

SEKER HASTALARINDA GLIKOZILLENMIS  
HEMOGLOBIN MIKTARININ TESBITI

Ismail CELIK\*

Esref YEGIN\*

OZET

Insanda nonenzimatik protein glikozillenmesinin en iyi bir örneği olan hemoglobin glikozillenmesinin (HbA<sub>1c</sub>), bu molekülün fonksiyonuna ve miktarına kan şekeri konsantrasyonunun etkisini belirlemek için bu çalışma yapıldı.

Bu çalışmada modifiye bir kolorimetrik metod kullanılarak 48 sağlıklı ve 48 seker hastası kişide glikozillenmiş hemoglobin tayin edildi. Seker hastalarında (17.8±4) ve kontrol gurubunda (5.69±1.53)% HbA<sub>1c</sub> değerleri istatistiki açıdan fark önemli (P<0.001) bulundu. Seker hastalarında açlık kan glikozu ile glikozillenmiş hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) arasındaki önemli korelasyon (r=0.46;P<0.001) glikozilasyon yüksek kan glikozu ile ilgili olduğunu gösteriyor.

Anahtar Kelimeler: Glikozillenmiş hemoglobin, Hemoglobin, Glikozilasyon.

GLAYCOSYLATED HEMOGLOBIN VALUES IN  
DIABETES MELLITUS SUBJECTS

SUMMARY

This study was carried out to determine the effect of high blood glucose concentration to the function and the quantity of HbA<sub>1c</sub> which is the best example of nonenzymatic protein glycosylation in human beings.

In present study by using a modified colorimetric method, HbA<sub>1c</sub> has been estimated in erythrocytes from 48 healthy and 48 diabetic subjects. HbA<sub>1c</sub> % in (17.8±4) and control group (5.69±1.53) differs in statistics (P<0.001). The correlation of fasting blood glucose levels to HbA<sub>1c</sub> has been found to be

\*Ars.Gör.Y.Y.U.Fen-Ede Fakültesi Biyoloji Bölümü

\*\*Yrd.Doc.Dr.Y.Y.U.Fen-Ede.Fakültesi Biyoloji Bölümü

significant ( $r=0.46$ ;  $P<0.001$ ). This suggest that the high rate of glycosylation in diabetics is closely related to high blood glucose concentrations.

Key Words; Glycosylated hemoglobin, Hemoglobin, Glycosylation.

## GIRIS

Normal hemoglobin (HbA) 'in glukoz bağlamasına glikozillenme denir ve bu glikozillenmiş hemoglobin (GHb) veya HbA<sub>1c</sub> olarak bilinmektedir (1.2). Glikozilasyon reaksiyonu bimoleküler bir kondensasyon reaksiyonudur. Hemoglobinin bata zincirindeki birinci amino asit valinin-NH<sub>2</sub> gurubu ile glukoz arasındaki bir Schiff bazı meydana gelir(3). Meydana gelen oldukça kararsız bir aldimin, Amadori düzenlemesiyle kararlı bir yapı olan ketoamine (HbA<sub>1c</sub>) dönüşür (1.4). Enzimatik olma-yan bu glikozilasyon reaksiyonu çok yavaş yürür. Ancak HbA<sub>1c</sub> sentezi eritrositin 120 günlük ömrü boyunca devam eder (3).

Normal bir insan eritrositinde bulunan hemoglobinler, Jel elektrodaklama metoduyla veya kolon kromatografisinde ayrıldıklarında en hızlı yürüyen dört fraksiyon (HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>) 'a hızlı hemoglobinler denir ve bu hemoglobinlerden sadece HbA<sub>1c</sub> nin yapısı bilinmektedir. Glikozillenmiş hemoglobinlerle normal hemoglobinler arasındaki tek fark NH<sub>2</sub> taşıyan amino asitlerin glukoz bağlamış olmasıdır (2).

Glikozillenmiş hemoglobin sağlam şahıslarda, normal hemoglobinin %5'ini şeker hastalarında ise %15'ini oluşturmaktadır. Hemoglobin glikozilasyonundaki artma kan glukoz konsantrasyonundaki artmayı, azlatma ise eritrosit ömrünün kısaldığını göstermektedir (5).

Bu çalışmada Paker ve arkadaşlarının (6) kolorimetrik metoduda küçük modifikasyonlar yapılarak Bakan arkadaşları (2) 'nin geliştirdikleri "Glikozillenmiş Hemoglobinin Kolorimetrik Tayini" ile HbA<sub>1c</sub> tayin edildi. Metodun esası kısaca şöyledir: HbA<sub>1c</sub> 'deki ketoamin 1-deoksi 1-amino, fruktoz kısmı seyreltik zayıf asitli (Otsalik asit) ortamda hidroliz edilerek 5-Hidroksi-metilfurfural (HMF) 'a dönüştürülür. Bu da 2-Tiyobarbiturik (TBA) asitle renklendirilerek 443 nm absorbans ölçülür.

## MATERYAL VE METOD

Araştırmamızda yer alan şahıslardan %10' luk EDTA' lı tüplere 3 ml kadar 96 (48 şeker hastası, 48 sağlam) kiseden açlık kanı alındı. Açlık kan şekeri (AKS) sigmanın kolorimetrik glukoz oksidaz (7) metoduyla ve hemoglobin Sahli yöntemine göre tayin edildi. Glikozillenmiş hemoglobin tayini bu kandan izole edilen eritrositlerde yapıldı.

Hemolizat Hazırlanması:

Santrifugasyonla izole edilen eritrositler serum fizyolojik ile üç defa yıkandıktan sonra, 2 ml distile su ve

0.5 ml CCl<sub>4</sub> (karbontetraklorür) ilave edilerek hemoliz edildi. Bu hemolizat 10g/ dl Hb içerek şekilde seyredildi. Ya hemen deneye tabi tutuldu veya bir haftadan fazla olmamak kaydıyla 20°C de deneyin yapılacağı güne kadar bekletildi (6).

#### HbA<sub>1c</sub> Tayini:

Hazırlanan hemolizat, Bakan ve arkadaşlarının "Kolorimetrik" metoduna göre deneye tabi tutuldu. Deneyin yapılışı kısaca şöyledir: Numune ve kör diye işaretlenen iki tüp alındı numune tüpüne 2 ml seyreltik hemolizat, 2 ml oksalik asit, kör tüpüne ise 2 ml oksalik asit, 2 ml serum fizyolojik konuldu. Deneye paralel olarak standart (fruktoz) çalışıldı. Standart tüplerine 2 ml oksalik asit ve 10-80 mikromol/L'lik standart solusyonlarından konuldu. Hazırlanan bütün tüpler magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Ağızla rı iyice kapatıldı. Otoklavda bir saat müddet 124±1°C da inkübe edildi. Müddetin sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulan tüplere 2 ml %40'lık TCA (Triklorasetik asit) ilave edildi. Karşılaştırıldı, içlerine cam yünü yerleştirilmiş kolonlarda süzülde. Berrak olmayanları santrifüj edildi. Sütunlerin OD'ları 443 nm de köre karşı okundu.

Numune, standart ve kör tüplerinde 1.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 2-Tiyobarbiturik asit ilave edildekten sonra 30 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Köre karşı tekrar 443 nm'de OD'ler okundu. İki okuma arasındaki fark bulundu.

Deney şartlarında 1 mol fruktoz 1 mol HMF'e dönüştüğünden (2) mikromol HMF/g Hb (-HMF indeksi) elde edilir. HbA'nın ne oranda glikozillendiğini bulmak için;

$$\%HbA_{1c} = \frac{32000 \times 100}{6} \times \frac{HMF_i}{10}$$

6

10

3.2xHMF<sub>i</sub> formülü kullanıldı.

#### BULGULAR

Toplam 96 (48 sağlam, 48 hasta) şahısta Hidroksi metil furfuraldehid indeksi (HMF<sub>i</sub>)'leri, %HbA<sub>1c</sub>, AKS ve hemoglobin (Hb) değerlerinin ortalamaları (X) ve standart sapmaları (±SD) hesaplandı (Tab-10-1).

Tablo-1: Hasta ve kontrol gurubunda HMF<sub>i</sub>, %HbA<sub>1c</sub>, AKS ve Hemoglobin (Hb) değreleri.

| GURUPLAR             | BULGULAR         |                    |        |       |
|----------------------|------------------|--------------------|--------|-------|
|                      | HMF <sub>i</sub> | %HbA <sub>1c</sub> | AKS    | Hb    |
| <u>Seker Hastası</u> |                  |                    |        |       |
| X                    | 5.56             | 17.80              | 299.77 | 15.30 |
| ±SD                  | 1.25             | 4.0                | 55.96  | 1.88  |
| <u>Kontrol</u>       |                  |                    |        |       |
| X                    | 1.82             | 5.69               | 82.0   | 15.35 |
| 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 tesbit ettiğiniz parametreler arasında yapılan korelasyon ve istatistikî açıdan önemlilik dereceleri tablo-2'de verilmistir.

Tablo-2:Hasta ve kontrol gurubunda korelasyon hesapları sonuçları

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

#### TARTISMA

Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler arasında yapılan istatistikî analizler sonucu seker hastalar gurubunun açlık kan şekeri ile HMF<sub>i</sub> arasında pozitif korelasyon ( $r=0.46$ ) ve fark önemli ( $P<0.00$ ) bulunurken diğer parametreler arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak, vücutta protein glikolizasyonunda esas önemli faktör uzun süreli hiperglisemidir. Seker hastalarında glikozillenmiş hemoglobinin yüksek olduğu gösteren bir çok çalışma vardır. Hemoglobin glikozilasyonu konusunda da birçok çalışma yapılmıştır. Diğer taraftan, Paisey ve arkadaşları (8) seker hastaların saçlarında, Bakan ve arkadaşları (9) seker hastaların tırnaklarında protein glikozilasyonu kontrol grubuna nazaran daha yüksek bulunmuştur.

HbA<sub>1c</sub> nin AKS ve uriner glikozdan daha önemli bir glisemik kontrol vasıtası olabileceğini, protein glikozilasyonu, seker hastalığı araştırmada yardımcı olabileceğinin inancındayız.

#### KAYNAKLAR

1-BAKAN, N., BAKAN, E., DEGER, O., AGBAS, A., KAY, N., Erzurum ve çevresinde sağlam şahıslarda glikozillenmiş hemoglobin değerleri; Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi 0.5-5.2.(1987)

2-BAKAN, E., KEHA, E.E., ERYILMAZ, T., BAKAN, N.:Glikozillenmiş hemoglobinin kolorimetrik tayini:, Atatürk Univ. Tıp Fak. Tıp bülteni, C. 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 glikozyonu, Glikozillenmiş

hemoglobin ve klinik önemi;Atatürk Univ.Tıp Fak.Tıp Bülteni  
Cilt.18 sayı-1 (1986)

5-BAKAN,N.,Erzurum ve çevresindeki sağlam şahıslarda  
glikozillermiş hemoglobin değerleri; Atatürk Univ.Tıp.Fak.  
Yüksek Lisans Tezi (1984)

6-PARKER,K.M., ENGLAND,J.D., DACOSTA,J., HEAS,R., GOLDSTEIN,D.  
E.,Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin.  
Clin.Chem. 27:,669-672 (1981)

7-GLUKOZ OKSIDAZ, Glukoz tayin kiti, Colorimetric method,  
Sigm Diagnostic St louis Mo. 63178 USA (1991)

8-PAISEY,R.B.,CLAMP,R.J.,KENT M.J.C.,LIGHT,M.D., HOPTON,M.,  
MARTOG,M.: Glycosylation of hair: Possible measure of chronic  
hyperglycemia, B.Med.j.288, 669-671.(1984)

9-BAKAN, E., BARAN,N., Glycosylation of nail in  
diabetics:Possible marker of long-term hyperglycemia, Clin.  
Chim.Acta 147(1),1-5,(1985)