

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞEKER HASTALARINDA GLİKOZİLLENMİŞ  
HEMOGLOBİN MİKTARININ TESPİTİ

İSMAIL ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yönetici : Yrd. Doç. Dr. Eşref YEGİN

V AN — 1992

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞEKER HASTALARINDA GLİKOZİLENMİŞ HEMOGLOBİN  
MİKTARININ TESPİTİ

İSMAİL ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

TEZ KABUL TARİHİ

..15.1.01.1992..

## ÖNSÖZ

Şeker hastalığı, tam veya nisbi bir insülin eksikliğinden ileri gelme bir hastalıktır. Bu hastalık metabolik ve anatomik bozukluklar arasında; lipemi, hiperkolesterolemi, ağırlık kaybı, kangren, gözde patolojik değişmeler, koma ve böbrek hastalığı vardır. Fakat her hakiki şeker hastalığı vakasında bütün bunlar görülmeyebilir.

Uzun süre kan glukoz konsantrasyonunun neticesinde glikozillenme ürünü olan glikozillenmiş hemoglobin, normal hemoglobine glukoz bağlanması -olarak bilinmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobinin klinik önemi kendini şimdilik şeker hastalarında göstermektedir. Dolayısıyla ülkemizde son yıllarda tıp alanında hekimlerimizin klinik tanı ve tedavide laboratuvar çalışmalarına önem vermeleri açısından şeker hastalarında glikozillenmiş hemoglobin değerinin tespiti ilerde glikozillenmiş hemoglobin tayininin rutin olarak kurulması için bir zemin olacağı inancındayız.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ .....	1
1. GİRİŞ .....	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	5
3. GENEL BİLGİLER .....	8
3.2. Hemoglobin .....	8
3.2.1. Hemoglobin Metabolizması .....	12
3.2.2. Hemoglobin Yıkımı .....	14
3.2.3. Hemoglobin Glikozilasyonu .....	17
3.2.4. Hemoglobin Glikozilasyonuna Etki Eden Faktör- ler .....	21
3.2.4.1. Glukoz Konsantrasyonu .....	21
3.2.4.2. Anormal Hemoglobinler .....	21
3.2.4.3. Aspirin .....	22
3.2.4.4. Gebelik .....	22
3.2.4.5. Üremi .....	22
3.2.4.6. Hemoliz .....	22
3.2.5. Glikozillenmiş Hemoglobin Klinik Önemi .....	23
4. MATERİYAL VE METOD .....	27
4.1. Materyal .....	27
4.1.1. Numune Toplanması .....	27
4.2. Metod .....	27
4.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	28

4.2.2. Kullanılan Çözeltiler .....	28
4.2.3. Kullanılan Cihazlar .....	29
4.2.4. Deneyin Yapılışı .....	30
4.2.4.1. Eritrosit Hemolizatin Hazırlanışı ....	30
4.2.4.2. Eritrositlerde HbA <sub>1c</sub> Tayini .....	30
4.2.5. Standart Eğrinin Hazırlanması .....	32
4.2.6. Sonuçların Hesaplanması .....	33
4.2.7. İstatistikî Analizler.....	34
4.2.7.1. Aritmetik Ortalama.....	34
4.2.7.2. Standart Sapma .....	34
4.2.7.3. "t" Testi .....	34
4.2.7.4. Korelasyon Katsayınının Hesaplanması	35
5. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	36
5.1. Bulgular .....	36
5.2. Tartışma .....	38
5.2.1. Metolla ilgili Tartışma .....	38
5.2.2. Bulgularla ilgili Tartışma .....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	44
ÖZET .....	45
TEŞEKKÜR .....	47
LİTERATÜR LİSTESİ .....	48

## ÖZ

Bu çalışmada, 48 şeker hastası ve 48 sağlıklı şahıs için hemolizatta, glikozillenmiş hemoglobin, açlık kan şekeri ve hemoglobin değerleri tespit edildi.

Glikozillenmiş hemoglobin tayini modifiye bir kolorimetrik metod, Açlık kan şekeri glukoz oksidaz yöntemine göre, Hemoglobin Sahli metoduna göre belirlendi.

Kontrol grubu için glikozillenmiş hemoglobin, açlık kan şekeri ve hemoglobin değeri  $\bar{X} \pm SD$  olarak sırasıyla  $1.82 \pm 0.36 \mu$  mol fruktoz/g Hb,  $82.0 \pm 7.11$  mg/100 ml,  $15.35 \pm 0.8$  g /dl bulunurken şeker hastalar grubu için bu değerler sırasıyla  $5.56 \pm 1.25 \mu$  mol fruktoz/g Hb,  $279.99 \pm 55.96$  mg/100 ml ve  $15.30 \pm 1.88$  g /dl olarak bulundu.

İstatistikî analizler diabetli hastalar grubu ile kontrol grubunun glikozillenmiş hemoglobin ve açlık kan şekeri değerleri arasındaki farkın önemli ( $P < 0.001$ ) olduğunu göstermiştir.

## ABSTRACT

In present study, Glycosylated hemoglobin, Fasting blood glucose and hemoglobin estimated in erythrocytes from 48 diabetes and 48 healthy subject.

By using a modified colorometric method, Glucose oksidase and Sahli method, Glycosylated hemoglobin, Fasting blood glucose and hemoglobin estimated in subject.

In non-diabetics the Glycosylated hemoglobin, fasting blood glucose and hemoglobin were found to be  $1.82 \pm 0.36$   $\mu$ mol fructoz/g Hb,  $82.0 \pm 7.11$  mg/100 ml, and  $15.35 \pm 0.8$  g /dl, respectively. In diabetes; these data were found to be  $5.56 \pm 1.25$   $\mu$ mol fructoz/g Hb,  $279.99 \pm 55.96$  mg/100 ml and  $15.30 \pm 1.88$  g /dl.

When evaluated statistically diabetes with controls between from this point of view glycosylated hemoglobin and fasting blood glucose differs in statistics ( $P < 0.001$ ).

## 1. GİRİŞ

Normal hemoglobine(HbA) glukoz bağlanmasına glikozillenme denir. Bu glikozillenmiş hemoglobin(GHb) veya HbA<sub>1c</sub> olarak bilinmektedir (1,2). Glikozilasyon reaksiyonu bimoleküler bir kondensasyon reaksiyonudur. Hemoglobin beta zincirindeki amino asit valinin-NH<sub>2</sub> grubu ile glukoz arasında bir Schiff bazı meydana gelir (3). Meydana gelen oldukça kararsız bu aldimin, Amadori düzenlenmesi ile kararlı bir yapı olan ketoamine (HbA<sub>1c</sub>) dönüşür(2). Biyokinetik bir model kullanılarak(1) aldimin oluşumunun ketoamin oluşumundan 60 kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik olmayan bu glikozilasyon reaksiyonu çok yavaş yürür. Ancak HbA<sub>1c</sub> sentezi eritrositin 120 günlük ömrü boyunca devam eder (4).

Normal bir insan eritrositinde bulunan hemoglobinler jel elektrokodaklama metoduyla veya kolon kromatografisinde ayrıldıklarında en hızlı yürüyen dört fraksiyona (Hb<sub>1a</sub>, Hb<sub>1b</sub>, Hb<sub>1c</sub>, Hb<sub>1a2</sub>) hızlı hemoglobinler denir. Bu hemoglobinlerden sadece HbA<sub>1c</sub> nin yapısı bilinmektedir. Glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) lerle normal hemoglobin (HbA) arasındaki tek fark NH<sub>2</sub> taşıyan amino asitlerin glukoz bağlanmış olmasıdır (2).

Hemoglobin glikozilasyonundaki artma kan glukoz konsantrasyonundaki artmayı, azalma ise eritrosit ömrünün kısaldığını göstermektedir (1).

Bu yüzden kan glukoz seviyesinin uzun süre yüksek ol-



duğu diabetli hastalarda HbA<sub>1c</sub> sentezi artmaktadır. Diğer taraftan eritrosit ömrünün kısa olduğu durumlarda (hemolitik anemi) glikozillenmiş hemoglobinin sentezi azalmaktadır (2). Gen eritrositlerde glikozillenme yüzdesinin normale göre düşük olması bu düşünceyi desteklemektedir (1).

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Glikozillenmiş hemoglobin (GHb) tayininde ilk kullanılan ve en eski metod, kolon kromatografisi SMİTH ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (2).

Mayer ve arkadaşları (5), Kolon kromatografik metodla elde edilen sonuçları destekleyen izoelektrik odaklama metoduyla hemoglobin ayırımını gerçekleştirmiştir.

Kunkell ve arkadaşları (6), Nişasta jel elektroforezine hemoglobin örnekleri tatbik ederek, hem yavaş ( $HbA_2$ ) hemde hızlı hareket eden ( $HbA_{1a1}$ ,  $HbA_{1b}$ ,  $HbA_{1a2}$ ,  $HbA_{1c}$ ) fraksiyonları gösterdiler.

Allen ve arkadaşları (7), Hemoglobin ayırımında Agar jel elektroforezi kullanarak tespitine gitmiştir.

Javid ve arkadaşları (8), Immunoassay metodunu, Malli ve arkadaşları tarafından önerilen bir başka metod, Affinite kromatografisidir (2).

Gallop ve arkadaşları (9), tarafından geliştirilen fotometrik metod; glikozillenmiş proteinlerin periyodat oksidasyonu sonucu meydana gelen formaldehid miktarının tayinine dayanan bir metoddur.

Bakan ve arkadaşları (2), Bu çalışmamızda kullandığımız metod olan kolorimetrik metoda uygun bazı değişiklikler yaparak geliştirmişlerdir.

Bakan ve arkadaşları (2) Erzurum ve çevresinde sağlam şahıslarda glikozillenmiş hemoglobinin değerleri üzerine araştırmalarında Hidroksimetil furfuraldehid indeksi  $2.79 \mu\text{mol}$  Fruktoz/g<sup>r</sup>. Hb olarak tespit edilmiştir.

Glikozillenmiş hemoglobin değeri üzerindeki çalışmalar daha ziyade Diabetes mellituslu hastalarda yoğunluk kazanmıştır.

Yıldırım (10) , Şeker hastalarında ve sağlam şahıslarda yaptığı çalışmada glikozillenmiş hemoglobin ve glikozillenmiş karbonik anhidrazın değerleri sırasıyla:  $0.80 \pm 0.11$ ,  $2.29 \pm 0.90$  mol Fruktoz/g . Hb ve  $3.03 \cdot 10^4 \pm 0.53 \cdot 10^4$ ,  $6.38 \cdot 10^6$  mg Fruktoz/mg protein olarak bulmuştur.

Bakan ve arkadaşları (11), Uzun süreli Hiperглиsemia ve sağlam şahısların glikozillenmiş hemoglobin ve glikozillenmiş tırnak değerleri üzerindeki araştırmalarında hiperглиsemi aların  $5.71 \pm 1.17$  mol Fruktoz/g . Hb ve  $16.0 \pm 7.35$  mol Fruktoz/mg tırnak bulunurken kontrol grubu için bu değerler  $2.24 \pm 0.45$  mol Fruktoz /g . Hb ve  $8.35 \pm 2.7$  mol Fruktoz /mg tırnak olarak bulunmuştur.

Eryılmaz ve arkadaşları (12), Diabetlerde glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) ve Göz ilişkileri çalışmalarında diabetlilerde glikozillenmiş hemoglobin %  $11.3 \pm 4.6$  kontrol grubunda bu değer %  $4.9 \pm 2.3$  mg<sup>r</sup> /Hb olarak bulunmuştur.

Yarat (13), STZ ile diabet oluşturulan sıçanlarda HbA<sub>1c</sub> değeri %  $14.41 \pm 2.16$  bulunurken kontrol grubu için bu değer %  $9.71 \pm 1.76$  olarak bulunmuştur.

Rahbar ve arkadaşları (14), yapmış oldukları çalışmalarda nadir hemoglobinlerin özellikle glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in özelliklerini taşıdığı ve hastalarda normallere göre iki katlık bir artış meydana geldiğini gösterdiler.

Bu literatür bilgilerden anlaşıldığı gibi yapılan araştırmalarda yüksek kan glukoz konsantrasyonunun sonucu olarak glikozillenme ürünü olan, glikozillenmiş hemoglobin değerinin normallere oranla daha yüksek olduğu kararına varılmıştır.

Bu araştırmanın amacı şeker hastalarda kan şekeri takibinde glikozillenmiş hemoglobinin bir ölçü olup olmadığını araştırmaktır.

### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. Şeker Hastalığı

Diabetes mellitus, tam veya nisbi bir insülin eksikliğinden ileri gelme kronik hiperglisemi ve glukozüri ile ilgili bir hastalıktır. Hastalık metabolik ve anatomik bozukluklarla ağırlaşabilen kronik bir hastalıktır. Bu metabolik ve anatomik bozukluklar arasında hiperkolesterolemi, ağırlık kaybı, kangren, gözde patolojik değişimler, böbrek hastalığı ve koma vardır. Ancak diabetlilerin çoğunda, hasta tedavi edilmesseler bile bu komplikasyonlar görülmez. Bunlarda hastalık hafiftir ve gittikçe daha da hafifliyebilir. Fakat her hakiki hasta vakasında infeksiyon, yara, şişmanlık, stres ve az tavsif edilmiş diğer arızalar yukarıdaki komplikasyonlardan bazılarını meydana getirirler ve bunlarda hastayı zayıf veya halsiz bir hale getirir ve ölüme kadar götürür. Bu da şeker hastalığı teşhisinin, belirtilerinin önemsiz oldukları zamanda da, neden önemli olduğunu ve sağlık hayat sigortalarının neden bu hastalığın teşhisine bu kadar önem verdiklerinin sebebini göstermektedir. Hastalık dışı sebeplerden ileri gelen hiperglisemi ve glukozüri bu çeşit patolojik hollere musait bir durum oluşturmaz (15).

#### 3.2. Hemoglobin

Hemoglobin, metaloporfirin halkasına sanip bileşik

bir kromoproteindir. Prostetik grubu hem, proteini globindir. Bir hemoglobin molekülünde dört demir iyonu (yaklaşık %33 kadarı demir) bulunur. Molekül ağırlığı yaklaşık 68.000 dir. Fakat hemoglobin tek bir protein molekülünden ibaret değildir. Her birisi 17000 molekül ağırlığında olan dört peptid zincirinden meydana gelmiştir. Her peptid zinciri hem adı verilen bir ferröz demir ve proporfirin bileşiği (ferrotoporfirin) ile bağlı haldedir. Ferröz demir protoporfirin molekülünde yer alan dört pirol halkasının azot atomları ile dört valanslı bir koordinasyon kompleksi meydana getirir. Halbuki ferröz ve ferrik haldeki demirin altı valanslı bir koordinasyon yapma eğilimleri vardır. Bu yüzden hem iki koordinasyon grubu ile daha bağlama yeteneğindedir. Başta  $O_2$ , HCN, CO olmak üzere oksijen ve azotun elektriksel olarak nötral halde bulunan grupları ile birleşebilir. (16,17).

Hemoglobindeki protein kısmı olan globin, basit proteinlerden olan histonlar alt sınıfına ait olup fazla miktarda bazı amino asitler (özellikle histidin) içerir. Hemoglobin  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olarak dört polipeptid zincirinden ibarettir (19,20).

Hemoglobin bu dört polipeptid zinciri birer hem grubu ile birleşmiştir. Yani bir hemoglobin molekülünde dört tane hem vardır. Bu dört hem ve polipeptid zincirleri kovalent olmayan bağlar (Hidrojen bağları, diğer Vander Waals kuvvetleri) ile bir arada tutularak belirli bir konformasyon meydana gelir (16, 19).

İnsan hemoglobninde bulunan alfa, beta ve gamma

zincirlerinin amino asit sayıları ve sırası tespit edilmiştir. Alfa zincirinde 141 tane beta, gamma ve delta zincirlerinde ise 146'şar tane amino asit mevcuttur. Çeşitli hemoglobin tipleri arasındaki fark, amino asit zincirleri ve bu zincirdeki amino asit cins ve sırasındaki meydana gelen ufak değişikliklerden ileri gelir (16,20).

Hemoglobinin yapısına giren hem porfirinler sınıfına dahildir. Porfirinler genel olarak, 4 tane metil grubu veya meten köprüsü ile birbirine bağlı 4 piroal halkasından meydana gelmiş porfirin halkasını ihtiva eder. Piroallerin halka dışında kalan köşelerindeki 8 karbon atomu porfirinin türüne göre farklı yan zincirler bulunur. Her piroalde, bu yan zincirlerden biri kısa diğeri ise uzundur (19).

Bu dört yan zincirin dizilişine göre dört grup porfirin halkası bulunması gerekir. Ancak kainatta I. ve II. gruplar bulunmaktadır (19,20).

Başlıca porfirinler şunlardır:

- a- Koproporfirinler (I ve II )
- b- Uroporfirinler (I ve III )
- c- Protoporfirin ( III )

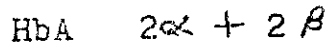
Koproporfirin(I ve II), küçük takıları 4 metil grubu ve büyük takıları ise 4 piropiyonik asit ihtiva eder. Bu sebeple koproporfirinler üroporfirinlere göre daha az asididirlere (20).

Uroporfirinler(I veIII),piroallerdeki küçük takılarını 4 asetik asit ve büyüklüklerini 4 piropiyonik asit teşkil eder. 8 karboksil yüzünden reaksiyonu en asidik olan bu porfirindir(20).

Protoporfirin(III) pirollerindeki takılarında küçükler 4 metilden ve büyükler ilk iki pirolde vinil (-CH-CH<sub>2</sub>)'ler ve diğerinde propiyonik asidlerden yapılmıştır(20).

Normal insan iki yada üç türlü hemoglobin vardır. Birisi, en büyük miktarda (total hemoglobinin %85-90'ı kadar) bulunan hemoglobin-A (hemoglobin A yada hemoglobin A<sub>1</sub>) ve diğer ikisi ise daha az miktardaki hemoglobin A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) (total hemoglobinin %2-3'ü) ve hemoglobin F (HbF) (totalin % 2-3) dir. Normal yetişkin hemoglobini olan HbA<sub>1</sub> normal fetus hemoglobini HbF ve yine normal insan hemoglobini HbA<sub>2</sub> molekülleri dördür polipeptid zincirinden yapılmıştır(16,20,21,22).

Bu zincirler her hemoglobin tipinde hepsi birlikte bulunmayan dört ayrı polipeptid zinciridir.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  adını alan bu zincirler hemoglobin tiplerine göre şu şekilde dağılmıştır.  $\alpha$  zinciri, bütün insan hemoglobinlerinde mevcuttur. Bundan başka hemoglobin A (A<sub>1</sub>) da 2 tane, hemoglobin F'de 2 tane  $\beta$  ve  $\gamma$ , hemoglobin A<sub>2</sub> de ise 2 tane  $\delta$  polipeptid zinciri mevcuttur. Hulasa



Bu dört zincirin tipik amino asit diziliş sıraları bazı araştırmacıların gayretiyle tespit edilmiştir(16,19,20,23, 25 ).

$\alpha$ -peptid zinciri: N-ucunda valin, lösin ile başlar 141 aminoasit kalıntısı kapsar. Molekül ağırlığı 15750 dir(20).

$\beta$ -Peptid zinciri: N- ucunda valin, histidin, lösin



ile bağlar. 146 amino asit kalıntısı ihtiva eder. Molekül ağırlığı 16500 dir (20).

Hemoglobin-A'nın  $\beta$ -peptidinin ve hemoglobin A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>)'nin  $\delta$ -peptidinin bileşimleri büyük bir benzerlik gösterir. Başlıca fark  $\beta$  peptid zincirinin 16. amino asidi glisin,  $\delta$  peptid zincirindeki ise arginindir.

Hemoglobin-F (HbF) nin  $\gamma$ -peptid zinciride,  $\beta$ -peptid zincirine benzer, yalnız 6. amino asidi ondan farklı olarak, lizindir.

Hemoglobin-F nin  $\alpha$ -sının da aynı yerdeki bir amino asidi farklı iki tipi (136. da, birinde glisin birinde alanin) bulunmuştur.

Yukarıda ifade edilen bu çeşitlerden başka birde hemoglobin A<sub>3</sub> (HbA<sub>3</sub>) vardır. Bu hemoglobin A<sub>3</sub> ün glutasyonla oluşturduğu bir komplekstir ihtiyarlanmış eritrositlerde rastlanır. Demir eksikliğinde ve diabetlerde artar (17,19,20, 23).

### 3.2.1. Hemoglobin Metabolizması

Hemoglobin, yetişkin insanda özellikle kemik iliğinde sentezlenir, halbuki fötüslerde; karaciğerde ve bir kismida başka dokularda yapılır (20).

Hemoglobin sentezinde, ilk basamak prostetik grubu olan hem'in teşekkülüdür. Hem sentezi eritroblastlarda ve sınırlı bir biçimde retikülositlerde olur. Olgun eritrositlerde mitokondri olmadığı için hem sentezi olmaz. Kemik iliğinin olgunlaşmamış eritrositlerinin mitokondrilerinde oluşmuş protoporfirin ya doğrudan doğruya dolaşımila bu hücrelerin zarları-

na kadar transferrinin getirdiği demiri ferro halinde veya aynı hücrelerde depolanmış ferritin demirini dolaylı olarak ferro halinde alır. Demirin protoporfirinin içine yerleşmesi yir mitokondride bulunan hem sentetaz yada ferro ketalaz yardımıyla olur (20).

Hulasa: hem sentezinin öncül maddeleri glisin ve söksinil CoA dır. Bir kaç ara basamaktan sonra protoporfirin-IX oluşur. Protoporfirin-IX'un  $Fe^{2}$  ile yaptığı komplekse "hem" denir (20,25).

Hemoglobin sentezinde ikinci basamak globin sentezidir. Globin sentezi, hem sentezi ile senkron olarak genç eritroblastlarda ve retikulusitlerde son bulur. Globin fakir bazı aminoasidlerce zengindir(Lizin %8-10, Histidin %7-6, arginin %3-6 ve Lösin %3-6) izoelektrik noktası  $p^H$  6.9- 7.0arasındadır(19,21).

Globin hem sentezi için gereklidir. Çünkü demirin protoporfirine bağlanması için globine ihtiyaç vardır(5).

İzotopla işaretlenmiş amino asitlerle ve elektron mikroskopu altında hemoglobin sentezi incelenmiştir. Buna göre sentez olan hemoglobinin strüktürünü ayarlayan bilgi çekirdeğin DNA'sındadır. Bu genetik bilgi protein sentez yeri olan ribozomlara mRNA ile iletilir. mRNA ribozomlarla birleşerek onları protein sentezi için yeterli hale getirir (18,20,26).

Hemoglobin olgunlaşması dört devrede meydana gelir.

I. olgunlaşma devresinde globin meydana gelir.

II. olgunlaşma devresinde globin artarken nükleik asit azalır;

III. olgunlaşma devresinde hemoglobin sentezi başlar.

IV . devrede en yükseye erişir (26).

Hemoglobin, erişkin insanda hususan kemik iliğinde, halbuki fütüste karaciğerde ve bir kısımda dalak gibi başka dokularda yapılır. Yetişkin bir insanda hemoglobin oluşumu için gerekli hem ve globin birbirine uygun miktarlarda günlük olarak yapılır. Her gün 8 gram globin 280 mg porfirin ve 27 mg demirin yenilendiği tespit edilmiştir. Böylece mevcut globinin %0.8-1'i hergün yenilenir demektir(20).

Hemoglobin sentezi eritroblastlarda başlayarak retikulosit evresine kadar, hatta hafifde olsa bile bu evrede de devam eder. Retikulositler kemik iliğini terkedip, dolaşım kanına atıldıktan sonra bir yada daha uzun bir süre, az miktarda hemoglobin yapımını sürdürürler(24).

Hemoglobin 4 tane "hem" in demirleriyle bir globin molekülünün histidinlerinin imidazol azotlarına bağlanmalarından oluşur. Hemoglobin yapımında esansiyel amino asitler ve demirin sağlanması esastır. Bakır, Vitamin-B<sub>12</sub> ve folik asit de bu sentezde yardımcı faktörler olarak görev alırlar (17,20, 23 ).

İzotopla izleme çalışmalarında hemoglobinin hem bölümünün, başlıca asetik asit ve glisinden sentez edildiği ve bu sentezin büyük kısmının mitokondrilerde geçtiği bilinmektedir ( 24).

### 3.2.2. Hemoglobin yıkımı

Hemoglobin eritrositler içerisinde kemik iliğinden do

laşına geçişinden eritrositlerin ömrü olan 120- 130 gün sonra retikulo-endoteryal sistem hücrelerinde yıkılırlar. Bu hücreler özellikle karaciğerde, dalakta ve kemik iliğinde bulunurlar(16,20).

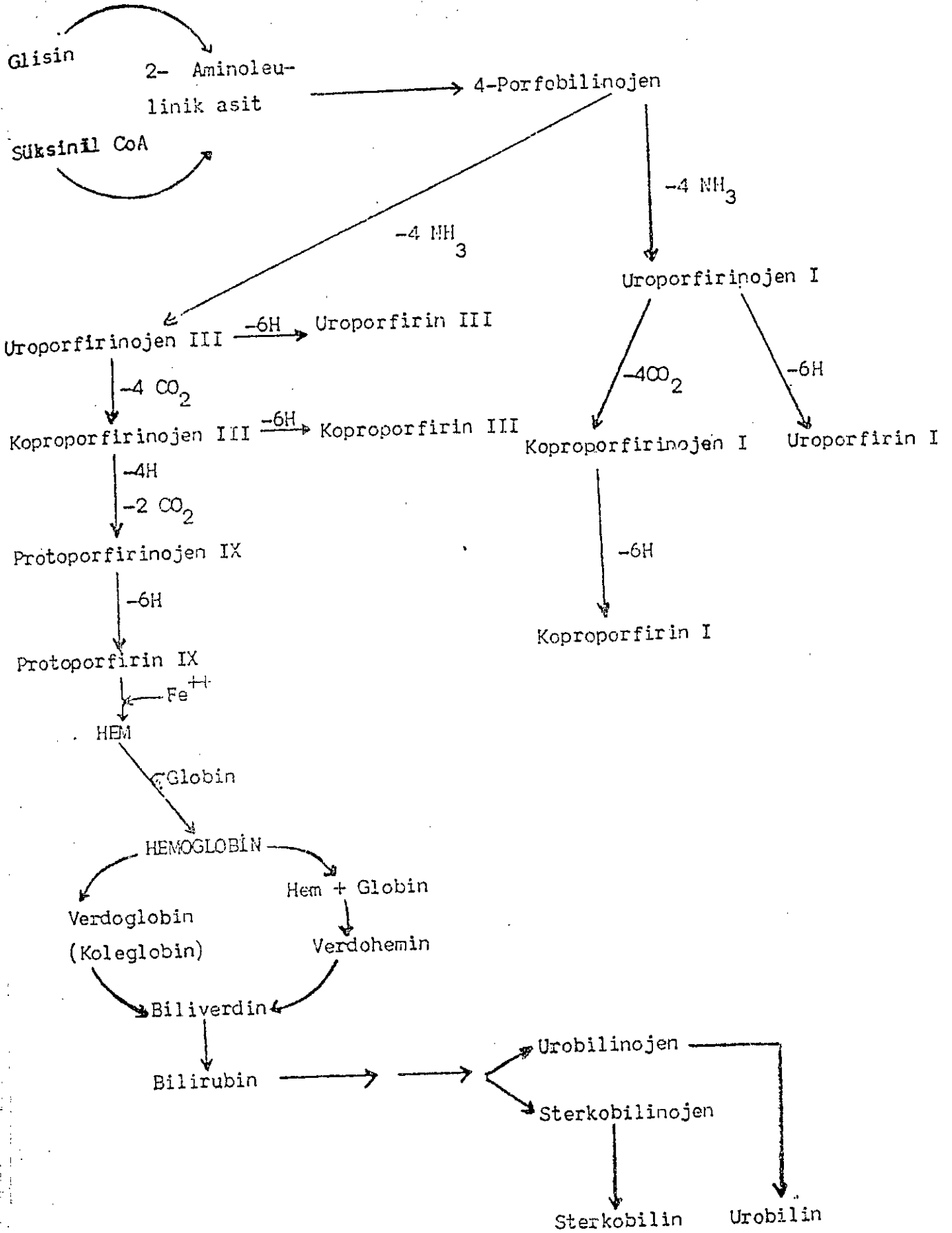
Hemoglobin zikredilen bu hücrelerde, özellikle karaciğerde yıkılırlar. Önce hemoglobinin hem kısmı porfirin halindeki  $\alpha$ -metin (=  $\alpha$ -metin) köprüsünün hemoksijenaz kataliziyle yıkılması ve bunun C- atomunun uzaklaşması sonucu açılır ve demir-biliverdinglobin'den oluşmuş yeşil renkli bir madde meydana gelir. Bu koleglobin=verdohemoglobindir(7).

Verdohemoglobinden demir ayrılır, bunun üzerine, globin ve biliverdin eçığa çıkarlar ( 20).

Bazılarına göre ise, bir monoksijenaz yani karma fonksiyonlu bir oksidaz olan hem-oksijenaz etkisiyle alfa metin köprüsünün oksitlenmesi birden ileri gider. Alfa metin köprüsünün karbonu  $CO_2$  haline dönerken hem'deki A ve B pirol halkarında hidroksillenir ve biliverdin  $Fe^2$  globin ayrılırlar(8).

Daha sonra tetra pirol zincirinin ortasındaki  $\gamma$ -metin (metin) köprüsü bilirubin redüktaz (kofaktörü NADH yada NADF) etkisiyle indirgenerek turuncu renkli bilirubin ortaya çıkar(16, 20).

Yapılan hesaplara göre bir gram hemoglobinden ancak 35 mg kadar bilirubin oluşur. Oluşan bilirubin, anerobik barsak bakterilerinin etkisiyle çeşitli derecede indirgenmiş bileşiklere dönüşürler. Ürobilin, Sterkobilin, Ürobilinojen, Sterkobilinojen vs dir(16,20).



ŞEKİL 1: HEMOGLOBİN METABOLİZMASI VE YIKIMI

### 3.2.3. Hemoglobin Glikozilasyonu

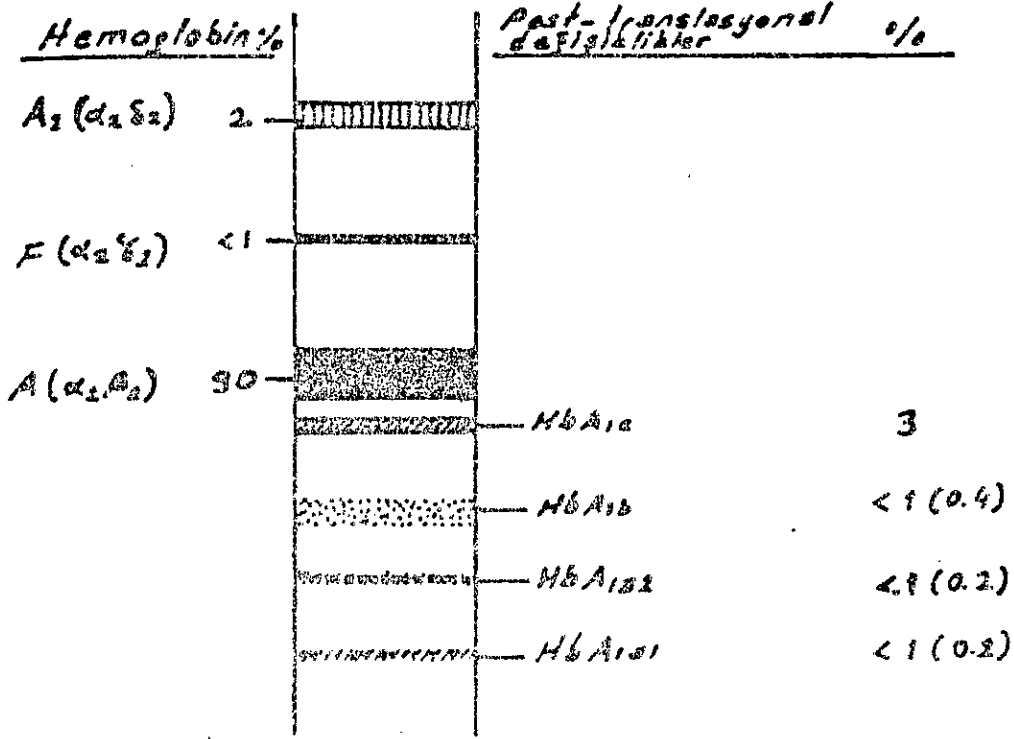
Hemoglobinin glukoz bağlanmış şekline glikozillenmiş hemoglobin veya HbA<sub>1c</sub> denir. HbA<sub>1c</sub> de beta zincirinin NH<sub>2</sub>-terminal valin amino asidine bir hekzozun (veya bir hekzoz fosfatın ) bağlı olduğu (4,8,27) tespit edilmiştir.

Uzun süreli yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına maruz kalan dokularda çeşitli proteinler glikozillenmektedir. Bunlar arasında hemoglobin, bazal membran proteinleri, kollojen, hücre membranındaki proteinler, albumin ve dolağımdaki diğer proteinler sayılabilir(12).

Yüksek kan glukoz seviyelerinin, şeker hastalarında sebep olduğu komplikasyonları araştırmak için proteinlerin non-enzimatik glikozilasyonu üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır (5). Yapılan bu araştırmalardan, Hemoglobinin glikozilasyonu son derece önem arz etmektedir. İlk olarak 1955 yılında Kunkel ve Wallenius nişasta jel elektroforezine hemoglobin örnekleri tatbik ederek hızlı yürüyen minor bir hemoglobin tespit ettiler(6). Daha sonra Allan ve arkadaşları(7), 1958'de hemoglobin A (HbA), heterojen hızlı bir fraksiyon elde edecek şekilde, katyon değıştirici kullanarak bunlara A<sub>1a</sub> (HbA<sub>1a</sub>) , hemoglobin A<sub>1b</sub> (HbA<sub>1b</sub>) ve hemoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) olarak isimlendirdiler. 1961 yılında Schneck ve Schroeder bu üç hızlı fraksiyon, hızlı elektroforelik fraksiyonda yer aldığını 1962 de Huisman ve Dozy ise karboksimetil sellölüz kolonlarının bu hızlı hemoglobini üç fraksiyona ayırabildiğini gösterdiler. Bu hızlı hemoglobinlerin herhangi bir öneme sahip olup olmadığını 1968'e kadar anlayılamamıştır(4).

Bunlar normal şahıslardaki değerleri toplam hemoglobinin %5'i olarak sırasıyla 0.2,0.2,0.4, 3 dür(8).

Jel elektrotlama metoduna göre normal eritrositler içerisindeki hemoglobin şekil-2' de gösterilmiştir.



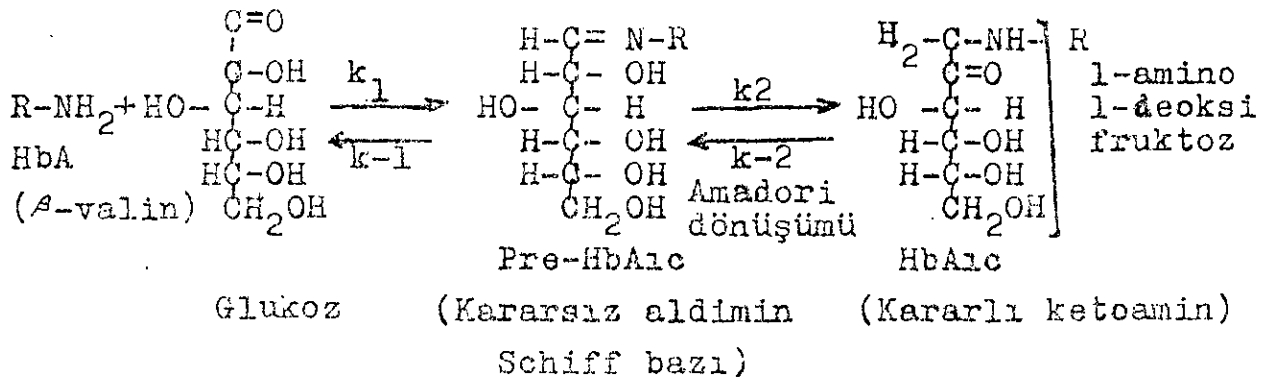
ŞEKİL-2

Bu fraksiyonlar, hemoglobinin (HbA) translasyon sonrası nonenzimatik glikozillenmesi sonucu teşekkül ederler. Glikozilasyon Hb'nın  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirindeki bazı amino asitler (valin, Lizin gibi)'in amino grubları ile olabilir. Ancak pH-7 civarında kromatografik bir fraksiyon halinde tespit edilebilecek uygun pH değerine sahip olan HbA<sub>1c</sub> dir(8).

HbA<sub>1c</sub> de beta zincirinin NH<sub>2</sub> - terminal valin amino asidine bir heksozun(veya bir heksoz fosfatın) bağlı olduğu tespit edilmiştir(4,8,27). Boekin ve Gallop bağlanan grupların heksozlardan ibaret olduğunu ve hemoglobin tetrameri ba-

şına iki molekül bağlandığını, yani her  $\alpha, \beta$  dimeri başına bir heksozun ve bir heksoz fosfatın bağlı olduğunu göstermişler. Aynı çalışmalarla, glikozillenmenin ketoamin bağıyla kararlı yapıyı kazandığı gösterilmiştir (4).

Reaksiyonda glikoz ile HbA<sub>1</sub>'in kararsız bir Schiff bazı meydana gelir. Buda "Amadori dönüşümü" (28) ile kararlı bir yapı olan HbA<sub>1c</sub> (ketoamin)'ye dönüşümsüz olarak dönüşür. Toplu reaksiyon ve denge sabitleri şekil-3 de gösterilmiştir (4,5,8).



Şekil-3 Hemoglobinin Glikozillenme reaksiyonları (R-hemoglobin  $\beta$  zinciri ;  $k_1 = 0.096 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$   $k-1 = 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_2 = 14.2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ;  $k-2 = 1.7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  )

Bu reaksiyon dizisinde birinci basamağın ikinci basamaktan 60 kat daha hızlı olduğu bilinmektedir (8,27). Diğer taraftan biyokinetik bir model kullanılarak HbA<sub>1c</sub> oluşum reaksiyon hız sabitine bir yaklaşım sağlanmıştır(4,8,28).

Hemoglobin A<sub>1</sub>'in şeker fosfatları ile olan reaksiyonları (4,29,30) glukoz ile olan reaksiyonlarına rağmen daha hızlıdır. Ancak bunlar dönüşümlüdürler ve HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1a2</sub> ve HbA<sub>1b</sub> yapısına girerler. Diğer taraftan şeker hastası eritrosit-



lerinde bu üç hemoglobinin türünün hiç bir zaman yükselmediği tespit edilmiştir (4,8).

HbA<sub>1c</sub> nin eritrositlerin 120-130 günlük ömrü boyunca sentezlendiği [<sup>59</sup>Fe] transferrin verilen bir kişiden alınan kan örneklerinin analizleriyle anlaşılmıştır(4,29). Seri halde belli aralıklarla 120 gün süreyle alınan numunelerde devamlı olarak hemoglobin -A<sub>1c</sub>(HbA<sub>1c</sub>)'in artması glikozillenme reaksiyonlarının eritrositlerin ömrü boyunca yavaş yavaş devamlı non-enzimatik ve dönüşümsüz bir reaksiyon olduğu fikrine götürmüştür. Bunu teyit eden bir başka hususta genç eritrositlerde HbA<sub>1c</sub> nin düşük bulunması ve hemolitik anemilerde düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiş olmasıdır(8,29).

Hemoglobin glikozilasyondaki artma kan glukozu konsantrasyonundaki artmayı, azalmada eritrosit ömrünün kısalığını göstermektedir (2). Bu bakımdan, kan glukoz seviyesinin uzun süre yüksek olduğu şeker hastalarında HbA<sub>1c</sub> sentezi artmaktadır. Diğer taraftan, eritrosit ömrünün kısa olduğu durumlarda (hemolitik anemi) glikozillenmiş hemoglobin (GHb) sentezi azalır (1). Genç eritrositlerde GHb yüzdesinin normale göre düşük olması (2) da bu fikri teyit etmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) normal şahıslarda total hemoglobininin %3-5'ini, diabetlilerde ise %15'ini teşkil eder. Ayrıca diabetin tipi ile ilgili olarak araştırılmada (12) insüline bağımlı ve normal erişkin hastalarda yaklaşık elde edilmiş olması yukardaki genel ifadeği teyit etmektedir.

Aynı zamanda hastalığı, 30 yaşından sonra başlayanlarda HbA<sub>1c</sub> değeri ile diabeti 30 yaşından sonra başlayanlar arasın-

da önemli bir fark gözlenmemiştir (12).

### 3.2.4. Hemoglobin Glikozilasyonuna Etki Eden Faktörler

Hemoglobin glikozillenmesine etki eden faktörlerin başında glukoz konsantrasyonu, Anormal hemoglobinler, Aspirin, Hemoliz, Üremi ve Gebelik sayılabilir.

#### 3.2.4.1. Glukoz Konsantrasyonu

Hemoglobin glikozilasyonu reaksiyonlarında glukoz konsantrasyonunun yüksek olmasının büyük etkisi vardır. Geçici ve ani glukoz seviyesi yükselmeleri, kararsız aldimin yapısındaki glikozillenmiş hemoglobin (GHb); yükselirken, uzun süreli yüksek glukoz konsantrasyonu kararlı keto amin formuna (HbA1c) yükselmektedir (4,5,8).

#### 3.2.4.2. Anormal Hemoglobinler

Diğer hemoglobinler, glikozillenmiş hemoglobin tayininin doğru olarak yapılmasında bazı yanlışlıklara sebep olabilir. Meselâ bir çok hematolojik hastalıklarda ve gebelikte yükselen HbF (fötal hemoglobin), bütün kromatografik metodlarda, hızlı hemoglobinler'le (HbA1a<sub>1</sub>, HbA1a<sub>2</sub>, HbA1b ve HbA1c) birlikte yürür. HbH, HbS ve Hbc için'de aynı şey söylenebilir. HbH glikolizilasyonunda yüksek değerler gösterirken, HbH ve HbC düşük değerlerin tespit edilmesine yol açar. Glikozillenmiş hemoglobin (GHb) tayini, yıkanmış eritrosit süspansiyonundan hemolizat hazırlanarak yapılmaz ve numune olarak total kan kullanılırsa, sarılıklı kan örnekleri yanlış neticelere sebep olur. Çünkü, bilirubin hızlı hemoglobinlerle

birlikte ortak bir parça teŖkil eder (4,5,8).

#### 3.2.4.3. Aspirin

Aspirin hemoglobini asetiller. AsetillenmiŖ hemoglobin hızlı hemoglobinlerle aynı elektroforetik hareket düzeyine sahiptir. Elektroforetik metodda ortaya çıkan bu yanlıŖlık, hastaların yüksek dozda aspirin almaları engellenerek nlenebilir (4,5,8,12,31).

#### 3.2.4.4. Gebelik

Gebelięin 20. haftasından sonra glikozillenmiŖ hemoglobinin normale göre azaldığı (8,12) ve gebelik sonuna kadar devam ettiği (5) tespit edilmiŖtir. Normal gebelikteki glikozillenmiŖ hemoglobin miktarındaki bu azalma gebelikte glukoz üretimi azalır ve ikinci üç aylık dönemde eritrosit (eritropo- ez) artar. Genç eritrositlerde glikozillenmiŖ hemoglobinin dŖk olması'da bunu destekler (4,8).

#### 3.2.4.5. Üremi

Bazı araŖtırmacılar (5,32) remide glikohemoglobin ve HbA<sub>1</sub> seviyelerini yüksek tespit etmiŖlerdir. Ancak yüksekliğin hemoglobin glikozillenmesinden ileri gelmediğini anlaŖılmıŖtır. Bu yüksek değer hemoglobin karbomilasyonundan ileri gelir. Çünkü bu hastalarda üre spontan olarak amonyak ve siyonata ayrılır (4,5,8).

#### 3.2.4.6. Hemoliz

Eritrosit ömrünün kısa olduğu patolojik durumlarda dŖk hemoglobin glikozilasyonu gözlenir. Bu nakilde verilen hemoglobin nispetinde glikozillenmeği arttırır. Tersine daladığı

çıkarılmaya (Splenekтоми) muteakip artan eritrosit ömrü ile birlikte HbA<sub>1c</sub> konsantrasyonunda yükselme görülür(4,32).

### 3.2.5. Glikozillenmiş Hemoglobin ve Klinik Önemi

Uzun süre yüksek kan glukozu seviyelerine maruz kalan dokular üzerinde glikozillenme reaksiyonlarının çok önemli fizyolojik etkileri olmaktadır. Bu sebepten vucutta çok çeşitli proteinler glikozillenmektedir. Bazal membran proteinleri hücre membranındaki proteinler, kollojen, albumin ve dolaşımdaki diğer proteinlerdir (29). Bu proteinlerin glikozillenmesi ile diabetin mikro ve makro damar ihtilatları arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Ancak tam anlaşılmamıştır ve araştırmaya açık bir konudur.

Hemoglobin glikozillenmesinin non-enzimatik reaksiyonlarına ait hız iki reaktifin konsantrasyonuna bağlıdır; Glukoz ve hemoglobin, Hemoglobin konsantrasyonunun hemen hemen sabit kaldığı kabul edilirse, Glikozillenmiş hemoglobin oluşum hızının uzun süre değişen glukoz konsantrasyonu tarafından belirlendiği söylenebilir. Geçici ve ani glukoz seviyesi yükselmeleri ise glikozillenmiş hemoglobin seviyelerine hemen hemen hiç etki etmez (2,8).

Ditzel ve Kjaerdgaard (33), bir şeker hastasının kan glukozu kontrol altına alındıktan sonra glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) seviyelerinin yavaş yavaş düştüğünü gösterdiler. Kan glukoz seviyeleri ile glikozillenmiş hemoglobinin arasında (2,4) ve glisemi (Açlık kan şekeri, serum trigliseridleri) ile Glikozillenmiş hemoglobin (29) arasında önemli bir korelasyon tespit edilmiştir.

Bu glikozillenmiş hemoglobinin yüksek kan glukozu konsantrasyonlarına cevap verdiğini göstermektedir.

Svendsen ve arkadaşları (34), şeker hastası ve normal şahıslardan aldıkları kanı yedi saat süreyle değişik glukoz konsantrasyonlarında inkübe ederek, artan glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak glikozillenmiş hemoglobin sentezinin arttığını müşahade ettiler.

Bazı araştırmacılar (2,35), kan glukozunun yükselmesinden hemen sonra glikozillenmiş hemoglobin seviyelerinde de yükselme kaydederek ve bunun kararsız Schiff bazından ileri gelmemiş olduğunu ve kararlı ketoamin grubundan dolayı olamayacağını gösterdiler.

Glikozillenmiş hemoglobin normal şahıslarda, normal hemoglobinin %5 ini diabetlilerde ise %15 ini oluşturmaktadır (4,8).

Glikozillenmiş hemoglobinin hemoglobin-A ile aynı amino asit sırasına sahip olduğu Helinquit ve Schroeder tarafından gösterilmiştir. Bun ve arkadaşları ise HbA<sub>1c</sub> nin glukoz ucunun 1-amino-1-dezoksi-fruktoz olduğunu belirtmişlerdir (4,29).

Hastalarda glikozillenmiş hemoglobin sentezi normal kişilerdekinden 2.7 kat daha hızlıdır (11). Glikozillenmiş hemoglobinden sadece HbA<sub>1c</sub>, diabetlilerde yükselir. Diğer fraksiyonlar aynı kalır. Diğer bir ifade ile HbA<sub>1c</sub> gliseminin bir ölçüsü olabilir (4).

Glikozillenmiş hemoglobinin önemi kendini şimdilik şeker hastalarında göstermektedir. Hastalığın tedavisi kan glukozu kontrol

altına alınmasına ve uzun süre sonra ortaya çıkacak mikro ve makro damar komplikasyonların önlenmesine yöneliktir. İyi bir glisemik kontrolün, mikro damar komplikasyonları önlenebileceği fikri halen korunmaktadır (4).

İyi bir kan glukozu kontrolü esastır. Kalitatif idrar glukozu ölçümü günlük kontrol için iyi bir vasıta olmasına rağmen, aynı anda alınan kan glukoz seviyeleri ile uygunluk göstermeyebilir (29). İyi bir kan glukoz kontrolü açlık kan şekeri, idrarda kalitatif tayini ve 24 saatlik idrarda kantitatif tespiti ile gerçekleştirilmektedir (4). Artık son zamanlarda, diabetlilerde kan glukozunun kontrolü için glikozillenmiş hemoglobinin ölçümünün kullanılması üzerinde durulmaktadır (4,8, 29).

Hiperglisemiye bağlı olarak diğer doku proteinlerinin de glikozillendiği bilinmektedir (8,29). Bu protein glikozilasyonu, şeker hastalığı arızalarını araştırmada da yardımcı olabilir (8,36).

Şeker hastalarında normal kişilere oranla daha fazla hemoglobin glikozillenmesi, eritrosit karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluk ile ilgili değildir. Çünkü normal bir kişiden alınan eritrositler şeker hastasına verildiğinde hemoglobin glikozillenmesi 2.7 kat artmıştır. Diğer taraftan normal kişiye verilen hasta eritrositlerinde şeker hastalarına oranla daha az bir glikozillasyon tespit edilmiştir. Buna dayanarak glikozillenmiş hemoglobin oluşumunda en önemli faktörün kan glukoz konsantrasyonu olduğunu söylenebilir (36).

Hemoglobin -A<sub>1c</sub> ilk keşfedildiği yıllarda bunun hasta-

lar için bir genetik işaretçi olabileceği düşünüldü. Daha sonraki çalışmalar (29) durumun zannedildiği gibi olmadığını göstermiştir.

Trivelli ve arkadaşları (37), şiddetli enfeksiyonu olan şeker hastalarında glikozillenmiş hemoglobin konsantrasyonunu yüksek bulunmuştur. Bunun daha önce metabolik kontrolün bozulmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), iyi bir metabolik kontrol indeksi olabileceği açıktır. Ancak, glikozillenmiş hemoglobin teşekkül hızı, eritrosit ömrü, Pre-HbA<sub>1c</sub> (Prehemoglobin-A<sub>1c</sub>) nin metoda bağlı olarak HbA<sub>1c</sub> diye tayin edilmesi, anormal hemoglobinler, ilaçlar, üremi ve gebelik gibi çeşitli durumlar glikozillenmiş hemoglobinin tayin ve yorumunda bir dizi problemler olarak karşımızda durmaktadır.

#### 4. MATERİYAL VE METOD

##### 4.1. MATERİYAL

Araştırma materyalimizi Van merkezindeki hiç bir klinik şikayeti bulunmayan 48 sağlıklı ve 48 şeker hastası oluşturdu.

##### 4.1.1. Numune Toplanması

Araştırmamızda yer alan şahıslardan %10'luk EDTA'lı tüplere 3 ml kadar 96 (48 şeker hastası 48 sağlam şahıs) kişiden açlık kanı, alındı. Çalışma materyalimizin dağılımı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	Vak'a sayısı
Şeker hastası	48
Kontrol grubu	48
T O P L A M	96

Alınan bu kan örneklerinde hemen Sahli metoduna göre hemoglobin tayini yapıldı. Numuneler 800xg' de 10 dakika (8) santrifüj edildi. Plazmaları ayrıldı. Sigmanın klorimetrik glukoz oksidaz (38), metoduna göre kan şekeri tayin edildi. Eritrositler oda sıcaklığında serum fizyolojik su ile üç defa yıkandı. Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) bu kandan izole edilen eritrositlerde yapıldı.

##### 4.2. METOD

Araştırmamızda, Parker ve arkadaşları(39) nın geliştirdi-



rilip, Bakan ve arkadaşları (2) tarafından küçük modifikasyonlar yapılarak geliştirilen "Glikozillenmiş hemoglobinin klorimetri tayini" metodunu kullanıldı.

#### 4.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullandığımız kimyasal maddeler, analitik saflıktadır. Bunların adları, formülleri ve temin edildikleri firmaları aşağıya çıkarılmıştır.

<u>Madde adı</u>	<u>Kimyasal F.</u>	<u>Temin edilen</u>
Fruktoz	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
Trikloroasetik asit (TGA)	$CCl_3COOH$	Merck
Oksalik asit	$C_2H_2O_4$	Sigma
Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
5-Hidroksimetil furfuraldehid (HMF)	$C_6H_6O_3$	Sigma
Karbon tetraklorür	$CCl_4$	Eastman
Sodyum klorür	NaCl	Sigma
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Yerli
2- Tiyo barbutirik asit	$C_4H_4O_2N_2S$	Sigma
Glukoz Tayin Kiti	(Klorimetrik)	Sigma

#### 4.2.2. Kullanılan Çözeltiler

Kullanılan bütün çözeltiler, hazırlanışlarıyla birlikte burada verilecek. Deneyin yapıldığı kısımda kısatılmış şekilde bahsedilecektir.

a- Serum Fizyolojik (0.15 mol/lt): 8.76 gram sodyum klorür bidistile suda çözülerek hacmi litreye tamamlandı (40)

b- Karbon Tetraklorür ( $CCl_4$ ): Orijinal şişeden alınarak kullanıldı.

c- Oksalik Asit (0.5 mol/lt) 6.3 gram oksalik asit bir miktar bidistile suda çözüldü karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında iki hafta stabildir. Buz dolabında saklandığı zaman oksalik asit kristalleri meydana gelir (40).

d- 2- Tiyobarbutirik Asit (TBA, 0.05 mol/lt): 0.721 gram 2-tiyobarbutirik asit bir miktar suda karıştırarak çözüldü. Hacmi su ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH'sı 5 mol/lt sodyum hidroksit (NaOH) ile 6'ya ayarlandı (39,40).

e- Trikloroasetik Asit (TCA, 400gr/lt): 400 gram trikloroasetik asit bir miktar suda çözüldü. Hacmi 1000 ml'ye tamamlandı (39,40).

f- 5-Hidroksimetil furfuraldehid (HMF, stok, 100  $\mu$ mol/lt): 12.6 mg 5-Hidroksimetil furfuraldehid, serum fizyolojik su içerisinde çözüldü. Hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu stoktan serum fizyolojik ile seyreltilmek suretiyle 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80  $\mu$  mol/lt'lik çalışma standartları hazırlandı (39,40).

g- Fruktoz (stok, 1 mmol/lt): 0.18 gram fruktoz serum fizyolojik su içerisinde çözümlenerek hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Bu stok serum fizyolojik ile seyreltilerek 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80  $\mu$  mol/lt'lik standartlar hazırlandı (39).

h- Etilendiamintetraasetik Asit (10 g /100 ml): 10 gram EDTA bir miktar suda çözüldü. Hacmi 100 ml'ye tamamlayıp pH sı sodyum hidroksit ile 7.4'e ayarlandı (15).

#### 4.2.3. Kullanılan Cihazlar

Bidistile su cihazı

Hassas terazi

pH metre

Karıştırıcı

Su banyosu

Santrifüj

Spektrofotometre

Buharlı sterilizatör (Otoklav)

Buz dolabı

Soğutmalı santrifüj

Sahli metodu düzeneyi

#### 4.2.4. Deneyin Yapılışı

##### 4.2.4.1. Eritrosit Hemolizatın Hazırlanışı

2 ml kandan elde edilen eritrosit paket üzerine 2ml bi-distile su, 0.5 ml karbontetra klorür ilâve edilerek karıştırıcıda iyice karıştırıldı. 1500xg'de yaklaşık 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Berrak hemolizat dikkatlice ayrıldı. Karbontetra klorür daha sonra temizlenerek kullanılmak üzere başka şişede toplandı. Bu hemolizat %1 gram hemoglobün içerecek şekilde su ile seyretildi. Seyreltik numune daha uzun süre saklanabildiğinden dolayı 2 ml seyretilmiş hemolizat kapaklı tüpte ve -20'de deneyin yapılacağı güne kadar (1 hafta kadar) saklandı (2,8).

##### 4.2.4.2. Eritrositlerde HbA<sub>1c</sub> Tayini

Çalışmamızda; numune, kör ve iki seri standart 5-Hidroksimetil furfuraldehit ve fruktoz tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

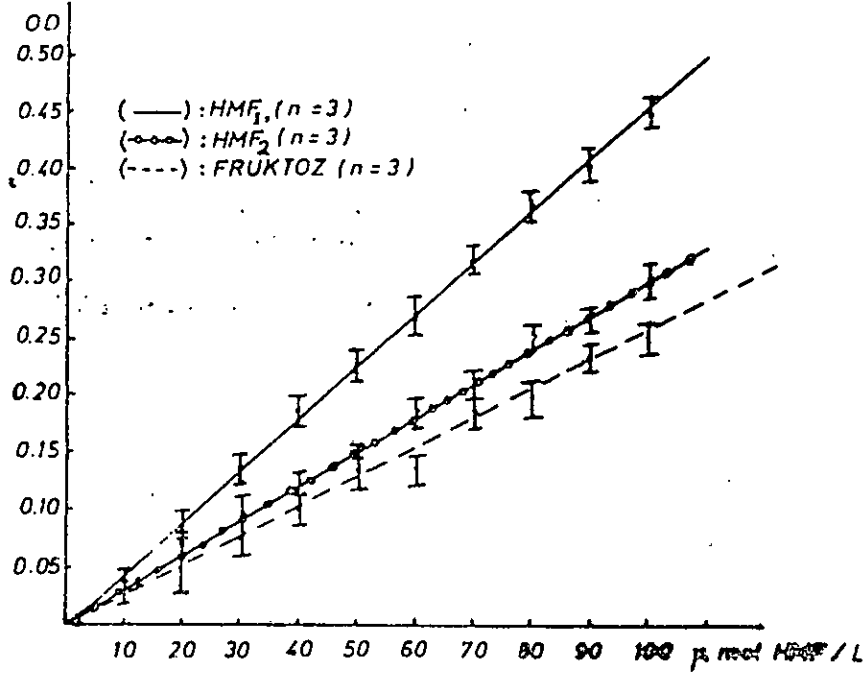


Tablodaki gibi hazırlanan tüpler (numune, standart ve kör) karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Tüplerin ağzı hava almayacak şekilde sıkıca kapatıldı. Otoklavda bir saat müddetle  $124 \pm 1$  °C'de inkübe edildi (8). Bu sürenin sonunda otoklavdan çıkarılan tüplerin sıcaklığı oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Alt üst edilerek karıştırıldı. Her tüpe %40'lık Trikloroasetik asit ilâve edildi. Magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldı. İçerisine cam yünü yerleştirilmiş 10X2 cm ebatındaki kolonlardan sadece numune tüpleri süzüldü. Berrak o madığı zaman santrifüj edildi. Süzüntülerin 443 nm optik dansiteleri köre karşı okunup kaydedildi (2,8,39).

Numune ve standart tüplerinden 1.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 2-Tiyobarbutirik asit (TBA) ilave edildi. (29,40). Magnetik karıştırıcıda karıştırılan bu tüpler, 37 °C lik bir su banyosunda 30 dakika müddetle inkübasyona tabi tutuldu. Bu inkübasyon işleminden sonra tüplerin oda sıcaklığına gelmesi için 15 dakika bekletildi. Tüpler 443 nm de optik dansiteler tekrar okundu. 37 °C deki inkübasyondan önceki ve sonraki optik dansiteler HMF ve fruktoz cinsinden hazırlanan standart eğride değerlendirildi (2,8).

#### 4.2.5. Standart Eğrinin Hazırlanması

İki seri fruktoz, iki seri HMF standartı daha önce bahsedildiği gibi hazırlandı. Hemolizat yerine 2 ml standart (10,20,30,40,50,60,70,80  $\mu$ mol/lt) alınarak diğer bütün işlemler bunlar içinde uygulandı. Bir seri HMF (Hidroksimetil furfuraldehit ) otoklav inkübasyonuna konulmadı. Bu otoklavda HMF'nin ne oranda azaldığını tayin etmek için kullanıldı. Bütün standart için grafik çizildi (Şek-4).



Şekil-4: HMF ve Fruktoz Standart Eğrileri  
 (HMF<sub>1</sub> : Otoklavda inkübe edilmeden)  
 (HMF<sub>2</sub> : Otoklavda inkübe edilerek)

#### 4.2.6. Sonuçların Hesaplanması

Deney şartlarımızda bir mol fruktoz bir mol HMF ye dönüştüğünden (1,2,8), hazırlanan standart eğri sonuçları mikro mol HMF ( $\mu$  mol HMF)/lt birimi cinsinden vermektedir. Hemoglobinin hemolizati, 10 g /lt hemoglobin içerdiğinden bu değeri 10'a bölmek suretiyle mikro mol HMF/g hemoglobin (HMF indeksi HMF<sub>i</sub>) elde edildi. Hemoglobin-A (HbA) nın ne oranda glikozillenerek hemoglobin -A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) ye dönüştüğünü bulmak veya %HbA<sub>1c</sub> yi hesaplamak için,

$$\% \text{HbA}_{1c} = \frac{32000 \times 100}{10^6} \times \text{HMF}_i \text{ formülü kullanıldı. Bu formülde, } 32000 \text{ hemoglobin } \alpha, \beta \text{ dimerinin molekül ağırlığı, } 100, \text{ yüzdeye çevirme, } 10^6, \text{ molu mikromola çevirme faktörüdür.}$$

## 4.2.7. İstatistikî Analizler

Bulgular istatistikî olarak kantitatif bulguların ortalama değerleri ( $\bar{X}$ ) ve standart sapmaları (SD) bulundu.

## 4.2.7.1. Aritmetik Ortalama (43)

Aritmetik ortalamaları hesaplamada

$$\bar{X} = \frac{\sum X_1}{N} \quad \text{formülü kullanıldı.} \quad (1)$$

## 5.2.7.2. Standart Sapma (43)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X_1^2 - \frac{(\sum X_1)^2}{N}}{N-1}} \quad \text{formülü kullanarak, standart}$$

sapmaları bulundu

(2)

## 4.2.7.3. "t,, Testi (43)

Bu test grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığını göstermek için yapılmıştır.

$$S_{xi}^2 = \frac{(N_1-1)S_1^2 + (N_2-1)S_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \quad (3)$$

$$S_{x_1 - x_2} = \sqrt{S_{X_1}^2 \left( \frac{1}{N_1} + \frac{2}{N_2} \right)} \quad (4)$$

Ortalamalara ait standart sapmanın hesaplaması için (3) ve (4) cü formüllerinden değerler bulunarak, formül (5) de yerine konularak "t,, hesabı yapıldı.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \quad (5)$$

Bu formüllerde ;

$\sum$  : Toplam işareti

N : Analiz sayısı

t : Kritik

$X_i$  : Her bir gözlem

SD : Standart sapma

$S_{x_1-x_2}$  : Ortalamalar arasındaki farkın hatası

n : Serbestlik derecesi ( $N_1 + N_2 - 2$ )

P : İhtimaliyet, "t" testi hesabından serbestlik derecesine göre bulunan değer

$S_{x_i}^2$  : Her iki gözlemin ortak varyansının ifadesidir.

#### 4.2.7.4. Korelasyon Katsayısının Hesaplanması (44)

Bu hesaplamada, aynı grubun vasıfları arasındaki ilgiği ortaya çıkarmak için yapıldı.

$$r(xy) = \frac{xy - \frac{x}{N} \frac{y}{N}}{\sqrt{\left(\bar{x}^2 - \frac{(x)^2}{N}\right) \left(\bar{y}^2 - \frac{(y)^2}{N}\right)}}$$

Bu katsayının önem testi için

$$S_r = \pm \frac{1-r^2}{\sqrt{N-2}} \quad t = \frac{r}{S_r} \quad \text{veya} \quad t = \frac{r}{(1-r^2) / \sqrt{N-2}}$$

formülleri kullanıldı.

Bu formüllerde

r : Korelasyon katsayısı

$S_r$  : Korelasyon katsayısının standart hatası

t : Kritik oran (Korelasyon katsayısı için)



## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Bulgular

Toplam 48 sağlam ve 48 hasta şahısta Hidroksimetil furfuraldehit indeks (HMF<sub>i</sub>)' leri, % Glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), Açlık kan şekeri (AKŞ), ve Hemoglobin (Hb) değerleri tespit edildi. Toplam 96 kişiden elde edilen HMF<sub>i</sub>, %HbA<sub>1c</sub>, AKŞ ve Hb değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları yapıldı (Tablo-1).

Tablo-1: Hasta ve kontrol grubunda HMF<sub>i</sub>, %HbA<sub>1c</sub>, AKŞ, ve Hb değerleri

GRUPLAR	B U L G U L A R			
	HMF <sub>i</sub>	% HbA <sub>1c</sub>	AKŞ	Hb
Şeker hastası				
$\bar{X}$	5.56	17.80	299.77	15.30
$\pm$ SD	1.25	4.0	55.96	1.88
Kontrol				
$\bar{X}$	1.82	5.69	82.0	15.35
$\pm$ SD	0.36	1.53	7.11	0.88
P	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05

Çalışmamızda, 48 sağlam ve 48 hasta şahısta tespit ettiğimiz parametreler arasında yapılan korelasyon ve istatistikî açıdan önemlilik derecesi tablo-2'de verilmiştir.

Tablo-2: Hasta ve kontrol grubunda korelasyon hesap-  
ları sonuçları

<u>G R U P L A R</u>	<u>r</u>	<u>t</u>	<u>p</u>
<u>Şeker hastası</u>			
Hb - HMF <sub>i</sub>	0.22	1.50	>0.05
AKŞ - HMF <sub>i</sub>	0.46	3.50	<0.001
<u>Kontrol</u>			
Hb - HMF <sub>i</sub>	0.03	0.20	>0.05
AKŞ - HMF <sub>i</sub>	-0.14	0.95	>0.05

Tablodan görüleceği gibi şeker hastalar grubunun AKŞ-HMF<sub>i</sub> arasında istatistiki açıdan önemli bir korelasyon bulunmuştur. Fakat diğer parametreler arasında istatistiki açıdan önemli bir korelasyon bulunmamıştır.

Fruktoz ve HMF standart çalışmaları, otoklava konan ve konulmayan saf HMF nin değişik miktarlarda olduğunu göstermiştir. Buna göre, otoklava konan HMF konulmayana göre %35 oranında parçalanmaktadır. Otoklava konulan HMF ve fruktoz standartları arasında yaklaşık %12 lik bir fark bulunmuştur.

## 5.2. Tartışma

### 5.2.1. Metod ile İlgili Tartışma

Yüksek kan glukozu konsantrasyonlarının şeker hastalarında sebep olduğu değişiklikleri araştırmak için proteinlerin non-enzimatik glikolizasyonu üzerine çeşitli çalışmalar (3,5) yapılmıştır. Bunların arasında hemoglobin molekülünün glikozillenmesi üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmış ve HbA<sub>1c</sub> çeşitli yönleri ile araştırılmıştır. Glikozillenmiş hemoglobin (GHb) nin iki ay veya daha fazla önceki ortalama kan glukozu seviyeleri için bir indeks olduğu (4), kan glukozu seviyeleri ile HbA<sub>1c</sub> arasında ve HbA<sub>1c</sub> ile glisemi parametreleri arasında (Açlık kan şekeri, Glukozüri) (8), önemli bir korelasyon bulunduğu tespit edilmiştir.

Hemoglobinin glikozillenmesine kan glukoz konsantrasyonu, anormal hemoglobinler (HbF, HbS, HbH, HbC), eritrosit ömrü, aspirin, üremi ve gebelik (4,5,8) etki etmektedir.

Şeker hastalığı kontrolünde bir ölçü olarak kullanılışın yanısıra HbA<sub>1c</sub> ölçümleri, hastalık taramaları içinde önemli bir methoddur. Başka bir önemli hususta, HbA<sub>1c</sub> seviyesinin, günün herhangi bir saatinde alınan tek bir numuneden çalışılabilir ve ortalama kan glukoz konsantrasyonu vermiş olmasıdır (8).

Konu kullanılan tayin metodu yönünden de hususiyet arz etmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobin tayininde ilk metod kolon kromatografisidir (2). İşlemleri kısaltıcı yeniliklerle daha kullanışlı hale getirilmiş olmasına rağmen pH, osmolarite, sı-

caklık, anormal hemoglobinler ve yüksek dozda aspirin hatalı sonuçlara sebep olur.

Kolon kromatografi sonuçlarını destekleyen izoelektrik odaklama metodu ile HbA<sub>1c</sub>, HbF den ayırabilir vasıfta olmasına rağmen yüksek dozda aspirin HbA<sub>1c</sub> miktarına pozitif bir hata meydana getirir (8).

Allan ve arkadaşları (7), tarafından geliştirilen "Agar Jel Elektroforezi" dir. Bununla ilgili ticari kitler geliştirilmiş olmasına rağmen fazla miktarda HbF varlığında GHbS ve GHbC'yi HbA<sub>1c</sub> den ayırt etmesi yanlış sonuçlar verir (2).

HbF hemoglobinlerin varlığına dayanan "İmmunoassay" metodurki şeker hastalığını taramalarından ziyade gestasyon tayininde kullanılmıştır (41)

Mallia ve arkadaşları tarafından önerilen "Affinite Kromatografisi" ile yüksek değerler bulunmuştur (8).

Gallop ve arkadaşları tarafından geliştirilen "Florimetrik metod glikozillenmiş proteinler Periyodatla oksitlenerek meydana gelen formaldehit miktarına dayanır. Kararlı ketoamin grublarının yanısıra kararsız Schiff bazları da tayin ettiğinden yüksek sonuçlar elde edilir. Dolayısıyla klinik uygulaması açısından hâlâ tartışılması gerekir (8).

Özellikleri ve sakıncalarını söylediğimiz bütün bu metodlar içerisinde laboratuvarımız şartlarına daha uygun bulduğumuz ucuz ve pratik bir metod olan "Kolorimetrik" metodu seçtik. Diğer metodlar, tek tek anlatılırken belirtildiği gibi, pahalı ve uygulama güçlüğü olan metodlardır. Rutin çalışmalara yönelik bu çalışma için hiçte uygun değildir.

Bu metod sonuçlarının tekrarlanabilirliği açısından tenkid edilmişse de (5), hidroliz ve renklendirme basamakları iyi bir şekilde optimize edilirse bu sakınca ortadan kalkmaktadır. Ön çalışmalar bunu desteklemiştir.

Son zamanlarda bu metodun rutin laboratuvarlarda uygulanabilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle inkübasyon süresini indirmeleri deneye son derece pratiklik kazandırmıştır.

Kolorimetrik metodun, yukarıda özelliklerine değindiğimiz diğer metodlara bir takım üstünlükleri vardır.

Kolorimetrik metod, kolon kromatografik metoda göre daha avantajlıdır. Çünkü,

1 - Hemolizat  $5^{\circ}\text{C}$  de 80 gün saklandığı zaman glikozillenmede kolorimetrik açıdan hiç bir değişme olmadığı halde kromatografik yöntemle aynı şartlarda 10 gün bekletilen numunelerde yanlış sonuçlar elde edilmiştir (8).

2 - Kolorimetrik metod sadece HbA<sub>1c</sub>'ye spesifiktir. Anormal hemoglobinlerden etkilemez (5).

3 - Diğer glikozillenmiş proteinler için de kullanılabilir (8,41).

4 - Hemoglobin yapısındaki kararlı ketoamin grupları 2-tiyobarbutirik asit kolorimetrik yöntemine göre reaksiyon verir. Kararsız Schiff bazları aynı reaksiyonu vermez (5).

İzoelektrik odaklama metodu, pahalı, özel ekipman isteyen ve yetiştirilmiş elemanı gerektirdiğinden kullanılması pratik değildir.

Yine, Agar jel elektroforezi özel ekipman ve yetiştire-

rilmiş eleman ister. Tampon, ısı ve pH değişiklikleri yöntemin duyarlılığına büyük dezevatajdır.

Aynı şekilde immunuassay ve affinite kromatografisinin sarf malzemeleri dış memleketlerden temin edilmesi çok güçtür ve zaman almaktadır.

Kolorimetrik metodu seçerken şu üstün taraflarını göz önünde tutularak tercih ettik:

- 1 - Standartlarının memleketimizde kolay bulunması
- 2 - Kolorimetrik metodun güvenilir ve tekrarlanabilir olması
- 3 - Mevcut laboratuvar imkanlarımıza uygun olması, Reaktiflerinin hazırlanmasının ve saklanması son derece basit oluşu, fazla sarf malzemesi gerektirmemesi üstün taraflarıdır.

Araştırmamızda kullandığımız kan örneklerinde antikoagulan olarak EDTA (15,26) kullanıldı.

Total kanı bazı arştırmacılar (40), tarafından 1000xg 4' °C de 10 dakika santrifuj etmişlersede biz bazı arştırmacıların (8,11) verdiği 800xg 4' °C de 5 dakika santrifüjü yeterli bulduk.

Santrifüj edilerek ayrılan plazma açlık kan şekeri için numune alındıktan sonra uzaklaştırıldı. Eritrositler oda sıcaklığında üç defa serum fizyolojik (8.76 g#/lt) ile yıkandı. Serum fizyolojik ile yıkamalarda üst fazın iyice berrak olmasına dikkat edildi. Elde edilen temiz eritrosit paketleri üzerine çalışma hemolizatını sağlamak için iki katı kadar bidistile su ve ortamdaki lipidleri uzaklaştırmak için 0.5 ml karbon tetra klorür eklendi. 1500xg de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak hemolizat

ayrıldı. Hemen çalışılmadığı takdirde hemoglobin konsantrasyonu %1 lik olacak şekilde seyreltilerek  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanarak deney yapılacağı (bir hafta geçmeyecek) güne kadar bekletildi.

### 6.2.2. Bulgularla İlgili Tartışma

Çalışmamızda 48 şeker hastası ve 48 sağlam şahısta hemoglobin, açlık kan şekeri ve glikozillenmiş hemoglobinin ortalama ve standart sapmaları olarak sırasıyla  $15.30 \pm 1.88$  gr/dl,  $279.99 \pm 55.96$  mg/100 ml,  $5.56 \pm 1.25$  mol fruktoz/g Hb, kontrol grubu için bu değerler;  $15.35 \pm 0.8$  gr/dl,  $82.0 \pm 7.11$  mg/100 ml ve  $1.82 \pm 0.36$  mol fruktoz/g Hb olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bulgular arasında yapılan istatistikî analizler sonucu şeker hastalar grubunun açlık kan şekeri ile HMF1 arasındaki farkın önemli ( $P < 0.001$ ) olduğu bulunurken diğer parametreler arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Eldeki literatür verilerine göre, şeker hastası grubunda belirttiğimiz glikozillenmiş hemoglobin değerleri aşağı yukarı uygunluk göstermektedir. Çalışmaların değerleri arasındaki fark muhtemeldir ki deney şartlarından ve rakımın farklı oluşu ile izah edilebilir.

Bu verilere dayanarak glikozillenmiş hemoglobin oluşumunda en önemli faktörün kan glukozu konsantrasyonu olduğunu söyleyebiliriz.

HbA1c nin AKŞ ve uriner glukozdan daha önemli bir glikemik kontrol vasıtası olabileceğini, protein glikozilasyonu, Şeker hastalığı komplikasyonlarını araştırmada yardımcı olabileceğini söylenebilir.

Glikozillenmiş hemoglobin tayini iyi bir metabolik kontrol indeksi olabilir (42). Ancak glikozilasyonun hızına daha önce bahsedilen faktörlerin etki etmesi problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastaların günlük takibi için ise AKŞ tayinlerinin yapılması gereklidir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 48 şeker hastası ve 48 sağlıklı kişilerin hemolizatında glikozillenmiş hemoglobin, açlık kan şekeri ve hemoglobin değerleri tespit edildi.

Kontrol grubu için glikozillenmiş hemoglobin, açlık kan şekeri ve hemoglobin  $\bar{X}$  ve  $\pm$ SD olarak sırasıyla  $\%5.69 \pm 1.53$  g HbA<sub>1c</sub>/dl,  $82.0 \pm 7.11$  mg/100 ml ve  $15.35 \pm 0.8$  g Hb/dl bulunurken, diabetli hastalar grubu için bu değerler sırasıyla  $\%17.8 \pm 4$  g HbA<sub>1c</sub>/dl,  $279.77 \pm 55.96$  mg/100 ml ve  $15.30 \pm 1.8$  g Hb/dl olarak bulundu. İstatistikî analizler, hastalar ile kontrol grubunun glikozillenmiş hemoglobin ve açlık kan şekeri arasındaki farkın önemli ( $P < 0.001$ ) olduğunu göstermiştir.

Vucutta protein glikozilasyonun da esas önemli faktör uzun süreli hiperglisemidir. Şeker hastalarında glikozillenmenin yüksek olduğunu gösteren bir çok çalışma vardır.

Hemoglobin glikozilasyonu konusunda daha da çok çalışma yapılmıştır. Diğer taraftan yapısal proteinlerde (keratin gibi) de glikozillenme yüksek bulunmuştur (8).

Mevcut laboratuvar imkanlarımızla yürüttüğümüz bu çalışmanın, hastanın daha sağlıklı bir biçimde kontrolünde bir indeks olabileceği açıktır. Ancak HbA<sub>1c</sub> teşekkül hızı, eritrosit ömrü Pre-HbA<sub>1c</sub>'nin metoda bağlı olarak HbA<sub>1c</sub> diye tayin edilmesi, anormal hemoglobinler, üremi ve gebelik gibi çelitleli durumlar HbA<sub>1c</sub> nin tayin ve yorumunda bir dizi problem olarak karşımızda durmaktadır. Dolayısıyla hastaların günlük takibi için açlık kan şekeri tayinlerinin yapılması gereklidir.

## ÖZET

Hemoglobine glukoz bağlanmasına glikozillenme denir. Beta zincirindeki amino asit valinin amino grubu ile glukoz arasında non-enzimatik bimoleküler bir kondensasyon reaksiyonu sonucu kararsız bir schiff bazı oluşur. Bu kararsız yapı Amadori düzenlenmesi ile kararlı bir ketoamine dönüşür. Bu keto aminin, hemoglobin kolon kromatografisinde HbA<sub>1c</sub> fraksiyonu oluşur.

"Şeker hastalarında glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) miktarının tespiti,, isimli bu çalışmanın birinci gayesi son yıllarda glikozillenmiş hemoglobin ölçümlerinin şeker hastalığı ve tedavisinin bir yeterliliğın kontrolde, şeker hastalığı komplikasyonlarının önlenmesinde ve uzun süreli kan şekeri seviyesinin takibinde kullanılan önemli bir indikatör olup olduğunu araştırmaktır.

Bu çalışmada modifiye bir kolorimetrik metod kullanılarak 48 şeker hastası ve 48 sağlıklı kişide glikozillenmiş hemoglobin tayin edildi. Şeker hastalarında  $17.8 \pm 4$  ve kontrol grubunda ise bu değer  $5.69 \pm 1.53$  olarak tespit edildi. % değerleri istatistikî açıdan önemli ( $P < 0.001$ ) fark göstermektedir.

Şeker hastalarında açlık kan glukozu ile HbA<sub>1c</sub> arasındaki önemli korelasyon ( $r=0.46$   $P < 0.001$ ) glikozilasyonun yüksek kan glukozu ile ilgili olduğunu gösteriyor.

## SUMMARY

That the hemoglobin binds glucose is known as glycosylation, A labile Schiff base is formed as a result of non-enzymatic bimolecular condensation reaction between glucose and amino ( $\text{NH}_2$ ) group of the first amino acid valine in beta-chain of hemoglobin molecule. Then, the Schiff base is arranged into stable ketoamine form by Amadori rearrangement. This constitutes the HbA<sub>1c</sub> fraction in column chromatography.

In this study titled " Determination of glycosylated hemoglobin in diabetes mellitus " The principal aim is to find out if the glycosylated hemoglobin measurement are important adequate indicators used in controlling diabetes and in its treatment, in preventing diabetic complications and in following the long term blood glucose level.

In present study, by using a modified colorimetric method, the presence of HbA<sub>1c</sub> has been estimated in erythrocytes of 48 healthy and 48 diabetic subjects %HbA<sub>1c</sub> in  $(17.8 \pm 4)$  and for control group this value  $(5.69 \pm 1.53)$ . % HbA<sub>1c</sub> values show important statistical differences ( $P < 0.001$ ).

The correlation of fasting blood glucose levels to HbA<sub>1c</sub> has been found to be significant ( $r = 0.46$ ,  $P < 0.001$ ). This suggests that the high rate of glycosylation in diabetics is closely related to high blood glucose concentrations.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tezimin hazırlanmasında bütün imkanlarını seferber ederek büyük bir özen ve sabırla bana yol gösteren, deneylerimde bana yardımcı olan, böyle bir konuyu bana tez çalışması olarak tespit eden danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Eşref YEĞİN'e,

Her zaman yardımlarını esirgemeyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Hayati ÇAMAŞ'a, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Nurhan AKYÜZ'e ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Avni ÖZTÜRK'e,

Her türlü desteğin yanında, elindeki kaynakları kullanmama izin veren, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Ebubekir BAKAN ve Doç. Dr. Nuri BAKAN'a,

Kan numunelerin toplanmasında her zaman yardımlarını esirgemeyen Van Devlet Hastanesi Biyokimya uzmanı Deniz KARAHAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- 1- BAKAN, N., BAKAN, E., D EĞER, O., AĞBAŞ, A., KAYA, N., Erzurum ve çevresinde sağlam şahıslarda glikozillenmiş hemoglobin değerleri: Türkiye klinikleri Tıp bilimleri Araştırma Dergisi C.5-5.2. (1987)
- 2- BAKAN, E., KEHA, E.E., ERYILMAZ, T., BAKAN, N.: Glikozillenmiş hemoglobinin kolorimetrik tayini: Atatürk Univ. Tıp Fak. Tıp bülteni Cilt; 17 sayı ,2 (1985)
- 3- BUNN, H.F. , Nonenzymatic Glycosylation of Relevance to diabetes, Am.J.Med.70: 325-330 (1981)
- 4- BAKAN, N., YEGIN, M.M.: Hemoglobin glikozilasyonu, Glikozillenmiş hemoglobin ve klinik önemi; Atatürk Univ. Tıp Fak. Tıp bülteni, Cilt:18 sayı-1 (1986)
- 5- MAYER, T.K., and FREEDMAN, Z.R.; Critical Reivewprotein Glicosylation in Diabetes Mellitus A Review of Laboratory measurements and of their clinical utility, Clin Chim Acta 127: 147-184 (1983)
- 6- KUNKEL, H.G., WALLENUIS, G., New hemoglobins in adult blood Science, 122,188, 1955
- 7- ALLAN, D .W., SCNROEDER, W. A., BALOG, J., Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: A study of the effects of crystallization and chromatography in the heterogeneity and isoleucine content: J. Am. Chem Soc. 80: 1628-1632 (1958)

- 8- BAKAN, N., Erzurum ve çevresindeki sağlam şahıslarda gliko-  
zillenmiř hemoglobin değerleri: Atatürk Üniv. Tıp  
Fak. yüksek lisans tezi (1984)
- 9 - GALLOP, P.M., FLUCKİGER, R., HENNEKEN, A., MININSOHN, M.M. and  
GABBAY, K.H., Chemical quantitation of hemoglobin gly-  
cosylation: Fluoric dedection of formaldehyde relea-  
sed upon periodate oxidation of glycoglobin, Anal  
Biochem 117: 427-432 (1981)
- 10 - KEHA, E.E., YILDIRIM, A., Diabetes mellituslu hastalarda g-  
likozillenmiř hemoglobin ve karbonik anhidraz mikta-  
rının tespiti, Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enstitü-  
sü Yüksek Lisans Tezi Erzurum (1989)
- 11 - BAKAN, E., BAKAN, N.: Glycosylation of nail in diabetes:  
Possible marker of Long- term hyperglycemia; Cli-  
nica Chimica Acta: 03117 (1985)
- 12 - ERYILMAZ, T., BAKAN, N., BAKAN, E., ÇAĐLAR, N., Diabetler-  
de HbA<sub>1c</sub> ve Göz ilişkileri, XIX. ulusal Türk oftamo-  
loji Kongresi Bülteni matbaa teknisyenleri basımevi  
İstanbul (1986)
- 13 - EMEKLİ, N., YARAT, A., STZ ile diabet oluşturulan sıçanlar-  
dan elde edilen diřeti bađ dokusu ve kuyruk tendon  
kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyonun incelen-  
mesi ve glikozillenmiş hemoglobin ile karşılaştırıl-  
ması: Marmara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dokto-  
ra Tezi İstanbul (1988)
- 14 - RAHBAR, S., BLUMENFELD, O., RANNEY, R.M. Stuaases of an anusu-  
al hemoglobin in patients with diabetes mellitus: Bi-  
chem Biophys, Nes, Cummon, 36; 836-843 (1969)

- 15- ARAS, K. ERSEN, G., Klinik Biyokimya: Hacetepe Taş Kitapçı-  
tapçılık Ltd. Şti. Ankara
- 16- PASTERMAK, C.A., İnsan Biyokimyasına Giriş(Çev. Gönenç,C.  
ve Ark.) Hacetepe Üniv. Yayınları, S 197-206(1980)
- 17- TEKMAN,Ş., ÖNER,N. Genel Biyokimya Dersleri Fatih Yayınevi  
Matbaası,İstanbul 1981 S 266-278.
- 18- BAYER,H.: Organic Chemistry(Translated by Knoop) Greiswald  
1963, S 288.
- 19- NOYAN, A. Fizyolojiye giriş. Meteksan A.Ş. ANKARA 1989 S678.
- 20- YENSON, M., İnsan Biyokimyası: Sermet Matbaası S492-506  
Kırklereleli (1984)
- 21 - ÖZARSLAN, S., Karşılaştırmalı Hayvan Fizyolojisi: İstan-  
bul Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Zooloji Ana-  
bilim Dalı S121- 122 İstanbul (1986)
- 22 - STRYER, L., Biochemistry Sec. Ed. SanFrancisco, W.H.Free-  
man and co. S 65 (1981)
- 23 -KARLSON, P. Biyokimya (çev. TELEFONCU, A.) Sermet Matbaası  
S 52-54 Kırklereleli (1988)
- 24 - ARTHUR, C. GUYTON, M.D., Tıbbi Fizyoloji (çev. GÖKHAN, N.  
ÇAVUŞOĞLU, H.) üçüncü baskı , Nobel Tıp Kitapevi S 64-  
68 İstanbul (1989)
- 25 - ERSOY, E., BAYŞU, N., Biyokimya , Ankara Üniv. Veteriner  
Fakültesi Yayınları No:408 S 236-285 Ankara (1986)
- 26 - AKSOY, M., Hematoloji-I, (Eritrosit hastalıkları) Anemi-  
ler ve Polisitemiler, Sermet Matbaası S4-21, 355-533  
İstanbul (1975)

- 27 - DONALT, M.J., SHAPIRO, R., BLEICHMAN, M., SOLWAY, J., and BUNN, H.F., Glycosylated minor Components of Human adult hemoglobin J. Biol chem. 253(7): 2327-2332 (1978)
- 28 - MORTENSEN, H.B., and CHRISTOPHERSEN, C., Glycosylation of human hemoglobin, A. Clin. Chim. Acta, 137; 85-89 (1984)
- 29 - LYTKEN LARSEN, M., BLAABJERG, O., HYLTOFT PETERSEN, P., HANSEN, H., HORDER, M., Analytical Goal Setting Prior to Selection of a Method for Glycated hemoglobin; Scand J. Clin lab. invest, 715-722 (1990)
- 30 - STEVERS, V.J., VLASSARA, H., ABATI, A., CERAMI, A., Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin J. Biol. Chem. 252; 2998-3002 (1977)
- 31 - NATHAN, D.M., FRANCIS, T.B. and PALMER, J.C., Effect of Aspirin on Determinations of Glycated hemoglobin, Clin. Chem. 29(3); 466-469 (1983)
- 32 - CASPARIA, A.F., MIEDEMA, K., Glycated hemoglobin in Diabetes and Renal Failure, Lancet 2; 758-759 (1977)
- 33 - DITZEL, J. and KJERGAARD, J.J., Hemoglobin-A1c concentration after initial insulin treatment for newly discovered diabetes Br. Med. J. 1, 741-742 (1978)
- 34 - SEVENDSEN, P.A., CHRISTIANSEN, J.S., WELINDER, B., and NERUP, J., Fast Glycosylation of hemoglobin, Lancet, 1; 630 (1979)
- 35 - LESLIE, R.D.G., ROGLER-BROWN, T.L. and WHITE, J.M., Fast Glycosylation of hemoglobin, Lancet, 1; 773-774 (1979)
- 36 - CERAMI, A.L., KOENIG, A., and PETERSON, C.M., Hemoglobin-A1c and diabetes mellitus, Br. J. Haematol, 38; 1-4, (1978)



- 37 - TRIVELLI, V.A., RANNEY, H.M., LIH, H.T., Hemoglobin Components in patient with diabetes mellitus New, Eng. J. Med. 284; 353-357 (1971)
- 38 - GLUKOZ OKSİDAZ, Glukoz tayin kiti, Cholorimetric method, Sigma Diagnostics St louis No. 63178 USA (1991)
- 39 - PARKER, K.M., ENGLAND, J.D., DACOSTA, J., HEAS, R., GOLDSTEIN, D.E., Improved colorimetric assy for glycosylated hemoglobin . Clin. Chem. 27; 669-672 (1981)
- 40 - STANDEFER, J.C., EATON, R.P., Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin Clin. Chem. 29;(1) 135-140 (1983)
- 41 - BAKAN, N., Hemoglobin glikozilasyonu, Glikozillenmiş hemoglobin ve klinik önemi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı ders notları ERZURUM
- 42 - GOLDSTEIN, D.L., Is glycosylated hemoglobin clinically useful? N. England. J. Med. 9; 384-385 (1984)
- 43 - KUTSAL, A., MULUK, F.Z., Uygulamalı Temel İstatistik. Hacettepe Univ. yayınları S.73-89 ANKARA
- 44 - PÜSKÜLCÜ, H., İKİZ, F., İstatistiğe Giriş. Ege Univ. Mühendislik Fakültesi ders kitapları yayın No:1 S. 234-235 Bornova-İZMİR (1989).