

DIABETES MELLITUSLU HASTALARDA GLİKOZİLENMİŞ HEMOGLOBİN VE KARBONİK ANHİDRAZ MİKTARLARININ TESBİTİ

Ali YILDIRIM (x)
Dr. Ebubekir BAKAN (xx)
Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU (xxx)
Dr. Ramazan YİĞİTOĞLU (xxxx)
Vekâlet TEK (xxxxx)

ÖZET :

Bu çalışmada 10 sağlıklı (yaş aralığı 22-30; hepsi erkek) ve 10 diabetli hasta (yaş aralığı 20-40; 2'si erkek) için, hemolizatta glikozillenmiş hemoglobin ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz çözeltilerinde glikozillenmiş karbonik anhidraz değerleri tesbit edildi. Kontrol grubu için glikozillenmiş hemoglobin değeri $X \pm SD$ olarak $0,80 \pm 0,11$ mikromol fruktoz/g hemoglobin, glikozillenmiş karbonik anhidraz değeri ise $3,03 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$ mg glukoz/mg protein bulunurken, diabetli hastalar grubu için bu değerler sırayla $2,29 \pm 0,50$ mikromol fruktoz/g hemoglobin ve $6,38 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$ mg glukoz/mg protein bulundu.

- İstatistik analizler, diabetli hastalar grubu ile kontrol grubunun glikozillenmiş hemoglobin ve glikozillenmiş karbonik anhidraz değerleri arasındaki farkın önemli olduğunu göstermiştir (her ikisi için $P < 0,001$). Kontrol grubu için glikozillenmiş hemoglobin ile glikozillenmiş karbonik anhidraz arasında az önemli bir korelasyon gözlenirken ($r = -0,64$, $P < 0,05$), diabetli hastalar grubunda bir korelasyona rastlanılmamıştır ($r = 0,49$, $P > 0,05$).

(x) Atatürk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

(xx) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doçenti

(xxx) Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı

Doçenti

(xxxx) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

(xxxxx) Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Uzmanı

GİRİŞ :

Uzun süre yüksek kan glukoz seviyesine maruz kalan dokular üzerinde glikozillenme reaksiyonlarının çok önemli fizyolojik etkileri bilinmektedir (1). Diabetli hastalarda uzun süreli hiperglisemiden dolayı hemoglobin (Hb)'in glikozillendiği öteden beri bilinmekte olup, klinik bir tanı olarak da kullanılmaktadır (2). Hb'den başka başka bazal membran proteinleri(3), kollagen(4), hücre membranındaki proteinler(1), albumin (5), bazı kan proteinleri (6) ve keratinin (7) de aynı şartlarda glikozillendiği bilinmektedir.

En önemli eritrosit proteini olan Hb'nin glikozilasyon ürünleri; HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} ve HbA_{1c}'dir. Bu ürünler HbA'nın transasyon sonrası nonenzimatik glikozillenmesi sonucu oluşurlar. Glikozilasyon HbA'daki α ve β zincirlerinin amino ucunda yer alan valin ve lösin amino asitlerinin amino grupları ile olabilir. Ancak fizyolojik pH'da kromatografik veya elektroforetik metotlarla tesbit edilebilen HbA_{1c}'dir (2,8). Yapılan araştırmalarda glikozillenmenin, kararsız bir schiff bazı üzerinden ketoamin bağı ile kararlı yapı kazandığı gösterilmiştir (9).

İlk defa memeli eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi(CA) hücrelerde CO₂'nin hidrasyonu ve HCO₃⁻'in dehidrasyonu reaksiyonlarını katalizlemektedir. Dokularda metabolizma artışı olarak oluşan CO₂, önce HCO₃⁻'a çevrilerek akciğerlere taşınır. Alveollerde ise hemoglobinin bıraktığı H⁺ ile birleşerek H₂CO₃'i ve ardından CO₂'i oluşturur ve CO₂ de gaz halinde nefesle dışarı atılır. Böylece CA, Hb ile birlikte solunum olayına katılır(10). Diabetli hastaların uzun süre yüksek kan glukoz seviyesine sahip olması, en önemli eritrosit enzimlerinden olan CA'nın da glikozillenmiş olabileceği fikrini vermektedir. Nitekim Kondo ve arkadaşları(11), diabetes mellituslu hasta eritrositlerinden elde edilen glikozillenmiş CA-1 miktarının sağlam şahıslara göre fazla olduğunu ve aktivitelerinin de düşük olduğunu bulmuşlardır.

Bu çalışmada diabetli hastalar ve kontrol grubundaki glikozillenmiş Hb ve glikozillenmiş toplam eritrosit CA miktarlarının tesbiti yapılmış ve aralarında bir korelasyonun bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kan Numunelerinin Alınması : Kontrol grubu olarak, hiçbir klinik şikayeti olmayan 22-30 yaşları arasındaki 10 erkek alındı. Hasta grubu olarak da Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Dahiliye servisinde yatmakta olan 20-40 yaşlarında diabetli 10 hasta (2'si erkek) alındı. Kan numuneleri tok karnına EDTA'lı tüplere 10'ar ml halinde alındı. 4°C'da muhafaza edilip en fazla 1-2 gün içinde kullanıldı.

Glikozillenmiş Hemoglobin Miktarının ölçümü : Kan nümunelerinden plazma ve lökosit tabakalarının uzaklaştırılmasından sonra elde edilen eritrositler, hacimlerinin 1,5 misli 0°C'daki suyla hemoliz edildi. Hemolizatın üzerine 1 ml. CCl_4 ilâve edilerek vortex'de iyice karıştırıldı ve 1500 rpm'de yaklaşık 20 dakika santrifü; edildi. Üst fazdaki berrak hemolizatta siyanmethemoglobin metoduna göre (12) Hb tayini yapıldı. Hemolizat. Hb değerleri % 1 g olacak şekilde destile su ile seyreltildi. Hemolizatın 3 ml'si glikozillenmiş Hb tayini için deney yapılacağı güne kadar -20°C'da saklandı. Daha sonra tekrar oda sıcaklığına getirilerek Parker ve arkadaşları(13) tarafından geliştirilen kolorimetrik metoda göre glikozillenmiş hemoglobin miktarı belirlendi. Nümune çalışmadan önce fruktoz kullanılarak standart bir eğri hazırlandı (Şekil 1). Standart eğriden nümuneler için μ mol fruktoz/litre değerleri bulundu. Hemolizat 10 g/litre Hb ihtiva ettiğinden bu değerler 10'a bölünerek μ mol fruktoz /g Hb değerleri elde edildi.

Glikozillenmiş Karbonik Anhidraz Tayini : Yukarıda anlatıldığı gibi elde edilen hemolizat, Whitney (14) tarafından önerildiği şekilde hazırlanan afinite kolonuna uygulanarak aynı metodla saflaştırıldı. CA aktivitesi gösteren fraksiyonlar biraraya getirildi ve Sephadex G-25 kullanılarak derişikleştirildi (15). Derişikleştirilmiş CA çözeltisinde coomasie blue metoduna göre(16) protein miktarı ve Parker ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik metodla (13) glikozillenmiş CA miktarları belirlendi. Sonuçlar mg glukoz/mg protein olarak verildi.

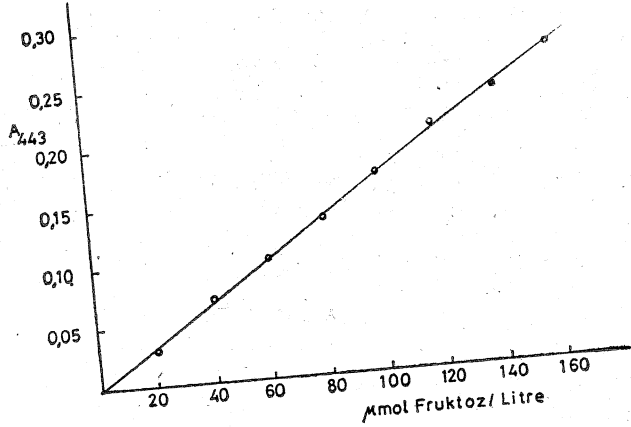
Karbonik Anhidrat Aktivitesi Tayini : CA enziminin saflaştırılması sırasında CA aktivitesi belirlenmesinde Rickli ve arkadaşları (17) tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metodu kullanıldı. Bu metod, CO_2 'in hidrasyonu sonucu H^+ iyonundan ileri gelen pH değışiminin bromtimol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

BULGULAR

Bu çalışmada 10 sağlıklı (yaş aralığı 22-30, hepsi erkek) ve 10 diabetli hasta (yaş aralığı 20-40, 2'si erkek) şahıslardan kan nümuneleri alınarak, önce hemolizatlarda glikozillenmiş Hb değerleri bulunmuştur. Daha sonra CA, afinite kromatografisi metodu kullanılarak saflaştırılmış ve glikozillenmiş CA değerleri belirlenmiştir. Kontrol grubu glikozillenmiş Hb'i ile diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş Hb'i arasında ve kontrol grubunun glikozillenmiş CA'ı ile diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş CA'ı arasında testi yapılarak sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuçlar her iki karşılaştırma için önemlilik derecesinin çok büyük olduğunu göstermiştir ($P < 0,001$).

Kontrol grubunun glikozillenmiş Hb'i ile glikozillenmiş CA'ı ve diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş Hb'i ile glikozillenmiş CA'ı arasında korelasyon

hesabı yapılarak elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş Hb'i ile glikozillenmiş CA'ı arasında korelasyon olmadığı, kontrol grubunda ise aynı parametrelerde az önemli bir korelasyonun olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 1. Standart fruktoz grafiği.

Tablo 1. Kontrol grubunun glikozillenmiş Hb'i ile diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş Hb'i ve kontrol grubunun glikozillenmiş CA'ı ile diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş CA'ı arasında t testi.

Parametre	$\bar{X} \pm SD$	t	P
Kontrol grubu için glikozillenmiş Hb (μ mol fruktoz/g Hb)	$0,80 \pm 0,11$		
Diabetli hastalar grubu için glikozillenmiş Hb (μ mol fruktoz/g Hb)	$2,29 \pm 0,90$	-4,9	<0,001
Kontrol grubu için glikozillenmiş CA (mg glukoz/mg protein)	$3,03 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$		
Diabetli hastalar grubu için glikozillenmiş CA (mg glukoz/mg protein)	$6,38 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$	13,3	<0,001

Tablo 2. Kontrol grubunun glikozillenmiş Hb'i ile glikozillenmiş CA'ı ve diabetli hastalar grubunun glikozillenmiş Hb'ı ile glikozillenmiş CA'sı arasında korelasyon hesabı.

Parametre	r	t	P
Kontrol grubu için glikozillenmiş Hb	-0,64	2,35	<0,05
Kontrol grubu için glikozillenmiş CA			
Diabetli hastalar için glikozillenmiş Hb	0,49	1,38	>0,05
Diabetli hastalar için glikozillenmiş CA			

TARTIŞMA :

Bu çalışmada sağlam şahıslarla diabetli hastalarda glikozillenmiş Hb ve glikozillenmiş eritrosit toplam karbonik anhidraz enzimlerinin miktarları belirlenmiştir.

Hemoglobinin glikozillendiği öteden beri bilinmekte olduğu halde (2), karbonik anhidraz izoenzimlerinden olan CA-I'in glikozillendiği sadece tek çalışmada bildirilmiştir (11). Diğer izoenzimlerle ilgili ve eritrositlerdeki toplam CA hakkında herhangi bir çalışmaya literatürde karşılaşmadık. Bundan hareketle bu araştırmada eritrositlerde bulunan toplam CA'nın diabetli hastalarda ve sağlam şahıslarda tesbiti ve aynı gruplarda glikozillenmiş Hb ve glikozillenmiş CA arasında bir korelasyonun bulunup bulunmadığı hedeflenmiştir.

Glikozillenmiş Hb ve CA tayininde Parker ve arkadaşları(13) tarafından geliştirilen kolorimetrik metot kullanılmıştır. Bunun için izoelektrik odaklama metodu(18) gibi değişik metodlar da önerilmesine rağmen daha ucuz ve pratik olması bakımından kolorimetrik metot tercih edilmiştir. Kondo ve arkadaşları (11) da CA-I'in glikozillenmesini aynı yolla belirlemişlerdir.

Glikozillenmiş Hb ve CA tayinleri için kullanılan standart eğrinin (Şekil 1) hazırlanmasında standart çözelti olarak fruktoz çözeltisi kullanıldı. Çünkü bütün heksozların okzalik asit gibi zayıf bir asitle ısıtılması sonucu 5-hidroksimetil furfurale dönüştüğü bilinmektedir(19). Bu yüzden standart olarak fruktoz veya glukozun kullanılması sonucu etkilememektedir.

Glikozillenmiş Hb birimi olarak diğer araştırmacılar gibi μmol fruktoz/g Hb kullanıldı. Glikozillenmiş CA birimi olarak ise mg glukoz/mg protein alındı. Kondo

ve arkadaşları (11) CA-I için birim olarak mg glukoz/ g Hb değerini kullanmışlardır. Ancak saflaştırma sırasında CA'nın bir kısmı kaybedildiğinden dolayı bu birimin kullanılması uygun bulunmamıştır.

Hemolizatta elde edilen μmol fruktoz/g Hb değerleri ($X \pm \text{SD}$ olarak kontrol grubu için $0,80 \pm 0,11$, diabetli hastalar grubu için $2,29 \pm 0,90$), Subramaniam ve arkadaşları (20)'nin elde ettikleri değerler (kontrol grubu için $1,67 \pm 0,23$; diabetli hastalar grubu için $2,93 \pm 0,95$) ile Standefer ve arkadaşları (21) tarafından elde edilen değerler (kontrol grubu için $0,70-0,92$ diabetli hastalar grubu için $1,04-3,10$ sınırları içinde)'le kıyaslandığında birbirine nisbeten yakın olduğu görülmektedir.

Kontrol grubu için toplam glikozillenmiş CA değerleri $X \pm \text{SD}$ olarak $3,043 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$ mg glukoz/mg protein, diabetli hastalar grubu için $6,38 \times 10^{-4} \pm 0,53 \times 10^{-4}$ mg glukoz/mg protein elde edilmiştir. Kondo ve arkadaşları (11) da 10 sağlıklı şahıs ve 10 diabetli için glikozillenmiş CA-I değerlerini, toplam CA-I'in yüzdesi olarak sırayla $3,4 \pm 1,9$ ve $8,3 \pm 3,8$ bulmuşlardır. Elde ettiğimiz değerler, 1 mol CA'nın 1 mol glukoz bağladığı nazara alınarak (11) toplam CA'nın yüzdesi olarak ifade edildiğinde $5,1 \pm 0,9$ ve $10,7 \pm 0,9$ olarak bulunur. Bu sonuçlar Kondo ve arkadaşlarınca bulunan değerden büyüktür. Bunun sebebi araştırma-mızda toplam CA'nın söz konusu olmasındandır.

Kontrol grubu için glikozillenmiş Hb ile glikozillenmiş CA arasında az önemli bir korelasyon olmasına rağmen ($P < 0,05$), diabetli hastalar grubu için korelasyona rastlanmamıştır ($P > 0,05$). Bu durum, normal şahıslarda kan glukoz seviyesinin belirli sınırlar için de sürekli sabit olması ve diabetli hastalarda glukoz seviyesinin düzensiz yükselip inmesinden kaynaklandığı şeklinde izah edilebilir.

SUMMARY

THE DETERMINATION OF GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN AND CARBONIC ANHYDRASE IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

In this study, glycosylated carbonic anhydrase values in carbonic canhydrase solution purified by affinity chromatography and glycosylated hemoglobin values were determined for 10 healthy control subjects (10 males, ages between 22-30) and 10 patients with diabetes mellitus (8 females and 2 males, ages between 20-40). While the glycosylated hemoglobin value was found 0.80 ± 0.11 micromole fructose/g hemoglobin, glycosylated carbonic anhydrase value was $3.03 \times 10^{-4} \pm 0.53 \times 10^{-4}$ mg glucose/mg protein in the control group. These values were 2.29 ± 0.9 micromoles fructose/g hemoglobin and $6.38 \times 10^{-4} \pm 0.53 \times 10^{-4}$ mg glucose/mg protein (mean $\pm$ SD) in diabetic group, respectively.

The results of the statistical analyses showed that the difference between glycosylated hemoglobin and glycosylated carbonic anhydrase values for diabetic and control groups was important (for both $P < 0.001$). While there was less important correlation between glycosylated hemoglobin and glycosylated carbonic anhydrase ($r = -0.64$, $P < 0.05$) for the control group, there was no correlation between these values for the diabetic group ($r = 0.49$, $P > 0.05$).

KAYNAKLAR

1. Mayer TK, Freedmann Z R: Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta* 127: 147-184, 1982.
2. McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, Solway J, Bunn HF: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin; purification, identification and partial structural analysis. *J. Biol. Chem* 253: 2327-2332, 1978.
3. McWerry BA, Fischer C, Hopp A, Huennes ER: Production of pseudo diabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections glycosylated proteins. *Lancet* 1: 738-740, 1980.
4. Schnider SL, Kohn RT: Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 66: 1179-1181, 1980.
5. Shin YS, Stern C, Vonruke A, et al: Glycated hemoglobin and glycated albumin. Evaluation of different methods in diabetic control. *J. Clin. Chem.* 22 (1): 47-51, 1984.
6. McFarland KF, Catalano EW, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW: Non-enzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 28: 1011-1024, 1979.
7. Paisley RB, Clamp JR, Kent MJC, Light ND, Hoptun M, Martog M: Glycosylation of hair: Possible measure of chronic hyperglycaemia. *B. Med. J.* 288: 669-671, 1984.
8. Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 103-109, 1975.
9. Mortensen HB, Volund A, Christophersen C: Glycosylation of human haemoglobin A. Dynamic variation in HbA_{1c} described by a biokinetic model. *Clin. Chim. Acta* 136: 75-81, 1984.
10. Tashian RE, Hewett-Emmett D (Ed.): Biology and chemistry of the carbonic anhydrase. *The Annals of The New York Academy of Sciences* 429, 275-298, 1984.

11. Kondo T, Murakami K, Ohtsuka Y, Tsuji M, Gasa S, Taniguchi N, Kawakami Y: Estimation and characterization of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* 166: 227-236, 1987.
12. Bauer JD, Franklen S, Reitman S, Sonnenwirth AC: *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Saint Louis, Thec. V. Mas by Company, 7 th ed. Vol. 1, 1970, pp: 403, 457-459,
13. Parker KM, England JD, Costa J, et al: Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* 29: 669, 1981.
14. Whitney PL: Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal. Biochem.* 57: 467-476, 1974.
15. Pharmacia Fine Chemicals, Sephadex ion exchangers: A guide to ion exchange chromatography Upsala, Sweden, 1970.
16. Bradford MP: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
17. Rickli EE, Ghaznafar SAS, Gibbons BH, Edsall JT: Carbonic anhydrase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 239: 1065-1079, 1964.
18. Krishnamoorthy R, Wajman H, Labie D: Isoelectricfocusing: A method of multiple applications for hemoglobin studies. *Clin. Chem. Acta* 69: 203-209, 1976.
19. Bozdağ, R, Yüreğir TG: Glikohemoglobin tayininde fruktozun standart olarak kullanılması. *Ç.Ü. Tıp Fak. Der.* 4: 310-315, 1982.
20. Subramaniam CV, Rādhakrishnamurthy, B, Berenson GS: Photometric determination of glycosylation of hemoglobin in diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 26 (12): 1683-1687, 1980.
21. Standefer JC, Eaton RP: Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* 29(1): 135-140, 1983.