.350
15	124	8.3	5.29	2.350
MV	151.6	8.527	7.266	2.136
SD	81.7	2.961	1.975	0.925

Tablo-5: Yöntem Geliştirmede yararlanılan olgulara ait bulgular

Vaka No	% HbA _{1c}	
	HMF	Kolon Kr.
1	7.5	6.0
2	6.5	5.5
3	8.7	8.8
4	5.8	6.8
5	11.1	16.0
6	10.4	14.3
7	4.9	6.1
8	4.8	7.1
9	4.7	6.4
10	9.7	8.7
11	7.5	6.0
12	5.2	8.3
13	11.1	16.0
14	10.4	14.3
15	4.8	7.1
16	4.9	6.1
17	6.5	5.5
18	10.2	8.1
19	8.9	9.0
20	9.7	8.7
21	5.8	6.8
22	4.7	6.4
23	5.2	9.4
24	9.0	7.4
25	8.7	8.8
MV	7.483	8.544
SD	2.317	3.182

Tablo-6: Kontrol grubu (nonobez) olgularına ait bulgular

vaka no	adı soy.	Cins	Yaş	Boy	Kilo	kg.m ⁻²	% mgr		TKol/ HDL- Kol	%HbA _{1c}		mmol.L ⁻¹	mEq/L (mmol.L ⁻¹)	
							AKŞ	İsaat kan şek		Ko- lon	HMF		Açlık FFA	tok. FFA
1	AA	K	22	1.68	54	19.14	62	123	4.00	4.3	5.44	2.34	2.055	1.092
2	RD	E	30	1.74	70	23.17	79	95	4.28	4.7	6.19	2.48	1.592	0.740
3	HA	K	30	1.69	62	21.75	85	103	2.76	4.9	6.01	2.61	1.203	0.796
4	NK	K	35	1.63	61	23.01	86	129	2.74	5.1	5.83	2.98	1.333	1.111
5	BS	K	29	1.70	63	21.79	93	133	3.03	4.7	6.29	2.55	1.018	0.500
6	SÖ	K	31	1.66	57	20.72	90	140	3.29	5.9	4.47	2.85	1.759	0.796
7	DA	K	28	1.64	55	20.52	87	125	3.46	6.6	4.91	2.40	1.222	1.092
8	HK	K	44	1.60	54	21.60	60	85	2.15	5.3	5.97	2.92	0.833	0.500
9	ZY	K	52	1.65	61	22.42	98	138	3.39	6.8	5.29	2.61	1.000	0.314
10	SK	E	38	1.65	60	22.05	73	129	2.00	4.9	5.43	2.82	1.314	0.796
		MV	33.90	1.664	59.70	21.617	81.30	120.0	3.110	5.320	5.583	2.6560	1.333	0.7740
		SD	8.70	0.039	4.95	1.219	12.74	18.94	0.731	0.842	0.585	0.2239	0.374	0.2749

Tablo-7: Hasta Grubu (obez) olgularına ait bulgular.

Vaka no	Adı soy.	Cins	Yaş	Boy	Kilo	BMI	AKŞ % mgr	I.h.kan şekeri %mgr	Tkol/HDL-Kol	% HbA _{1c}		mmol/L Fruktozamin	mEq/L	
										Kolon	HMF		Açlık FFA	Tokluk FFA
1	LB	K	55	1.50	86	38.2	96	122	3.382	6.6	4.96	1.7091	1.111	0.740
2	SÇ	K	53	1.65	80	29.4	83	101	2.777	4.9	3.94	2.0663	1.296	0.755
3	ATK	K	65	1.58	140	56.2	109	118	7.781	6.5	4.04	1.3724	1.705	0.625
4	NS	K	35	1.64	75	27.9	90	116	3.621	6.1	3.45	1.9132	0.760	0.440
5	AM	K	47	1.58	90	36.1	76	124	5.675	5.3	3.41	2.0631	1.100	0.740
6	NÖ	E	17	1.76	84	27.1	95	115	3.074	5.8	4.41	2.0153	0.728	0.460
7	HH	K	42	1.50	72	32.0	82	108	2.964	4.4	3.99	1.470	1.28	0.670
8	MÇ	K	44	1.55	85	35.4	98	114	3.935	5.3	4.34	2.09	1.185	0.629
9	NC	K	43	1.55	83	34.58	119	135	4.729	4.6	5.57	1.90	0.888	0.555
10	TÖ	K	35	1.57	100	40.65	114	128	4.968	5.3	5.72	1.45	1.018	0.581
11	MG	K	41	1.53	125	53.4	92	104	4.604	5.9	4.74	1.95	1.561	0.796
12	NH	K	32	1.60	72	28.1	91	131	4.302	5.1	5.61	1.97	0.861	0.662
13	FS	K	58	1.60	87	33.9	95	135	3.808	5.6	4.03	1.87	0.787	0.518
14	RB	K	48	1.70	92	31.8	110	133	5.312	5.6	4.53	1.62	0.833	0.625
15	HT	K	53	1.58	89	35.7	90	98	4.555	6.0	4.95	2.28	0.916	0.433
16	MA	K	53	1.60	85	33.2	82	114	3.288	6.6	5.24	2.30	1.000	0.816
17	HK	K	68	1.55	87	36.25	71	83	4.183	6.3	4.76	1.39	1.944	1.740
18	AT	K	36	1.53	86	36.75	81	103	3.681	6.2	4.98	2.01	1.555	0.950
19	SK	K	23	1.55	105	43.75	91	120	2.538	4.9	4.20	1.951	1.210	0.754
		MV	44.63	1.5853	90.68	36.34	92.89	115.89	4.167	5.639	4.575	1.8627	1.1442	0.7099
		SD	13.23	0.0656	17.00	7.80	12.89	14.42	1.231	0.663	0.686	0.2834	0.3437	0.2859

Tablo-8: Serbest yağ asitleri ölçüm yöntemlerinin karşılaştırıldığı olgulara ait bulgular

Vaka NO	Serbest Yağ Asitleri	
	mEq/L Titrasyon Yöntemi	% mg Kolorimetrik Yöntem
1	7.5	5.5
2	8.5	6.1
3	9.4	9.7
4	8.7	5.5
5	8.3	6.2
6	12.8	7.9
7	18.9	10.4
8	20.8	11.9
9	23.6	14.4
10	20.3	22.7
11	15.2	11.4
12	8.0	7.4
13	19.3	15.4
14	14.2	11.1
15	10.6	8.6

Tablo-9: Açlık kan glukozu korelasyonları.

(Tab.1,2,4) (n=27)	r	p
Fruktozamin	0.390	<0.05
GHb (HMF)	0.568	<0.01
GHb (Kolon)	0.518	<0.01
(Tab.1,2,3) (n=27)	r	p
Fruktozamin	0.722	<0.001
GHb (HMF)	0.696	<0.001

Tablo-10: Fruktozamin korelasyonları.

(Tab.1,2,4) (n=27)	r	p
GHb(HMF)	0.709	<0.001
GHb(Kolon)	0.905	<0.001
(Tab.1,2,3) (n=27)	r	p
GHb(HMF)	0.544	<0.01

Tablo-11: Gliko-Hb ölçüm yöntemlerinin korelasyonları.

(Tab.1,2,4) (n=27)	r	p
HMF	0.620	<0.001
Kolon		
(Tab.1,2,4,5) (n=52)	r	p
HMF	0.579	<0.001
Kolon		

Tablo-12: Serbest yağ asitleri ölçüm yöntemlerinin korelasyonu

(Tab.8) n=15	r	p
Kolorimetrik	0.803	<0.001
Titrimetrik		

Tablo-13: Kolon kromatografi ile ölçülen normal ve abnormal kontrol serumlarına ait değerler

	Normal (n=5)	Abnormal (n=5)
Mean %	7.2	15.5
Range %	5.0-8.0	14.1-17.1

Çalışmamızın ikinci bölümünde de obez, nonobez olgulardaki glukoz intoleransını ve kardiovasküler riski araştırdık. Tablo-6 ve 7' de 19 obez, 10 nonobez olguda; açlık glukozu, 1. saat glukozu, glikozile hemoglobin (HMF ve Kolon kromatografi yöntemleri ile ölçülen), fruktozamin, serbest yağ asitleri (açlıkta ve toklukta) düzeyleri, T.Kol/HDL-Kol oranı, BMI parametrelerini ve her parametrenin birbirleriyle olan korelasyonlarını saptamaya çalıştık.

1. Açlık Kan Glukozu (Tablo-6 ve 7' deki olgularda):

a. Açlık kan glukozu ve OGTT' nin 1. saatindeki değerler: Obez grupta açlıktaki glukoz değerleri % (92.89±12.89) mgr, kontrol grubundaki değerlerden % (81.30±12.74) mg istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunmadı (p>0.05).

OGTT' nin birinci saatindeki glukoz değerleri obez grupta % (115.89±15.24) mg, kontrol grubunda % (120.0±18.94) mg bulundu. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında birinci saat glukoz düzeyleri bakımından anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05).

Obez grubun açlıktaki glukoz değerler ile 1. saatteki glukoz değerlerindeki artış farkı ortalamaları yüzdesi % 23 olarak bulundu.

Kontrol grubunda ise bu artış farkı ortalamaları yüzdesi % 39 olarak hesaplandı.

b. Obez grupta açlık glukoz düzeyi ile glikozile hemoglobin (HMF yöntemi ile ölçülen) düzeyi arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.654$, $p<0.05$ olarak bulundu.

Kontrol grubunda ise korelasyon katsayısı $r=0.794$, $p<0.05$ olarak saptandı.

c. Obez gruptaki açlık kan glukozu düzeyi ile glikozile hemoglobin (Kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen) düzeyi arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.457$, $p<0.05$ olarak saptandı. Kontrol grubunda ise $r=0.632$, $p<0.05$ olarak bulundu.

d. Obez grupta açlık kan glukozu düzeyi ile fruktozamin düzeyi arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.472$, $p<0.05$, kontrol grubunda ise $r=0.650$, $p<0.05$ olarak bulundu.

e. Obez grupta açlık kan glukozu düzeyi ile T.Kol/HDL.Kol oranı arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.427$, $p>0.05$, kontrol grubunda ise $r=0.168$, $p>0.05$ olarak bulundu.

f. Obez grubun açlık kan glukozu ile BMI (vücut kitle indeksi) arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.236$, $p>0.05$, kontrol grubunda ise $r=0.354$, $p>0.05$ bulundu.

Tablo-14: Açlık kan glukozu korelasyonları

	Obez (n=19)		Nonobez (n=10)	
	r	p	r	p
GHb (HMF)	0.654	<0.05	0.794	<0.05
GHb (Kolon)	0.457	<0.05	0.632	<0.05
F.amin	0.472	<0.05	0.650	<0.05
T.Kol/HDL.Kol	0.427	>0.05	0.168	>0.05
BMI	0.236	>0.05	0.354	>0.05

2. Glikozile Hemoglobin (Tablo-6 ve 7' deki olgularda)

a. Obez grupta glikozile hemoglobin düzeyleri (HMF yöntemi ile ölçülen) % (4.575 ± 0.686) kontrol grubundaki glikozile hemoglobin düzeylerinden % (5.583 ± 0.585)

anlamli derecede farkli bulunmadı ($p>0.05$).

b. Obez grupta glikozile hemoglobin düzeyleri (Kolon kromatografi ile ölçülen) % (5.639 ± 0.663), kontrol grubundaki glikozile hemoglobin düzeylerinden % (5.320 ± 0.842) istatistiksel olarak anlamli derecede farkli bulunmadı ($p>0.05$).

c. Obez gruptaki gliko hemoglobin (HMF ve Kolon kromatografi yöntemleri ile ölçülen) düzeylerinin korelasyon katsayısı $r=0.663$, $p<0.001$ olarak bulundu.

d. Obez grupta glikozile hemoglobin (HMF yöntemi ile ölçülen) düzeyleri ile fruktozamin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.456$, $p<0.05$, kontrol grubunda ise bu değer $r=0.655$, $p<0.05$ bulundu.

e. Obez grupta glikozile hemoglobin (HMF yöntemi ile ölçülen) düzeyleri ile serbest yağ asitleri, T.Kol/HDL.Kol oranı ve BMI arasında istatistiksel açıdan anlamli bir ilişki bulunamadı. Bu değerler açısından kontrol grubunda da istatistiksel açıdan anlamli bir ilişki bulunamadı.

Tablo-15: Glikozile Hb (HMF yöntemi ile ölçülen) korelasyonları

	Obez (n=19)		Nonobez (n=10)	
	r	p	r	p
GHb (Kolon)	0.663	<0.001	0.721	<0.01
F.amin	0.456	<0.05	0.655	<0.05
FFA	N.S.		N.S.	
T.Kol/HDL.Kol	N.S.		N.S.	
BMI	N.S.		N.S.	

f. Obez gruptaki glikozile hemoglobin (Kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen) düzeyleri ile Fruktozamin düzeyleri arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.459$, $p<0.05$, kontrol grubunda ise $r=0.652$, $p<0.05$ olarak bulundu.

g. Obez gruptaki glikozile hemoglobin (Kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen) düzeyleri ile serbest yağ asitleri düzeyleri, T.Kol/HDL.Kol oranı ve BMI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamli bir ilişki gözlenmedi.

Tablo-16: Glikozile Hb (Kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen) korelasyonları

	Obez (n=19)		Nonobez (n=10)	
	r	p	r	p
Fruktozamin	0.459	<0.05	0.652	<0.05
FFA	N.S.		N.S.	
T.Kol/HDL.Kol	N.S.		N.S.	
BMI	N.S.		N.S.	

3. Fruktozamin (Tablo-6 ve 7' deki olgularda)

a. Obez grubun fruktozamin değerleri (1.8627 ± 0.2834) mmol.L^{-1} , kontrol grubundaki değerlerden (2.6560 ± 0.2239) mmol.L^{-1} anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.01$).

b. Obez grubun fruktozamin değerleri ile serbest yağ asitleri düzeyi, T.Kol/HDL.Kol oranı ve BMI değerleri arasında istatistiksel olarak negatif bir ilişki saptandı. Kontrol grubunda ise fruktozamin değerleri ile serbest yağ asitleri düzeyi TKol/HDL.Kol oranı arasında negatif bir ilişki gözlenirken, BMI değerleri arasında istatistiksel olarak pozitif ilişki saptandı ($r = 0.437$, $p > 0.05$). Ancak bu pozitiflik istatistiksel açıdan yeterli düzeyde bulunamadı.

4. Serbest Yağ Asitleri (Tablo-6 ve 7' deki olgularda)

a. Obez hastalarda açlıktaki FFA değerleri (1.1442 ± 0.3437) mmol.L^{-1} , kontrol grubundaki değerlerden (1.333 ± 0.374) mmol.L^{-1} istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmadı ($p > 0.05$).

b. Obez grubun OGTT' nin birinci saatindeki FFA değerleri (0.7099 ± 0.3743) mmol.L^{-1} ile kontrol grubunun değerleri (0.7740 ± 0.2749) mmol.L^{-1} arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

c. Açlıktaki FFA değerleri ile toklukta FFA değerleri arasında; obez hastalarda ($r = 0.545$, $p < 0.05$) ve kontrol grubunda ($r = 0.614$, $p < 0.05$) pozitif korelasyon gözlemlendi. Her iki grupta da açlıktaki FFA değerleri, toklukta FFA değerlerinden

anlamli derecede yuksek bulundu ($p < 0.05$).

d. Obezlerde aclik glukozu ve aclik FFA degerleri ile OGTT' nin 1. saatindeki glukoz ve FFA degerleri arasinda negatif bir iliski saptandi ($r = -0.356$, $r = -0.197$).

Kontrol grubunda da bu degerler acısından istatistiksel olarak negatif iliski gozlendi ($r = -0.242$, $r = -0.095$).

e. Obez grupta serbest yağ asitleri degerleri ile TKol/HDL.Kol oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı iliski saptanmadı ($r = 0.221$ $p > 0.05$). Kontrol grubunda ise bu deger $r = 0.593$, $p > 0.05$ bulundu.

f. Obez grupta FFA degerleri ile BMI degerleri arasındaki iliski istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r = 0.607$ $p < 0.01$). Kontrol grubunda ise anlamlı bir iliski saptanamadı.

Tablo-17: FFA Korelasyonları.

Obez (n=19)		nonobez (n=10)	
	r	p	
TKol/HDL.Kol	N.S.		0.593
BMI	0.607	<0.01	NS

5. T.Kol/HDL.Kol (Tablo-6 ve 7' deki olgularda):

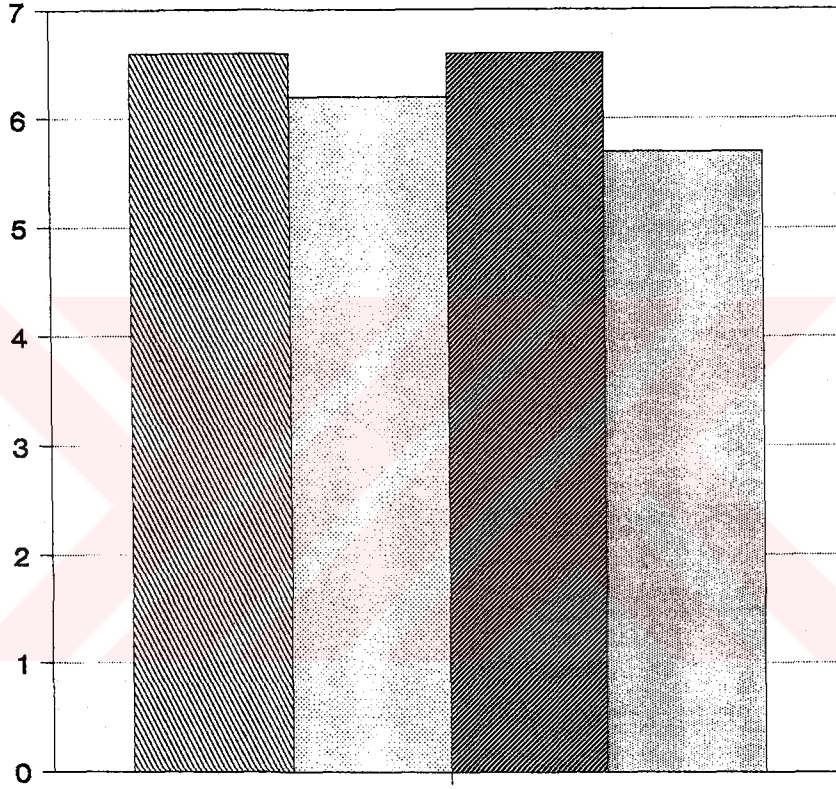
a. Obez grupta T.Kol/HDL.Kol degerleri (4.167 ± 1.231), kontrol grubundaki degerlerden (3.110 ± 0.731) anlamlı derecede yuksek bulundu ($p < 0.05$).

b. Obez grupta TKol/HDL.Kol oranı ile BMI degerleri arasındaki korelasyon önemli bulundu ($r = 0.546$, $p < 0.001$). Kontrol grubunda ise anlamlı bir iliski saptanmadı.

Tablo-18: TKol/HDL.Kol Korelasyon

	Obez (n=19)		nonobez (n=10)	
	r	p	r	p
BMI	0.546	<0.01	NS	

Grafik-1: Obez ve nonobez çalışma gruplarında ölçülen glikohemoglobin değerleri



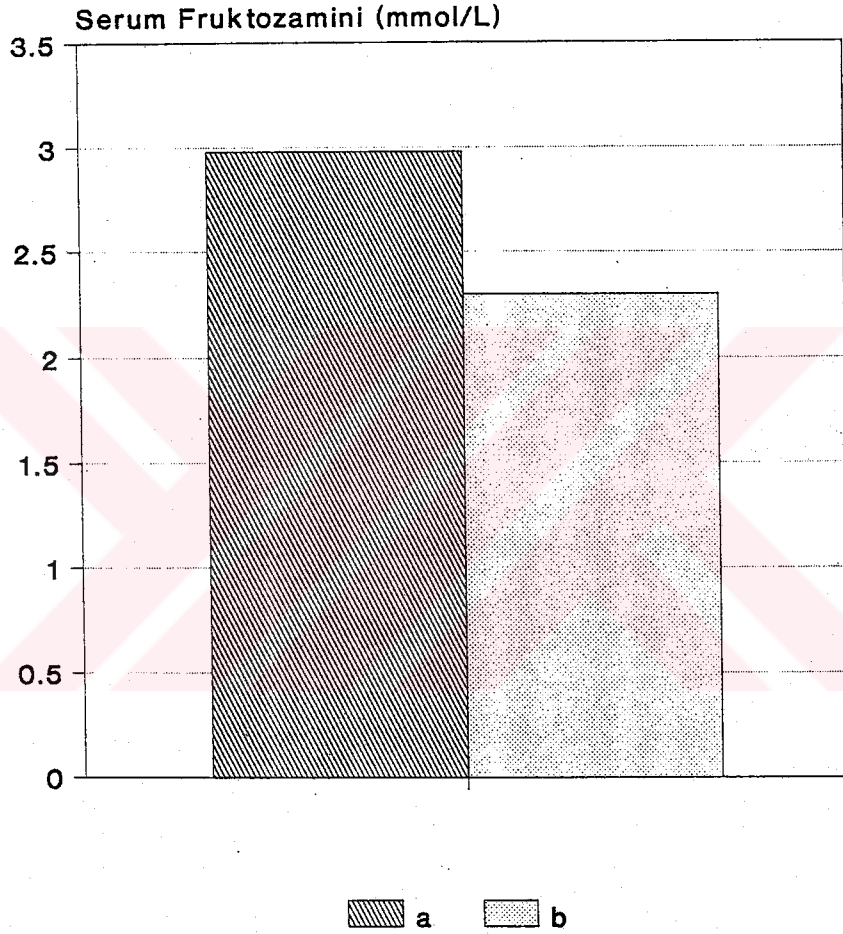
▨ a □ b ▨ c □ d

a. Nonobez kontrol grubu olgularında Kolon Kromatografi yöntemiyle ölçülen Gliko-hemoglobin değerleri

b. Nonobez kontrol grubu olgularında HMF yöntemiyle ölçülen Gliko-Hmoglobin değerleri

c. Obez hasta grubunda Kolon Kromatografi yöntemi ile ölçülen Gliko-Hemoglobin değerleri

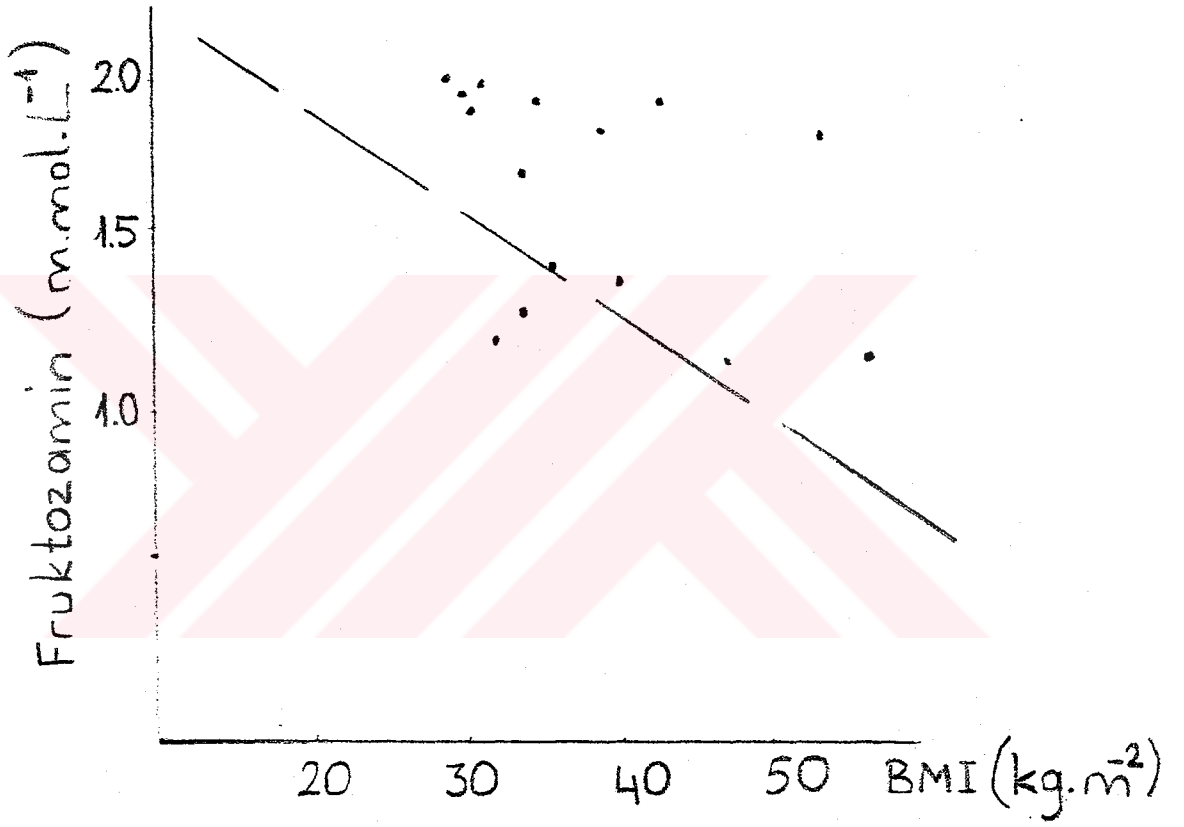
d. Obez hasta grubunda HMF yöntemi ile ölçülen Gliko-Hemoglobin değerleri

Grafik-2: Obez ve nonobez çalışma gruplarında serum fruktozamin değerleri

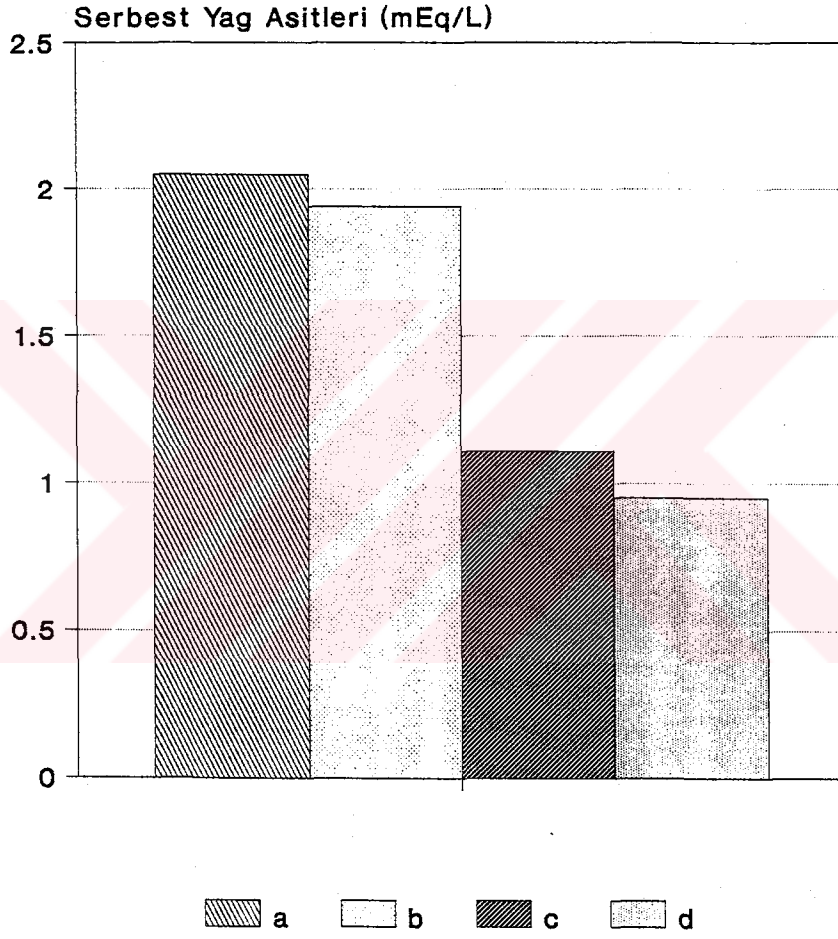
a. Nonobez kontrol grubu

b. Obez kontrol grubu

Grafik-3: Obez grupta BMI ile serum fruktozamin konsantrasyonu arasındaki ilişki

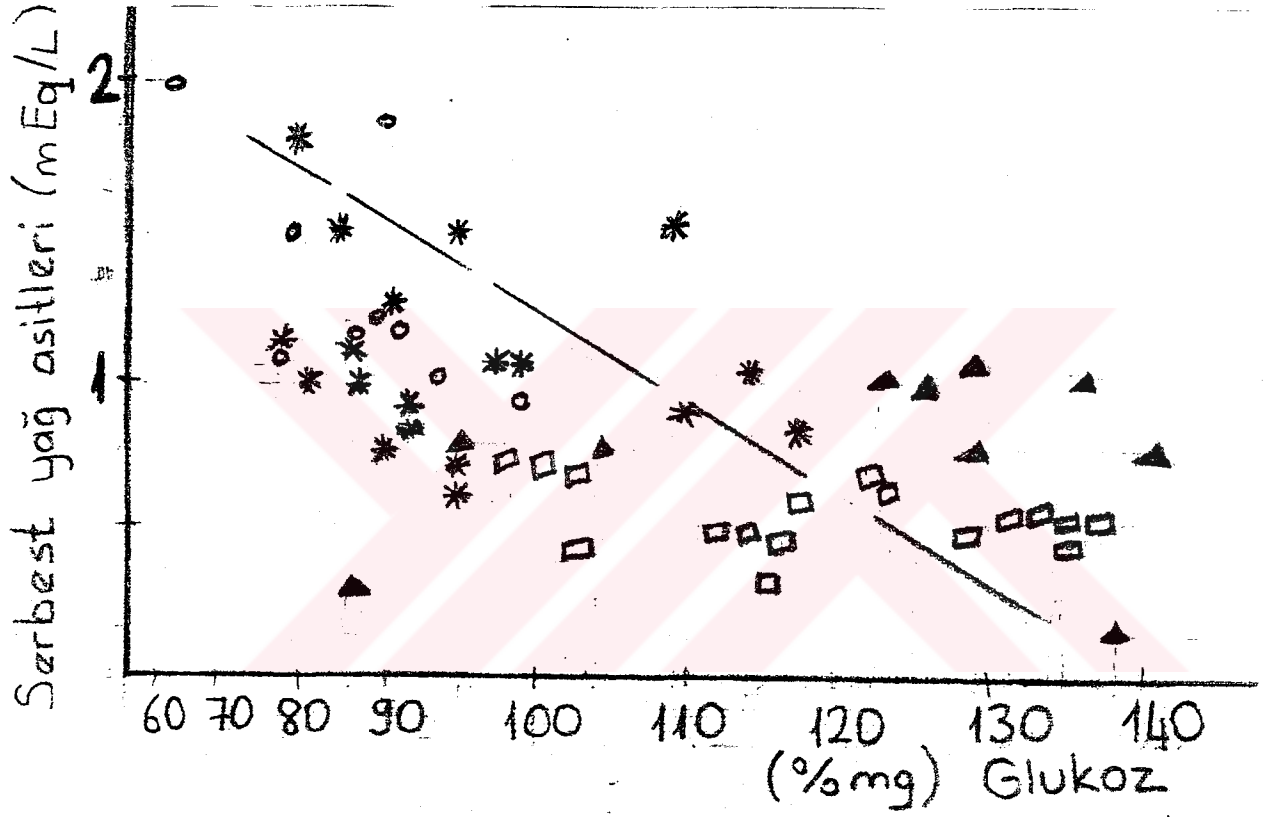


Grafik-4: Obez ve nonobez çalışma gruplarında açlık ve tokluktaki serbest yağ asitleri değerleri



- a. Nonobez kontrol grubu (açlık)
- b. Obez hasta grubu (açlık)
- c. Nonobez kontrol grubu (tokluk)
- d. Obez hasta grubu (tokluk)

Grafik-5: Obez ve nonobez çalışma gruplarında glukozu karşı serbest yağ asitlerinin yanıtı



- Nonobez olgularda açlık kan glukozu ile açlık serbest yağ asitleri
- ▲ Nonobez olgularda tokluk kan glukozu ile tokluk serbest yağ asitleri
- * Obez olgularda açlık kan glukozu ile açlık serbest yağ asitleri
- Obez olgularda tokluk kan glukozu ile tokluk serbest yağ asitleri

TARTIŞMA ve SONUÇ

I.YÖNTEM TARTIŞMASI

Günümüze dek, hemoglobinin nonenzimatik glikozilasyonu sonucu oluşan glikozile hemoglobin düzeyleri, klinisyenler tarafından diabetiklerin metabolik kontrolünde gerçek bir biyolojik gösterge olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu sonucu oluşan fruktozamin (glikozile protein) düzey ölçümleri de bu alanda klinik önem kazanmıştır.

Yakın zamanda obezlerin diabete yatkınlığı göz önüne alınarak, obezite de glikozile hemoglobin ve fruktozamin ölçümlerinin klinik öneminin olup olmadığı araştırılmaya başlanmıştır.

Daha önceleri metabolik olarak inert olduğu düşünülen adipoz dokunun günümüzde vücuttaki en aktif dokulardan birisi olduğu ve insülin aktivitesi ile karbonhidrat-lipid etkileşiminin burada gerçekleştiği anlaşılmıştır. Adipoz doku kitlesinin fazlalığında yani obezite de glukoz intoleransı olduğu, glukozun serbest yağ asitlerine yanıtının değiştiği dikkati çekmiştir.

Çalışmamızda bu bilgiler ışığında obez nondiabetik ve nonobez-nondiabetik olgularda glukoz tolerans testleri, glikozile hemoglobin, fruktozamin, serbest yağ asitleri yanı sıra TKol/HDL-Kol oranları da araştırılmıştır. Glikozile hemoglobin ve serbest yağ asitleri ölçümlerinde farklı yöntemler kullanılarak birbirleriyle kıyaslama yapılmıştır.

Birçok klinisyen tarafından analizi istenen glikozile hemoglobin düzeylerini ölçmek amacıyla yapılan çalışmalarda değişik yöntemler kullanılmıştır.

Mortensen ve ark. isoelektrik fucosing yöntemi ile labil glikozile fraksiyonun anoda yakın olarak zayıf bir band halinde hemoglobin A_{1c} bandına doğru uzandığını bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı HbA_{1c}'nin hatalı kantitasyonuna yol açabilecek bu labil fraksiyonun eritrositlerin serum fizyolojik ile bir süre

inkübasyonundan sonra elimine edilebileceğini göstermişlerdir (44).

Yüksek basınçlı likid kromatografi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda eğer hemolizatta HbF, HbS veya diğer değişik hemoglobinler var ise HbA_{1c} fraksiyonunun tam olarak ayırlamadığı ve dolayısıyla sonuçların doğru değerlendirilemediği bildirilmiştir (23). Bu nedenle gebelik esnasında gözlenen yüksek HbA_{1c} düzeyleri, kromatografik ayırma HbF' nin HbA_{1c} ile birlikte hatalı değerlendirilmesine neden olabilir (23).

Mary Ellen King yayınladığı çalışmada glikozile hemoglobinin ölçüm metodlarını ve her bir metod ile ölçülebilen glikohemoglobin tiplerini bildirmiştir (33). Kolorimetrik mini kolon metoduyla affinite kromatografisi uygulandığında ayrılan hemoglobin komponentinin, A₁ + Non-A₁ glikohemoglobin olduğunu gözlemiştir. Elektroforez metoduyla yük ayırımlarına göre ve minikolon metoduyla ion-değişim kromatografisi yapıldığında ayrılan komponentin A₁ + Labil A₁ olduğunu bildirmiştir. Yüksek performanslı likid kromatografisi metoduyla iyon değişim kromatografisi yapıldığında ise ayrılan glikohemoglobin komponentinin A_{1c} + Labil A_{1c} olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca bu yöntemlerin referans dağılımlarının farklı olduğunu belirtmiştir (33).

Birçok araştırmacı metodolojiler arasındaki farklılıklar nedeniyle referans dağılımlarının farklı olduğunu ve bunun standardizasyon işlemleri yapılarak giderilebileceğini öne sürmüşlerdir (33, 55).

Son zamanlarda hem glikozile Hb hem de plazma proteinlerinin ölçümünde affinite kromatografisi uygulanmaktadır (19). Affinite kromatografi yöntemi boronik asidin HbA_{1c} gibi glukozla değişime uğramış cis-glikollerle etkileşimine dayanmaktadır. Bu tekniğin sensitiv, kesin, pH ve ısı değişikliklerine dirençli hayvan türleriyle yapılan çalışmalara kolayca uygulanabilecek özellikte olduğu öne sürülmüştür (19). Hayvanlardaki hemoglobin heterojenliğinin insanunkine benzemesinden dolayı bu yöntem, hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalara rahatlıkla uygulanabilmiştir.

B.J.Gould ve ark. diabetli ve istenmeyen hipoglisemili hayvan modellerinde glikozile hemoglobin ve glikozile plazma proteinleri, affinite kromatografisi yöntemiyle ölçmüşlerdir. Glikozile hemoglobinleri yüksek bulmuşlardır (19).

Somani ve ark. affinite kromatografisinin NBT' un ve başka bir çalışmada da TBA' in kullanıldığı kolorimetrik yöntemler ile iyi korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (60).

Dennis C. Klenk ve ark. affinite kromatografisini; TBA' in kullanıldığı kolorimetrik, iyon-değiş tokuş kromatografisi, HPLC yöntemleriyle kıyaslamışlardır. Affinite kromatografi yönteminin hızlı, basit, kesin ve sensitiv olmasıyla günümüzde kullanılan birçok yonteme alternatif oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (36).

Son aylarda Cully M. ve ark. HbA_{1c}' yi İmmünotürbidimetrik yöntem ile saptanmışlardır. Bu metodun kullanım için oldukça uygun olduğunu savunmaktadırlar. Örnek (EDTA' lı, heparinli veya kapiller kan) yeni bir hemoliz reagenti ile hemoliz edilir. Bir klinik otoanalizöre yerleştirilir. Hb ve HbA_{1c} ölçümü 10 dakika içinde % HbA₁ olarak yazdırılır. Yüksek antikör spesifikliğı ile diğer glikozillenmiş Hb' ler ve interferans yapan (HbF, Karbomoillenmiş ve asetillenmiş Hb' ler) maddelerin interferansını önleyerek HbA_{1c} içeriğinin doğru olarak saptadığını ileri sürmüşlerdir (12, 49).

İmmünotürbidimetrik yöntem bu ölçüm için çok yeni tanımlandığından bu yöntem ile birçok laboratuvar çalışmalarının yapılıp, günümüze kadar kullanılan diğer yöntemlerle korelasyonun incelenmesinin yerinde olacağı kanısındayız.

Birçok araştırmacı glikozile hemoglobin ölçümünde pekçok engel nedeniyle bu hedefe ulaşmanın güçlükleri olduğunu öne sürmüşler ve bunları şöyle sıralamışlardır (26, 36).

1. Labil fraksiyona bağlı olası bozukluklar ve bazı yöntemlerin ısı ve pH' ya aşırı duyarlılıkları büyük hatalara yol açabilir.
2. Herkesin kullanabileceğı kabul edilebilir standartların bulunmaması,

laboratuvarlar arasında veya aynı laboratuvarlarda sonuçların kıyaslanmasını, yeni yöntemlerin değerlendirilmesini güçleştirmektedir.

3. Bu analiz için tanımlanmış çok sayıdaki teknikler, glikozile hemoglobinlerin aynı grubunu ölçmemekte ve olası etkileşimlerinden aynı derecede etkilenmemektedir.

Bu bilgiler göz önüne alınarak çalışmamızda glikozil hemoglobin düzeylerinin ölçülmesinde iki ayrı yöntem kullanıldı. Ekonomik olması nedeniyle TBA' in kullanıldığı kolorimetrik yöntem az zaman alıcı ve uygulamasının kolaylığı bakımından da kolon kromatografisi yöntemleri kullanıldı. Kolon metodunda **Helena-Gliko Hb Quick Column 5344** kitinden yararlanıldı.

Daha önce yapılan çalışmalar da glikozil Hb ölçümlerinde interferans yapan bazı maddelerin olduğu öne sürülmüştür. HbF, Salisilat, Karbonat, Galaktoz ve lipemi yanlış pozitif değerlere, eritrosit turnoverindeki bir artış, HbS ve HbC' nin yanlış negatif değere yol açtığı bildirilmiştir (33).

Bizim çalışmamızda da interferans yapan maddeler göz önünde bulundurularak çalışıldı. Elde ettiğimiz sonuçların, daha önce bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü.

Fluckiger ve Winterhalter tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemin (17) modifiye edilmiş şekli olan bizim yöntemimizde asid hidroliz basamağında 100°C' de 30 dakikalık bir inkübasyon işlemi uygulandı. Standefer ve ark. nin yaptıkları bir çalışmada asit ile hidroliz basamağı 100°C' de beş saat gibi uzun bir süre almaktadır (62). TBA reaksiyon basamağı ve diğer işlemler düşünüldüğünde bu yöntemin altı saatten fazla zaman alacağı ortadadır. Subramaniam ve ark. nin kullandıkları yöntemde asid hidroliz basamağı 100°C' de 16 saat gibi çok uzun bir zaman gerektirmektedir (61). Saibene ve ark. hidroliz işlemini 100°C' de 60 dakika (53), Nayak ve ark. 100°C' de 4 saat gibi bir süre içerisinde tamamlamışlardır (45). Ancak hidroliz süresinin bu derece uzun tutulması kuvvetli bir hidrolize ve dolayısıyla hidroliz aşamasında oluşan 5-HMF yıkımını arttıracığından biz çalışmamızda hidroliz

aşamasının daha kısa tutulduğu Fluckiger ve Winterhalter' in modifiye kolorimetrik yöntemini tercih ettik.

Araştırma konumuz öncelikle yöntem geliştirme ve bu yöntemi rutin klinik çalışmalar da kullanma amacını güttüğünden hasta grubunu seçerken bireylerin klinik ayrıntıları fazla göz önünde bulundurulmadı. Ancak son yıllarda obezite konusunun önem kazanması dikkatimizi çektiği için çalışmamızın ikinci bölümünde obez-nondiabetik ve nonobez-nondiabetik olgular seçildi.

Tiobarbitürik asitin (TBA) kullanıldığı kolorimetrik yöntem ile olguların glikozile hemoglobin düzeyleri ölçüldükten sonra kolon kromatografi yöntemi ile karşılaştırıldı. Kolon kromatografi yöntemi tampon solüsyonun iyonik gücünde ve pH' ında ortam ısısında olabilecek küçük değişimlerden, interferans yapan maddelerden çok etkilendiği için bu etkenler göz önünde bulundurulurken çalışıldı.

Kolon kromatografi yönteminin işlerliği ise normal, abnormal kontrol serumları çalışılarak kontrol edildi. Kontrol serumlarının her ikisinden beşer örnek hazırlanıp, kromatografi yapıldı. Bulduğumuz değerlerin literatürdeki değerler ile uyumlu olduğu gözlemlendi (66). Rena R. Wing ve arkadaşları kolon kromatografi yöntemi ile glikozile hemoglobinlerin düşük, orta, yüksek kontrol serumlarını 22°C' de çalışmışlar ve sonuçları uyumlu bulmuşlardır (66).

Çalışmamızda glikozile hemoglobin ölçümleri için kullandığımız iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında aralarında iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Tablo-11, 15). Kolon kromatografi yönteminin kolorimetrik yöntemle göre daha kolay uygulanabilir olduğu ve daha kısa sürede sonuçlandığı dikkatimizi çekmiştir. Ancak klinik rutin çalışmalar için ekonomik olmadığı gerçeği gözlenmiştir. Elimizdeki kaynaklarda bu kromatografik yönteminin kullanımının yaygın olması yanı sıra rutin kullanımlar için pahalı bir test olduğu belirtilmektedir. Buna karşın TBA' nın kullanıldığı kolorimetrik yöntem çok daha ucuz olması ve ayrıca kolon kromatografi yöntemi ile iyi bir korelasyon göstermesi nedeniyle rutin laboratuvar çalışmalarda tercih

edilmiştir. Ayrıca günümüzde hemen hemen bütün klinik rutin çalışmalar otomatik cihazlar ile yapılmaktadır. Yapılan araştırmalarda kullanılan yöntemlerin otomatik analize uygulanabilir olması gerektiği dikkati çekmiştir. Yakın zamanda Somani ve ark. HbA_1' i ölçmek için asetonla Hem'i ayrıştırıp bu yöntemi otomatik analize uygulayabilmeyi tasarlamışlardır (26, 60). R.P. Hill bu yöntemi modifiye ederek, glikozile hemoglobin ile NBT arasındaki tepkimeyi incelemiştir. Otomatik analiz aygıtı için optimum hale getirilmiş ve yeniden formüle edilmiş bir miyar tanımlanmıştır (26).

Kaynak incelemelerimizde glikozile hemoglobin ölçümü için birçok yöntem ve bu yöntemlerin avantajlarından bahsedildiği gözlenmiştir. Ancak kolorimetrik yöntem dışında otomatik analize uyarlanabilir yöntemlere rastlanmamıştır. Böylece kolorimetrik yöntemin bir üstünlüğünün de otomatik analize uyarlanabilir olduğudur. Bu nedenle kalorimetrik yöntemin kullanıldığı daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

FRUKTOZAMİN:

Dolaşımdaki glikozile hemoglobin (HbA_{1c}) düzeylerinin ölçümü, stabil glisemiye değerlendirmek için objektif bir test olup, diyabetin erken tanısında yararlı olmaktadır.

Son zamanlarda kısa süreli glisemi kontrolde kullanışlı, sağaltımdaki ani değişikliklere duyarlı bir parametre ve bunun ölçümü içinde ucuz, az zaman alan, basit bir kolorimetrik yöntem tanımlanmıştır. Johnson tarafından tanımlanan bu yöntem, serum glikozil proteinlerinin ölçüldüğü Fruktozamin testidir (8). Fruktozamin değerleri postprandial glisemiden çok az etkilenip, temel olarak bazal veya açlık konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Diyabetik kontroldeki sapmaları belirlemede yüksek duyarlılığa ve 2-3 haftalık bir yarı ömre sahip olması fruktozamine çok önemli klinik özellikler katmaktadır (3, 8, 30).

Elimizdeki kaynaklara göre Fruktozaminin ölçüldüğü çalışmaların pek çoğunda standart madde olarak DMF' un, renk reaktifi olarak da NBT' un kullanıldığı kolorimetrik yöntem uygulanmıştır. Ayrıca bir çok araştırmacı bu yöntemi otomatik

analiz cihazlarına uyarlıyabilmek için çalışmalar yapmışlardır. Bizim çalışmamızda da aynı kolorimetrik yöntem kullanıldı ve klinik rutin çalışmalar için laboratuvarımıza uyarlanmaya çalışıldı. Çalışmamızın ilk bölümünde bu amacı güttüğümüzden hasta grubunu seçerken bireylerin klinik ayrıntıları üzerinde durulmadı. Ancak çalışmamızın diğer bölümünde obez nondiabetik olgular hasta grubu, nonobez nondiabetik olgularda kontrol grubu olarak seçildi.

Johnson ve ark. ilk deneylerini oda sıcaklığında ve alkali pH' da gerçekleştirip, DMF' un bazı tetrazolizm tuzlarını indirgeme yeteneğinin de olduğunu gözlemişlerdir (30). Test ettikleri maddeler arasında DMF' nin en çok NBT' a karşı reaktif olduğunu vurgulanmıştır. Bu indirgeme olayını ise pH, sıcaklık ve NBT konsantrasyonuna bağlamışlardır. 30°C ve pH 10 veya aşağısında hemen hemen hiç bir tepkime olmadığını, pH 11-13 aralığının üzerinde aktivitede büyük bir artış olduğunu gözlemişlerdir. Sıcaklık ve NBT konsantrasyonu arttığında tepkimenin şiddetli gerçekleştiğini izlemişlerdir. Bu araştırmacılar albuminin yüksek konsantrasyonda her bakımdan DMF' a benzer biçimde reaksiyon gösterdiğini, sadece pH 13' de tepkimenin bifazik olarak gerçekleştiğini saptamışlardır. DMF' da görülmeyen erken bir hızlı fazın ardından uzamış ikinci bir faz geldiğini, bu fazın 30 dakika sonunda hala tamamlanmadığını gözlemişlerdir. Ortama p-kloromerküribenzoat ve N-etilmaleimidin eklendiğinde bu fazın bozulduğunu gözledikten sonra hızlı fazın proteinin -SH gruplarından ileri geldiğini düşünmüşlerdir. Yavaş fazda belirli bir sonlanma noktasının bulunmamasının karektetistik bir özellik olduğunu söylemişlerdir (30). Glukozun pH 11' in üzerinde NBT' da anlamlı bir indirgemeye neden olduğunu, pH 10.5-11.0 arasında bu etkinin ortadan kalktığını gözlemişlerdir (30).

Johnson ve ark. NBT kullanılarak serum fruktozaminini ölçerken, 5 ve 20 dakikalar arasında birbirini izleyen 5 dakikalık süreler içinde 530 nm deki emilim değişimlerini izlemişlerdir. NBT indirgememesinin DMF konsantrasyonu ile doğrusallık gösterdiğini gözlenmişlerdir. Bu doğrusallığın 8 mmol DMF/L' ye kadar korunduğunu

izlemişlerdir. 5 ve 10. dakikalarda elde edilen değerler 10 ve 15. dakikalardakinden anlamlı biçimde daha yüksek ölçülmüş ve 15-20 dk. da daha büyük değişimler olmamıştır. Başlangıçtaki yüksek değerlerin özgül olmayan indirgeyicilerden kaynaklandığı kabul edilip, fruktozamin ölçümünü 37°C' de en azından 10 dakika geçinceye kadar ertelemişlerdir (30).

Bizim çalışmamızda standart madde olarak kullanılan DMF konsantrasyonu 8 mmol/L idi. 10 ve 15. dakikalarda 530 nm dalga boyunda optik dansiteler kaydedildi. 15. dakikadaki ölçümler 10. dakikadaki değerlerden anlamlı derecede yüksek bulundu. Inkübasyon 37°C' de su banyosunda gerçekleştirildi. Bazı araştırmacılar serum fruktozamin konsantrasyonunun protein konsantrasyonundan etkilendiğini öne sürerek sonuçlarda albumin veya serum protein konsantrasyonu için bir düzeltme yapılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar serum albumin konsantrasyonunun % 3 gr' ın altına düştüğü durumlarda fruktozamin değerlerinin beklenenden daha düşük olduğunu gözlemişlerdir. Bu nedenle serum fruktozamin konsantrasyonunun serum protein konsantrasyonundan etkilendiğini öne sürerek sonuçlarda serum protein ve albumin değerlerine göre bir düzeltme yapılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (30, 31, 38).

Bazı araştırmacılar da böyle bir düzeltme yapıldığında normal ve diabetik serumlar arasındaki ayrımın daha belirsiz hale geldiğini görmüşlerdir (30). Buna dayanarak fruktozamin sonuçlarımızda albumin veya protein konsantrasyonu için bir düzeltme yapılmamıştır. Ancak, hemoliz, ürik asit, lipemi, bilirubin, hipertrigliserideminin interferans yaparak fruktozamin konsantrasyonunu etkilemekte olduğu; özellikle yöntemin otoanalizöre uyarlanması durumunda ürikaz kullanılarak interferansın önlenebileceği bildirilmiştir (8, 52, 57). Davit Lloyd ve ark. albumin konsantrasyonu 35-53 gr/L olduğunda interferans yapmadığını saptamışlardır (39). Bazı literatürlere göre fruktozamin ölçümünün yapılacağı serum örnekleri 7 gün +4°C' de (31), 45 gün -20°C' de (38), 4 ay -20°C' de (39) saklanabilmektedir.

Literatürlerin böyle bildirmesine rağmen bizim çalışmamızda serum örnekleri aynı gün çalışıldı.

Mainwaring Burton ve ark. glikozile proteinlerin ölçümü için kullanılan kolorimetrik yöntemde standart olarak DMF' un kullanıldığı ancak bu materyelin eldesinin zor olduğunu bu nedenle alternatif olarak DMF yerine glikozile polizinin kullanılabilceğini önermişlerdir (38).

Erwin D. Schleicher ve ark. (C^{14}) glukozla in vitro glikozillenmiş albumin ve polilizin örneklerini kullanıp ikinci bir serum protein standardı elde etmişlerdir. Standart madde olarak Σ -amino fruktozlinin' i ve diğer işaretli albumini kullanarak ölçüm yaptıklarında sonuçların birbiriyle iyi bir uyum gösterdiğini bildirmişlerdir (55).

Joachim Siedel ve ark. fruktozamin otoanalizörde ve HPLC yöntemleriyle ölçmüşlerdir. Sonuçların birbiriyle çok iyi korelasyon olduğunu bulmuşlardır (57).

Davit Lloyd ve ark. serum proteinlerinin kolorimetrisini santrifüsel analiz aygıtı ile ölçmüşlerdir. Bu yöntem ile fruktozamin ölçümünün oldukça duyarlı ve basit olduğunu tanımlamışlardır. Yine bu araştırmacılar otoanalizörde kalibrasyon, Linearite, Recovre, Precision, Referans intervallerini sonuçlandırmışlardır (39).

Mainwaring Burton ve ark. glikozillenmiş albumini affinite kromatografisi ve RIA ile (38), Erwin D. Schleicher ve ark. furozin/HPLC yöntemiyle ölçmüşlerdir (55).

Kaynak araştırmalarımıza göre fruktozamin ölçüm yöntemi olarak genellikle NBT' un kullanıldığı kolorimetrik yöntem önerilmektedir. Bu yöntemin düşük maliyetli, hassas, basit olması yanısıra otomatik analize uyarlanabilir olmasıyla da diğerlerinden üstün olduğu kanısındayız. Günümüzde diabet kliniklerinde rutin olarak fruktozamin ölçümlerinin yapıldığı laboratuvarların (30) olduğu ve obesite de klinik öneminin araştırıldığı bu denli önemli bir parametrenin ölçümünde yeni yöntemlerin uyarlanabilmesi için ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısındayız.

FFA (SERBEST YAĞ ASİTLERİ):

Günümüzde klinik çalışmalarda glukoz intoleransı açısından glikozile

hemoglobin ve fruktozamin önemli birer biyolojik göstergedir. Ancak glukoz intoleransının erken evrelerinde bu testler, tanı koydurmada yeterli olamayınca, glukozu karşı serbest yağ asitlerinin yanıtı intolerans açısından çok daha yararlı olmaktadır.

Çalışmamızda serbest yağ asitlerinin düzeyi iki ayrı yöntem ile ölçüldü. Öncelikle, Titrimetrik ve Kolorimetrik yöntemleri karşılaştırmayı amaçladığımız için olguların seçiminde klinik ayrıntılar üzerinde durulmadı. Çalışmamızın ikinci bölümünde obez-nondiabetik ve nonobez-nondiabetik olgularda serbest yağ asitleri düzeyi ölçüldü.

Plazma FFA' nin düzeyini ölçebilmek için Dole Metodunun Trout tarafından modifiye edilen yöntemi Titrimetrik yöntem olarak seçildi. Standart madde palmitik asit, indikatör Thymol blö ve titrasyon alkalisi olarak da sodyum hidroksit kullanıldı. Sonuçlar sarfedilen NaOH miktarını tespit etmekle hesaplanabildi. Titrasyonunu sona erdiğini ortamın, nil yeşiline veya yağ yeşiline döndüğünü an olarak belirlendi (27). Kolorimetrik yöntem olarak da **Haury'** nin yöntemi seçildi. Bu yöntemde de standart olarak palmitik asit kullanıldı. Serumdaki serbest yağ asitleri $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ile kloroform da çözülebilen bakır tuzları haline çevrilmektedir. Kloroform ekstratındaki bakır tayini ile serumdaki FFA ekivalanları tayin edilebilmektedir. Sonuçlar spektrofotometrik okumadan sonra hesaplandı (21).

İki farklı yöntemi birbiriyle karşılaştırmayı amaçladığımız çalışmada, Titrimetrik ve Kolorimetrik yöntemin sonuçları bakımından çok iyi bir korelasyonu olduğu tespit edildi.

Titrimetrik yöntemin zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle kolorimetrik yöntemi, bu yönteme üstün kılmaktadır. Elimizdeki kaynaklarda rutin klinik laboratuvarlarda plazma FFA düzeylerinin ölçümleri için Haury ve Duncombe' nin kolorimetrik tekniğinin hızlı ve basit olduğu ileri sürülmüştür (15, 27). Bununla birlikte titrimetrik yöntemler zincir uzunluklarına bakmaksızın plazmadan ekstrakte edilen tüm

FFA' nı ölçerken, kolorimetrik yöntemin C_{10} - C_{18} zincirli yağ asitlerini daha hassas bir şekilde ölçtüğü ileri sürülmüştür (15, 27). Bu nedenlerle çalışmamızda kolorimetrik yöntemin kullanılmasının daha yararlı olacağı kanısına vardık.



II. BULGU TARTIŞMASI

Obezite ile diabet arasında sıkı bir ilişki olduğu yıllardır bilinmektedir. Obezite; diabetin ortaya çıkmasını kolaylaştırmakta, obezite ortadan kalkınca diabet gerilemektedir (56). Nondiabetik obezite durumunda kanda insülin düzeylerinin yükselmesiyle birlikte çevresel dokularda glukoz kullanılmasının güçleştiği, glikoz toleransının çevresel dirence bağlı olarak azaldığı kabul edilmektedir. Erişkin tip diabetiklerin % 60 veya daha fazlası obez olmaktadır (22). Diabet insidensi ile obezite paralel gitmektedir (7). Vücut ağırlığı % 10 fazla olanlarda diabet insidensi normallerden 1.5 misli, % 20 fazlalıkta 3.2 misli, % 25' den fazla olanlarda ise 8.3 misli bulunmuştur. Vücut ağırlığı % 25' ten fazla olan diabetiklerde ölüm, normal ağırlıkta olan diabetiklerden 8 misli fazla olduğu öne sürülmektedir (7).

Çalışmamızın hasta grubunu oluşturan obezlerde açlık kan glukozu değerleri ile nonobez kontrol grubundaki glukoz değerleri anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). OGTT' nin birinci saatindeki glukoz değerleri ile açlık glukozu arasındaki signifikant farklılık, obezlerde ve nonobezlerde anlamlı bulundu ($p<0.05$). Her iki grupta birinci saat glukoz değerleri açısından anlamlı farklılık gözliemedik ($p>0.05$). Ancak obez olgularda açlıktaki glukoz değerleri ile birinci saattaki glukoz değerlerindeki artış farkı ortalamaları yüzdesi % 23 olarak bulundu. Kontrol grubunda ise bu artış farkı ortalamaları yüzdesi % 39 olarak hesaplandı. Bu bulgularımız obesitede glukoz intoleransının oluştuğu izlenimini bırakmıştır.

Kissebach, üst veya alt vücut kısımlarında obezite olanların oral glukoz yüklenmesine, glukoz ve insüline yanıtlarının farklı olduğunu bildirmiştir (65). Yine aynı kişi obezite ile ilişkili risk faktörlerinin değerlendirilmesinde glukoz intoleransı, hiperinsülinizm, yüksek trigliserid konsantrasyonları ve hipertansiyon parametrelerini incelemiş; bu değerlerin obez erkeklerde obez kadınlardan çok daha fazla belirgin olduğunu bildirmiştir (65).

Ohlson, abdominal vücut yağı fazlalığının glukoz intoleransına eğilim

yaratabildiğini fakat daha birçok mekanizmanın var olduğunu belirtmiştir (65).

Birçok kaynakta kan glukoz düzeyleri ile glikozile hemoglobin düzeyleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da kolorimetrik ve kolon kromatografik yöntemlerle ölçülen glikozile hemoglobin düzeyleri ile açlık kan glukozu düzeyleri arasında böyle anlamlı bir ilişki gözlenmiştir (Tablo-9). Bu bulgularımız kan, glikozile hemoglobin düzeylerinin ölçümünün, glukoz intoleransının erken tanısında yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bazı araştırmacılar azalmış glukoz toleransının saptanmasında OGTT' nin güvenilir tek test olduğunu kabul ederek, glikozile hemoglobin ve glikozile protein düzeylerinin ancak OGTT' ni desteklemek amacı ile kullanılabileceğini ileri sürmektedirler (1). Christiane Broussolle ve ark. obezlerde yaptıkları çalışmada HbA_{1c} ve kan glukoz konsantrasyonunun normal olduğunu izlemişlerdir (8).

Elizabeth Barrett Connor ve ark. açlık kan glukozu ile glikozile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyonları diabetik ve nondiabetiklerde araştırmışlardır. Korelasyon katsayısını diabetik erkeklerde $r=0.73$, diabetik kadınlarda $r=0.88$, nondiabetiklerde $r=0.14$ olarak bulmuşlardır ($p<0.01$) (11). B.J. Gould ve ark. glukoz düzeyleri ile glikozile hemoglobin düzeyleri arasındaki korelasyonu sıçanlarda $r=0.90$, farelerde $r=0.91$ olarak bulmuşlardır. Streptozotocin ile diabet başlattıklarında farelerin plazma glukozunun 2.5-3.4 kat, glikozile hemoglobininin 7.2-8.2 kat, vücut ağırlığının 1.5-1.9 kat arttığını gözlemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarını 0., 2., 8., 15. ve 22. günlerde kaydetmişlerdir. Glikozile hemoglobinlerin 8. güne dek yükselmediğini gözlemişlerdir (19).

Açlık kan glukozu ile kısa ve orta süreli glisemi düzeylerini yansıttığı için metabolik kontrolün değerlendirilmesinde yararlı olduğu öne sürülen glikozile plazma protein düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyonun olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Ayrıca açlık kan glukozu ile fruktozamin arasındaki böyle anlamlı bir ilişki obez ve nonobez çalışma gruplarımızda da izlendi ($p<0.05$). Açlık kan glukozu ile

TKol/HDL-Kol oranları ve BMI değerleri obez ve nonobez olgularda pozitif bir korelasyon göstermesine rağmen bu pozitiflik istatistiksel anlamda yeterli değidi ($p>0.05$).

Birçok araştırmacı glikozile hemoglobin düzeylerini farklı yöntemler ile ölçmüşler ve bu yöntemler arasındaki korelasyonları gözlemişlerdir. Bizim çalışmamızda glikozile hemoglobin düzeyleri kolorimetrik ve kolon kromatografik yöntemlerle ölçüldü ve bu iki yöntem arasında anlamlı bir ilişki gözlendi ($p<0.001$). Bu anlamlı korelasyon, çalışmamızın her iki bölümündeki olgularda araştırılarak izlendi.

Dennis C. Klenk ve ark. glikozile hemoglobin ölçümü için kolorimetrik, affinite kromatografik ve ion değiş-tokuşu kromatografisi yöntemlerini kullanmışlardır. Kolorimetrik ve affinite kromatografik yöntemler arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.97$, ion değiş-tokuşu ve affinite kromatografisi yöntemleri arasındaki korelasyon katsayısını $r=0.98$ bulmuşlardır. Bu yöntemlerle ölçülen glikozile hemoglobinlerin referans aralığının % 5.3-7.3, ortalama % 6.36, SD % 0.55 olduğunu saptamışlardır (36).

Fluckiger ve ark. HbA_{1c} değerlerini kolorimetrik yöntem ile ölçmüşler ve % 4-6.5 olarak, GHb/THb oranını ise $< \% 7.2$ bulmuşlardır (17). Rena R. Wing ve ark. kolon kromatografi ile glikozile hemoglobinlerin normal kontrol serumları 22°C' de çalışıp, ortalama olarak 6.5 ± 0.5 bulmuşlardır (66). Bizim çalışmamızda glikozile hemoglobinlerin normal ve abnormal kontrol serumları kolon kromatografi ile çalışıldı. Normal kontrol serumlarında glikozile hemoglobin düzeyi 26°C' de % 5.0-8.0, ortalama 7.2, abnormal kontrol serumda ise 26°C' de %14.1-17.1, ortalama 15.5 bulundu. Sonuçlarımızın kaynaklarda belirtilen sonuçlarla uyumlu olduğu tespit edildi.

A. Ardizzi ve ark. glikozile hemoglobin düzeylerini DM' lu obez deneklerde, sağlıklı grupta ve glukoz toleransı normal obez kişilerde araştırmışlardır. Anlamlı fark gözlemişlerdir ($p<0.01$). Obez DM' lu kişilerde anlamlı derecede yüksek

bulunurken, diğ erleri arasında pek fazla farklı bulunmamıştır (1).

Çalışmamızda obez ve nonobez deneklerde her iki yöntem ile ölçtüğ ümüz glikohemoglobin düzeyleri anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$).

Nondiabetik erişkinlerde temperatur kontrollü kolon kromatografi yöntemi ile ölçülen HbA₁ düzeyi % 4.5-8.5, elektroforez yöntemi ile % 5.0-7.6, HPLC yöntemi ile % 4.5-5.2, affinite kromatografi ile % 5.3-7.5, kolorimetrik (TBA) yöntemde ise 10 mg Hb için 20-22 nmol arasında bulunmuştur (33). Bu araştırmada kolon yöntemi ile ölçülen % HbA₁ değerlerinin yaşa bağlı olduğunu, diğ er yöntemler içinde bunun geçerli olabileceğini, glikozile hemoglobinin cinsiyet ve ırka bağlı olmadığını bildirmişlerdir (33). Çalışmamızda obez ve nonobez olgularda kolon yöntemiyle ölçülen glikozile hemoglobin düzeyleri ile yaş arasında pozitif korelasyon izlendi. Ancak bu pozitiflik istatistiksel açıdan yeterli düzeyde değ ildi ($p>0.05$). Kolorimetrik yöntemi ile ölçülen glikozile hemoglobin düzeylerinin anlamlı bir korelasyonu olmadığını gözledik.

Elizabeth Barret-Connor ve ark. glikozile hemoglobinin total kolesterol ve LDL-Kol ile korale olduğunu, erkeklerde trigliserid ve VLDL-Kol ile korelasyon gösterdiğ ini izlemişlerdir. Glikozile hemoglobinin kadın ve erkek de HDL-Kol ile ilişki göstermediğini ö ne sürmüşlerdir. Lipid ve Lipoproteinler arttığında GHb (glikozile hemoglobin)' nin bu artıştan etkilenmesi hem diabetik hem de nondiabetiklerde iskemik kalp hastalığı riski ile ilişkisi olabileceği fikrini ortaya koyduğunu söylemişlerdir (11).

Çalışmamızda kolorimetrik (HMF) ve kolon kromatografik yöntemlerle ölçülen glikozile hemoglobin düzeylerinin TKol/HDL-Kol oranı, BMI değerleri ve serbest yağ asitleri ile anlamlı bir korelasyon göstermedi. Bunun yanı sıra glikozile plazma proteinleri (fruktozamin) ile korelasyonunun pozitif olduğu saptandı ($p<0.05$).

Hayes ve ark. glikozil hemoglobin düzeyleri ile trigliserid ve kolesterol arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada trigliserid ile GHb arasında küçük ancak anlamlı ilişki

saptamışlar, kolesterol ile anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (23).

L. Kennedy ve ark. in vitro olarak glikozile hemoglobinin değişken oksijen satürasyon eğrilerine sahip olduğunu ve organik fosfatın allosterik etkilerine karşı azalmış sensitivite gösterdiğini öne sürmüşlerdir (35). HbA_{1c}' nin primer glikozilasyon yeri olan β zincir terminalindeki valin kalıntısı, aynı zamanda Hb-Oksijen affinitesinin fizyolojik regülatörü olan 2.3 DPG' ında bağlanma bölgesi olmaktadır. Buna karşın in vivo olarak hemoglobinin diabetik hastalarda yüksek oksijen affinitesine sahip olduğu ve diabetik-normal popülasyonlarda tüm vücut oksijen satürasyon eğrilerinin birbirine eşit bulunduğu bu nedenle hemoglobin glikozilasyonunun herhangi bir patolojik etkisinin olmadığını öne sürmüşlerdir (14, 35).

Çalışmamızda kan glikozile hemoglobin düzeylerinin açlık kan glukozu ve fruktozamin düzeyleriyle olan anlamlı korelasyonu; glikozil hemoglobinin glisemi düzeylerinin kontrolünde yararlı olabileceği izlenimini bırakmıştır. Bazı araştırmacılar glikozile hemoglobin ölçümlerinin yanı sıra glikozile plazma proteinlerinin ölçümünün de kısa süreli glisemik kontrolde yararlı olduğunu öne sürmüşlerdir (3, 8, 9, 31, 58, 60).

Çalışmamızda glikozile plazma proteinlerinin (fruktozamin) düzeyleri kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. Kendi laboratuvar koşullarımızda elde ettiğimiz fruktozamin değerleri 1.86-2.65 mmol.L⁻¹ olarak bulundu.

Bazı araştırmacılar fruktozamin ölçümünde kullanılan kolorimetrik yöntemde Linearite Limiti 8 mmol/L olan DMF' u standart olarak kullandıklarında serum fruktozamin normal değerlerini 2.0-2.8 mmol.L⁻¹ olarak hesaplamışlardır (31, 38). Johnson ve ark. fruktozamin ölçümünde standart madde olarak DMF kullandıklarında 2.7 mmol/L, modifiye metot ile modifiye reagent kullandıklarında 290 μmol/L olarak ölçmüşlerdir. Bu iki metod arasında fruktozamin değeri açısından korelasyon katsayısını r=0.58 p<0.01 olarak elde etmişlerdir (30). Ayrıca fruktozamin düzeylerini 5-10. dakikada 2.35 mmol.L⁻¹, 15. dakikada 2.10 mmol.L⁻¹, 20. dakikada 2.07 mmol/L

olarak ölçmüşlerdir (30). B.L. Somani ve ark. normoglisemiklerde fruktozamin değerlerini 1.42 mmol/l, diabetiklerde 2.26 mmol/L bulmuşlardır (60).

Davit Lloyd ve ark. nondiabetik kontrol grubunda, glukoz toleransı bozulalarda, tedavi edilmeyen diabetiklerde ve insülin ile tedavi edilen diabetiklerde fruktozamin düzeylerini ölçmüşlerdir. Tedavi edilmeyen diabetiklerde fruktozamin düzeylerinin bilinmesiyle % 84' ünü belirlemişlerdir. % 8' inde yanlış bilgi verdiğini görmüşlerdir (39). Bir başka çalışmada fruktozaminin tek başına sadece % 70' lik bir oranla diabetik hastaları metabolik kontrolde doğru kategoriye koyduğunu öne sürmüşlerdir. Fruktozamin düzeylerinin diabetik hastalarda yüksek bulunması, nondiabetiklere göre daha iyi tayin edilebileceğini göstermektedir (8).

A.B.Roberts 28-30 haftalık gebelikte fruktozamin ile açlık kan glukozu arasında çok belirgin bir korelasyonun olduğunu, 36 haftalık gebelikte bu korelasyonun ($r=0.29$) daha zayıf hale geldiğini izlemişlerdir. Bu çalışmada gestasyonel diabetin belirlenmesi için bir tarama testi olarak serum fruktozaminini ölçmenin yararlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (50).

B.J.Gould ve ark. diabetli ve hipoglisemili hayvan modellerinde glikoz ile glikozile plazma proteinlerinin korelasyonunu araştırmışlar ve ilişkinin anlamlı olduğunu öne sürmüşlerdir (19). Bir başka çalışmada serum fruktozaminini ile açlık kan glukozu korelasyonunu $r=0.87$ $p<0.001$ bulmuşlardır (39). Roger N.Johnson ve ark. diabetiklerin oluşturduğu grupta fruktozamin konsantrasyonunu normallere göre daha yüksek bulmuşlardır. Küçük bir değer aralığında yer alan normal örneklerle göre diabetiklerin değerlerinin daha geniş bir dağılım gösterdiğini gözlemişlerdir. Ayrıca fruktozamin ile açlık kan glukozu arasındaki korelasyonun ($r=0.72$) çok anlamlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (30).

Plazma proteinlerinin glikozilasyonunun diabetik nefropati gelişiminde rolü olduğu düşünülmekte ancak kesin kanıt bulunamamaktadır. Bu düşünce ile 12 hafta boyunca normal farelere non-enzimatik olarak glikozillenmiş plazma proteinleri IV

olarak enjekte edilmiş ve glomerüler bazal membran kalınlaşması olduğu gözlenmiştir (35). Nefrodik sendromlu, ağır hipoalbuminemiilerde ve hemodilüsyona bağlı olarak hamilelikte düşük bulunan fruktozamin düzeyleri, hipotroidizmde yüksek bulunmuştur. Bu durum serum albumin turnoverindeki bir azalma ile açıklanmaktadır. Diğer yandan hipertroidizmde albumin turnoverinin artması ise plazma konsantrasyonunda meydana gelen düşüşün fruktozamin konsantrasyonunda da bir düşüş oluşturduğunu kanıtlamışlardır (8, 35, 50, 52, 58).

Kaynak araştırmalarımıza göre fruktozamin ölçümünün genellikle diabetik alanda yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak son yıllarda obezitenin klinik öneminin artmasıyla birlikte obezitede fruktozamin ölçümlerinde önem kazanmaya başladığı dikkatimizi çekmiştir.

Christiane Broussole ve ark. obezitede fruktozamin testini ve diabette post-glisemik kontrollerin değerlendirilmesi ile çıkan sonuçları bildirmişlerdir (8). Nondiabetik obezlerde fruktozamin düzeylerini, nondiabetik zayıf kontrol grubundan önemli ölçüde düşük bulmuşlardır. Diabetik obezlerde de fruktozamin düzeylerini nonobez diabetiklere göre düşük olduğunu izlemişlerdir. Buna karşılık hem obez diabetiklerde hem de nonobez diabetiklerde daha yüksek fruktozamin düzeyleri ölçmüşlerdir (8). Bizim çalışmamızda fruktozamin düzeyleri obez-nondiabetik olgularda, nonobez-nondiabetik olgulara göre düşük bulundu. Kaynaklara göre obezlerdeki bu azalmanın kan şekeri ve protein konsantrasyonları ile ilişkili olmadığı, ancak protein turnoverinin arttığı düşünülmektedir (8). Ancak protein turnoverinin arttığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. Son zamanlarda obez kişilerin serumda fruktozamin oluşumuna bir inhibitörün etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. Bu olayın doğrudan glikasyon mekanizmasındaki bir değişime bağlı olabileceği söylenmektedir (58). In vitro çalışmalarda C¹⁴-glukoz ile glikasyon oluşturulduğunda obez nondiabetiklerde kontrol grubuna göre önemli bir düşüş izlenmiştir (8). Obez hastalarda işaretlenmiş glukozun proteinlere yapılaşma hızının (değişik glukoz

konsantrasyonlarının varlığında) ve fruktozamin formasyon hızının azaldığı gözlenmiştir. pH, ısı, protein konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonu, amino grupları, enkübasyon süresi gibi in vitro değişkenler nonenzimatik glikasyon miktarını tayin ettiğini bildirmişlerdir (8).

Jan Skrha ve ark. serum fruktozamin ve şişmanlık konusunda yaptıkları çalışmada ortalama fruktozamin konsantrasyonlarını obezlerde, obez olmayanlara oranla çok düşük bulmuşlardır (0.74 ± 0.13 e karşı 0.95 ± 10 mmol.L⁻¹). Serum fruktozamin konsantrasyonu ile BMI arasında ters orantı saptamışlardır (58). Çalışmamızda obez olgularda fruktozamin konsantrasyonu ile BMI değerleri arasındaki ilişkinin negatif olduğu bulundu.

A.Ardızzi ve ark. fruktozamin düzeylerini DM' lu obezlerde, glukoz toleransı normal ve bozuk obezlere göre anlamlı yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir (1). Sağlıklı kontrol grubu ile diğer iki grup obezlerde fark gözleyememişlerdir (1). Trigliserid düzeylerinin fruktozamin kons. da 0.01 mmol/L' lik bir artış oluşturabileceği öne sürülmüştür. Diğer taraftan 0.11 mmol/L düşürebileceği de savunulmaktadır (8).

Sonuç olarak fruktozamin kısa ve orta süreli glisemi düzeylerini yansıttığı için metabolik kontrolün değerlendirilmesinde yararlı olacağına inanmaktayız. Kronolojik olarak glisemi düzeyleri ile glikozile hemoglobin düzeyleri arasında yer alabileceğini düşünmekteyiz. Fruktozamin düzeyleri şişmanlıkta düşük olarak tayin edilmektedir. Obez hastalarda glisemik kontrol yorumlanırken, serum fruktozamin konsantrasyonları dikkate alınması gerekir kanısındayız.

Glukoz intoleransı araştırmalarında glukoz tolerans testleri, glikozile hemoglobin, fruktozaminin yanı sıra serbest yağ asitlerinin (FFA) glukozu yanıtının araştırılması, tanı açısından önemli olmaktadır. Çalışmamızda metabolik olayların değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan FFA, titrimetrik ve kolorimetrik yöntemlerle ölçüldü. Bu iki yöntemin korelasyonu ($r=0.803$ $p<0.001$) çok anlamlı idi.

P.J.N. Howorth ve ark. bizim kullandığımız Duncombe' nin kolorimetrik

yöntemi ile yine yararlandığımız Trout' un titrimetrik yöntemini kullanarak nondiabetik 133 olguda plazma serbest yağ asitleri düzeylerini ölçmüşlerdir. Bu iki yöntemin korelasyon kat sayısını $r=0.833$ bulmuşlar ve ilişkinin anlamlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (27).

Çalışmamızda serbest yağ asitlerini iki farklı yöntem ile çalıştıktan sonra obez ve nonobez olgularda açlıkta ve toklukta düzeyleri ölçüldü. Her iki grup olguda açlık FFA düzeyleri tokluk FFA düzeylerinden anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Glukoz ile FFA değerleri arasındaki korelasyon negatif bulundu. Kan glukozu azalırken yüksek serbest yağ asitleri, OGTT' nin birinci saatinde kan glukozu artarken azalmış serbest yağ asitleri düzeyleri ölçüldü. Obez olgularda açlıkta FFA konsantrasyonunun artması, toklukta azalması nonobez kontrol grubuna göre daha yavaş olmakta idi. Bu azalma, obez olgularda ortalama yüzdesi olarak % 43 bulunurken, nonobez olgularda bu değer % 56 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgularımız obezitenin glukoz intoleransı yarattığı izlenimini bırakmıştır.

Çalışmamızda dikkatimizi çeken bir konuda obez olgularda serbest yağ asitlerinin vücut kitle indeksi (BMI) ile çok anlamlı bir korelasyon göstermesiydi ($r=0.607$ $p<0.01$). Bu anlamlı ilişkiyi nonobez kontrol olgularımızda gözleyemedik.

Ayrıca serbest yağ asitleri düzeyleri ile TKol/HDL-Kol oranı arasında pozitif korelasyon izlendi. Ancak obez ve nonobez olgulardaki bu olumlu ilişki istatistiksel açıdan yeterli düzeyde değildi. Obez olgularda TKol/HDL-Kol oranı nonobez olgulara göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Yine obezlerde TKol/HDL-Kol oranı ile BMI (vücut kitle indeksi) ilişkisi anlamlı iken ($p<0.01$) nonobez kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon göstermedi.

Obezitede glukoz intoleransı araştırmalarında glukoz ve serbest yağ asitlerinin karşılıklı ilişkilerinde hormonların da etkili olduğu dikkati çekmektedir. Özellikle insülin yağ dokusu ve kas gibi dokular üzerinde glukoz alınıp-tutuluş hızını arttırmaktadır. Serbest yağ asitleride insülin salıverilişine neden olan maddeler

arasında yer almaktadır. Glukagon hormonunda insülin kadar önem taşımaktadır (13, 29, 46). Obezite de karbonhidrat ve lipid metabolizmaları incelenirken hormonal yönüde içine alan çok yönlü ve daha ileri klinik araştırmalar yapılmasının, bunların laboratuvar çalışmalarıyla belirlenmesinin yerinde olacağı kanısındayız.



ÖZET

Günümüzde klinik önemi gittikçe artan, diyabet ve kardiovasküler riske zemin hazırlayan obezite bu çalışmanın konusu olarak seçildi. Çalışmaya 19 obez-nondiabetik olgu hasta grubu olarak ve 10 nonobez-nondiabetik olgu da kontrol grubu olarak alındı.

Açlık kan glukozu, OGTT yanı sıra diyabetin metabolik kontrolünün birer göstergesi olarak glikozile hemoglobin (GHb) ve Fruktozamin düzeyleri ölçüldü. Ayrıca diyabetin erken tanısında bu parametreleri desteklediği öne sürülen serbest yağ asitleri, TKol/HDL-Kol oranlarında araştırıldı. Rutin analizler açısından kullanılabilir en iyi yöntemi belirlemek amacıyla glikozile hemoglobin, fruktozamin ve serbest yağ asitleri ölçümleri farklı yöntemler kullanılarak, birbirleriyle kıyaslandı. Glikozile hemoglobin ölçümünde kullanılan Kolorimetrik (HMF) ve Kolon Kromatografik yöntemler birbirleriyle karşılaştırıldığında, her ikisi arasında oldukça anlamlı bir korelasyon saptandı ($p < 0.001$). Ekonomik ve duyarlı olması nedeniyle kolorimetrik yöntemin rutin laboratuvar kullanımı açısından en uygun yöntem olduğu saptandı.

Serum fruktozamin düzeyleri ölçümünde basit, ucuz ve hızlı olduğu öne sürülen kolorimetrik yöntem kullanıldı. Obez kişilerde serum fruktozamin düzeylerinin düşük olduğu belirlendi.

Serbest yağ asitleri düzeyleri, Titrimetrik ve Kolorimetrik yöntemlerle ölçüldü ve her iki yöntemin de birbirleriyle anlamlı korelasyon gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.001$). Ancak Titrimetrik yöntemine göre daha kolay, daha hızlı ve de daha duyarlı olan Kolorimetrik yöntemin rutin laboratuvar kullanımı için uygun olduğu saptandı.

Obez olgularda açlıkta FFA düzeylerindeki artış, toklukta (OGTT' in birinci saati) FFA düzeylerindeki azalış kontrol grubuna kıyasla daha düşük olarak saptandı. Toklukta FFA düzeylerindeki azalma; obez olgularda ortalama % 43 bulunurken, nonobez olgularda % 56 olarak bulundu. Bu sonuçlar obezitede glukoz intoleransının oluştuğu izlenimini bıraktı.

SUMMARY

The subject of this study was chosen to be obesity, due to its effect in predisposing the patient to develop diabetes and cardiovascular risks.

The patient group consisted of 19 obese nondiabetics, while the control group included 10 nonobese nondiabetics cases.

First of all; we determined fasting blood glucose, oral glucose tolerance test (OGTT), glycosylated hemoglobin (GHb) and fructosamine levels which are the indicators of metabolic control of diabetes. Besides these parameters, free fatty acids (FFA) and total cholesterol/HDL cholesterol ratios which support these parameters in the early diagnosis of diabetes were also investigated.

Various methods were compared to determine GHb, fructosamine and FFA in order to select the best method for routine analyses. GHb measurements were compared using colorimetric (HMF) and column chromatographic methods; the correlation between these two methods was significant ($p < 0.001$). Colorimetric method was chosen for routine laboratory usage because of its high sensitivity and cheapness.

Serum fructosamine levels were measured with colorimetric method, which is thought to be cheap, fast and simple and found to be lower in obese cases. FFA levels were determined by titrimetric and colorimetric methods. The correlation between these methods were significant ($p < 0.001$). For routine analyses, the colorimetric method was found to be appropriate, because it is much more faster, simple and sensitive compared to titrimetric method. It was observed that in obese cases the increase of FFA levels in fasting and the decrease of FFA levels in the first hour of OGTT was lower than the results in nonobese cases. The decrease of FFA levels in the first hour of OGTT was lower than the results in nonobese cases. The decrease of FFA levels in the first hour of OGTT was approximately 43% in obese cases while it was 56% in nonobese cases. From these results, it was concluded that glucose intolerance occurs in obesity.

KAYNAKLAR

1. Ardizzi, A., Grugni, G., Moreni, G., Sartorio, A., Conti, A.F., **Interesse del dosaggio delle proteine plasmatiche glicate nella diagnostica dell intolleranza glucidica nell obesità**, Minerva Medica, Vol. 81(11), (1990), 773-776.
2. Aleyassine, H., Gardiner, R.J., Blankstein, L.A., and Dempsey, M.E.: **Agargel electroforetic determination of glycosylated hemoglobin: Effect of variant hemoglobins, hiperlipidemia and temperature**, Clin. Chem. 27(3): 472, 1981.
3. Baker, J.R., Johnson, R.M., Scott, D.J., **Serum fruktozamine concentrations in patients with type II (non-insulin dependent) diabetes mellitus during changes in management**, British Medical Journal, Vol: 288(1984), 1484-1486.
4. Bender, A.E., Brookes, L.J., **Body weight control**, Churcill Livingstone, (1987), 40, 185.
5. Bunn, H., Franklin Gabbay Kenneth, H., Gallop Paul, M.: **The glycosilation of hemoglobin**, Science, Vol: 200, (1978), 7: 21.
6. Bunn, H., Franklin Haney, N., Gallop Paul, M.: **The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}**, The Journal of Clinical Investigation, Vol 57: (1976), 1652.
7. Bostancı, N., **Diabet ve Şişmanlık, Şeker Hastalığı (D.M.)**, İst. Üni.Tıp Fak., (1974), 75-82.
8. Broussolle, C., Tricot, F., Garcia, I., Orgiazzi, J., Revol, A., **Evaluation of the Fructosamine Test in obesity: Consequences for the Assessment of post glyceimic control in Diabetes**, Clin. Biochem, Vol: 24, (1991), 203-209.
9. Calbreath, D.F., **Fructosamine**, W.B. Saunders Company, U.S.A., (1992), 271.
10. Candan, G., **Diabetes Mellitus ve Glikozillenmiş Hemoglobin**, Endokrinoloji Yıllığı, İst. Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak., Yayın No: 12, (1985-1986), 104.
11. Connor, E.B., Criqui, M.H., Witztum, J.L., Philippi, T., Zettner, A., **Population-Based study of Glycosylated Hemoglobin, Lipids and Lipoproteins in Nondiabetic Adults**, Arteriosclerosis, Vol: 7, No: 1, (1987), 66-70.

12. Cully, M., Burns, G., Engel, W.D., **Quick HbA_{1c} Assay**, Abstracts, European Association for the study of Diabetes 28th Annual Meeting Prague, 8-11 Sept (1992), A206, 794.
13. De Groot, L.J., **Obesity: An Endocrine Perspective**, Endocrinology, W.B. Saunders Company, 141, (1989), 2305.
14. Ditzel, J., Anderson, H., Peters, D.N.: **Oxygen affinity of hemoglobin and red cell 2,3 diphospho glycerate in childhood diabetes**, ACTA Paediatr. Scand., 61: (1975), 355.
15. Duncombe, W.G., **The Colorimetric micro-determination of nonesterified Fatty Acids in Plasma**, Clin. Chim. Acta, 9, (1964), 122-125.
16. Erlaçın, S., **Karbonhidratlar Temel ilkeleri ile BİYOKİMYA**, E.Ü. Basımevi, İZMİR (1985), 113.
17. Fluckiger, R., Winterhalter, K.H., **Hemoglobine Glycosylee A_{1c}** Febs Lett., 71 (1976), 356-360.
18. Garrow, J.S., **Obesity and related diseases**, Churchill Livingstone, (1988), 2-39.
19. Gould, B.J., Flatt, P.R., Kotecha, S., Colett, S.K., **Measurement of Glycosylated Hemoglobins and Glycosylated Plasma Proteins in Animal Models with Diabetes or Inappropriate Hypoglycaemia**, Horm. Metabol. Res., 18, (1986), 795-799.
20. Görpe, A., Görpe, U., **Obesite**, Pratik Endokrinoloji, İst. Üni. Tıp Fak., (1987), 197.
21. Haury, H., **Acides gras non-estérifiés (acides gras libres)**, Imren, 631, Biochem J., (1966), 69-88.
22. Hatemi, H., Biyal, F., Korugan, Ü., **Obesite, Diabetes Mellitus ve Karbonhidrat Metabolizması**, Diabetes Mellitus, 28, (1983), 28-100.
23. Hayes, E.J., Gleason, R.E., Soeldner, J.S., Wacks, M. and Blankstein, M.: **Measurement of hemoglobin A₁ by liquid chromatography and by agar gel**

electrophoresis compared. Clin Chem, 27/13: (1981), 476.

24. Hawk, L.J., Brook, C.G.D., **Influence of body fatness in childhood an fatness in adult life**, British Medical Journal, (1979), 151-152.

25. Henry, J.B., **Lipids and Dyslipoproteinemia**, Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 10, (1991), 188-189.

26. Hill, R.P., **Semi-Automated Colorimetric Method for Measuring Glycohemoglobin, with Reduction of Nitroblue Tetrazolium Evaluated**, Clin. Chem., 36/12, (1990), 2131-2133.

27. Howarth, P.J.N., Gibbard, S., Marks, V., **Evaluation of a Colorimetric method (Duncombe) of determination of plasma non-esterified Fatty Acids**, Clin. Chim. Acta, 14, (1966), 69-73.

28. James, W.P.T., Bailes, J., Davies, H.L., Dauncey, M.J., **Elevated Metabolic Rates in Obesity**, The Lancet, (1978), 1122-1125.

29. Jensen, M.D., Heiling, V.J., Miles, J.M., **Effects of Glucagon on Free Fatty Acid Metabolism in Humans**, Journal of Clin. End. and Metb., Vol: 72, No: 2, (1991), 308-315.

30. Johnson, R.N., Metcalf, P.A., Baker, J.R., **Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control**, Clin. Chim. Acta, 127, (1982), 87-95.

31. Jury, D.R., Dunn, P.J., **Fructosamine Measurement**, Diabetic Medicine, Vol: 9(1992), 206.

32. Kalkhoff, R.K., Kandaraki, E., Morrow, P.G., **Relationship Between Neonatal Birth weight and Maternal Plasma Amino Acid Profiles in Lean and Obese Nondiabetic Women and in Type I Diabetic Pregnant Women**, Metabolism, Vol: 37 (1988), No: 3, 234-339.

33. Kaplan, L.A., Pesce, A.J., **Glycosylated hemoglobin**, Clin. Chem. Theory,

Analysis and Correlation, Copyright, Missouri, (1989), 1040-1042.

34. Kaplan, L.A., Cline, D., Gartside, P., Burstein, S., Sperling, M., Stein, E.A.: **Hemoglobin A₁ in hemolysates from healthy and insulin-dependent diabetic children as determined with a temperature controlled mini column assay**, Clin. Chem., 28/2: (1982), 13.

35. Kennedy, L., Baynes, J.W., **Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview**, Diabetologia, 26, (1984), 93-98.

36. Klenk, D.C., Hermanson, G.T., Krohn, R.I., **Determination of Glycosylated Hemoglobin by Affinity Chromatography: Comparison with Colorimetric and Ion-Exchange Methods, and Effects of Common Interferences**, Clin. Chem., 28/10, (1982), 2088-2094.

37. Kynoch, P.A.M., Lehman, H.: **Rapid estimation (2.5 hours) of glycosylated hemoglobin for routine purposes**. The Lancet, 2: 8027, 1977.

38. Lamb, E., Burton, M., Dawnay, A., **Effect of Protein Concentration on the Formation of Glycated Albumin and Fructosamine**, Clin. Chem. 11(1991), 2138.

39. Lloyd, D., Marples, J., **Simple Colotimetry of Glycated Serum Protein in a Centrifugal Analyzer**, Clin. Chem., 30/10, (1984), 1686-1688.

40. Martin, Jr., D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., **Karbonhidrat ve Lipid metabolizmasının düzenlenmesi**, Harper' in Biyokimyaya Bakışı, Çevirenler: Menteş, N.K., Menteş, G., İzmir (1986), 352-370.

41. Mayer, T.K., Freedman, Z.R., **Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of Laboratory measurements and of their clinical utility**, Clin. Chim. Acta, 127 (1983), 147-184.

42. Mc. Donald, M.J., Shapiro, W.P., Bleichman, M., Solway, J., Bunn, H.F.: **Glycosylated minor components of human adult hemoglobin**, J. Biol. Chem., 253: 2327, 1978.

43. Menez, H.F., et al., **Hemoglobine Glycosylee A_{1c}**, Clin. Chem. 27 (1981),

1947-1948.

44. Mortensen, H.B., Carlsen, C.: **Glycosylation of human hemoglobin a in red blood cells studied in vitro. Kinetics of formation and dissociation of hemoglobin A_{1c}** Clin. Chem. Acta, 134: (1983), 317.
45. Nayak, S.S. and Pattabiraman, T.N.: **A new colorimetric method for the estimation of glycosylated hemoglobin**, Clin. Chem. Acta, 109: (1981), 267.
46. Olefsky, J., Bacon, V.C., Baur, S., **Insulin Receptors of Skeletal Muscle: Specific Insulin Binding Sites and Demonstration of Decreased Numbers of Sites in Obese Rats**, Metabolism, Vol: 25, No: 2(1976), 179-189.
47. Opie, L.H., Walfish, P.G., **Plasma Free Fatty Acid Concentrations in Obesity**, The New England Journal of Medicine, Vol: 268, No: 14(1963), 757-763.
48. Parker, K.M., England, J.D., Costa, J.D., Hess, R.L., Goldstein, D.E.: **Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin**. Clin. Chem., 2715: 669, 1981.
49. Philcox, J.C., Haywood, M.R., Rofe, A.M., **Hemoglobin A_{1c} by HPLC with the Pharmacia Mono S HR 5/5 Cation. Exchange Column: Influence of Sample Protein Load on Optimal Chromatographic Cnditions**, Clin. Chem., 38/8, (1992), 1488-1490.
50. Roberts, A.B., Baker, J.R., Court, D.J., **Fructosamine in Diabetic Pregnancy**, The Lancet, (1983), 998-999.
51. Rodin, J., **Comparative effects of fructose, aspartame, glucose and water preloads on calorie and macronutrient intake**, Clin. Nutr., 51 (3), (1990), 428-435.
52. Romay, C., Armesto, J., Pascual, C., **Secondary wavelength to use in the Fructosamine Test performed with Hitachi Analyzers**, Clin. Chem., Vol: 37, No: 5, (1991).
53. Saibene, V., Bremblia, L., Bertoletti, A., Bolognani, L., Pozza, G.: **Chromatographic and colorimetric detection of glycosylation hemoglobins; a comperative analysis of two different methods**. Clin. Chim. Acta, 93: (1978), 199.
54. Samaja, M., Melotti, D., Careini, A. and Pozza, G.: **Glycosylated hemoglobins**

and the oxygen affinity of whole blood. *Diabetologia*, 2315: (1982), 399.

55. Schleicher, E.D., Vogt, B.W., **Standardisation of Serum Fructosamine Assay**, *Clin. Chem.* 36/1, (1990), 136-139.
56. Sencer, E., **Şişmanlık**, *Endokrin ve Metabolik Hastalıklar*, İst. Üni. Tıp Fak., Cilt: 9, (1976), 248.
57. Siedel, J., Vogt, B., Kerscher, L., **Serum Fructosamine Assay: Two Different color reagents compared with Reference to A HPLC Procedure**, *Clin. Chem.*, Vol: 34, No: 6, (1988), 1316.
58. Skrha, J., Svacina, S., **Serum Fructosamine and Obesity**, *Clin. Chem.*, 11, (1991), 2020.
59. Smith, E.L., **Minor-Component Heterogeneity**, *Principles of Biochemistry*, *Mamalian Biochem.*, 4, (1988), 11.
60. Somani, B.L., Sinha, R., Gupta, M.M., **Fructosamine Assay Modified for the Estimation of Glycated Hemoglobin**, *Clin. Chem.*, Vol: 35, No: 3 (1989), 497.
61. Subramaniam, C.V., Rahhakrishnanurty, B., Brenson, G.S., **Photometric determination of glycosylation of hemoglobin in diabetes mellitus**, *Clin. Chem.*, 26, (1980), 1683.
62. Standefer, J.C., Eaton, R.P., **Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin**, *Clin. Chem.*, 29/1, (1983), 135.
63. Svacina, S., Hovarka, R., **Computer models of albumin and haemoglobin glycation**, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 32, (1990), 259-263.
64. Truswell, A.S., **Diet and plasma lipids-a reappraisal**, *The American Journal of clinical Nutrition*, (1978), 977-989.
65. Van Gaal, L., Vansant, G., Acker, K.V., Leeuw, D.I., **Decreased hepatic insulin extraction in upper body obesity: relationship to unbound androgens and sex hormone binding globulin**, *Diabetes Research and Clin. Practice*, 12, (1991), 99-106.
66. Wing, R.R., Epstein, L.H., **Doesself Monitoring of Blood Glucose Levels**

Improve Dietary Compliance for obese Patients with Type II Diabetes, The American J. Med., Vol: 81, No: 5, (1986), 830-836.



ÖZGEÇMİŞ

- 1962 İzmir-Buca' da dünyaya geldim.
- 1968-73 İzmir Buca 23 Nisan ilkokulunda ilk öğrenimimi tamamladım.
- 1973-79 İzmir Buca Lisesinde orta öğrenimimi ve aynı okulun fen bölümünde lise öğrenimimi başarıyla tamamladım.
- 1980-81/
1984-85 İzmir 9 Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Bölümü Kimya Ana Bilim dalından birincilik ile mezun oldum.
- Ekim 1985-
Haziran 1986 Karşıyaka Turyağ tesislerinin deterjan bölümünde görev yaptım.
- Ocak 1987-
Şubat 1991 İzmir SSK Buca Hastanesinde Hematoloji, Seroloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında görev yaptım. Bu arada Alman Kültür merkezinde dil kurslarına devam edip, sertifika aldım.
- Şubat 1991' den
bu yana Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimimi yapmaktayım.