

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞINDA MALNUTRİSYONUN
GLİKOZİLE TRANSFERRİN
İZOFORMLARININ DAĞILIMINA ETKİSİ**

Dr. ÖZNUR BİLEN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞINDA MALNUTRİSYONUN
GLİKOZİLE TRANSFERRİN
İZOFORMLARININ DAĞILIMINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZNER BİLEN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Canan ÇOKER

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2008.KB.SAG. 031
sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	v
Teşekkür.....	vii
Özet.....	1
Abstract.....	4
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	7
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	9
2.1. GLİKOPROTEİNLER	9
2.1.1. Proteinlerin Glikozilasyonu.....	9
2.1.2. Glikoproteinlerin İşlevi.....	11
2.1.3. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması.....	12
2.2. PROTEİN GLİKOZİLASYONUNUN BOZULDUĞU DURUMLAR	12
2.2.1. Konjenital Glikozilasyon Bozuklukları	13
2.2.2. Kronik Alkol Alımı	14
2.2.3. Protein Glikozilasyonunun Etkilendiği Diğer Patolojik Durumlar.....	15
2.3. GLİKOZİLASYON PATERNLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN TANIMINDA "TRANSFERRİN MODELİ"	17
2.3.1 Transferrin Yapısı ve İzoformları.....	17
2.3.2. Transferrin İzoformlarının Analizi	19
2.4. İZOELEKTRİK FOKUSLAMA ELEKTROFOREZİ	20

2.5. MALNUTRİSYON	22
2.5.1. Tanımı ve Görülme Sıklığı	22
2.5.2. Etiyolojik Faktörler	23
2.5.3. Değerlendirme Yöntemleri	24
2.5.3.1. Nutrisyonel Antropometrik Yöntemler	24
2.5.3.2. Biyokimyasal Belirteçler	26
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</u>	29
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	29
3.1.1. Cihazlar	29
3.1.2. Kimyasallar ve Diğer Sarf Malzemeleri	30
3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	31
3.2.1. Olguların Seçimi	31
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	32
3.3. TRANSFERRİN İZOFORMLARININ İEF YÖNTEMİ İLE ANALİZİ	32
3.3.1. Yöntem Değerlendirme	32
3.3.2. İEF Yöntemi ile "Multiphor II" Elektroforez Cihazında Transferrin İzofomlarının Analizi	33
3.3.2.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar	33
3.3.2.2. İEF Basamakları	34
3.3.3. İEF Yöntemi ile "PhastSystem" Elektroforez Cihazında Transferrin İzofomlarının Analizi	36
3.3.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar	37
3.3.3.2. İEF Basamakları	38
3.3.4. Transferrin İzofomlarının Kantitasyonu	41

3.4. TRANSFERRİN ANALİZİ.....	41
3.5. DEMİR / TOTAL DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ ANALİZİ	41
3.6. FERRİTİN ANALİZİ.....	42
3.7. PREALBUMİN ANALİZİ.....	42
3.8. İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ ANALİZİ.....	42
3.9. ÇİNKO ANALİZİ.....	42
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	43
3.11.1. Verilerin Kaydedilmesi, Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. HASTA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR.....	44
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş Dağılımları ve Malnutrisyon Dereceleri .	44
4.2. YÖNTEM DEĞERLENDİRME	45
4.2.1. Kesinlik Deneyleri	45
4.2.1.1. "Multiphor II" cihazında yapılan deneyler	45
4.2.1.2. "Phastsystem" cihazında yapılan deneyler	47
4.2.2. Doğruluk Deneyleri	48
4.2.3. Nöraminidaz Enzimiyle İşleme ile Transferrin Varyantlarının Gösterilmesi.....	48
4.2.4. Yöntem Karşılaştırma	49
4.2.4.1. Bağımlı gruplarda t testi	49
4.2.4.2. Regresyon Analizi	49
4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	53
4.4. TRF İZOFORMLARININ VE CDT'NİN DAĞILIM YÜZDELERİ.....	59

4.5. KORELASYON ANALİZLERİ	63
<u>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	66
5.1. TARTIŞMA.....	66
5.2. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
<u>6. KAYNAKLAR VE EKLER</u>	78
6.1. KAYNAKLAR.....	78
6.2. EKLER.....	84

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Gelişmekte olan ülkelerde 5 yaş altı çocuklarda protein enerji malnutrisyonunun prevalansı, 1995	23
Tablo 2: Malnutrisyonda kullanılan "Gomez" ve "Waterlow" Sınıflamaları	25
Tablo 3: Cihazlar	29
Tablo 4: Kimyasallar ve diğer sarf malzemeleri	30
Tablo 5: "Multiphor II" cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan prefokuslama ve ayırma basamakları	36
Tablo 6: "Phast" Sistem cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan prefokuslama ve ayırma basamakları	39
Tablo 7: "Phast" Sistem cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan boyama ve yıkama basamakları	40
Tablo 8: Olguların yaş (ay) dağılımı	44
Tablo 9: Olguların BGA değerlerinin dağılımı	44
Tablo 10: Hastaların malnutrisyon derecelerine göre dağılımı	44
Tablo 11: "Multiphor II" cihazında yapılan jeliçi ve jellerarası tekrarlanabilirlik sonuçları...45	45
Tablo 12: "Phast" Sistem cihazında yapılan jeliçi ve jellerarası tekrarlanabilirlik sonuçları...47	47
Tablo 13: "Multiphor II" cihazının "Phast"sisteme göre kontrol materyali kullanılarak bulunan % bias sonuçları.....48	48
Tablo 14: "Multiphor II" ve "Phast" Sistem ile yapılan yöntem karşılaştırma sonuçları.....49	49
Tablo 15: Hasta gruplarında biyokimyasal belirteçler ve kontrol grubu ile karşılaştırılması .53	53
Tablo 16: Hasta gruplarında TRF izoformları, CDT ve bu değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....59	59
Tablo 17: Biyokimyasal belirteçlerin, transferrin izoformlarının ve CDT'nin BGA ile korelasyonları.....63	63

Tablo 18. Biyokimyasal belirteçlerin birbirleri ile korelasyonları.....	64
--	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Lipid bağlı oligosakkaritin proteine transferi	10
Şekil 2: N-Glikozilasyonda işlemlenme aşaması	11
Şekil 3: Tetrasiyalo-Fe _{1N} ⁻ Transferrin	18
Şekil 4: Transferrin izoform paternleri.	20
Şekil 5: "Multiphor II" sisteminde yapılan jeliçi tekrarlanabilirlik analizleri	46
Şekil 6: "Phast" Sistemde yapılan jeliçi tekrarlanabilirlik analizleri	47
Şekil 7: Nöraminidaz ile işleme ardından elde edilen İEF jel görünümü.....	48
Şekil 8: Asiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği	49
Şekil 9: Monosiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği....	50
Şekil 10: Disiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği.....	50
Şekil 11: Trisiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği.....	51
Şekil 12: Tetrasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği...51	
Şekil 13: Pentasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği...52	
Şekil 14: Hekzasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği...52	
Şekil 15: Hasta ve kontrol gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği.....	54
Şekil 16: Hasta ve kontrol gruplarında demir düzeyi kutu grafiği.....	54
Şekil 17: Ağır ve orta manitre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği.....	55
Şekil 18: Ağır ve orta manitre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında demir düzeyi kutu grafiği.....	55
Şekil 19: Ağır ve orta manitre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında TRF düzeyi kutu grafiği.....	56

Şekil 20. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında ferritin düzeyi kutu grafiği.....	56
Şekil 21. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği.....	57
Şekil 22. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında ferritin düzeyi kutu grafiği.....	58
Şekil 23. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında asiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği.....	60
Şekil 24. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında disiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği.....	61
Şekil 25. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında monosiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği.....	62
Şekil 26. Transferrin proteinindeki mutasyonların nöraminidaz ile saptanması.....	68
Şekil 27. TRF mikroheterojenitesinin izoform analizi üzerine etkisi.....	68
Şekil 28. Dünyada 5 yaş altı çocuklarda görülen ölüm sebepleri.....	70

KISALTMALAR

Ab: Antikor

AN: Anoreksiya Nervoza

BMI: Vücut kütle indeksi

BOS: Beyin omurilik sıvısı

BSA: "Bovin" serum albumini

BGA: Boya göre ağırlık

CBB G250: "Coomassie brilliant blue G 250"

CDG: Konjenital Glikozilasyon Bozuklukları

CDT: Karbohidratı eksik transferrin izoformları (Carbohydrate deficient transferrin)

CE: Kapiller elektroforez

CZE: Kapiller zon elektroforezi

DDBK: Doymamış demir bağlama kapasitesi

DNA: Detaylı nutrisyonel değerlendirme

Dol-P: Dolikol-monofosfat

Dol-P-P-oligosakkarid: Dolikol-pirofosfat-oligosakkarid

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

ER: Endoplazmik retikulum

GlcNAc: N-asetil glukozamin

GlcNAc-PP-Dol: GlcNAc-pirofosfat-dolikol

HFI: Herediter Fruktöz İntoleransı

HPLC: Yüksek performanslı likit kromatografisi

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

İEF: izoelektrik fokuslama

Man: Mannoz

pI: İzoelektrik pH

PİNİ: Prognostik inflamatuvar ve nutrisyon indeksi

RBP: Retinol bağlayıcı protein

s: Standart sapma

SA: siyalik asit

SGA: Subjektif global değerlendirme

TBG: Tiroksin bağlayıcı globulin

TDBK: Total demir bağlama kapasitesi

TCA: Trikloroasetik asit

TİA: Türbidimetrik immun ölçüm

TRF: Transferrin

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan, her konuda manevi desteğini esirgemeyen, tez çalışmalarım da bilimsel olarak bana yol gösteren tez danışmanım ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER'e ve ayrıca Prof. Dr. Banu ÖNVURAL'a ve Biyokimya Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine; Eğitim sürecimdeki sonsuz katkılarından dolayı Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN, Dr. Tuncay KÜME ve Dr. Özgür KADIÇEŞME'ye;

Uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık, dostluk ve sevgilerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, kardeşim Dr. Eylem SEÇKİN BOZKURT, Dr. Nur Hilal YUSUFOĞLU ve Dr. Yılmaz ÖZALP'e;

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren anabilim dalı sekreterimiz Eda OLUM'a; çalışmalarım esnasında kimyasal maddelerin temininde yardımcı olan Sayın Emin Çavuşlu ve ihtisas süresince hep desteğini gördüğüm Sayın Tuncer HACIOĞLU'na ve tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına;

Beni bugünlere getiren değerli anne, babama, ve bana her konuda destek olan sevgili kardeşim Özcan ERSOY'a ve eşim Rifat Özgür BİLEN'e sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Dr. Öznur BİLEN

2010

ÖZET

Golgi ve endoplazmik retikulumda bir dizi karmaşık reaksiyon sonucu oluşan protein glikozilasyonu; hücre adezyonu, migrasyonu, hücre büyümesi, hücre yüzeyinin tanınması, hücre yüzey antijenitesi gibi birçok fizyolojik durumla yakından ilişkilidir. Bu nedenle glikozilasyonun bozulması, konjenital glikozilasyon bozuklukları yanısıra inflamasyon, romatoid artrit, kanser, karaciğer hastalığı, galaktozemi, sepsis ve kronik alkol alımı gibi birçok patolojik durumla birliktelik gösterebilir. Katabolik durumla seyreden hastalıklarda da protein glikozilasyonunun etkilendiğine dair yayınlar yapılmış, fakat bu durum henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada malnutrisyonlu hasta grubunda transferrin izoformlarının (glikoform) dağılımı ve bu dağılımın malnutrisyonun derecesi ve beslenme belirteçleri ile ilişkisi incelenerek malnutrisyonun glikozilasyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışma grubunu 6 ay - 5 yaşları arasında "Waterlow" sınıflamasına göre değerlendirilen 42 malnutrisyonlu (n=24 hafif, n=12 orta, n=6 ağır) ve 30 sağlıklı çocuk oluşturdu. Her iki grupta da prealbumin, insülin benzeri büyüme faktörü-1, ferritin, demir, total demir bağlama kapasitesi, çinko ve transferin düzeyleri ölçüldü. Glikozilasyondaki değişiklikleri değerlendirmek üzere TRF izoform analizi referans yöntem olan izoelektrik fokuslama ile gerçekleştirildi. Bu yöntem "Multiphor II" ve "Phast" sistem olmak üzere iki ayrı sistemde uygulandı ve değerlendirildi. İstatistiksel analizler için "SPSS 16.0 for Windows" programı kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma, t testi ve/veya "Mann-Whitney U" testi ile gerçekleştirildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi. Korelasyon değerlendirmesinde "Pearson" ve "Spearman" analizleri kullanıldı.

"Multiphor II" sistemi ile İEF yönteminde di- ve tetrasiyalotransferrin izoformları için iki düzey kontrolde jel içi tekrarlanabilirlik $< \% 3,5$ (n=7), jeller arası tekrarlanabilirlik ise $< \% 7$ (n=20); "Phast" Sistemde sırasıyla $< \% 7$ (n=8) ve $< \% 6$ (n=10) bulundu. "Multiphor II" sistemi için % bias değerleri düşük ve yüksek düzey kontrol materyalinde disiyalotransferrin için sırasıyla 9,69 ve 9,27, tetrasiyalotransferrin için sırasıyla 1,33 ve 2,15 olarak bulundu. A-, mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hekza- ve heptasiyalotransferrin izoformlarının oransal (%) değerleri açısından iki sistem arasında (n=40) anlamlı fark olmadığı, di- ve tetrasiyalotransferrin izoformları için korelasyon katsayılarının (r) sırası ile 0,85 ve 0,64 olduğu saptandı.

Biyokimyasal beslenme parametreleri açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve demir düzeylerinin hasta grubunda anlamlı (sırasıyla $p= 0,009$ ve $p= 0,006$) düşük olduğu saptandı. Ağır ve orta malnutrisyonlu hasta grubunda ($n=18$) serum IGF-1, demir ve TRF düzeyleri kontrol olgularına göre anlamlı düşük (sırasıyla $p= 0,007$, $p= 0,036$ ve $p= 0,018$), ferritin düzeyleri ise anlamlı yüksek ($p= 0,010$) saptandı.

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1'in demir ($p= 0,000$, $r= 0,562$), transferrin ($p= 0,001$, $r= 0,421$) ve prealbumin ile ($p= 0,001$, $r= 0,420$) pozitif yönde, ferritin ile ($p= 0,001$, $r= -0,446$) negatif yönde korelasyon gösterdiği saptandı. Demir ise insülin benzeri büyüme faktörü-1 yanısıra transferrin ($p= 0,027$, $r= 0,276$), prealbumin ($p= 0,006$, $r= 0,340$) ve çinko ile ($p=0,041$, $r= 0,254$) pozitif yönde korelasyon gösterdi. Ferritin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 yanısıra transferrin ile de ($p=0,000$, $r= -0,484$) negatif yönde korelasyon gösterdi.

Transferrin izoformlarının dağılımı ve a-,mono- ve disiyalotransferrinin toplamı olarak tanımlanan "karbohidratı eksik transferrin" açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Ağır ve orta malnutrisyonlu hastaların serum a- ve disiyalotransferrin düzeyleri kontrol olgularına göre anlamlı yüksek (sırasıyla $p= 0,040$ ve $p= 0,036$) saptandı.

"Boya göre ağırlık" indeksinin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 ($p= 0,006$ ve $r= 0,359$) ve demir ($p= 0,006$, $r= 0,339$) ile olumlu, disiyalotransferrin ($p= 0,017$ ve $r= -0,292$) ve CDT ($p= 0,007$ ve $r= -0,328$) ile olumsuz korelasyon gösterdiği belirlendi.

Transferrin ile disiyalotransferrin ($p= 0,022$, $r= 0,283$) ve karbohidratı eksik transferrin ($p= 0,009$, $r= 0,323$) arasında olumlu, tetrasiyalotransferrin ($p= 0,025$, $r= -0,278$) arasında ise olumsuz korelasyon saptandı. Transferin izoformlarının diğer biyokimyasal parametreler ile ilişkisi değerlendirildiğinde ise sadece asiyalotransferrin ile prealbumin ($p= 0,021$, $r= 0,287$) arasında olumlu korelasyon saptandı.

Sonuç olarak olgu ve kontrol grupları arasında, karbohidratı eksik transferrin ve onu oluşturan izoformlar açısından anlamlı bir fark bulunmasa da olgu grubunda değerlerin daha yüksek olması ve monosiyalotransferrin izoformunun ağır malnutrisyonlu hasta grubunda hafif malnutrisyonlu hasta grubu ve kontrollere kıyasla anlamlı yüksek olması malnutrisyonun glikozilasyonu etkileyebilecek bir durum olduğuna işaret etmektedir. BGA ile disiyalotransferrin ve karbohidratı eksik transferrin arasındaki anlamlı negatif korelasyon bu

görüşü desteklemektedir. Daha ağır malnutrisyonlu olgularda ya da katabolik süreç ile seyreden diğer hastalıklarda izoelektrik fokuslama ile yapılacak transferrin izoform analizinin glikozilasyon değişikliklerini ortaya koyabileceği düşünülmektedir. Katabolik süreçte protein glikozilasyonunda ortaya çıkan değişikliklerin nedenleri ve sonuçları hakkında ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Glikozilasyon, malnutrisyon, transferrin izoformları, izoelektrik fokuslama

ABSTRACT

Protein glycosylation, a result of many complex reactions in golgi and endoplasmic reticulum, is closely related to physiological processes such as cell adhesion, migration, cell surface recognition and cell membran antigenity. Therefore, defects in glycosylation is associated with several pathological conditions including inflammation, rheumatoid arthritis, cancer, liver diseases, galactosemia, sepsis and chronic alcohol abuse in addition to congenital disorders of glycosylation. Moreover some studies suggested that catabolic diseases may effect protein glycosylation, yet this issue needs further clarification. The aim of this study has been to evaluate the effect of malnutrition on glycosylation by investigating the possible changes in transferrin isoform (glycoform) pattern in malnutrition and its relationship to the degree of malnutrition and other nutritional parameters.

The study group included 42 malnourished patients (n=24 mild, n=12 moderate, n=6 severe) and 30 healthy controls (age range: 6 months- 5 years) who were evaluated according to Waterlow classification. In both groups prealbumin, insulin like growth factor-1, ferritin, iron, total iron-binding capacity, transferrin and zinc levels were measured. Transferrin isoform analysis was performed by isoelectric focusing, the reference method, to demonstrate the changes in glycosylation. The method was applied and evaluated on two different systems (Mutiphor II and Phastsystem). Statistical analyses were performed by "SPSS 16.0 for Windows" program. The comparison between the groups was done using t test or Mann-Whitney U test. For all analyses p value less than 0.05 was considered to be stastically significant. Correlations between parameters were evaluated using "Pearson" and "Spearman" tests.

In isoelectric focusing method by Multiphor II system the coefficients of variation (CV) were determined to be < 3.5 % for within run (n=7) and < 7 % for between run (n=20) imprecision considering di- and tetrasialotransferrin isoforms in two levels of control material. The same values for Phastsystem were < 7 % (n=8) and < 6 % (n=10) respectively. The bias of Multiphor II system against Phast system was 9.69% and 9.27% for disialotransferrin and 1.33% and 2.15% for tetrasialotransferrin using low and high levels of control material respectively. A-,mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- and heptasialotransferrin isoforms (%) showed no significant difference between the two systems

(n=40) and coefficients of correlation for di- ve tetrasialotransferrin isoforms were determined to be 0.85 ve 0.64 respectively.

Considering the biochemical nutritional parameters, insulin like growth factor-1 and iron were determined to be significantly lower ($p= 0.009$ and $p= 0.006$ respectively) in the patient group in comparison to the control group. Significantly lower values were observed for IGF-1, iron and transferrin ($p= 0.007$, $p= 0.036$ and $p= 0.018$ respectively) and higher values were observed for ferritin ($p= 0.010$) in moderately and severely malnourished patient group (n= 18) compared to controls.

Insulin like growth factor-1 was correlated positively with iron ($p= 0.000$, $r= 0.562$), transferrin ($p= 0,001$, $r= 0,421$) and prealbumin ($p= 0.001$, $r= 0.420$) while negatively with ferritin ($p= 0.001$, $r= -0.446$). Iron was correlated positively with transferrin ($p= 0.027$, $r= 0.276$), prealbumin ($p= 0.006$, $r= 0.340$) and zinc ($p=0.041$, $r= 0.254$) along with insulin like growth factor-1. Ferritin showed a negative correlation with transferrin ($p=0.000$, $r= -0.484$) along with insulin like growth factor-1.

For transferrin isoforms and for "carbohydrate deficient transferin" described as the sum of a-, mono- and disialotransferrin, no significant difference existed between patients and controls. Significantly higher values were observed for asialotransferrin and disialotransferrin ($p= 0.040$ and $p= 0.036$ respectively) in moderately and severely malnourished patients compared to controls.

"Weight for Height" was positively correlated with insulin like growth factor-1 ($p= 0.006$, $r= 0.359$) and iron ($p= 0.006$, $r= 0.339$) while negatively correlated with disialotransferrin ($p= 0.017$, $r= -0.292$) and CDT ($p= 0.007$, $r= -0.328$).

Transferrin was positively correlated with disialotransferrin ($p= 0.022$, $r= 0.283$) and CDT ($p= 0.009$, $r= 0.323$) while negatively correlated with tetrasialotransferrin ($p= 0.025$, $r= -0.278$). As to the relationship of transferrin isoforms to other biochemical parameters, a positive correlation was observed only between asialotransferrin and prealbumin ($p= 0.021$, $r= 0.287$).

In conclusion, the results of this study point out that malnutrition is a disease status which may effect glycosylation. Although insignificant, higher values were observed for

"carbohydrate deficient transferrin" and for the isoforms constituting it in malnourished patients compared to the control group and the monosialotransferrin isoform was significantly higher in severely malnourished patients compared to mildly malnourished and the control group. The significantly negative correlation between "Weight for Height" and disialotransferrin and "carbohydrate deficient transferrin" further support this opinion. In a larger patient group with severe malnutrition and in other disease states with markedly increased catabolism, transferrin isoform analysis with isoelectric focusing may reveal the alterations in protein glycosylation. The mechanisms underlying the alterations in glycosylation during catabolic process and its outcomes need to be elucidated with further studies.

Keywords: Glycosylation, malnutrition, transferrin isoforms, isoelectric focusing

1. GİRİŞ VE AMAC

Glikozilasyon en sık görülen post-transyonel modifikasyon reaksiyonlarından biridir ve ökaryotlardaki bilinen proteinlerin yaklaşık yarısı glikoziledir (1). Glikoproteinlerin oligosakkarit yapısı (glikan); hücre adezyonu, migrasyonu, hücre büyümesi (1, 2), hücre yüzeyinin tanınması (hormonlar, virusler ve başka hücreler tarafından), hücre yüzey antijenitesi (örneğin kan grubu antijenleri) (3) gibi birçok fizyolojik durumla yakından ilişkilidir. Bu nedenle glikozilasyonun bozulması birçok patolojik durumla birliktelik gösterebilir (2). Glikozilasyonun primer olarak etkilendiği konjenital glikozilasyon bozukluklarının (4-6) yanı sıra inflamasyon, romatoid artrit, kanser, gebelik, karaciğer hastalığı (7), galaktozemi (8), sepsis (9) ve kronik alkol alımı (10, 11) gibi sekonder nedenlere bağlı olarak da glikozilasyon bozulabilir. Son zamanlarda anoreksiya nervoza (AN) gibi katabolik durumla seyreden hastalıklarda da protein glikozilasyonunun etkilendiğine dair yayınlar yapılmıştır (12-14).

Glikozilasyonun karmaşık mekanizmasının anlaşılabilmesi ve bozukluklarının aydınlatılabilmesi için şimdiye kadar birçok glikoprotein üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu glikoproteinlerin içinde tanı amaçlı kullanıma en uygun olan ve en sık analiz edilen ise transferrindir (6). Transferrinin içerdiği siyalik asit miktarına göre 8 ayrı izoformu bulunur (10). Transferrin (TRF) izoformlarının analizinde, yüksek selektivitesi nedeniyle izoelektrik fokuslama elektroforezi (İEF) referans yöntem olarak kullanılır. Glikan zincirlerinden birinin veya ikisinin birden yokluğuyla oluşan; a-, mono- ve disiyalotransferrini içeren gruba "karbohidratı eksik transferin (CDT)" denir (15). CDT bilimsel literatürde ilk kez 1976 yılında Stibler ve Kjellin tarafından, alkoliklerin serum ve BOS' larında (beyin omurilik sıvısı) rapor edilmiştir (16). Kronik alkol alımında CDT'nin artış mekanizması henüz tam anlaşılmamakla birlikte etanol veya onun metaboliti olan asetaldehitin, golgide, N-glikan zinciri sentezini etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca alkoliklerin serumunda galaktozil transferaz ve N-asetilglukozaminiltransferaz aktivitelerinin azaldığı da gösterilmiştir (10).

Son zamanlarda anoreksiya nervoza gibi katabolik sürecin hakim olduğu hastalıklarda da CDT artışı olabileceği savunulmuştur (13, 14). CDT'nin artmasında olası mekanizma olarak, açlığa bağlı kanda artan asetoasetatın alkol metaboliti olan asetaldehite yapısal benzerliği nedeni ile enzim inhibisyonu yapması öne sürülmüştür (14). Başka bir çalışmada

ise AN'de aslında CDT artışının olmadığı, bu hatalı yüksekliğin özgüllüğü ve duyarlılığı düşük yöntemlerle çalışmanın bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (12). Bu konuda az sayıda çalışma yapılmış olması ve bu çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılmış olması sonuçların yorumunu güçleştirmektedir. Ayrıca katabolik hastalarda yapılan çalışmalarda genellikle kromatografik ayırımın ardından türbidimetrik immün ölçüm (TİA) ile CDT ölçümü üzerine yoğunlaşmış (% CDT-TİA) referans yöntem olan İEF ile tüm izoformların değerlendirildiği bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle AN gibi katabolik durumla seyreden hastalıkların glikozilasyon bozukluğu ile ilişkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Daha önce katabolik hasta gruplarında CDT analizi yapılmış olsa da olgu grubunu sadece malnutrisyonlu hastaların oluşturduğu bir çalışma yoktur. Olgu grubu olarak malnutrisyonlu çocukları seçmemizin nedeni malnutrisyonda da vücutta besin yetmezliği sonucu katabolik bir durum oluşmasıdır. Bizim çalışmamız malnutrisyonlu hastalarda tüm TRF izoformlarının referans yöntem olan İEF ile değerlendirildiği ilk çalışma olacaktır.

Bu çalışmada malnutrisyonlu hasta grubunda transferrin izoformlarının dağılımı ve bu dağılımın malnutrisyonun derecesi ve beslenme belirteçleri ile ilişkisi incelenerek malnutrisyonun glikozilasyon üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmadaki ikincil amacımız ise TRF izoform analizi için referans metot olan İEF yöntemini laboratuvarımızda kurmaktır. Glikozilasyon bozukluklarının tanısında referans metot olarak kabul edilse de İEF yönteminin performansının değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle yöntemin doğruluk ve kesinlik gibi analitik performans kriterlerinin değerlendirilmesi ve ayrıca İEF yöntemine dayalı iki cihazın birbiri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİKOPROTEİNLER

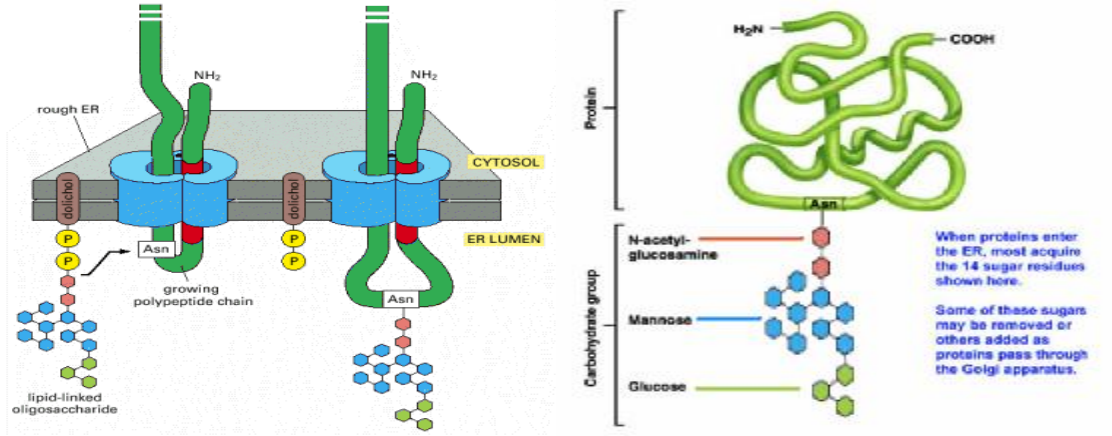
Polipeptid omurgalarına kovalent olarak bağlanmış oligosakkarid zincirleri (glikanlar) içeren proteinlerdir (3, 17). Ökaryotik proteinlerin yaklaşık % 50'sine şeker bağlı olduğu tahmin edilmektedir, dolayısı ile glikozilasyon (şekerlerin enzimatik bağlanması) proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları arasında en sık rastlanılandır. Şekerlerin proteinlere enzimatik olmayan yollardan da bağlanması mümkündür ve bu durum glikasyon olarak tanımlanır. Bu sürecin ciddi patolojik sonuçları ortaya çıkabilir (örneğin kontrolsüz diyabetes mellitusta). Glikokonjugat veya kompleks karbohidrat eşdeğer terimler olup glikoproteinleri, proteoglikanları ya da glikolipidleri oluşturmak üzere bir proteine ya da bir lipide kovalent olarak bağlanmış bir ya da daha fazla karbohidrat zinciri içeren molekülleri tanımlamak için kullanılırlar. İnsanlarda albumin hariç hemen tüm plazma proteinleri glikoproteindir. Hücre membranı proteinlerinin çoğu önemli miktarda karbohidrat içermektedir. Kan grubu maddelerinin birkaçı glikoprotein, diğerleri glikosfingolipid yapıdadır. Bazı hormonlar da (örneğin koriyonik gonadotropin) glikoprotein yapıdadır (17).

2.1.1. Proteinlerin Glikozilasyonu

Protein glikozilasyonunun N-glikozilasyon ve O-glikozilasyon olmak üzere 2 ana tipi vardır. N-glikozilasyon biraraya gelme [sitozol ve endoplazmik retikulum (ER)] ve işleme (ER ve golgi) aşamalarından oluşur. O-glikozilasyon ise sadece biraraya gelme aşamasından oluştuğu halde daha karmaşıktır (18).

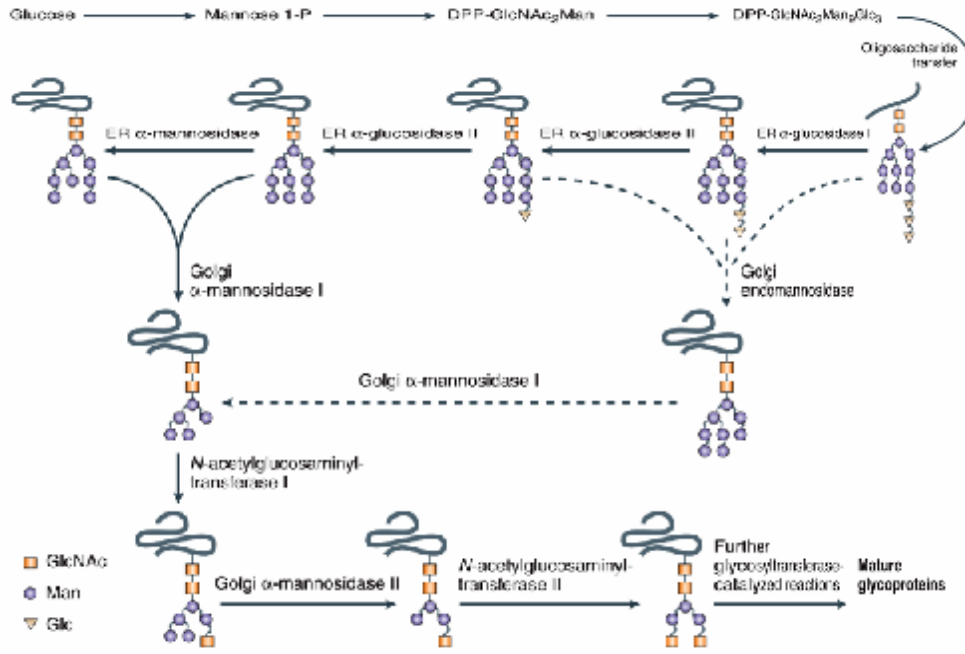
Dolikal-pirofosfat-oligosakkarid (Dol-P-P-oligosakkarid), N-bağlı glikoproteinlerin biyosentezinde anahtar rol oynar. Bu bileşiğin oligosakkarid zinciri genellikle R-GlcNAc₂Man₉Glc₃ (R=Dol-P-P) yapısına sahiptir. Bu bileşiğin şekerleri önce Dol-P-P omurgası üzerinde toplanır (17). İlk reaksiyon, N-asetil glukozamin (GlcNAc) fosfatın, UDP-GlcNAc'den, membrana bağlı dolikal monofosfata (Dol-P) transferidir (ER'nin sitoplazmik kısmında). Bu transfer sonunda GlcNAc-pirofosfatdolikal (GlcNAc-PP-Dol) oluşur. Bu lipid bağlı monosakkarite sırayla bir GlcNAc ve beş mannoz (Man) kalıntısı eklenir. Bu mannozların kaynağı glikolitik yolun ara ürünü olan fruktoz 6-fosfattan sentezlenen GDP-

mannozlardır. Bu lipid bağılı heptasakkarit- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ membrandan lümene geçer ve dört mannoz ile üç glukoz daha sırayla ilave olur. Böylece ilk aşama olan bir araya gelme aşaması sona ermiş olur. Bu reaksiyonlar için dört mannozil transferaz, üç glukozil transferaz ve dolikolfosfat bağılı monosakkaritlere (Dol-P-Man ve Dol-P-Glc) ihtiyaç vardır (18). Tamamlanan $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ oligosakkarit, oligosakkarit transferaz kompleksi ile olgunlaşmamış proteinin asparagin rezidüsüne transfer edilir (Şekil 1) (18-20).



Sekil 1. Lipid bağılı oligosakkaritin proteine transferi (20)

N-glikozilasyonun işleme aşaması ise ER'de glukozların (glukozidaz I ve II tarafından kataliz edilir.) ve bir mannozun (α -mannozidaz I tarafından kataliz edilir.) uzaklaştırılması ile başlar. Daha sonra yeniden yapılanma [GlcNAc, fukoz, galaktoz, siyalik asit (SA) gibi şekerlerin ilavesi] ile sonlanır (Şekil 2) (18, 20).



Şekil 2. N-Glikozilasyonda işleme aşaması (20)

O-bağlı glikoproteinlerin oligosakkarid zincirleri ise, şekerlerin özgün glikoprotein glikoziltransferazlar tarafından katalizlenen tepkimelerde adım adım eklenmesi ile Golgi cisimciğinde sentez edilir. Glikoprotein yapısına katılan şekerlerin donörü, nükleotid şekerlerdir. N-bağlı glikoproteinlerin sentezinin aksine özgün bir dolikol-P-P-oligosakkarid ve çeşitli glikozidazlar sentezde yer almaz (17).

2.1.2. Glikoproteinlerin İşlevi

Glikoproteinlerin yapısındaki glikanların biyolojik işlevleri çok hücreli kompleks organ ve organizmaların oluşumunda önem kazanır, çünkü bu süreçte hücrelerin birbirleri ile ve kendilerini çevreleyen hücre dışı matris ile etkileşimleri gerçekleşmek zorundadır. Glikanların çoğu hücre içi ve hücre dışına salgılanan glikoproteinlerin dış yüzeyinde bulunurlar ve dolayısı ile hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini düzenlemek veya aracılık etmek için çok uygun bir yerleşimdedirler. Membrana bağlı bu glikoproteinler, hücre yüzeyinin tanınması (hormonlar, viruslar ve başka hücreler tarafından), hücre yüzey antijenitesi (örneğin kan grubu antijenleri), hücre dışı matris bileşenlerini oluşturma gibi

birçok hücreyel olayda rol alırlar. Gastrointestinal ve ürogenital yolların müsin salgısı olarak biyolojik koruyucu kaygan yapıyı oluştururlar (3).

TRF ve serüloplazmin taşıyıcı molekül olarak görev yapar. Tiroid stimulan hormon, koryonik gonadotropin gibi hormonlar ve alkaleen fosfataz gibi bazı enzimler de glikoprotein yapıdadır. Trombositlerin yüzey membranlarındaki spesifik glikoproteinler ise hemostazda rol oynarlar. Ayrıca embriyonik gelişim, normal doku organizasyonu, tümör metastazı ve hücrelerin hücre dışındaki moleküller ile etkileşimlerinde de rol aldıklarını gösteren birçok veri mevcuttur (17).

2.1.3. Glikoproteinlerin Sınıflandırılması

Polipeptid ve oligosakkarid zincirleri arasındaki bağın özelliğine bağlı olarak, üç ana sınıfa ayrılırlar (17):

1. O-glikozid bağı taşıyanlar (O-bağı):

Bağlanma serin veya treoninin hidroksil yan zinciri ile N-asetilgalaktozamin (GalNAc-Ser[Thr]) arasında olur.

2. N-glikozid bağı taşıyanlar (N-bağı):

Bağlanma asparaginin amid azotu ile N-asetilglukozamin arasında (GlcNAc-Asn) olur.

3. Glikozilfosfatidilinozitol bağı taşıyanlar (GPI-bağı):

Bir proteinin karboksil ucundaki amino aside bir fosforil-etanolamin kısmı ile bağlanmış bir oligosakkarid (glikan) mevcuttur ve bu da glukozamin aracılığı ile fosfatidilinozitole (PI) bağlıdır.

2.2. PROTEİN GLİKOZİLASYONUNUN BOZULDUĞU DURUMLAR

Glikoproteinlerin karbohidrat (glikan) kısımlarının fonksiyonlarını anlayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Glikanların yapısal farklılığı gösterilmiştir (7). Karbohidrat zincirindeki değişikliklerin gösterildiği durumlar; konjenital glikozilasyon bozuklukları (CDG) (5, 18, 21-23), inflamasyon, romatoid artrit, kanser, gebelik, karaciğer hastalığı (7),

galaktozemi (8), sepsis (9), kronik alkol alımı (10, 11) ve AN gibi katabolik durumla seyreden hastalıklar (13, 14) olarak sayılabilir.

2.2.1. Konjenital Glikozilasyon Bozuklukları

Glukokonjugatların biyosentezindeki enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan doğumsal metabolik hastalıklar CDG olarak tanımlanır. CDG'lerde ya glikokonjugatın glikan (oligosakkarit) kısmının sentezi ya da makromoleküle aktarımı bozuktur. Bu hastalıkların klinik fenotipleri geniş bir yelpaze gösterir, başta normal beyin gelişimi ve işlevleri olmak üzere sinir sistemi, gastrointestinal ve immun sistem etkilenir. CDG'lerin çoğu heterojen klinik tablolar ile ortaya çıkabilen multisistemik hastalıklardır (5).

N-Glikozilasyon bozuklukları CDG-I ve CDG-II olmak üzere iki ana gruba ayrılır. CDG-I oligosakkaritin bir araya gelme ve proteine eklenme aşamasındaki defekt sonucu, CDG-II ise işleme aşamasındaki defekt sonucu oluşur. Son zamanlarda bazı N-glikozilasyon bozukluklarında O-glikozilasyonun da etkilendiği gösterilmiştir (5). Şimdiye kadar tanımlanan 16 CDG alt tipinin 12 tanesinde primer olarak N-glikozilasyonda, 4 tanesinde ise O-glikozilasyonda bozukluk görülmüştür. N-Glikozilasyon bozukluklarının sekizi (CDG-Ia, CDG-Ib, CDG-Ic, CDG-Id, CDG-Ie, CDG-If, CDG-Ig, CDG-Ih) bir araya gelme, dördü (CDG-IIa, CDG-IIb, CDG-IIc, CDG-IId) ise işleme aşamasındaki defekte bağlıdır. Bu hastalıklardan en sık görülen fosfomannoz-2 eksikliğine bağlı gelişen CDG-Ia'dır. Bu grupta tek tedavi edilebilen hastalık ise fosfomannoz-izomeraz eksikliğine bağlı gelişen CDG-Ib'dir (mannoz tedavisi). O-Glikozilasyon bozuklukları ise iki O-ksilozilglikan (Ehlers-Danlos sendromunun progeroid varyantı ve multipl ekzostoz sendromu) ve iki O-mannozilglikan (Walker-Warburg sendromu ve kas-göz-beyin hastalığı) defektini içerir. Multipl ekzostoz sendromu hariç tüm bilinen CDG'ler otozomal resesif kalıtılır (18).

CDG'li hastalarda birçok biyokimyasal test sonucu anormal çıkabilir. CDG-Ia'da anormal karaciğer fonksiyon testleri, proteinüri ile beraber düşük plazma kolesterol ve kolinesteraz aktivitesi görülebilir. Hipoalbuminemi, yetersiz insülin artışıyla beraber hipoglisemi, yüksek aminotransferaz aktivitesi CDG-Ib için; oransız aminotransferaz aktivitesi, artmış AST, normal ALT düzeyi CDG-II altgrupları için tipiktir. Plazma ve BOS'da yüksek glisin düzeyi, trombositopeni ve yüksek plazma ferritini görülebilir. CDG-Ia'da amniyotik sıvıda artmış β -hekzozaminidaz aktivitesi belirteç olarak kullanılabilir (6).

CDG tip I'de; alfa-1 antitripsin (aAT), tiroksin bağlayıcı globulin (TBG) ve TRF gibi glikoproteinlerin izoformlarının dağılımının değiştiği gösterilmiştir. Bu proteinlerin miktarı genellikle hayatın ilk yıllarında düşüktür. Bu durum bir çok pıhtılaşma faktörü ve onların inhibitörleri (F V,XI, II, X, ATIII, Protein C/S, heparin kofaktör II) için de geçerlidir. Tiroid hormonları (T3, T4, rT3) sıklıkla normalin altındadır. Bu glikoproteinlerin seviyeleri zamanla artar ve sabitlenir (6).

CDG tanısı genellikle İEF elektroforezinde, TRF izoform analizi ile konulur. Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki farklı İEF paterni vardır. Tip 1 patern, di- ve asiyalotransferrin bandlarının artışı, tetraasiyalotransferrin bandının düşüklüğü ile karakterizedir. Tip 2 patern ise tri- ve monosiyalotransferrin bandlarının yüksekliği ile karakterizedir (21). CDG-I olan hastalarda tip 1 patern, CDG-II olan hastalarda tip 2 patern görülür (18). CDG'nin alt tiplerinin tanısının konabilmesi için ise enzim ve mutasyon analizleri gibi ileri tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulur (21).

2.2.2. Kronik Alkol Alımı

Kronik alkol tüketimi sonucu (haftada en az birkez 50-80 g/gün alkol) TRF izoformlarının dağılımının değiştiği, CDT'yi oluşturan izoformların arttığı gösterilmiştir (24). Bu artış ölçülü alkol alımında ılımlı düzeydeyken, aşırı alkol alımında çok yüksek seviyelere çıkabilir (25).

Yoğun alkol kullanımı dönemlerinde TRF içindeki karbohidrat içeriği (SA, galaktoz, N-asetilglukozamin) düşmektedir (11). Kronik alkol alımında CDT'nin artış mekanizması henüz tam anlaşılmamakla birlikte etanol veya onun metaboliti olan asetaldehitin, golgide N-glikan zinciri sentezini etkilediği düşünülmektedir. Stibler ve Borg, alkoliklerin serumunda galaktozil transferaz ve N-asetilglukozaminiltransferaz aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. Örneklere in-vitro asetaldehit eklenmesi enzim aktivitesini ayrıca düşürmüştür (10).

Son 10 yıl içinde, CDT alkol kullanımını gösteren önemli bir belirleyici olmuştur (11). Bunun nedeni γ -glutamiltransferaz, aspartat aminotransferaz, glutamat dehidrogenaz gibi diğer belirteçlerin sadece belli bir organdaki hastalığı göstermeleri ayrıca özgüllük ve duyarlılıklarının düşük olmasıdır (24). CDT ise kronik alkol alımını değerlendirmede kullanılan en spesifik laboratuvar belirteçidir (26).

2.2.3. Protein Glikozilasyonunun Etkilendiği Diğer Patolojik Durumlar

Sepsis

Sepsisli hastaların eritrositlerinin, membran SA içeriklerinin azaldığı gösterilmiştir. Eritrosit membranındaki SA negatif yüklü olduğundan eritrositlerin birbirini itmesini sağlar ve agregasyonu engeller. Sepsisli hastalarda ise membran SA içeriği azalmasına bağlı eritrositlerin agregabilitelerinin arttığı, deformabilitelerinin azaldığı gösterilmiştir (27).

Yapılan başka bir çalışmada ise sepsiste transferrinin hızlı desiyalilasyonu gözlenmiştir. Bu durumun siyalik asidi parçalayan enzim olan nöraminidaz aktivitesi ya da üretiminin artışı veya tetrasiyalo-TRF ile disiyalo-TRF'nin plazmaya salınım hızlarının farklı oluşuna bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Sepsisli hastalarda SA azalmasının mekanizmasının anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (9).

Tedavi Edilmemiş Herediter Fruktöz İntoleransı ve Galaktozemi

Her iki hastalıkta da yüksek CDT düzeyleri gösterilmiştir. Bu hastalıkların tanısındaki gecikme ağır sekillere ve ölüme yol açabileceğinden erken tanı çok önemlidir. Galaktozemi taramasında kuru kan damlası örneğinde total galaktoz (galaktoz ve galaktoz 1 fosfat) ve/veya galaktoz 1 fosfat üridil transferaz (GALT) enzim aktivitesi tayini yapılır (28). Herediter fruktoz intoleransı (HFİ) taramasında ise laboratuvar tanı daha güçtür. HFİ için, Aldolaz B gen mutasyon taraması güvenilir bir tanı yöntemi gibi görünse de duyarlılığının çok iyi olmayışı, pahalı oluşu ve sadece bu mutasyonu taşıyanları saptayabilmesi bu testin kullanımını kısıtlar (8). Kesin tanı için ise her iki hastalıkta da enzim aktivitesinin tayini gerekir (HFİ için karaciğerde aldolaz B , galaktozemi için eritrositlerde GALT enzim aktivitesi) (29). Bu nedenle CDT ölçümü önemlidir. Ayrıca tedavi sonrası CDT düzeyleri normale indiğinden, tanı konmuş hastaların diyetle uyumunu değerlendirmede de bu test kullanılabilir (8).

Tedavi edilmemiş galaktozemili hastalarda yapılan, İEF elektroforezi sonucu CDG'li hastalara benzer anormal paternler görülmüştür (30, 31). Bu durumun altında yatan mekanizma henüz çözülmemekle birlikte galaktozeminin; N-glikozilasyonun hem bir araya gelme hem de işleme aşamasındaki bozukluk sonucu oluşan sekonder "dual" bir CDG olduğu düşünülmektedir (30).

Kanser

Kanser ile ilgilenen araştırmacıların çoğu kanser hücrelerinin yüzeylerindeki glikoprotein ve diğer glikokonjüгатların yapısındaki değişimlerin metastaz olayında önem taşıdığını düşünmektedir (17).

Serum CDT düzeyinin alkolizm tanısı koyma gücünün, hepatosellüler kanserli hastalarda düştüğü gösterilmiştir (32). 2003 yılında kanser hastalarında yapılan bir çalışmada trisiyalotransferrinin arttığı saptanmış ancak bu artış trisiyalotransferrin ile birlikte göç eden olasılıkla sakkarit yapıda bir başka maddenin varlığına bağlanmıştır (33).

Romatoid Artrit ve İnflamasyon

Akut ve kronik inflamatuvar durumların, birçok glikoprotein glikozilasyon paterninde değişikliğe yol açtığı tanımlanmıştır (34). Kronik inflamasyonla seyreden romatoid artrit, dolaşımdaki immunoglobulin G (IgG) moleküllerinin glikozilasyonunun bozulması ile ilişkilidir. IgG'nin Fc bölgesi galaktozdan yoksun kalır ve GlcNAc ile sonlanır. Manno-bağlayıcı protein (MBP), karaciğer hücreleri tarafından sentez edilerek dolaşıma salınan bir C-lectin olup mannoz, GlcNAc ve diğer bazı şekerleri bağlar. Dolayısıyla agalaktozil IgG moleküllerini de bağlayabilir ve bu moleküller daha sonra kompleman sistemini aktive ederek eklemlerin sinovyal membranlarındaki kronik inflamasyona katkıda bulunurlar (17).

2001 yılında yapılan bir çalışmada; erkeklerde yüksek CDT düzeylerinin, artmış romatoid artrit riskiyle birliktelik gösterdiği kanıtlanmıştır (34). Daha önce yapılan birkaç çalışmada ise romatoid artritli hastalarda, yüksek sayıda SA içeren TRF izoformlarının artışı ve buna bağlı CDT'nin düşüşü gösterilse de bunun nedeni açıklanamamıştır (35, 36).

Anoreksiya Nervoza ve Katabolik Durumla Seyreden Diğer Hastalıklar

Katabolik durumla seyreden hastalıklarda da protein glikozilasyonunun etkilendiğine dair yayınlar yapılmış, fakat bu durum henüz tam açıklığa kavuşturulmamıştır. Yapılan bir çalışmada farklı etiyojilere bağlı katabolik sürece girmiş hastalarda, serum CDT düzeylerinin yüksek olduğu ve CDT'nin bu hasta grubunda alkol alımını değerlendirmek için uygun bir belirteç olmadığı gösterilmiştir (14). Yine aynı ekibin 2005 yılında AN'li hastalarda yaptığı çalışmada ise CDT artışının hastalığın prognoz ve ciddiyetiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (13).

Katabolik durumlarda oluşan keton cisimlerinden biri asetoasetattır. Asetoasetatın, bir alkol metaboliti olan ve glikozil transferazları inhibe eden asetaldehite yapısal olarak benzerliği, katabolik durumlarda CDT artışının olası mekanizması olarak düşünülmüştür (14).

Başka bir çalışmada ise AN'de aslında CDT artışının olmadığı, bu hatalı yüksekliğin özgüllüğü ve duyarlılığı düşük yöntemlerle çalışmanın bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (12).

2.3. GLIKOZİLASYON PATERNLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN TANIMINDA "TRANSFERRİN MODELİ"

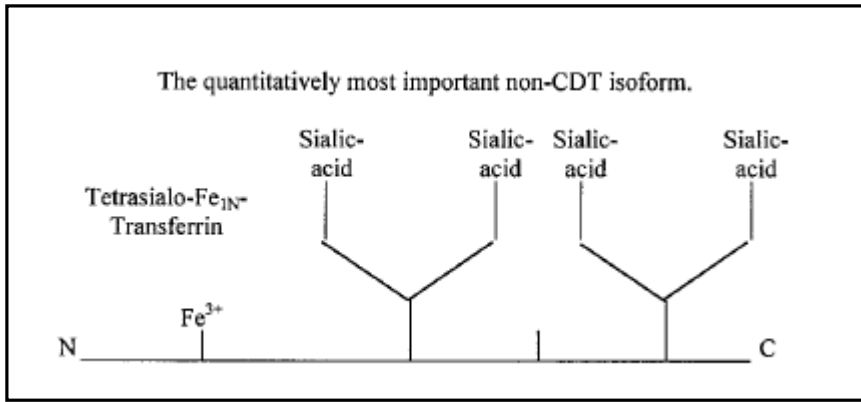
Glikoprotein sentezinin bozulduğu durumlarda alfa-1 antitripsin (aAT), tiroksin bağlayıcı globulin (TBG) ve TRF gibi birçok proteinin izoformlarının dağılımının değiştiği gösterilmiştir. Bu glikoproteinler içinde tanı amaçlı kullanıma en uygun olan ve en sık analiz edilen TRF'dir. Çünkü TRF'nin glikan yapıları tanımlanmış ve glikozilasyon bölgelerinin sayısı belirlenmiştir. Glikozilasyon mekanizması ise göreceli olarak daha basittir (6).

2.3.1. Transferrin Yapısı ve İzofomları

Demir (Fe^{+3}) için temel taşıyıcı molekül olan TRF, 79.600 dalton ağırlığında, yaklaşık % 5.5 oranında karbohidrat içeren ve tek polipeptid zincirinden oluşan bir glikoproteindir. TRF primer olarak karaciğerde sentezlenir, plazma düzeyleri demir yeterliliğiyle düzenlenir. Yarı ömrü 8-10 gün olan TRF'nin yaklaşık yarısı lenf ve BOS gibi ekstrasellüler sıvılarda vasküler kompartmanın dışında bulunur (37). Tek polipeptid zinciri, iki ayrı metal iyonu bağlama bölgesi (biri N-terminal, biri C-terminal bölgede olmak üzere) ve iki N-bağlı kompleks glikan zinciri olmak üzere üç ayrı yapısal bölümden oluşur. Bu yapı, farklı patolojik durumlarda belirgin değişkenlik gösterir. Genetik TRF varyantları polipeptid zincirindeki aminoasitlerin yer değiştirmesine bağlı olarak meydana gelir. Bilinen en az 38 transferrin varyantı vardır. Fakat bunlardan sadece dört tanesinin prevalansı % 1' i aşar. Beyaz ırkta en çok görülen C (Caucasians) varyantının 16 alt tipinden TRF-C1'in prevalansı % 95'tir (10, 38). Her TRF molekülü en fazla iki metal iyonu (tercihen Fe^{+3}) bağlayabilir. Organizmanın Fe^{+3} ihtiyacına bağlı olarak TRF; demir iyonu bağlamayabilir (Fe_0 -TRF veya apo-TRF), tek demir iyonu (Fe_{1N} - veya Fe_{1C} -TRF) veya iki demir iyonu bağlayabilir. Her iki glikan zincirinin ise dallanma dereceleri "bi-, tri- ve tetraantennary" olmak üzere farklılık

gösterebilir ve her biri negatif (-) yüklü bir SA molekülü ile sonlanır. Böylece serumda asiyalotransferrin (SA içermeyen) ve siyalotransferrin (monosiyalotransferrinden oktasiyalotransferrine kadar) izoformları oluşur. (10).

TRF molekülü 3 ayrı yapısal bölümden oluşmasının bir sonucu olarak; farklı sayıda SA içerebilir, farklı sayıda demir iyonu bağlayabilir veya farklı kişilerde çeşitli TRF varyantları (polipeptid zincirinde farklılıklar) görülebilir. Bu durum TRF mikroheterojenitesinden sorumludur. Sağlıklı kişilerde TRF'nin bağladığı Fe^{+3} iyonu sayısı kişinin demir ihtiyacına göre değişirken, en sık görülen varyant TRF-C ve miktarı en çok olan izoform ise tetrasiyalotransferrindir (Şekil 3) (10).



Şekil 3. Tetrasiyalo- Fe_{1N} - Transferrin (10)

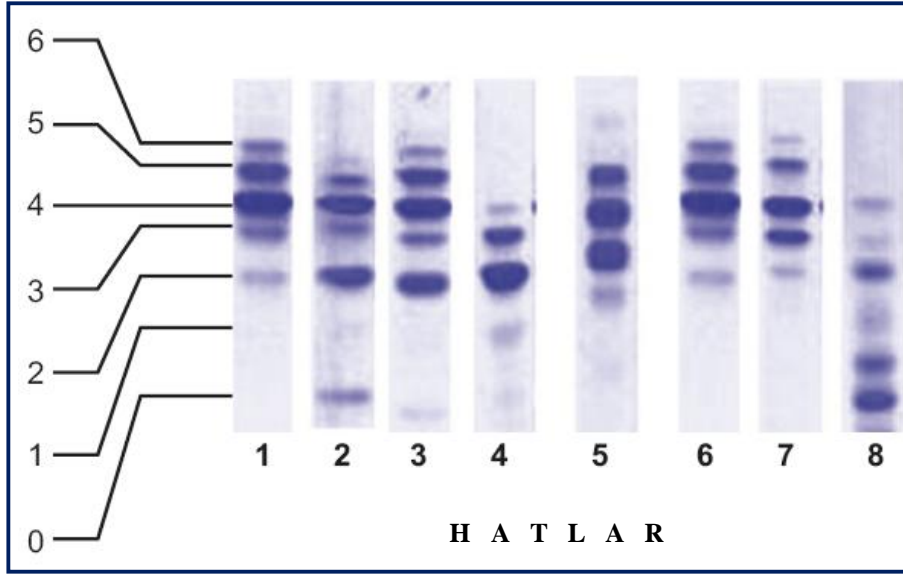
Glikan zincirlerinden birinin veya ikisinin birden yokluğuyla oluşan; a-, mono- ve disiyalotransferrin içeren gruba ise "karbohidratı eksik transferrin" denir (15). CDT bilimsel literatürde ilk kez 1976 yılında Stibler ve Kjellin tarafından, alkoliklerin serum ve BOS' larında rapor edilmiştir (16). CDT'nin fizyolojik rolü henüz tam bilinmemekle birlikte, intraselluler migrasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (39). Son 10 yıl içinde, CDT alkol kullanımını gösteren önemli bir belirleyici olmuştur. Yoğun alkol kullanımı dönemlerinde TRF içindeki karbohidrat içeriği (SA, galaktoz, N-asetilglukozamin) düşmektedir (11).

CDT düzeyleri alkol alımının yanı sıra cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, obezite, serum demir ve insülin düzeyi gibi bir çok faktörden etkilenebilir. Fakat bu durumların hiçbirinde CDT düzeyi eşik değerin üzerine çıkmaz (14).

2.3.2. Transferrin İzofomlarının Analizi

TRF izoform analizinde kullanılan yöntemlerin çoğu kromatografi ve elektroforez esasına dayanır (40). Özellikle birçok klinik durumla ilişkili olan CDT izoformları için ilk kez tanımlandıkları 1976 yılından bu yana çeşitli analiz metotları yayınlanmıştır. Günümüzde halen CDT'ye spesifik kimyasal reaksiyonların ve antikorların mevcut olmaması nedeniyle, doğru analiz için CDT'nin CDT olmayan izoformlardan iyi ayırımına ihtiyaç vardır (41).

Bu ayırım; İEF (38, 42), kapiller elektroforez (CE) (12), kapiller zon elektroforezi (CZE) (43), yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) (44, 45) ve mikrokolonda anyon değişim kromatografisi (40) gibi elektroforetik veya kromatografik yöntemler ile sağlanabilir. Kromatografik metotlarla kıyaslandığında elektroforetik yöntemler daha yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahiptirler (6). Yine son zamanlarda özellikle CDG alt tiplerinin ayırımında daha duyarlı ve özgül bir yöntem olan kütle spektrometrisinin farklı tipleri ["matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS)", "Surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry (SELDI-MS)", "electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)"] kullanılmaya başlanmıştır (6, 46). TRF izoformlarının analizinde, yüksek selektivitesi nedeniyle izoelektrik fokuslama elektroforezi referans yöntem olarak kullanılır (15). İEF yöntemi ile serum ve plazmadaki normal patern, CDG'li hastalarda görülen tip 1 ve tip 2 patern, TRF varyantlarının olduğu durumlardaki patern birbirinden ayırt edilebilir (Şekil 4) (47).



Şekil 4. Transferrin izoform paternleri. Hat 1 ve 6 normal patern, hat 2 ve 3 tip 1 patern, hat 4 ve 5 tip 2 patern, hat 7 TRF protein varyantı, hat 8 normal EDTA'lı (Etilendiamin tetra asetik asit) plazma örneği. Sol taraftaki numaralar transferrin izoformlarının içerdiği SA sayılarını gösterir (47).

2.4. İZOELEKTRİK FOKUSLAMA ELEKTROFOREZİ

İzoelektrik fokuslama elektroforezinin kullanımı proteinler, enzimler ve peptidler gibi yüklü moleküllerle sınırlıdır. Bunlar aynı zamanda amfoterik moleküllerdir. Proteinin net yükünü belirlemede, aminoasit yan zincirlerinin pozitif ve negatif yüklerinin toplamı ve üç boyutlu konfigürasyonları önemlidir. Örneğin karboksil yan grubu taşıyan aminoasitler, düşük pH değerlerinde nötral, yüksek pH değerlerinde negatif yüklüken, imidazol grubu taşıyan aminoasitler ise düşük pH değerlerinde pozitif yüklü, yüksek pH değerlerinde nötraldirler. Gliko ve nükleoproteinler gibi kompleks proteinlerin yükleri ise yapılarındaki şeker ya da nükleik asitlerden etkilenir (48).

Yöntemin prensibi, proteinlerin uygun pH gradiyenti içinde izoelektrik noktalarına (pI) eş değer bölgeye ulaşınca kadar göç etmeleri ve o noktada keskin bir bant oluşturmalarıdır (bir başka deyişle kendi pI'larında odaklanmalarıdır). İzoelektrik noktada proteinin net yükü "sıfır" olur ve göç durur (49).

Bir protein karışımı pH gradiyenti içinde bir noktaya uygulandığında, her protein farklı yüklenir (48). Proteinler, izoelektrik pH'larının altında pozitif olarak yüklüdür ve sabit pH'lı bir ortamda negatif yüklü elektroda (katoda) doğru göç eder. İzoelektrik noktalarının

üstündeki pH'larda ise, proteinler proton kaybeder, negatif yüklü hale geçer ve pozitif yüklü elektroda (anoda) doğru göç eder (50). Proteinlerin göçü, her biri kendi izoelektrik noktasına ulaşmaya kadar sürer (48). İki proteinin İEF'de ayrılabilmesi için izoelektrik noktaları arasında en az 0.02 pH ünitesi fark olması gerekir (49).

İzoelektrik fokuslama yöntemi bir "end-point" metottür. Bunun anlamı; protein izoelektrik noktasına ulaştığında zamandan bağımsız olarak o noktada sabit kalır. Bu odaklanma etkisi sayesinde keskin protein zonları ve yüksek rezolüsyon elde edilir (48).

İzoelektrik fokuslama elektroforezinde hem poliakrilamid jel hem de agaroz jel kullanılabilir. Poliakrilamid jel, agaroz jele oranla daha iyi ayırım sağlar; çünkü ayrılma hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır (50). Poliakrilamid jelin dezavantajı ise akrilamid monomerinin nörotoksin oluşu ve jellerin uygun kalınlık ve içerikte hazırlanmasının güçlüğüdür (48).

Agaroz jelin kullanımının avantajları; porlarının poliakrilamid jelden daha geniş olması ve dolayısıyla 500 kDA'dan daha büyük makromolekülleri bile ayrılabilmesi, ayırım ve boyanma zamanının kısa olması ve komponentlerinin toksik olmamasıdır. Agaroz jelin dezavantajı ise poliakrilamid jelden daha güçlü elektroendozmosis etkisinin olmasıdır (48).

İEF elektroforezinde, protein göçünü sağlayan temel koşul jeldeki pH gradyentidir. Bu pH gradyenti, jele sonradan ilave edilen serbest taşıyıcı amfolitlerle oluşturulabileceği gibi pH gradyentli olarak hazırlanmış jeller (immobilize pH gradyenti) doğrudan da kullanılabilir. Serbest taşıyıcı amfolitlerle oluşturulan pH gradyentinde, bir grup amfoterik poliaminokarboksilik asit olan taşıyıcı amfolitler kullanılır (49). Bu bileşikler kendi pI değerlerinde; yüksek tamponlama kapasitesi ve çözünürlüğe, aynı zamanda iyi ve düzenli bir iletkenliğe sahiptirler. Molekül ağırlıkları düşüktür ve biyolojik etkileri yoktur (48). pKa değerleri arasında ise çok az fark vardır (49).

Farklı sayıda (50 ila 100) amfolit karışımı ortama eklendiğinde, her bir amfolit, elektroforez esnasında kendi pI değerine ulaşmaya kadar göç eder ve böylece natural pH gradyenti oluşur. En düşük pI'ya sahip olan amfolitler anoda, en yüksek pI'ya sahip olan amfolitler katoda doğru göç eder. Diğer taşıyıcı amfolitler ise pI'larına uyumlu olarak dizilirler ve çevrelerindeki pH'yı oluştururlar (49).

Çalışmada kullanılacak amfolit karışımı seçilirken, ayrılması istenen proteinlerin pI'ları göz önünde bulundurulur. Ayrım geniş bir pH aralığında (örneğin pH 3-10) yapılabileceği gibi, daha dar bir alanda da (örneğin pH 4-5) gerçekleştirilebilir (50). Dar pH aralığı genellikle yüksek rezolüsyon istendiğinde tercih edilmelidir (48).

İmmobilize pH gradiyenti, taşıyıcı amfolitlerin birtakım kısıtlılıklarından dolayı, rezolüsyonu ve üretkenliği arttırmak için alternatif bir teknik olarak geliştirilmiştir (48, 49). Gradyent tamponlanmış akrilamid türevleri ile oluşturulur; immobilinler poliakrilamid jelde akrilamid monomerlerinin ko-polimerizasyonu ile oluşur. İmmobilinler, pKa değerleriyle tanımlanan zayıf asit ve bazlardır. İstenilen pH değerinde tamponlamanın olabilmesi için biri asit diğeri baz olmak üzere en az iki immobilin gereklidir. Jelin immobilinlerle polimerizasyonu esnasında istenilen pH değeri, karışımdaki immobilin oranlarıyla ayarlanır. İmmobilin oranlarının sürekli değiştirilmesiyle pH gradiyenti elde edilir (48). İmmobilize pH gradiyenti, taşıyıcı amfolitlerle oluşturulan gradyente göre; yüksek rezolüsyon, katodik kaymanın olmayışı, değişmeyen düzenli iletkenlik ve tamponlama kapasitesi, kontrollü iyonik güç gibi birçok avantaja sahiptir (51).

İEF için ısı kontrolünün sağlanması ve etkin soğutma yapılması önemlidir. İEF işleminde keskin bantlar elde edilebilmesi için elektriksel alan gücünün yüksek olması gerekir. Bu nedenle yeterli voltajı sağlayabilen ve çok fazlı bir İEF protokolünü otomatik olarak programlayabilen bir güç kaynağı kullanılır (52).

2.5. MALNUTRİSYON

2.5.1. Tanımı ve Görülme Sıklığı

Malnutrisyon, bir ya da daha fazla besin ögesinin vücudun fizyolojik ve metabolik dengesini bozacak şekilde yetersiz veya fazla alınması sonucunda ortaya çıkan patolojik tablolara verilen ortak isimdir (53). Enerji, protein ve diğer spesifik besinlerin alımındaki dengesizlikle tetiklenen bu süreç, erken dönemde metabolik ve fonksiyonel değişikliklere, geç dönemde ise antropometrik değişikliklere yol açar (54). Çocukluk yaş grubunda "malnutrisyon" terimi yetersiz beslenmeyi ifade etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tezin bundan sonraki bölümünde malnutrisyon yetersiz beslenmeyi tanımlamak için kullanılacaktır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre en sık 6 ay-5 yaş arası çocuklarda görülmektedir. Malnutrisyon özellikle gelişmekte olan ülkeler için en önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir (Tablo 1). 2000-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 815 milyonu gelişmekte olan ülkelere olmak üzere dünyada yaklaşık 852 milyon insanın bu sorunla karşı karşıya olduğu gösterilmiştir (55).

Tablo 1. Gelişmekte olan ülkelere 5 yaş altı çocuklarda protein enerji malnutrisyonunun prevalansı, 1995 (55)

Bölge	"stunting" *	"underweight" **	"wasting" ***
Afrika	39	28	8
Asya	41	35	10
Latin Amerika ve Karayipler	18	10	3
Okyanusya	31	23	5

* Stunting; boya göre ağırlık oranı normale yakınen boy kaybı

** Underweight; yaşa göre ağırlık kaybı

*** Wasting ise yaşa göre boy oranı normalden kilo kaybı

2.5.2. Etiyolojik Faktörler

Düşük doğum ağırlığı, maternal malnutrisyon, spesifik besin eksiklikleri (iyot, A vitamini, demir, çinko), diyare, enfeksiyon hastalıkları, kronik hastalıklar, yetersiz beslenme, ekonomik kısıtlılıklar, kentleşme gibi birçok nedene bağlı olarak gelişebilir (56). Malnutrisyon morbidite ve mortaliteyi arttırabilen kötü sonuçlara neden olsa da besin desteği ile geri döndürülebildiğinden beslenmenin doğru değerlendirilmesi çok önemlidir (54).

2.5.3. Değerlendirme Yöntemleri

Beslenmenin değerlendirilmesinde günümüzde halen altın standart bir yöntem yoktur. Beslenme durumunun tanısını doğru koyabilmek ve tedavisini planlayıp izlemek için antropometrik ölçümlerden, biyokimyasal belirteçlerden veya bu yöntemlerin çeşitli kombinasyonlarından yararlanılır (57). Bu kombinasyonlardan en sık kullanılanları; detaylı nutrisyonel değerlendirme (DNA), prognostik inflamatuvar ve nutrisyon indeksi (PİNİ) ve subjektif global değerlendirmedir (SGA). DNA yönteminde ağırlık, lenfosit sayımı, serum albumin ve kolesterol konsantrasyonu, vücut kütle indeksi gibi birçok parametre birlikte değerlendirilirken PİNİ'de albumin, • 1-asitglikoprotein ve CRP ölçümü ile indeks hesaplanır. SGA ise fizik muayene, hastanın gastrointestinal semptomları, beslenme öyküsü, hastalığının evresi ve fonksiyonel durumu ile belirlenen klinik bir değerlendirme yöntemidir (58).

2.5.3.1. Nutrisyonel Antropometrik Yöntemler

Hastaların hastaneye gelişte beslenme durumlarına göre sınıflandırılmasında kullanılan basit bir değerlendirme yöntemidir. Antropometrik ölçümlerin biyokimyasal belirteçlerin aksine her yaş aralığına uygun standardize değerleri vardır (59).

Antropometrik değerlendirmede kullanılan parametreler (59, 60)

- Vücut ağırlığı
- Boy uzunluğu
- Baş çevresi
- Vücut kütle indeksi
- Triseps deri kıvrım kalınlığı
- Orta kol çevresi ölçümü

Çocuklarda büyüme ve gelişmeyi değerlendirirken bu parametrelerden sadece vücut ağırlığını baz almak yerine çocuğun boyunu ve yaşını da göz önünde bulundurmak daha uygun olur. Bu nedenle parametreler kombine edilerek antropometrik indeksler oluşturulur.

Bu indekslerden en sık kullanılanları "yaşa göre ağırlık", "boya göre ağırlık " ve "yaşa göre boy" dur (61).

Malnutrisyon şiddetinin değerlendirilmesinde "Gomez" ve "Waterlow" kriterleri en yaygın kullanılan sınıflamalardır (Tablo 2) (62, 63). "Gomez" tarafından yapılan sınıflamada, malnutrisyon, yaşa göre ağırlık baz alınarak; hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmıştır (64). Ancak günümüzde boyu da içine aldığı ve kronik malnutrisyonu da gösterdiğinden "Waterlow" sınıflaması daha çok kullanılmaktadır . "Waterlow" sınıflamasında malnutrisyon; yaşa göre boy ve boya göre ağırlık oranları kullanılarak "wasting" ve "stunding" olarak iki gruba ayrılmıştır. "Wasting " yaşa göre boy oranı normalden kilo kaybını ve akut beslenme yetersizliğini; "stunding" boya göre ağırlık oranı normale yakınken boy kaybını ve kronik beslenme yetersizliğini göstermektedir. "Waterlow" kriterleri kullanılarak malnutrisyon; şiddetine göre hafif, orta ve ağır, başlangıç şekline göre ise akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir. Boya göre ağırlık (BGA); çocuğun ağırlığının boyunun 50 percentilde olması gereken standart ağırlığa bölünmesiyle bulunur. Yaşa göre ağırlık ise çocuğun ağırlığının, aynı yaş ve cinsten 50 percentilde olması gereken standart ağırlığa bölünmesiyle bulunur. Bu değerlere büyümenin takibinde kullanılan büyüme eğrileri ve percentil çizelgelerinden ulaşılır (63).

Tablo 2. Malnutrisyonda kullanılan "Gomez" ve "Waterlow" Sınıflamaları (63)

MALNUTRİSYONUN DERECESİ	"GOMEZ" SINIFLAMASI	"WATERLOW" SINIFLAMASI	
	Yaşa göre medyan ağırlık yüzdesi	Boya göre medyan ağırlık yüzdesi (akut)	Yaşa göre medyan boy yüzdesi (kronik)
NORMAL	90-110	90-110	>95
HAFİF	75-89	80-89	90-94
ORTA	60-74	70-79	85-89
AĞIR	<60	<70	<85

2.5.3.2. Biyokimyasal Belirteçler

Laboratuvar araştırmaları özellikle spesifik besin eksikliklerinin tanısında (örneğin iz elementler), besin desteğinin yeterliliğini izlemede, metabolik komplikasyonları saptamada değerlidir. Malnutrisyonlu hastalarda immun fonksiyonların baskılanması, zayıf yara iyileşmesi, kas fonksiyonlarının zayıflaması gibi morbidite ve mortaliteyi arttıran komplikasyonlara rastlanabilir (65). Karaciğer proteinlerinin hastaların beslenme durumunu değerlendirmekten çok mortalite ve morbiditeyi göstermede ve besin desteğiyle iyileşme sürecinin takibinde faydalı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (66).

Malnutrisyonun değerlendirilmesinde albumin, prealbumin, retinol bağlayıcı protein (RBP), IGF-1, TRF gibi plazma proteinleri, esansiyel yağ asitleri, vitaminler (67), çinko, bakır, demir gibi eser elementler (68), elektrolitler, trigliserit düzeyi (62), hemoglobin, hematokrit ölçümleri ve tam kan hücre sayımı (53) kullanılabilir.

İdeal bir protein-enerji belirtecinden beklenen özellikler (69):

- Biyolojik yarı ömrü kısa olmalı
- Kolay elde edilebilir vücut sıvılarında bulunmalı
- Homeostatik düzenlenmesi sınırlı ve katabolizma hızı sabit olmalı
- Patolojik durumlardan etkilenmesi en az düzeyde olmalı

Prealbumin (Transtiretin)

54,98 kDa ağırlığında, globuler ve glikozile olmayan bir proteindir (70). "Turn-over" hızı yüksektir, yarı ömrü 2,5 gündür. Yarı ömrünün kısa olması nedeniyle plazma konsantrasyonları son zamanlardaki besin alımını yansıtır (65). Triptofan içeriğinin fazla olması ve yapısındaki esansiyel/esansiyel olmayan aminoasit oranının yüksek olması nedeniyle diyetle alınan proteinin kalitesi hakkında bilgi verir. Protein-enerji malnutrisyonunda plazma konsantrasyonu düşerken beslenme ile tekrar yükselir (69).

Prealbuminin dolaşımdaki düzeyleri, taşıdığı ve ligandı olan tiroksin ve özellikle triiyodotironin düzeylerinden etkilenir. Bu nedenle dolaşımdaki T3 düzeylerinin azaldığı durumlarda (hipotiroidizm gibi) prealbuminin bir besin belirteci olarak kullanılması uygun değildir. Plazmada RBP ile kompleks oluşturarak RBP'nin glomeruler filtrasyon sonucu kaybını önler (69). Plazma konsantrasyonu akut faz reaksiyonunda, ekstravaskuler kompartmana geçişin artması nedeniyle düşer. İnflamasyon, travma, malignite, doku nekrozu gibi akut faz reaksiyonuna yol açacak ciddi klinik durumlarda kullanımını uygun değildir (54).

Sonuç olarak prealbumin birçok durumdan etkilense de beslenme durumundaki erken dönem değişikliklerle yakından ilişkili olduğu için faydalı bir malnutrisyon belirtecidir. Kapsamlı ve zaman alıcı malnutrisyon değerlendirmelerinin yapılamayacağı durumlarda kullanımını uygun ve güvenilir bir testtir. Duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir (58).

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

Somatomedin C olarak da bilinen IGF-1, aminoasit dizilimi insüline oldukça benzeyen polipeptit yapıda bir hormondur. Dolaşımdaki IGF-1'in büyük bir kısmı karaciğerden kaynaklanmaktadır (69). Yarı ömrü 2-8 saat gibi oldukça kısa bir süredir (71). Plazma konsantrasyonu, büyüme hormonu düzeylerinden ve beslenme durumundan etkilenir (65). Malnutrisyonlu hastalarda serum düzeylerinin düştüğü ve iyi bir biyokimyasal belirteç olduğu gösterilmiştir (72). Duyarlı bir beslenme belirteci olmasına rağmen referans aralığının yaşla ve cinsiyetle değişmesi sonuçların yorumlanmasını güçleştirir (65).

Çinko

Birçok enzimin fonksiyon gösterebilmesi için gerekli olan çinko, DNA ve RNA sentezini içeren çok sayıda metabolik süreçte de rol alır. Bu nedenle çinko eksikliği gen ekspresyonu, protein sentezi, iskelet büyümesi, gonad gelişimi, iştah ve immünite gibi birçok biyolojik fonksiyonu etkiler. Nötrofiller ve doğal öldürücü hücreler gibi spesifik olmayan immunitayı düzenleyen hücrelerin fonksiyonunda merkezi rol oynar (55).

Orta ve ağır şiddetteki malnutrisyonda çinko, bakır, demir gibi eser elementlerin nutrisyonel eksikliklerine sık rastlanır (73). Çinko eksikliği genellikle yüksek fitat ve lifli, düşük proteinli beslenme ya da kancalı kurt ve şistomiyazis gibi parazitik enfeksiyonlar sonucu oluşur (74). Ayrıca çocukluk çağında malnutrisyona yol açan diyare, anne sütü

eksikliği ve tekrarlayan respiratuvar sistem enfeksiyonları gibi durumlar da çinko eksikliğine sebep olur. Malnutrisyonlu çocuklarda görülen anemi ve hipoproteinemiye sıklıkla serum düşük çinko düzeyi de eşlik eder (75).

Demir / Total Demir Bağlama Kapasitesi

Demir eksikliği yetersiz beslenme, artmış ihtiyaç (gebelik, erken çocukluk dönemi vb.) ve parazitik enfeksiyonlara bağlı kronik kayıp sonucu gelişebilir. Vücutta hemoglobin, miyoglobin ve çeşitli enzimlerin yapısında bulunan demirin eksikliği sonucu büyüme geriliği, kognitif bozukluklar ve anemi gelişebilir (55). Demir eksikliği anemisi, çocuklarda görülen beslenme problemlerinin başlıca sebeplerinden biridir. Serum demir düzeyi düşüklüğü dışında laboratuvar bulguları arasında düşük transferrin saturasyonu ve demir bağlama kapasitesi de yer alır (53).

Çocuklarda demirin lineer büyümeye etkisini araştıran birçok çalışma vardır. Demir tedavisinin lineer büyüme üzerine olan olumlu etkisinin sadece anemisi olan çocuklarla sınırlı olduğu gösterilmiştir (74).

Total demir bağlama kapasitesi ise (serumdaki demir bağlayan grupların neredeyse tamamının transferrin üzerinde bulunmasından dolayı) aynı zamanda kandaki transferrin miktarının dolaylı yoldan bir ölçütüdür. Serum TDBK düzeyi gebelik, oral kontraseptif kullanımı ve demir eksikliğinde artarken enfeksiyon, malignite gibi kronik enflamatuvar durumlarda azalmaktadır (76).

Ferritin

Küresel bir protein olan ferritin; yirmidört altbirimden oluşan bir apoferritin kabuğa ve bir de iç kısmında demir-III-oksihidroksit kristal çekirdeğe sahiptir. Apoferritin yaklaşık 445.000 dalton ağırlığında iken demir ile doymuş proteinin ağırlığı en çok 900.000 daltondur. Vücut depo demirinin yaklaşık üçte ikisini oluşturur. Depo demirinin çözünür şeklidir (77). Vücuttaki demir deposu ile serum ferritin düzeyi yüksek oranda korelasyon gösterir. Sağlıklı kişilerde demir durumunu değerlendirmek için kullanılan en duyarlı indekstir (53, 67).

Transferrin

Demir (Fe^{+3}) için temel taşıyıcı molekül olan TRF, 79.600 dalton ağırlığında bir glikoproteindir (37). Protein enerji dengesinin duyarlı bir belirteci ve prognostik bir

göstergesidir. Yarı ömrü 8- 10 gündür (69).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar

Tablo 3. Cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Yöntem	Model/ Katalog no.	Üretici Firma
Otoanalizör	Architect	C8000	Abbott Diag., USA
Otoanalizör	Architect	C16000	Abbott Diag., USA
Otoanalizör	İmmulite	2500	SiemensDiag., USA
Elektroforez ünitesi	GE Healthcare	Multiphor II /18-1018-06	GE Healthcare, İsveç
Elektroforez ünitesi	GE Healthcare	Phastsystem /18-1018-24	GE Healthcare, İsveç
Görüntü tarayıcı	GE Healthcare	Image Scanner II/18-1170-84	GE Healthcare, İsveç
Güç kaynağı	GE Healthcare	EPS 3501 XL/18-1130-32	GE Healthcare, İsveç
Su banyosu	GE Healthcare	Multitemp III/18-1102-78	GE Healthcare, İsveç
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Co, Almanya
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos	Heraeus, Almanya
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research	Eppendorf, USA

3.1.2. Kimyasallar ve Diğer Sarf Malzemeleri

Tablo 4. Kimyasallar ve diğer sarf malzemeleri

Kimyasal / Sarf Malzeme Adı	Markası	Kimyasal / Sarf Malzeme Adı	Markası
Sodyum klorür	Sigma S-7653	Glutardialdehit	Merck 104239
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)	Merck 8382Z002 642	Sodyum karbonat	Riedel-de Ha• n 13418
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma T-8657	EDTA	Fluka 03680
Potasyum hidroksit (KOH)	Carlo Erba 1310-58-3	Gümüş nitrat	Fluka 85228
Asetik asit	Sigma-aldrich 27225	Gliserol	Uparc 07921002
Formaldehit	Sigma F-1635	Etanol	Riedel-de Ha• n 32221
Ferrik sitrat monohidrat	Fluka 44941	Sülfürik asit	Carlo Erba 7664-93-9
"Coomassie brilliant blue G 250" protein boyası (CBB G250)	Amresco 6104-58-1	Sodyum bikarbonat	Merck K36375029 635
"Mineral oil" (Drystrip cover fluid)	GE Healthcare 17-13350-01	"Bovine" Serum albumin Solüsyonu	Sigma A 7284
% CDT-TIA Kontrol Seti	Recipe 21082	"Sample well stamp" (örnek kuyucuk kalıbı)	GE Healthcare 18-0097-01
"Polyclonal rabbit anti-human TRF" Antikoru	Dako A0061	"Pharmalyte" solüsyonu (pH 5-8)	GE Healthcare 17-0453-01
"PhastGel" İEF 4-6.5	GE Healthcare 17-0544-01	Nöraminidaz	Fluka 72197
"İmmobiline dry plate" pH 4-7 Jel	GE Healthcare 80-1128-28	8 x 0.5 µL aplikatör	GE Healthcare 18-1617-01

3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

3.2.1. Olguların Seçimi

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Çocuk Gastroenteroloji ve Beslenme Polikliniğine zayıflık yakınması ile getirilen, öyküsünde beslenme bozukluğu veya kronik ishali olan, 6 ay -5 yaş arası 42 çocuk alındı. Kontrol grubu ise hasta grubuyla yaş ve cinsiyet olarak benzer olan, rutin sağlık kontrolü için çocuk polikliniğine getirilen 30 sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilen tüm kontrol ve hastaların velilerine bilgilendirme formu okutularak bilgi verildikten sonra onam formu imzalatıldı (sırasıyla EK 1 ve 2).

Malnutrisyonun tanısı "Waterlow" sınıflamasına göre hastaların "boya göre ağırlık" değerleri kullanılarak kondu. Her çocuğun boy ve vücut ağırlığı ölçüldü. Boy uzunluğunun hangi ayın 50 percentil boy uzunluğu değerine karşılık geldiği ve ardından o ayın 50 percentildeki vücut ağırlığı (kg) bulundu. Çocuğun gerçek vücut ağırlığının bulunan bu değere oranı % 90'ın altında ise akut malnutrisyon tanısı kondu. Malnutrisyonun şiddetine göre hastalar; hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu olmak üzere üç gruba ayrıldı.

$$\text{Boya göre ağırlık (BGA) (\%)} = \frac{\text{Çocuğun ağırlığı (kg)}}{\text{Çocuğun boyuna 50. percentilde karşılık gelen vücut ağırlığı (kg)}} \times 100$$

Kronik hastalığı (kronik akciğer hastalığı, karaciğer hastalığı, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu, metabolik hastalığı) olan ve kan alımı sırasında akut enfeksiyonu olan çocuklar çalışmaya dahil edilmedi.

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hasta ve kontrollerden bir kez kan örneği alındı. Kan alımı DEÜTF Hastanesi Merkez Laboratuvarı kan alma ünitesinde gerçekleştirildi. Örnekler hastaların periferik venlerinden 10 mL'lik kırmızı kapaklı tüplere alındı. Kan örnekleri yarım saat içinde 1500 g'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Her biri 50 µL olmak üzere 5 ependorfa bölündükten sonra geri kalan serum örneği başka bir ependorfa konularak tüm örnekler çalışılacakları güne kadar -70 °C'de saklandı.

3.3. TRANSFERRİN İZOFORMLARININ İEF YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

Yöntemin prensibi, proteinlerin uygun pH gradiyenti içinde izoelektrik noktalarına eş değer bölgeye ulaşıncaya kadar göç etmeleri ve o noktada keskin bir bant oluşturmalarıdır. Örnek, pH gradiyenti içinde bir noktaya uygulandığında, farklı TRF izoformları bu pH aralığında farklı yüklenirler. İzoformlar bu pH gradiyenti içinde proton kaybedip negatif yüklü hale geçer ve pozitif yüklü elektroda (anoda) doğru göç eder. İzoformların göçü, her biri kendi izoelektrik noktalarına ulaşıncaya kadar sürer.

Çalışmamızda tüm kontrol ve hasta grubunun örnekleri "Multiphor II" elektroforez cihazı ile immobilize gradiyentli jeller kullanılarak analiz edildi. Bunun yanı sıra yöntem değerlendirme aşamasında, pH gradiyentinin amfolit karışımı ile oluşturulduğu jellerin kullanıldığı "Phast" Sistem ile karşılaştırma yapıldı. Bu iki cihaz da aynı yöntemle çalışmakla beraber "Phast" Sistem, "Multiphor II" cihazına göre daha otomatize, çok az örnek volümüyle çalışılabilen ve en önemlisi kısa sürede çok örnek analiz edebilen bir cihazdır.

3.3.1. YÖNTEM DEĞERLENDİRME

Laboratuvarımızda yeni bir cihaz olan "Multiphor II" cihazı ve yine aynı yöntemle çalışan fakat daha hızlı ve otomatize bir cihaz olan "Phast" Sistemde; performans ölçütleri (tekrarlanabilirlik ve doğruluk) incelendi.

Bu iki cihaz arası yapılacak olan karşılaştırmada, kesinliği değerlendirmek için her iki cihazda jeliçi ("Phast" Sistem ile n=8, "Multiphor II" cihazı ile n=7) ve jellerarası tekrarlanabilirlik ("Phast" Sistem ile n=10, "Multiphor II" cihazı ile n=20) değerlendirildi. Bu analizler iki farklı düzey ticari kontrol materyali ile gerçekleştirildi. Doğruluğu değerlendirmek için de aynı kontrol materyali ile yapılan analizler kullanıldı. "Multiphor II" cihazında negatif kontrol olarak içinde herhangi bir transferrin izoformu bulunmayan "bovine" serum albumini kullanıldı. Ayrıca 10 malnutrisyonlu çocuktan, 10 CDG şüphesi olan çocuktan ve 20 sağlıklı kontrol olgusundan alınan toplam 40 olguya ait kan örnekleri her iki sistem ile analiz edilerek yöntem karşılaştırma yapıldı.

3.3.2. İEF Yöntemi ile "Multiphor II" Elektroforez Cihazında Transferrin İzofomlarının Analizi

Bu yöntemde pH değeri 4.0-7.0 olan immobilize kuru plak jel kullanıldı. Jel, rehidrasyonun ardından (yüksek voltaj uygulandığı için) ısısı 15°C'ye kadar düşürülen seramik tablanın üzerine yerleştirilerek, prefokuslama ve ardından örnek ekimi gerçekleştirildi. Ekim öncesi serum örnekleri demir ile doyurularak tüm izoformların Fe₂-TRF haline gelmesi sağlandı. Yüksek voltaj altında İEF işlemi tamamlandıktan sonra anti-TRF antikoruna ile bantların immunopresipitasyonu sağlandı. Boyama işlemi CBB G250 protein boyası ile manual olarak gerçekleştirildi (78-82).

3.3.2.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Reaktifler

- **Hidrasyon çözeltisi:** 10-12 mg Tris, 40 mL saf su içinde çözüldü. Üzerine 10 mL % 87'lik giserol eklendi. Manyet yardımıyla karıştırıldı.
- **% 0,6'lık BSA çözeltisi ("bovine" serum albumini):** % 30'luk BSA çözeltisi beş kez serum fizyolojik (SF) ile dilüe edildi. Daha sonra on kez hidrasyon sıvısı ile dilue edildi.
- **0.5 M Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisi:** 2,1 g NaHCO₃, 50 mL saf su içinde çözüldü.

- **10 mM Fe⁺³ sitrat çözeltisi:** 26,2 mg Fe⁺³ sitrat 2 mL saf suda ısı yardımıyla çözüldü. Saf su ilave edilerek 10 mL'ye tamamlandı.
- **Serum fizyolojik:** 9 g NaCl, 1 L saf suda çözüldü (0.15 M).
- **Boyama çözeltisi:**
 - Ø 1 g CBB G 250 boyası, 0,5 L saf suda 5 dakika çok iyi karıştırılarak çözüldü.
 - Ø 26.5 mL konsantre sülfürik asit, 473,5 mL saf su içine eklendi.
 - Ø Dilue sülfürik asit, bir önceki basamakta hazırladığımız solüsyona eklendi. 5 dakika manyet yardımı ile karıştırıldı.
 - Ø Elde edilen solüsyon en az 3 saat bekletildikten sonra filtre edilip 900 mL'si alındı.
 - Ø PH'sı 7.0 ± 0.2 olacak şekilde içine 90 ila 100 mL 10 M KOH ilave edildi.
 - Ø 125 g trikloroasetik asit (TCA) üzerine çözelti eklendi. Hazırlanan boya çözeltisi 5-7 gün bekletildikten sonra ancak kullanıma uygun hale geldi.
 - Ø Kullanmadan önce her porsiyon (bir çalışma için ~ 120 mL gerekir), berrak bir çözelti elde etmek için filtre edildi.

Örnek hazırlığı

50 µL serum, 3 µL 0,5 M NaHCO₃, 3 µL 10 mM Fe⁺³ sitrat ve 444 µL hidrasyon çözeltisi karıştırıldı. Hazırlanan örnekler ekim yapmadan önce 2 dakika 1500 g'de santrifüj edildi.

3.3.2.2. İEF Basamakları

Jel Ön Hazırlığı

Ekim yapacağımız örnek sayısına göre uygun miktarda jel kesildi (her bir örnek için 1 cm jele gereksinim vardır; 8 örnek= 8 cm jel). Kalan jel - 20°C'de saklandı.

- Hidrasyon sıvısından uygun miktarda (1cm jel için 0,5 ml olacak şekilde) alındı ve cam bagetle tüm jelin üzerine yayıldı. Jel 16 saat horizontal düzlemde tutularak hidrate edildi.
- 16 saat sonunda jel pensle kurutma kağıdı üzerine alındı ve kenarlarında kalan fazla hidrasyon sıvısı ikinci bir kurutma kağıdı yardımıyla alındı.
- Her örnek için bir cm olacak şekilde 2 adet strip kesildi (örn. 8 adet örnek çalışılacak ise sekizer cm'lik 2 strip). Stripler içinde saf su olan bir kaba daldırılıp ıslatıldı.
- Her örnek için 50 µL olacak şekilde uygun miktarda "lamb oil" elektroforez tablasının tam ortasına koyulup hafifçe yayıldı. Jel, pens yardımıyla tüm yüzeyi temas edecek şekilde elektroforez tablasının üzerine yerleştirildi.
- Saf su ile ıslatılan stripler, kurutma kağıdı yardımıyla fazla suyu aldırılarak hafif nemli hale getirildi. Jelin iki ucuna; anoda ve katoda yerleştirildi.
- Elektrotları içeren cam, elektrotlar striplere temas edecek şekilde jelin üzerine yerleştirildi ve elektrotlar güç kaynağına bağlandı.
- Su banyosundan gelen elektroforez tablosunu soğutacak suyun sıcaklığı 15 °C'ye ayarlandı.

İzoelektrik Fokuslama Elektroforezi

- Cihaza önceden girilen program doğrultusunda 1 saat 15 dakika boyunca prefokuslama aşaması gerçekleştirildi (Tablo 5). Bu sürenin sonunda örnek ekimi yapmak için sistem durduruldu. Katoda yerleştirdiğimiz stripten 1cm uzağa, 3 µL örnek / 3 µL BSA olacak şekilde ardışık ekim yapıldı (örnek+BSA= 1 cm). Elektroforez tekrar başlatıldı ve izoformların ayrımı için gerekli olan faz 2-5 uygulandı (Tablo 5).
- Süre bitiminde elektroforez işlemi sonlandırılıp, stripler jelin üzerinden alındı.

İmmunopresipitasyon

- Her örnek için 25 µL olacak şekilde "monospesific anti-human antitransferrin" Antikoru (Ab) kullanılarak, stripleri yerleştirdiğimiz bölgeye üçer cm kalacak şekilde jelin orta kısmı antikör ile kaplandı. Jel üzeri petri kutusu ile örtülerek oda ısısında 60 dakika bekletildi. Böylece transferrin izoformlarının immunopresipitasyonu sağlanmış oldu.
- Jel toplamda 1 L 0,15 M NaCl kullanılarak 24 saat boyunca yıkandı (bu süre içinde bir kez SF değiştirildi).

Boyama

- 20 saat boyunca % 0,1'lik CBB G 250 boyası içinde bekletilerek boyandı.
- 0,15 M NaCl kullanılarak 1 saat yıkama yapıldı (bu süre içinde bir kez SF değiştirildi).
- Jel oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Tablo 5. "Multiphor II" cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan prefokuslama ve ayırma basamakları

FAZ	Volt (V)	Miliamper (mA)	Watt (W)	Saat:dakika (H:m)	Voltsaat (Vh)	Miliampersaat (mAh)
1 (prefokuslama)	3500	2,0	5	01:15	3500	1
2	350	1,0	1	00:15	100	1
3	1500	1,0	1	00:15	400	1
4	2500	1,0	1	00:15	625	1
5	3500	1,0	1	02:30	9000	1

3.3.3. İEF Yöntemi ile "Phast" Sistem Elektroforez Cihazında Transferrin İzofomlarının Analizi

Kullandığımız "Phast" Sistem elektroforez cihazı, "separation unit" ve "development unit" olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Bu yöntemde pH değeri 4-6.5 olan "Phast" jeller kullanıldı. "Phast" sistemin "separation" ünitesinde İEF yöntemi ile prefokuslama ve ardından örnek ekimi gerçekleştirildi. Ekim öncesi serum örnekleri demir ile doyurularak tüm izoformların Fe₂-TRF haline gelmesi sağlandı. Yüksek voltaj altında İEF işlemi tamamlandıktan sonra anti-TRF antikoru ile bantların immunopresipitasyonu sağlandı. Boyama cihazın "development" ünitesinde gümüş boya ile gerçekleştirildi (83, 84).

3.3.3.1. Ölçüm Öncesi Hazırlıklar

Reaktifler

- **200 µM Fe⁺³ sitrat çözeltisi:** 0,52 mg Fe⁺³ sitrat tartıldı. 2 mL saf suda ısı yardımıyla çözülüp 10 mL'ye tamamlandı.
- **Fiksasyon çözeltisi (Fixation solution):** 20 g TCA 100 mL saf suda çözüldü.
- **Yıkama çözeltisi 1 (Wash solution 1):** % 50 etanol, % 10 asetik asit saf suda çözüldü (5:1:4 oranında).
- **Yıkama çözeltisi 2 (Wash solution 2):** % 10 etanol, % 5 asetik asit saf suda çözüldü (1:0.5:8.5 oranında).
- **Gümüş nitrat boyası:** 0,5 g gümüş nitrat 100 mL saf suda çözüldü.
- **"Developer" çözeltisi:** 2,5 g sodyum karbonat 100 mL saf suda çözüldü. 15 µL forlmaldehit ilave edildi.
- **% 25 Glutardialdehit çözeltisi:** Saf su ile 1:2 oranında dilüe edilerek % 8,3'lük glutardialdehit elde edildi.
- **Sonlandırma çözeltisi (Stop solution):** 3,72 g EDTA 100 mL saf suda çözüldü.

Örnek hazırlığı

- 10 µL serum, 10 µL 200 µM Fe⁺³ sitrat ve 30 µL saf su ile karıştırıldı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra tekrar saf su ile 1:25 oranında dilüe edildi.

Nöraminidaz ile muamele: 10 µL serum, 10 µL 200 µM Fe⁺³ sitrat ve 30 µL saf su ile karıştırıldı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Üzerine 10 µL nörominidaz ilave edildi. Bu karışım 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra saf su ile 1:25 oranında dilüe edildi.

- Parafilm üzerine her örnek için aparat yardımıyla kuyucuk açıldı. Kuyucuklara 3 µL örnek kondu.

3.3.3.2. İEF Basamakları

Jel ön hazırlığı

- "Phastsystem separation unit" üzerinde jelin konacağı porselen yüzeye 80 µL saf su konup üzerine "Phast" jel (İEF 4-6.5) tabla ile tam temas edecek şekilde yerleştirildi.
- Kurutma kağıdından kesilerek oluşturulan 3-4 mm'lik strip, 20 µL "pharmalyte" solüsyonu (pH 5-8) ile ıslatıldı. Jelin katodik ucuna yerleştirildi.

İzoelektrik Fokuslama Elektroforezi

- Cihaza, prefokuslama ve ayrılmanın en uygun koşullarda olması için belirli voltaj (V), amper (A) ve voltsaat (Vh) değerlerini içeren program girildi (Tablo 6). Cihazın kapağı kapatılıp elektroforez işlemi başlatıldı [programın prefokuslama aşamasını başlatmak için "sep start" düğmesine basıldı. Jel sayısı (örn. 2) girilip "Do" düğmesine, istenilen program numarası (örn. 4) girilip tekrar " Do" düğmesine basıldı].
- Prefokuslama işlemi bittiğinde (73 Vh'de) cihaz beklendiği gibi alarm verdi. "Sep pause" düğmesine basıldı ve kapak açıldı. "Pharmalyte" ile kaplı strip jelin yüzeyinden alındı.
- Aplikatör yardımı ile parafilm üzerindeki kuyucuklardaki serum örnekleri alındı. Aplikatör katodik bölgeye "ekstra alarm" ve "step x.2" arasına yerleştirildi. Her jele her biri 0,5 µL olmak üzere 8 örnek ekildi. Aynı anda iki jel yürütüldü. Ciğazın kapağı kapatılıp, "sep start" düğmesine basıldı ve elektroforetik göçün gerçekleşmesi için program tekrar başlatıldı. Bir süre sonra aplikatördeki serumlar otomatik olarak jele applike oldu. Cihaza girilen program doğrultusunda belirli voltaj, amper ve voltsaat

değerlerinde elektroforetik ayrılma işlemi gerçekleşti. Beklendiği gibi ortalama 275 Vh'de cihaz alarm verdi ve elektroforez işlemi sonlandı. Cihazın kapağı açıldı ve jeller çıkarıldı.

İmmunopresipitasyon

- 20 µL anti-TRF IgG antikoru 60 µL 0.15 M NaCl ile dilüe edildi. Jelin üzerine cam pipet yardımıyla yüzeye zarar vermeden yayıldı. 40 dakika antikorda bekletilen jel, 0,15 M NaCl içine kondu ve gece boyunca salinde bekletildi.

Boyama

- Jel, cihazın yıkama ve boyama işleminin yapıldığı "Phastsystem development unit" kısmına yerleştirildi. Kapağı kapatılıp işlem başlatıldı [sırasıyla "DEV start", 4 (program numarası), "Do" düğmelerine basılarak]. Boyama sırasında hazırladığımız reaktiflerin herbiri (özel hortumları vasıtasıyla) belirli bir sıra ile cihazın boyama ünitesine alındı. Reaktifler belli ısıda ve dakikada burada tutulduktan sonra (özel hortumları vasıtasıyla) dışarı atık kabına atıldı. Böylece boyama işlemi tamamlanmış oldu (Tablo 7).

•

Tablo 6. "Phast" Sistem cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan prefokuslama ve ayırma basamakları

Örnek aplikatör down 1.2. basamak: 0 Vh
Örnek aplikatör up 1.3. basamak: 0 Vh
Ekstra alarm to sound 1.1. basamak: 73Vh
Ayırma 1.1. basamak: 2000 V/ 2,5 mA / 3,5 W / 15°C / 75 Vh
Ayırma 1.2. basamak: 200 V/ 2,5 mA / 3,5 W / 15°C / 15 Vh
Ayırma 1.3. basamak: 2000 V/ 5,0 mA / 3,5 W / 15°C / 185 Vh

Tablo 7. "Phast" Sistem cihazında siyalotransferrin dağılımını saptamak için uygulanan boyama ve yıkama basamakları

Basamak No	Solüsyon	Giriş hortumu (IN-port)	Çıkış hortumu (OUT-port)	Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
1	Fiksasyon çözeltisi	1	9	5	20
2	Yıkama çözeltisi 1	3	0	2	50
3	Yıkama çözeltisi 2	2	9	2	50
4	Yıkama çözeltisi 2	2	9	4	50
5	% 8.3'lük glutardialdehit	4	9	6	50
6	Yıkama çözeltisi 2	2	9	3	50
7	Yıkama çözeltisi 2	2	9	5	50
8	Saf su	5	0	2	50
9	Saf su	5	0	2	50
10	% 0.5 Gümüş nitrat boyası	6	9	10	50
11	Saf su	5	0	0.5	50
12	Saf su	5	0	0.5	50
13	"Developer" çözeltisi	7	0	0.5	50
14	"Developer" çözeltisi	7	0	12	50
15	Sonlandırma çözeltisi	8	0	5	50
16	Saf su	5	0	5	50

3.3.4. Transferrin İzoformlarının Kantitasyonu

Jeller "Image Scanner 2, 100-240 V" görüntü tarayıcı ile tarandı. Bu işlem "Phast" jeller için gümüş boyamaya uygun, red filtre kullanılarak ve 600 dpi (dot per inch) çözünürlükte, "ImmobilineTM Dry Plate" jeller için ise CBB G250 boyamaya uygun, blue filtre kullanılarak ve 600 dpi çözünürlükte gerçekleştirildi. TRF izoformlarının kantitasyonu için görüntü analiz programı olan "ImageMaster 1D Elite Software" kullanıldı. Arka plan etkisini en aza indirmek amacıyla, band seçiminden önce "manual background subtraction" işlemi yapıldı. "Phast" jellerde her hatta asiyalotransferrinden heksasiyalotransferrine kadar 7 bant, "ImmobilineTM Dry Plate" jellerde ise asiyalotransferrinden heptasiyalotransferrine kadar 8 bant saptandı. Bant seçimi de "manual" olarak yapıldı. Sonuçlar "TRF izoform yüzdesi" olarak verildi.

3.4. TRANSFERRİN ANALİZİ

TRF ölçümleri, Architect C8000 (Abbott Diag., USA) otoanalizöründe immünotürbidimetrik yöntemle yapıldı.

Örneğe TRF antikoruna eklendiğinde oluşan çözünmez immün komplekslere bağlı artan türbidite ölçülmektedir. TRF içeren örnek, (Tris, polietilen glikol ve sodyum azid içeren) bir tampon ile inkübe edilip antikor ilave etmeden önce örnek körü alınmaktadır. Antikor (Ab) ilavesinden sonra uygun Ab konsantrasyonuna ulaşıncaya türbiditeden faydalanılarak TRF konsantrasyonu ölçülmektedir.

3.5. DEMİR / TOTAL DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ ANALİZİ

Demir ve demir bağlama ölçümleri, Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizöründe spektrofotometrik yöntemle yapıldı.

Demir ölçümü için ilk olarak asidik ortamda demir, transferrinden ayrılmaktadır. Daha sonra askorbat kullanılarak, ferrik formdan ferröz forma indirgenen demir ferrozin ile renkli

bir kompleks oluşturmaktadır. 570 nanometrede fotometrik olarak ölçülen renk şiddeti demir konsantrasyonu ile orantılıdır.

Doymamış demir bağlama kapasitesinin ölçümü için, seruma, belirli konsantrasyonda demir içeren alkali tampon/indirgeyici solusyonu eklenerek transferrin doyurulmaktadır. Geriye kalan ferröz forma indirgenmiş demirin ferrozin ile oluşturduğu renkli kompleks 580 ile 600 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmektedir. Doymamış demir bağlama kapasitesi (DDBK) arttıkça absorbans ters orantılı olarak azalmaktadır. DDBK, demir ile toplanarak TDBK bulunur.

3.6. FERRİTİN ANALİZİ

Ferritin ölçümü, solid-faz iki yönlü kemilüminesans immün ölçüm yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.7. PREALBUMİN ANALİZİ

Prealbumin ölçümleri, Architect C8000 (Abbott Diag., USA) otoanalizöründe immünotürbidimetrik yöntemle yapıldı.

Örneğe prealbumin antikoru eklendiğinde oluşan çözünmez immün komplekslere bağlı artan türbidite ölçülmektedir. Prealbumin içeren örnek, (Tris, polietilen glikol ve sodyum azid içeren) bir tampon ile inkübe edilip Ab ilave etmeden önce örnek körü alınmaktadır. Ab ilavesinden sonra uygun Ab konsantrasyona ulaşıncaya türbiditeden faydalanılarak prealbumin konsantrasyonu ölçülmektedir.

3.8. İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ ANALİZİ

IGF-1 ölçümü, solid-faz iki yönlü kemilüminesans immün ölçüm yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.9. ÇİNKO ANALİZİ

Çinko ölçümleri, Architect C8000 (Abbott Diag., USA) otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle yapıldı.

Çinko, 5-Br-PAPS [(2-5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfo-propylamino) phenol] varlığında örnekteki çinko konsantrasyonu ile orantı olarak şiddeti değişen renkli bir bileşik oluşturmaktadır.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

3.10.1. Verilerin Kaydedilmesi, Analizi ve Tablolar ile Gösterilmesi

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 16.0 for Windows" programından yararlanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme, parametrik koşulları sağlayan veriler için bağımsız gruplarda t testi ile, sağlamayan veriler için ise non parametrik "Mann-Whitney U" testi ile gerçekleştirildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi. Korelasyon değerlendirmesinde parametrik koşulları sağlayan veriler için "Pearson", sağlamayan veriler için ise "Spearman" analizleri kullanıldı. Korelasyon; $r = 0,00 - 0,24$ ise zayıf, $r = 0,25 - 0,49$ ise orta, $r = 0,50 - 0,74$ ise güçlü, $r = 0,75 - 1,00$ ise çok güçlü olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. HASTA GRUBUNU TANIMLAYICI BULGULAR

4.1.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş Dağılımları ve Malnutrisyon Dereceleri

Tablo 8. Olguların yaş (ay) dağılımı

Çalışma grubu	n	Ortalama	Standart Sapma (s)	Minimum	Maksimum	Ortanca
Hasta	42	18,09	10,02	7,00	45,00	15,50
Kontrol	30	23,57	12,88	7,00	51,00	24,00

Bu bulgulara göre hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından anlamlı bir fark yoktur ($p= 0,054$).

Tablo 9. Olguların BGA değerlerinin dağılımı

Çalışma grubu	n	Ortalama	s	Minimum	Maksimum	Ortanca
Hasta	42	79,71	7,22	63,00	89,00	81,50
Kontrol	30	97,38	5,00	90,00	113,00	97,00

Bu bulgulara göre hasta ve kontrol grubu arasında BGA değerleri açısından anlamlı bir fark vardır ($p= 0,000$).

Tablo 10. Hastaların malnutrisyon derecelerine göre dağılımı

Malnutrisyon derecesi	BGA	n	Ortalama	s	Minimum	Maksimum	Ortanca
Hafif	80-89	24	84,83	2,85	80,00	89,00	85,00
Orta	70-79	12	76,08	2,64	71,00	79,00	76,50
Ağır	< 70	6	66,50	2,94	63,00	69,00	67,50

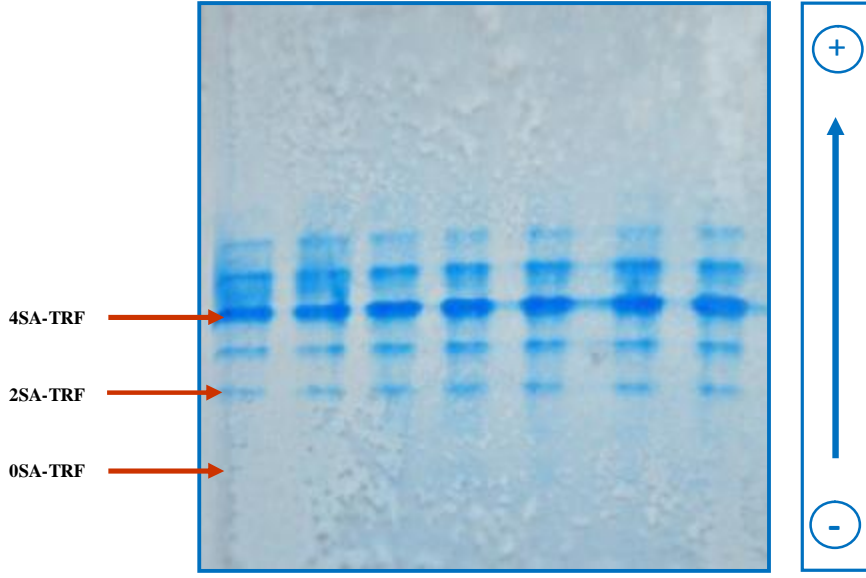
4.2. YÖNTEM DEĞERLENDİRME

4.2.1. Kesinlik Deneyleri

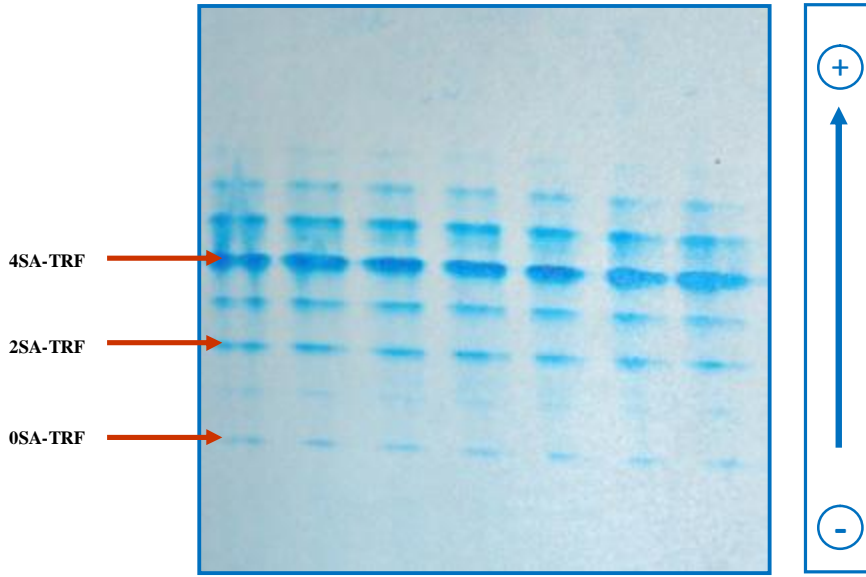
4.2.1.1. "Multiphor II" cihazında yapılan deneyler

Tablo 11. "Multiphor II" cihazında yapılan jeliçi ve jellerarası tekrarlanabilirlik sonuçları

Jeliçi Tekrarlanabilirlik (% CV)			Jellerarası Tekrarlanabilirlik (% CV)		
Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF	Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF
1 (n=7)	3,47	1,88	1 (n=20)	6,44	3,88
2 (n=7)	3,10	1,92	2 (n=20)	7,04	3,21



(a)



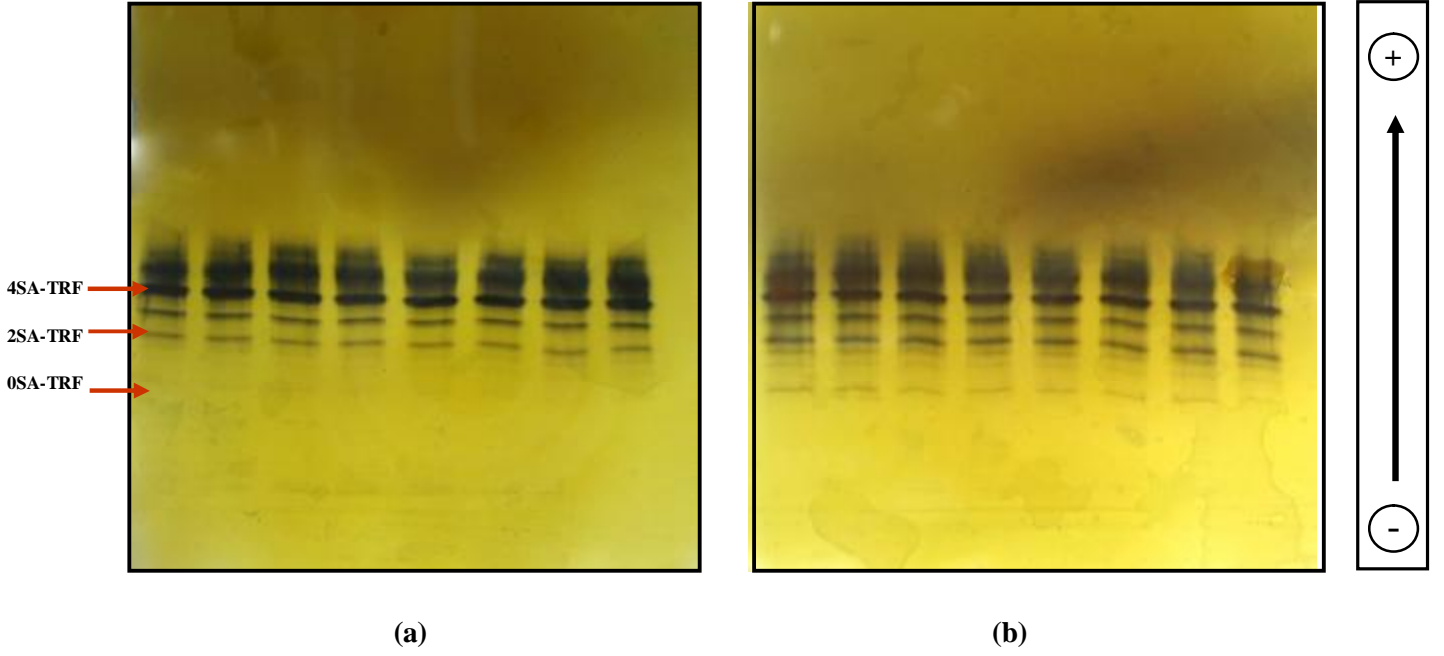
(b)

Şekil 5. "Multiphor II" sisteminde yapılan jeliçi tekrarlanabilirlik analizleri: **(a)** 1.seviye kontrol **(b)** 2. seviye kontrol

4.2.1.2. "Phast" Sistem cihazında yapılan deneyler

Tablo 12. "Phast" Sistem cihazında yapılan jeliçi ve jellerarası tekrarlanabilirlik sonuçları

Jeliçi Tekrarlanabilirlik (% CV)			Jellerarası Tekrarlanabilirlik (% CV)		
Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF	Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF
1 (n=8)	4,49	1,19	1 (n=10)	5,27	3,15
2 (n=8)	6,96	0,99	2 (n=10)	6,05	2,89



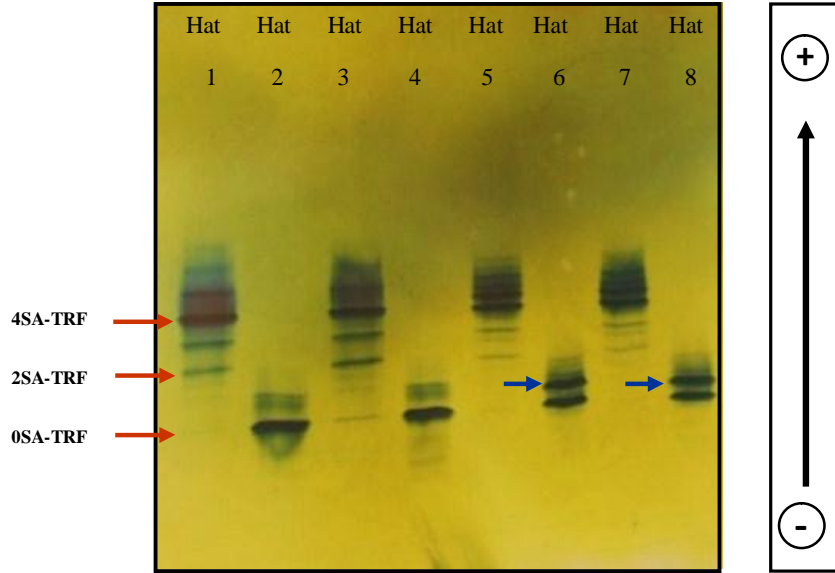
Şekil 6. "Phast" Sistemde yapılan jeliçi tekrarlanabilirlik analizleri: (a) 1.seviye kontrol (b) 2. seviye kontrol

4.2.2. Doğruluk Deneyleri

Tablo 13. "Multiphor II" cihazının "Phast"sisteme göre kontrol materyali kullanılarak bulunan % bias sonuçları

Seviye	İzoform	Birim	"Phast" Sistem ile belirlenen hedef değer (n=10)	"Multiphor II" ile bulunan sonuç (n=20)	% Bias
1	2SA-TRF	%	4,64	4,19	9,69
	4SA-TRF	%	59,93	59,13	1,33
2	2SA-TRF	%	9,16	8,31	9,27
	4SA-TRF	%	54,85	56,03	2,15

4.2.3. Nöraminidaz Enzimiyle İşleme ile TRF Varyantlarının Gösterilmesi



Şekil 7. Nöraminidaz ile işleme ardından elde edilen İEF jel görünümü. Hat 1: 1.seviye kontrol, hat 2: 1.seviye kontrol+nöraminidaz, hat 3: 2.seviye kontrol, hat 4: 2.seviye kontrol+ nöraminidaz, hat 5: TRF varyant (?) olgu 1, hat 6: TRF varyant (?) olgu 1+ nöraminidaz, hat 7: TRF varyant (?) olgu 2, hat 8: TRF varyant (?) olgu 2+ nöraminidaz. Mavi ok ile işaretli bölgeler, asiyalotransferrin bandının üzerinde TRF varyantından kaynaklandığı düşünülen ekstra bandı gösterir.

4.2.4. Yöntem Karşılaştırma

4.2.4.1. Bağımlı gruplarda t testi

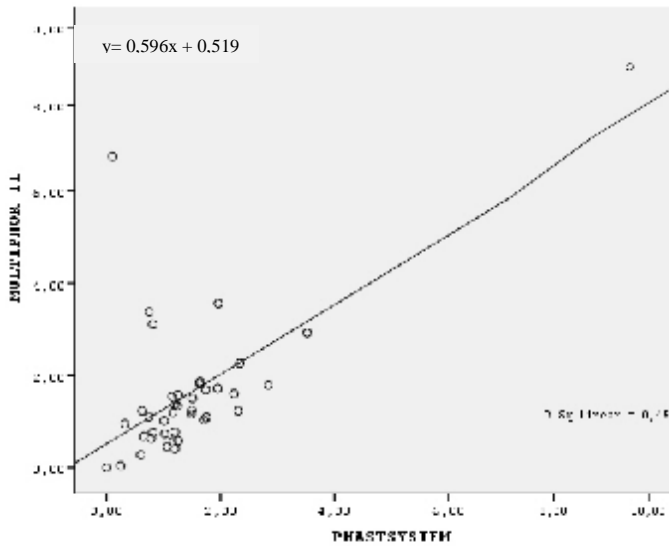
Tablo 14. "Multiphor II" ve "Phast" Sistem ile yapılan yöntem karşılaştırma sonuçları

İzoform	"Phast" Sistem (%)		Multiphor II (%)		Bias	s	p	r
	Ortalama	s	Ortalama	s				
0SA-TRF	1,50	1,49	1,64	1,68	0,15	1,30	0,48	0,67
1SA-TRF	0,94	0,89	1,09	1,31	0,15	1,02	0,36	0,63
2SA-TRF	6,42	3,09	6,25	4,07	0,18	2,18	0,61	0,85
3SA-TRF	9,78	3,04	9,37	3,20	0,41	2,07	0,22	0,78
4SA-TRF	55,57	6,20	53,82	7,73	1,75	6,08	0,08	0,64
5SA-TRF	19,89	2,65	20,52	3,33	0,63	2,63	0,14	0,63
6SA-TRF	6,06	1,47	6,54	2,21	0,48	2,23	0,18	0,31

Tüm izoformlar için her iki cihazda bulunan sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

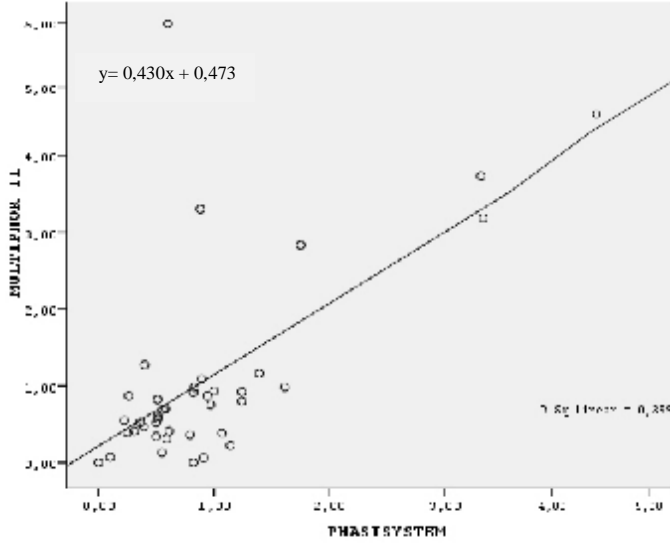
4.2.4.2. Regresyon Analizi

Asiyalotransferrin Regresyon Analizi



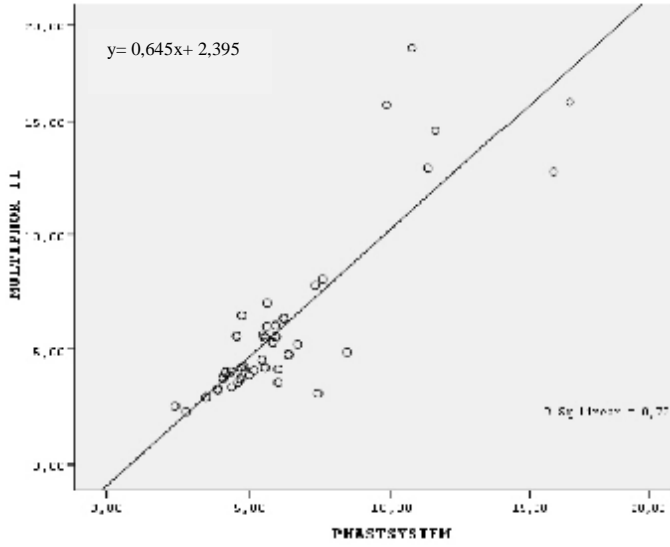
Şekil 8. Asiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Monosiyalotransferrin Regresyon Analizi



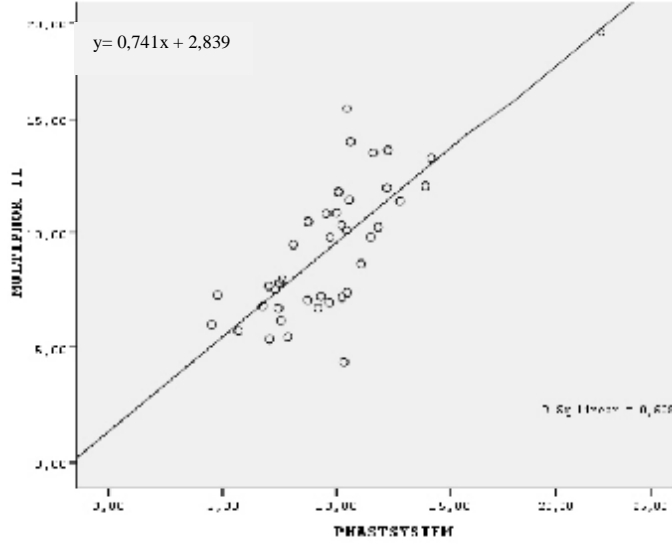
Şekil 9. Monosiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Disiyalotransferrin Regresyon Analizi



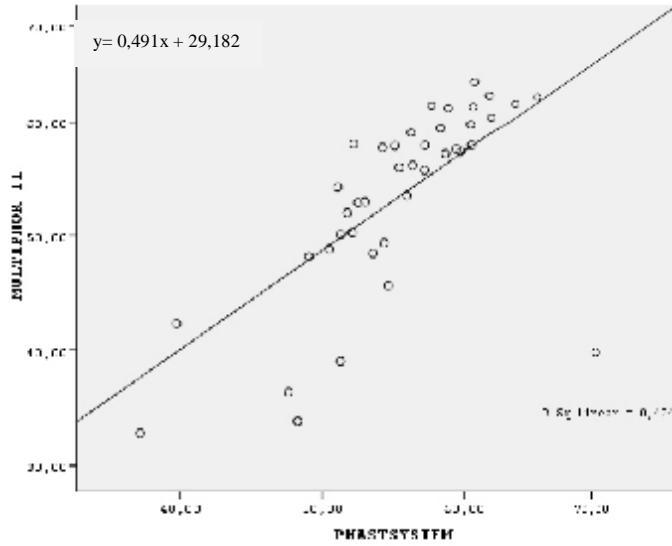
Şekil 10. Disiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Trisiyalotransferrin Regresyon Analizi



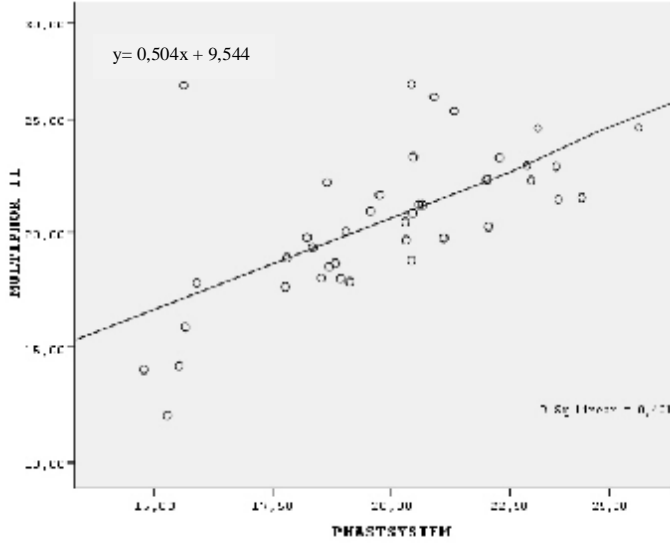
Şekil 11. Trisiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Tetrasiyalotransferrin Regresyon Analizi



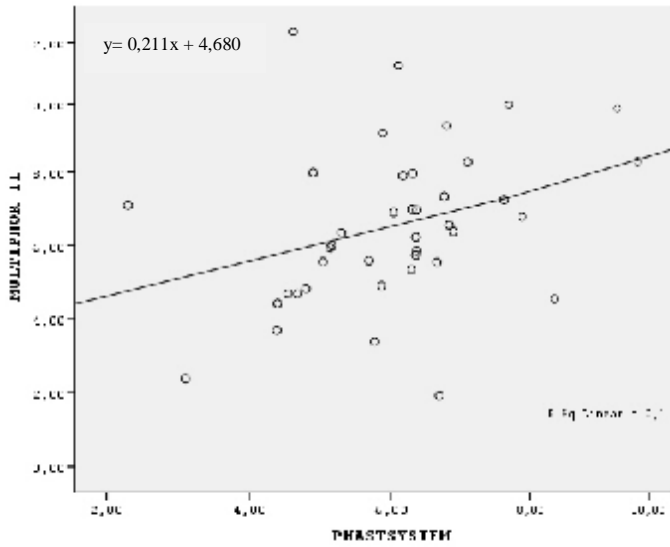
Şekil 12. Tetrasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Pentasiyalotransferrin Regresyon Analizi



Şekil 13. Pentasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Hekzasiyalotransferrin Regresyon Analizi



Şekil 14. Hekzasiyalotransferrin ölçümü için iki cihaz arasındaki regresyon analizi grafiği

Heptasiyalotransferrin Regresyon Analizi

"Phast" Sistem'de gümüş boyadan kaynaklanan koyu renk arka planın etkisiyle 7 SA-TRF değerlendirilememiştir. Bu nedenle bu bant için yöntem karşılaştırma yapılamamıştır.

4.3. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

Biyokimyasal parametrelerin ortalama, standart sapma (s), minimum, maksimum ve ortanca değerleri Tablo 15'te sunulmaktadır.

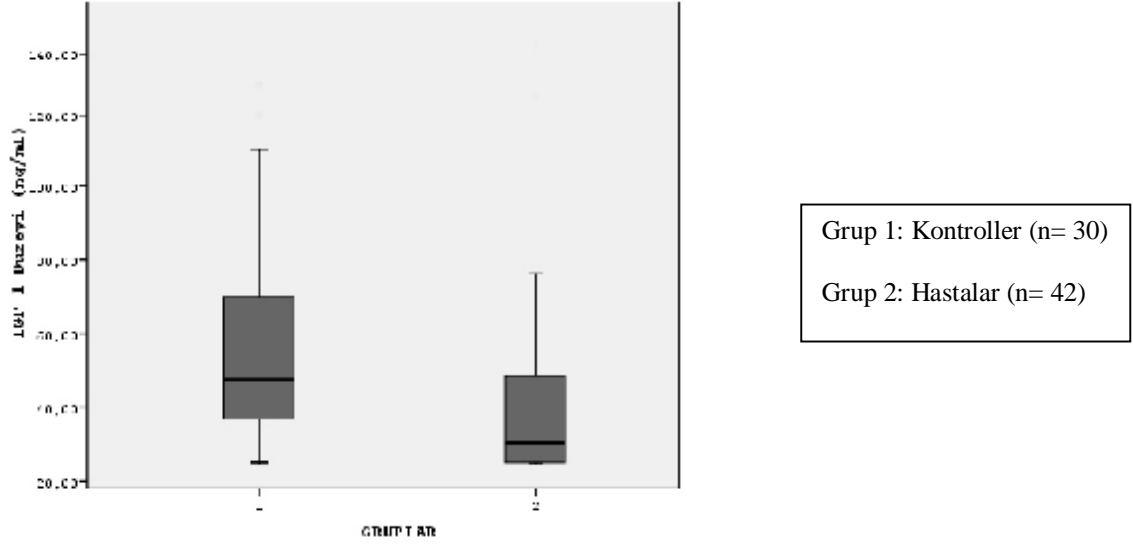
Tablo 15. Hasta gruplarında biyokimyasal belirteçler ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUP	Parametre	Demir	TDBK	TRF	Ferritin	Prealbumin	IGF-1	Çinko
	Birim	µg/dL	µg/dL	mg/dL	ng/mL	mg/dL	ng/mL	µg/dL
Tüm Hastalar (n=42)	Ortalama	45,64	316,67	259,90	65,48	17,60	42,350	0,32
	s	21,79	67,91	57,33	71,08	4,47	28,020	0,04
	Minimum	10,00	183,00	133,00	9,64	10,00	25,00	0,25
	Maksimum	97,00	469,00	378,00	347,00	31,00	143,00	0,38
	Ortanca	43,00	307,00	248,00	42,35	17,00	30,30	0,33
	p değeri*	0,006	0,584	0,213	0,190	0,412	0,009	0,220
Orta ve Ağır Malnutrisyonlu Hastalar (n= 18)	Ortalama	41,00	295,61	243,00	72,62	17,66	39,84	57,37
	s	20,82	62,49	54,90	65,06	4,71	30,51	17,61
	Minimum	10,00	34,20	133,00	34,20	10,00	25,00	35,05
	Maksimum	79,00	295,00	375,00	295,00	28,00	143,00	98,36
	Ortanca	45,00	297,50	244,00	51,60	15,50	26,80	54,07
	p değeri*	0,036	0,069	0,018	0,010	0,485	0,007	0,276
Hafif Malnutrisyonlu Hastalar (n= 24)	Ortalama	48,00	333,91	275,24	59,85	17,77	43,33	58,96
	s	21,42	69,34	57,30	76,77	4,37	26,56	16,44
	Minimum	17,00	215,00	174,00	9,64	10,00	25,00	26,40
	Maksimum	97,00	469,00	378,00	347,00	31,00	126	98,73
	Ortanca	42,50	338,00	279,00	32,10	17,50	33,20	60,87
	p değeri*	0,119	0,427	0,633	0,927	0,480	0,073	0,507
Kontrol (n=30)	Ortalama	64,500	328,68	275,75	43,78	18,53	57,15	0,31
	s	31,790	51,320	41,70	35,38	4,50	30,23	0,04
	Minimum	19,00	210,00	183,00	7,58	7,00	25,00	0,25
	Maksimum	121,00	463,00	382,00	149,00	26,00	130,00	0,35
	Ortanca	60,50	333,00	275,00	34,15	18,500	47,40	0,31

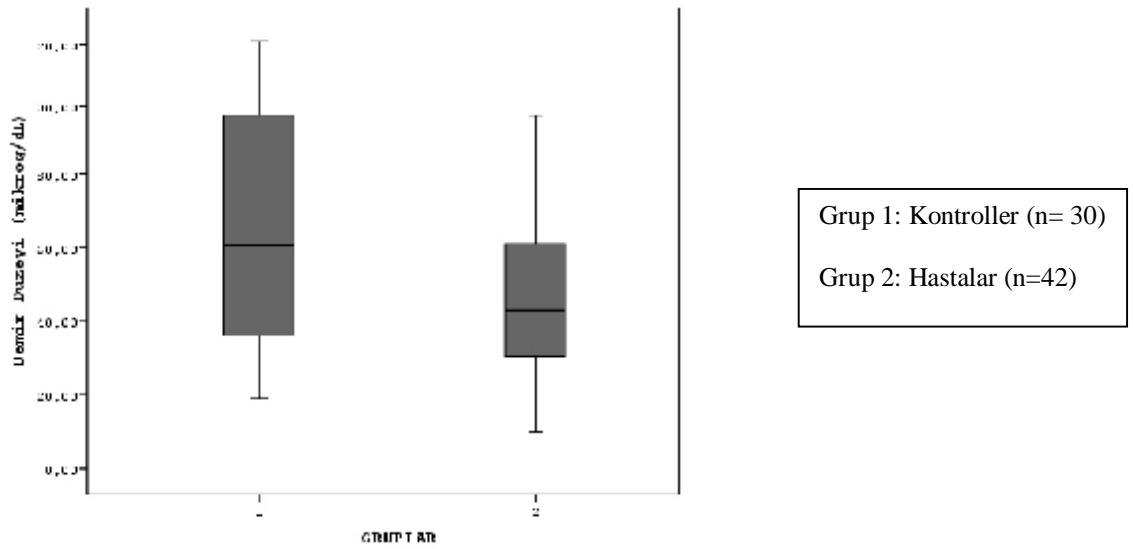
* İlgili hasta grubunun kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyi

** Orta ve ağır malnutrisyonlu hasta grubunun hafif malnutrisyonlu hasta grubuna göre anlamlılık düzeyi

Biyokimyasal parametreler açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında IGF-1 ve demir düzeylerinin hasta grubunda anlamlı (sırasıyla $p= 0,009$ ve $p= 0,006$) düşük olduğu saptandı (sırasıyla Şekil 15 ve 16).

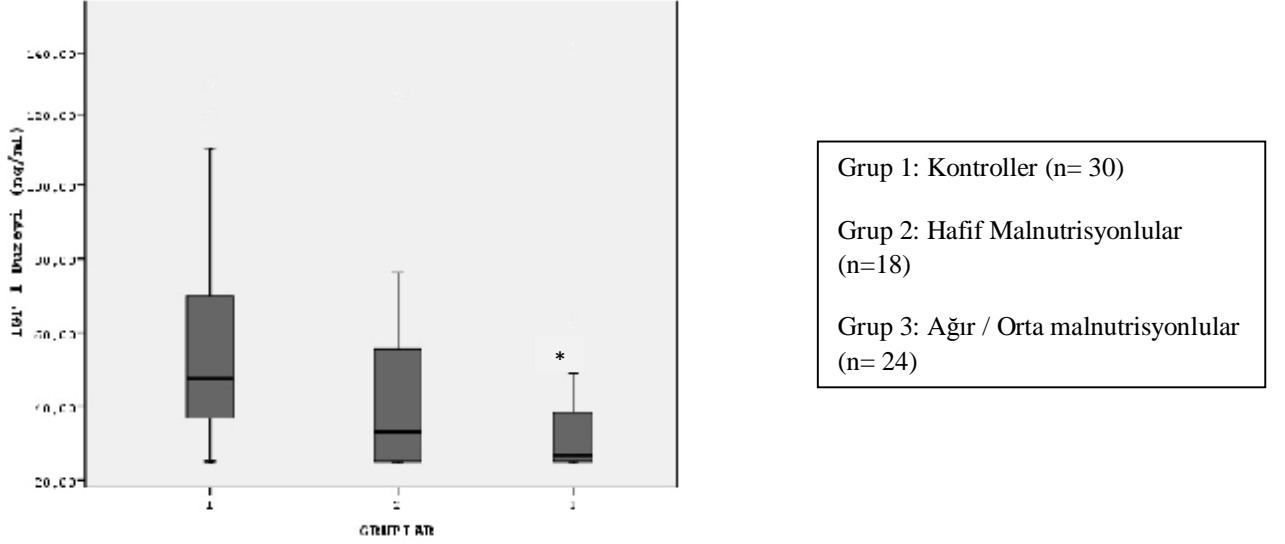


Şekil 15. Hasta ve kontrol gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği (box-plot)



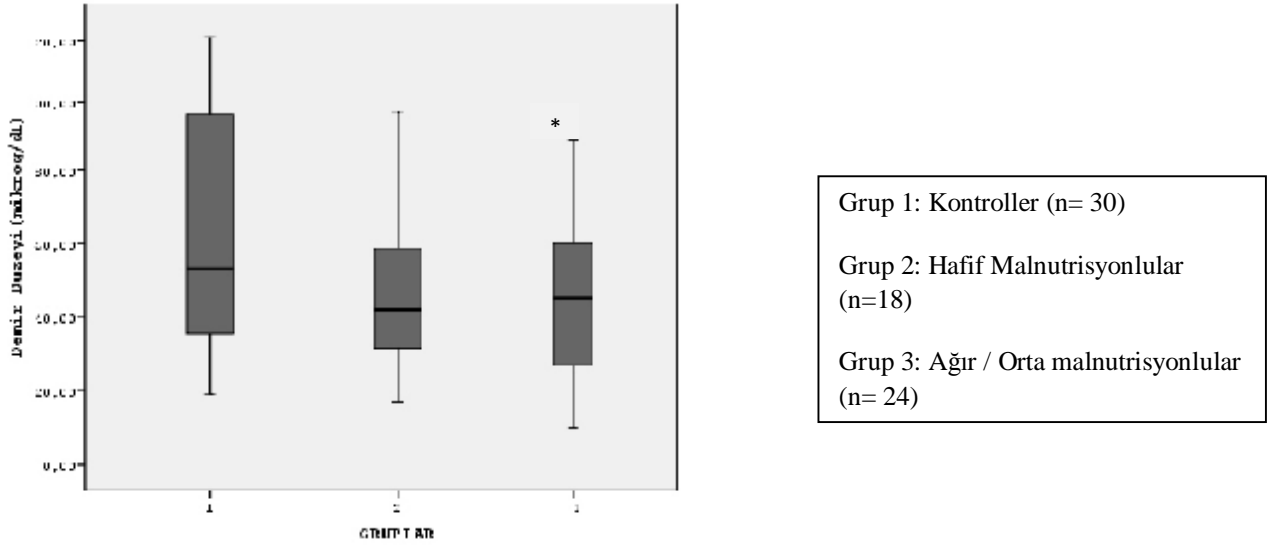
Şekil 16. Hasta ve kontrol gruplarında demir düzeyi kutu grafiği (box-plot)

Ağır ve orta malnutrisyonlu hasta grubunda serum IGF-1, demir ve TRF düzeyleri kontrol olgularına göre anlamlı düşük (sırasıyla $p= 0,007$, $p= 0,036$ ve $p= 0,018$), ferritin düzeyleri ise anlamlı yüksek ($p= 0,010$) saptandı (sırasıyla Şekil 17, 18, 19 ve 20).



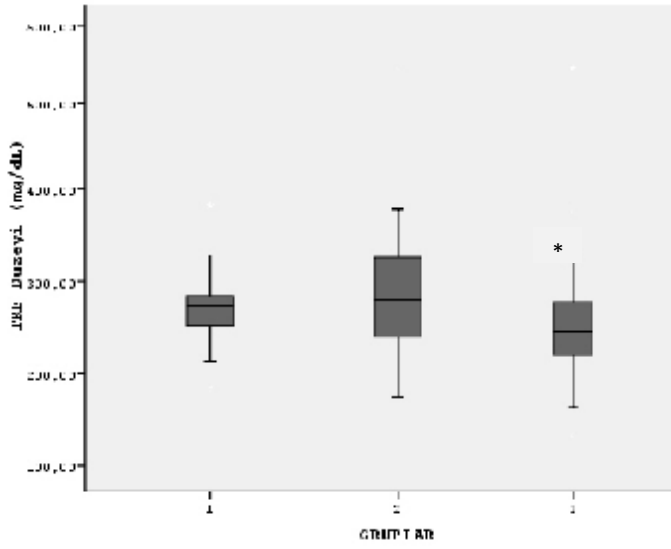
* $p= 0,007$ kontrol grubuna göre

Şekil 17. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği (box-plot)



* $p= 0,036$ kontrol grubuna göre

Şekil 18. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında demir düzeyi kutu grafiği (box-plot)



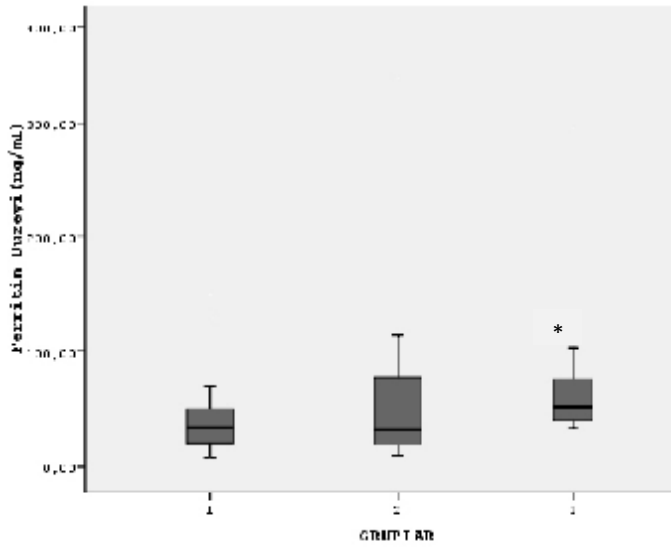
Grup 1: Kontroller (n= 30)

Grup 2: Hafif Malnutrisyonlular
(n=18)

Grup 3: Ağır / Orta malnutrisyonlular
(n= 24)

* $p=0,018$ kontrol grubuna göre

Şekil 19. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında TRF düzeyi kutu grafiği (box-plot)



Grup 1: Kontroller (n= 30)

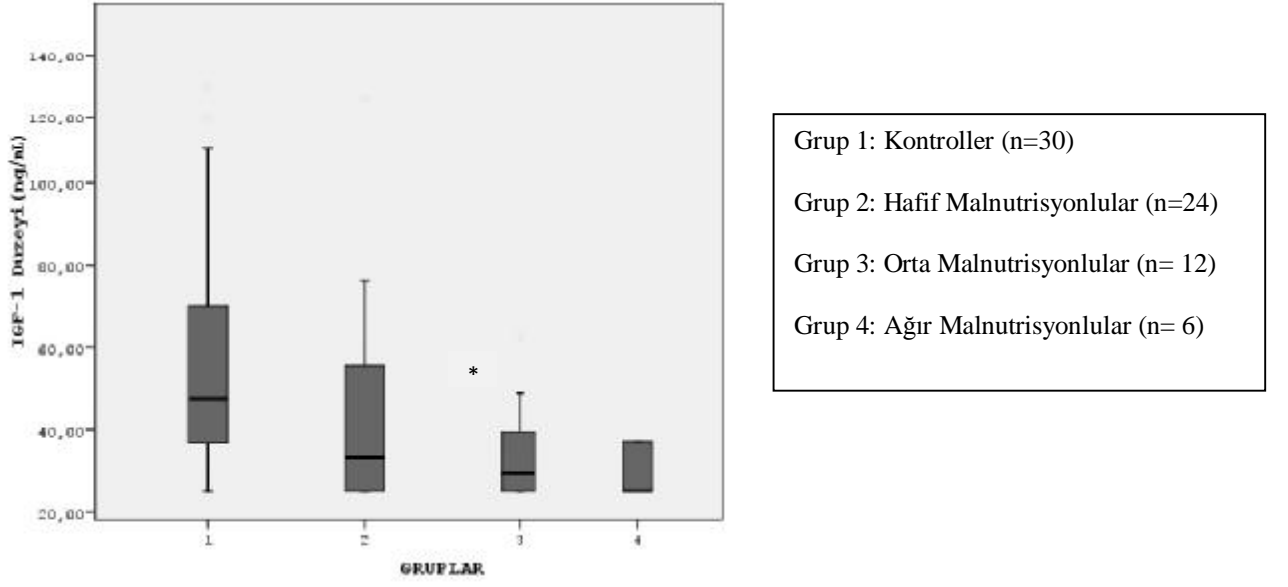
Grup 2: Hafif Malnutrisyonlular
(n=18)

Grup 3: Ağır / Orta malnutrisyonlular
(n= 24)

* $p=0,010$ kontrol grubuna göre

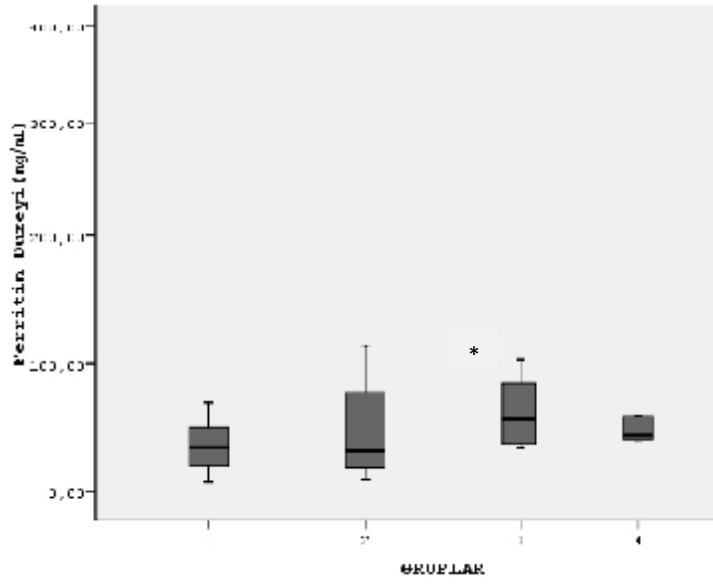
Şekil 20. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında ferritin düzeyi kutu grafiği (box-plot)

Hastalar hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu olmak üzere üç ayrı grup olarak birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece orta malnutrisyonlu hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla IGF-1'in anlamlı düşük, ferritin düzeylerinin ise anlamlı yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p= 0,011$ ve $p= 0,022$) (sırasıyla Şekil 21 ve Şekil 22). Diğer biyokimyasal parametreler açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



* $p= 0,011$ kontrol grubuna göre

Şekil 21. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında IGF-1 düzeyi kutu grafiği (box-plot). IGF-1 düzeylerinin grup 1, 2, 3 ve 4'te ortalama \pm s değerleri sırasıyla $57,15 \pm 30,23$, $44,33 \pm 26,56$, $34,26 \pm 12,53$, $51,00 \pm 51,69$ olarak bulundu.



Grup 1: Kontroller (n=30)

Grup 2: Hafif Malnutrisyonlular (n=24)

Grup 3: Orta Malnutrisyonlular (n= 12)

Grup 4: Ağır Malnutrisyonlular (n= 6)

* $p= 0,022$ kontrol grubuna göre

Şekil 22. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında ferritin düzeyi kutu grafiği (box-plot). Ferritin düzeylerinin grup 1, 2, 3 ve 4'te ortalama \pm s değerleri sırasıyla $43,78 \pm 35,38$, $59,85 \pm 76,77$, $81,72 \pm 78,21$, $54,46 \pm 20,87$ olarak bulundu.

4.4. TRF İZOFORMLARININ VE CDT'NİN DAĞILIM YÜZDELERİ

TRF izoformlarının ve CDT'nin ortalama, standart sapma (s), minimum, maksimum ve ortanca değerleri Tablo 16'da sunulmaktadır.

Tablo 16. Hasta gruplarında TRF izoformları, CDT ve bu değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması

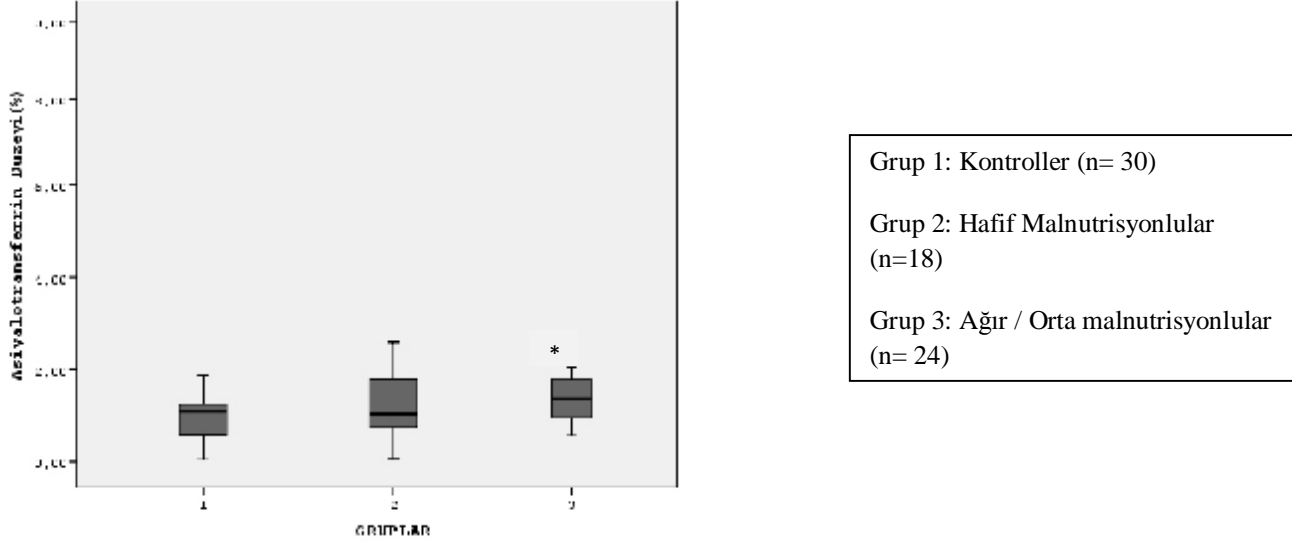
Grup	Parametre	0SA-TRF	1SA-TRF	2SA-TRF	3SA-TRF	4SA-TRF	5SA-TRF	6SA-TRF	7SA-TRF	CDT
	Birim	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Tüm Hastalar (n= 42)	Ortalama	1,43	0,66	5,13	8,40	55,81	21,43	6,09	0,93	7,21
	s	1,35	0,62	2,20	2,29	6,52	3,02	2,22	0,70	3,76
	Minimum	0,08	0,00	2,21	3,82	32,81	16,25	3,27	0,00	2,45
	Maksimum	8,99	3,30	16,00	12,35	65,27	33,39	11,74	3,31	28,00
	Ortanca	1,28	0,45	4,58	8,58	57,60	21,18	5,74	0,95	6,48
	p değeri*	0,12	0,526	0,078	0,459	0,265	0,173	0,200	0,106	0,104
Orta ve Ağır Malnutrisyonlu Hastalar (n= 18)	Ortalama	1,76	0,89	5,57	8,21	57,72	20,97	6,72	1,11	8,21
	s	1,91	0,78	2,87	2,22	7,54	2,55	2,42	0,75	5,31
	Minimum	0,56	0,00	3,53	3,82	32,81	16,85	3,38	0,04	5,51
	Maksimum	8,99	3,30	16,00	11,40	65,27	24,56	11,74	3,31	28,00
	Ortanca	1,37	0,76	4,86	8,98	55,45	20,73	6,62	1,01	6,28
	p değeri*	0,040	0,326	0,036	0,535	0,188	0,551	0,518	0,518	0,056
P değeri**	0,401	0,080	0,570	0,705	0,570	0,533	0,165	0,149	0,254	
Hafif Malnutrisyonlu Hastalar (n= 24)	Ortalama	1,22	0,51	4,85	8,58	56,38	21,71	5,75	0,82	6,58
	s	0,70	0,43	1,58	2,42	5,78	3,49	1,98	0,65	1,94
	Minimum	0,08	0,02	2,21	4,10	38,84	16,25	3,33	0,00	2,45
	Maksimum	2,59	1,55	7,89	12,35	64,84	33,39	11,70	2,90	10,43
	Ortanca	1,03	0,36	4,58	8,58	57,75	21,26	5,57	0,71	6,88
	p değeri*	0,383	0,164	0,241	0,896	0,521	0,207	0,317	0,229	0,173
Kontrol (n=30)	Ortalama	1,01	0,62	4,27	8,86	57,51	20,34	6,29	1,04	5,91
	s	0,51	0,30	1,15	2,70	4,84	3,14	2,04	0,57	1,47
	Minimum	0,04	0,06	2,28	4,35	45,62	14,20	1,92	0,16	3,11
	Maksimum	1,86	1,16	6,47	13,91	65,95	26,82	12,36	2,47	8,43
	Ortanca	1,09	0,57	4,08	7,92	57,79	20,23	5,93	0,88	6,13

* ilgili hasta grubunun kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyi

** Orta ve ağır malnutrisyonlu hasta grubunun hafif malnutrisyonlu hasta grubuna göre anlamlılık düzeyi

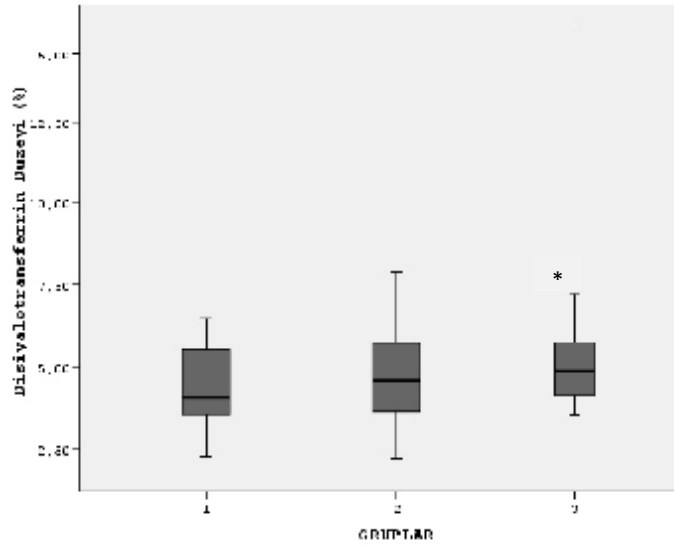
Hasta ve kontrol grupları arasında TRF izoformlarının dağılımı ve CDT açısından anlamlı fark bulunmadı.

Ağır ve orta malnutrisyonlu hastaların serum a- ve disiyalotransferrin düzeyleri kontrol olgularına göre anlamlı yüksek (sırasıyla $p= 0,040$ ve $p= 0,036$) (Şekil 23 ve 24) saptandı.



* $p= 0,040$ kontrol gruba göre

Şekil 23. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında asiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği (box-plot)



Grup 1: Kontroller (n= 30)

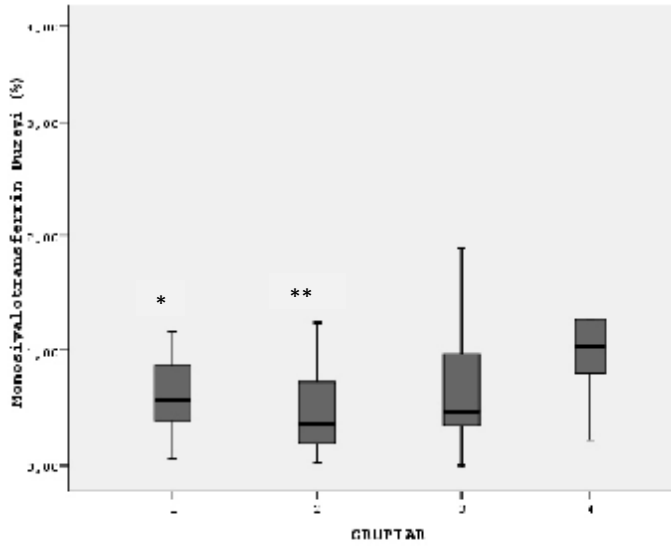
Grup 2: Hafif Malnutrisyonlular
(n=18)

Grup 3: Ağır / Orta malnutrisyonlular
(n= 24)

* $p= 0,036$ kontrol gruba göre

Şekil 24. Ağır ve orta manutre / hafif malnutre hasta ve kontrol gruplarında disiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği (box-plot)

Hastalar hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu olmak üzere üç ayrı grup olarak birbirleriyle ve kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece ağır malnutrisyonlu hasta grubunda monosiyalotransferrin düzeylerinin sırasıyla kontrol grubu ve hafif malnutrisyonlu hasta grubuna kıyasla anlamlı (sırasıyla $p= 0,049$ ve $p= 0,041$) yüksek olduğu görüldü (Şekil 25). Diğer tüm transferrin izoformları ve CDT için; hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta grupları birbirleriyle ve kontrol grubu ile kıyaslandı. Fakat bu parametrelerin hiçbiri açısından aralarında anlamlı fark bulunmadı.



Grup 1: Kontrol (n=30)

Grup 2: Hafif Malnutrisyonlular (n=24)

Grup 3: Orta Malnutrisyonlular (n= 12)

Grup 4: Ağır Malnutrisyonlular (n= 6)

* $p= 0,049$ ağır malnutrisyonlu gruba göre

** $p= 0,041$ ağır malnutrisyonlu gruba göre

Şekil 25. Kontrol, hafif, orta ve ağır malnutrisyonlu hasta gruplarında monosiyalotransferrin düzeyi kutu grafiği (box-plot). Monosiyalotransferrin yüzdelerinin grup 1, 2, 3 ve 4'te ortalama \pm s değerleri sırasıyla $0,62 \pm 0,30$, $0,51 \pm 0,43$, $0,68 \pm 0,55$, $1,27 \pm 1,05$ olarak bulundu.

4.5. KORELASYON ANALİZLERİ

BGA ile biyokimyasal parametreler, transferrin izoformları (%) ve CDT (%) arasındaki korelasyonlar tablo 17’de, biyokimyasal belirteçlerin birbirleri ile korelasyonları ise tablo 18’de sunulmaktadır.

Tablo 17. Biyokimyasal belirteçlerin, transferrin izoformlarının ve CDT’nin BGA ile korelasyonları

Parametreler		p	r	Parametreler		p	r
BGA	Demir	0,006	0,339	BGA	Asiyalotransferrin	0,127	-0,190
	TDBK	0,113	0,195		Monosiyalotransferrin	0,350	-0,117
	TRF	0,094	0,207		Disiyalotransferrin	0,017	-0,292
	Ferritin	0,179	-0,182		Trisiyalotransferrin	0,516	0,081
	Prealbumin	0,387	0,107		Tetrasiyalotransferrin	0,178	0,168
	IGF-1	0,006	0,359		Pentasiyalotransferrin	0,701	-0,048
	Çinko	0,206	0,157		Hekzasiyalotransferrin	0,959	0,006
	CDT	0,007	-0,328		Heptasiyalotransferrin	0,691	-0,050

Tablo 18. Biyokimyasal belirteçlerin birbirleri ile korelasyonları

Parametreler		p	r
Demir	TDBK	0,026	0,276
	TRF	0,027	0,274
	Ferritin	0,115	-0,215
	Prealbumin	0,006	0,340
	IGF-1	0,000	0,562
	Çinko	0,041	0,254
TDBK	TRF	0,000	0,842
	Ferritin	0,000	-0,547
	Prealbumin	0,004	0,344
	IGF-1	0,003	0,393
	Çinko	0,897	-0,016
TRF	Ferritin	0,000	- 0,484
	Prealbumin	0,061	0,230
	IGF-1	0,001	0,421
	Çinko	0,245	0,144
Ferritin	Prealbumin	0,086	-0,231
	IGF-1	0,001	-0,446
	Çinko	0,997	0,000
Prealbumin	IGF-1	0,001	0,420
	Çinko	0,391	0,107
IGF-1	Çinko	0,524	-0,086

Transferrin ile TRF izoformlarının dağılımı ve CDT arasındaki korelasyonlar değerlendirildiğinde TRF ile disiyalotransferrin ($p= 0,022$, $r= 0,283$), TRF ile tetrasiyalotransferrin ($p= 0,025$, $r= -0,278$) ve TRF ile CDT ($p= 0,009$, $r= 0,323$) arasında anlamlı korelasyon saptandı. Diğer biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde ise sadece asiyalotransferrin ile prealbumin ($p= 0,021$, $r= 0,287$) arasında anlamlı korelasyon saptandı.

5. TARTIŞMA VE SONUC

5.1. TARTIŞMA

En sık görülen post-translasyonel modifikasyon reaksiyonlarından biri olan glikozilasyonun birçok patolojik durumla ilişkili olduğu öne sürülmektedir (2). Glikozilasyonun primer olarak etkilendiği konjenital glikozilasyon bozuklukları (4-6) dışında bu süreç; inflamasyon, romatoid artrit, kanser, gebelik, karaciğer hastalığı (7), galaktozemi (8), sepsis (9) ve kronik alkol alımı (10, 11) gibi sekonder nedenlere bağlı olarak da bozulabilir. Son zamanlarda AN gibi katabolik durumla seyreden hastalıklarda da protein glikozilasyonunun etkilendiğine dair yayınlar bulunmaktadır (12-14).

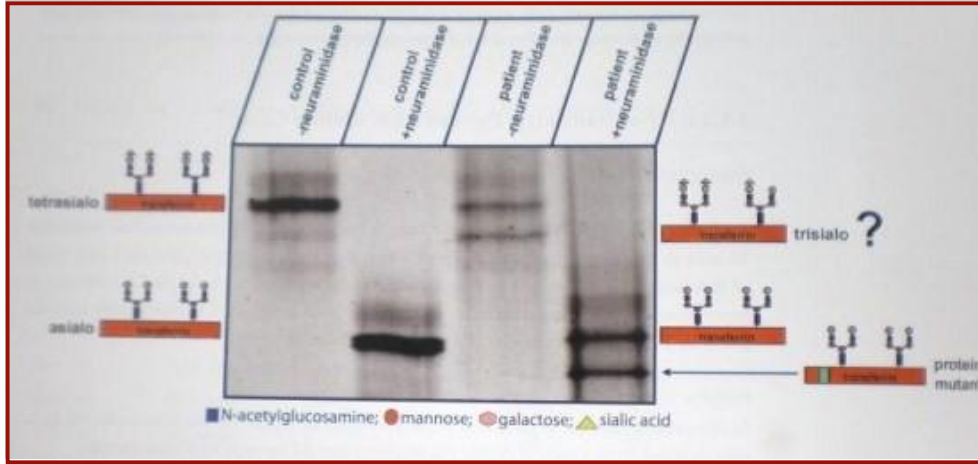
Malnutrisyon da AN gibi katabolik süreçle seyreden bir durum olduğu için çalışmamızda bu özel hasta grubunda protein glikozilasyonunun nasıl etkilendiğini araştırdık. Olgu grubumuzu belirlerken 6 ay ile 5 yaş arasındaki çocukları seçmemizin nedeni Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre malnutrisyonun en sık bu yaş grubunda görülmesidir. Türkiye'de ise Ulusal Beslenme–Sağlık Araştırması verilerine göre, 0-5 yaş grubu çocukların %17,6'sı orta ve hafif, %2,4'ü de daha ağır derecede malnutrisyonludur (85). Çalışmamızda malnutrisyon tanısı konmasında ve derecelendirilmesinde "Waterlow" sınıflamasının kullanılma sebebi değerlendirmede boyu da içine alması ve hem akut hem de kronik malnutrisyonu gösterebilmesidir.

Olgu grubunu bu şekilde belirledikten sonra glikozilasyondaki olası değişiklikleri saptamak için İEF yöntemi ile transferrin izoformlarının analizini gerçekleştirdik. Glikozilasyonun karmaşık mekanizmasının anlaşılabilmesi ve bozukluklarının aydınlatılabilmesi için şimdiye kadar başta TRF olmak üzere birçok glikoprotein üzerinde çalışma yapılmıştır (6). TRF izoformlarının analizinde, yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle İEF referans yöntem olarak kullanılır (15).

TRF izoform analizinde İEF dışında SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez), İEF ve SDS-PAGE'in kombine edildiği iki boyutlu elektrofrez, agaroz jel elektrofrez ve CE gibi diğer elektroforetik yöntemler de kullanılabilir. Kromatografik yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinin elektroforetik yöntemlere kıyasla daha iyi olmakla beraber duyarlılık ve özgüllüklerinin daha düşük olduğu

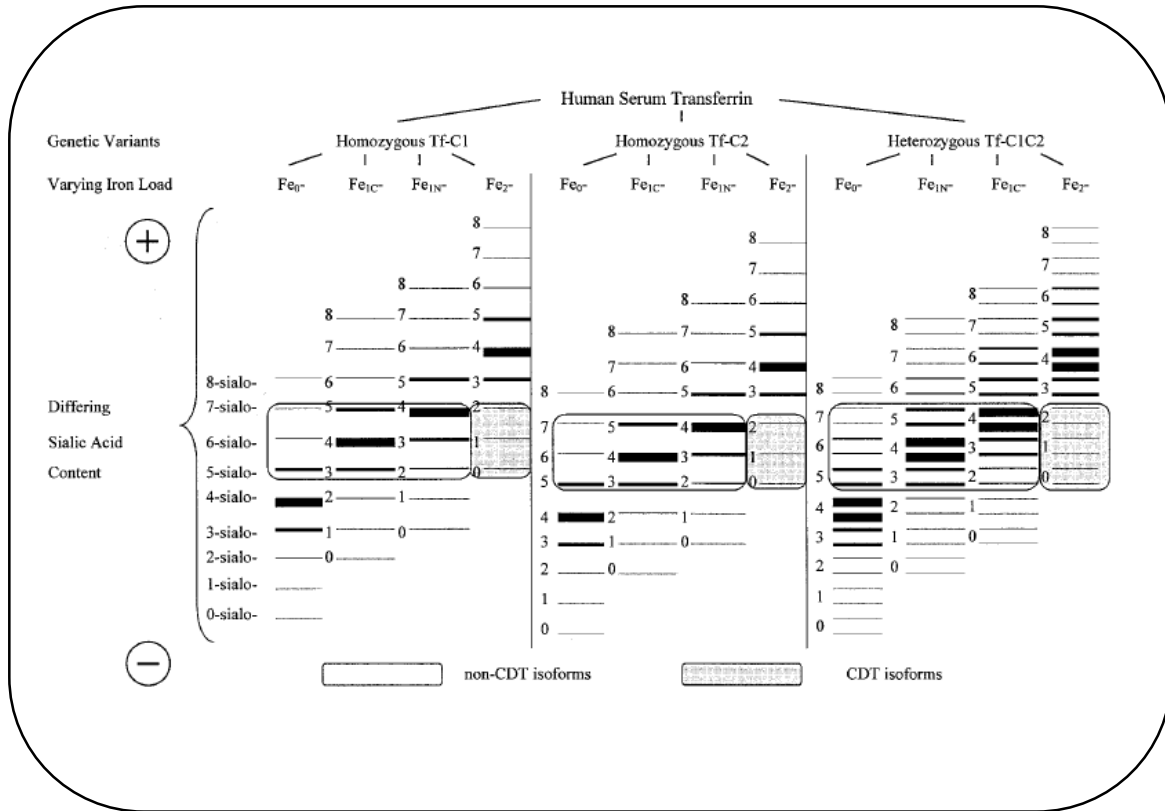
bildirilmiştir (6). Mikrokolonda CDT ve CDT olmayan izoformların ayrımının ardından, türbidimetrik immunometrik ölçümün yapıldığı % CDT-TIA yönteminde ise trisyalotransferrinin CDT izoformları ile beraber elüe olarak yanlış yüksek CDT sonuçlarına neden olduğu öne sürülmektedir (86).

Analitik sebepler dışında, genetik TRF varyantlarının serumdaki varlığının da CDT düzeylerini etkileyerek yanlış yüksek ya da düşük sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir. Yanlış yüksek CDT düzeylerinin nedeni, transferrin D varyantının CDT olmayan izoformlarının, kromatografik yöntemlerde transferrin C varyantının CDT izoformları ile beraber elüe olması ya da İEF’de bu izoformlarla beraber aynı izoelektrik noktada odaklanmasıdır (10, 24, 87). TRF B varyantının CDT izoformları ise TRF C’ye kıyasla artmış elektroforetik mobiliteleri nedeni ile, TRF C varyantının CDT olmayan izoformları ile beraber elüe olurlar ve yanlış negatif sonuçlara yol açarlar (10). İEF yönteminde; izoformlardan herhangi birinde, alışılmış paternlerin dışında bir yükseklikle karşılaşıldığında, bu durumun TRF varyantından kaynaklandığı şüphesine düşülürse örnek nöraminidaz ile muamele edilerek sonuç kesinleştirilir. Nöraminidaz TRF’deki terminal siyalik asit rezidülerini yıkan enzimdir. Kişi TRF varyantları açısından homozigot ise nöraminidazla muameleden sonra asiyalotransferrin bölgesinde tek bir bant, heterozigot ise bu banta ilave olarak asiyalotransferrin bölgesinin altında ya da üstünde bir bant daha (Şekil 26) görülür (88). Böylece İEF yönteminde varyantların ölçüm üzerindeki interferansı ortadan kaldırılmış olur. Biz de çalışmamızda iki olgunun transferrin izoform paternlerinin normalden farklı oluşu nedeni ile bu olgularda TRF varyantı olabileceğini düşündük. Bu örnekleri nöraminidazla muamele ettiğimizde asiyalotransferrin bölgesindeki bant dışında ilave bir bant daha gördük (Şekil 7). Bu durum bize olgularımızdaki anormal paternin büyük olasılıkla TRF varyantından kaynaklandığını gösterdi.



Şekil 26. Transferrin proteinindeki mutasyonların nöraminidaz ile saptanması (83)

TRF molekülünün çeşitli varyantlarının olması kadar farklı sayılarda demir iyonu bağlayabilmesi de izoformların pI'larına etki ederek ölçümü interfere edebilir (Şekil 27) (10). Bu nedenle yöntemimizin örnek hazırlığı aşamasında serum örnekleri demir ile doyurulup tüm izoformlar Fe_2 -TRF haline getirerek bu etki ortadan kaldırılmaktadır.



Şekil 27. TRF mikroheterojenitesinin izoform analizi üzerine etkisi (10)

Bu çalışmada kullandığımız İEF yöntemi ile "Multiphor II" cihazında yapılan analizlerde di- ve tetrasialotransferrin izoformları için her iki düzey kontrolde de jel içi tekrarlanabilirlik % 3,5'in, jeller arası tekrarlanabilirlik ise % 7'nin altında bulunmuştur (Tablo 11). "Phast" Sistem cihazında yapılan analizlerde ise aynı değerler sırasıyla % 7'nin ve % 6'nin altında bulunmuştur (Tablo 12). Jel içi ve jeller arası tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirildiğinde her iki cihazda da yöntem kesinliğinin tatmin edici düzeylerde olduğunu söylemek mümkündür. Doğruluğu ölçmek için kullandığımız kontrol materyali HPLC için hazırlanmış olduğu için hedef değerler İEF yöntemine uygun değildi. TRF izoformlarının analizinde HPLC'nin daha kesin ancak duyarlılığı daha düşük bir yöntem olduğu bilinmektedir (10, 89). Bu nedenle HPLC ile belirlenmiş hedef değerlerin İEF yöntemine kıyasla a-, mono- ve disialotransferrin izoformları için daha düşük, tetrasialotransferrin izoformu için ise daha yüksek olduğunu saptadık. Bu durumda benzer elektroforetik yöntemler için önerilen ve kalitatif yöntemler için de geçerli olan bir kavramdan yola çıkarak pik alanlarının tekrarlanabilirliğinin bir doğruluk göstergesi olabileceğini (90) kabul ettik ve "Phast" Sistem ve "Multiphor II" için aynı kontrol materyalini ard arda analiz ederek ortalama değerleri bulduk. Bu değerleri kıyasladığımızda "Multiphor II" sisteminin "Phast" sisteme göre disialotransferrin ve tetrasialotransferrin için gösterdiği sapmanın (% bias) (Tablo 13) kabul edilir olduğu düşünüldü.

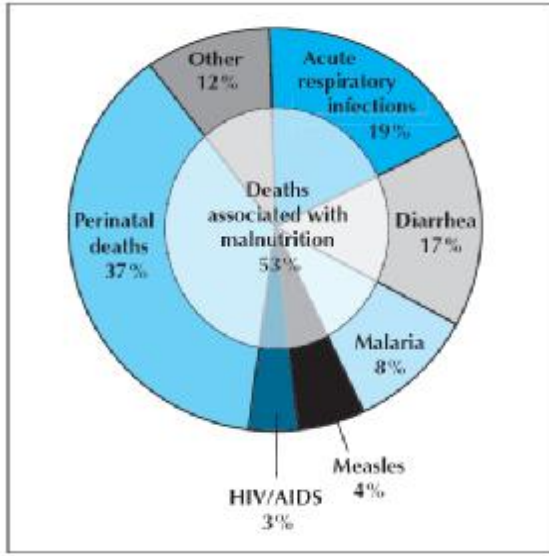
40 örnek ile yapılan iki cihaz arasındaki regresyon analizinde özellikle di- ve trisialotransferrin izoformları için yüksek oranda korelasyon saptanmıştır (sırasıyla $r^2=0,72$, $r^2=0,61$) (sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11). En düşük korelasyon ise hekzasialotransferrin izoformu analizinde gözlenmiştir ($r^2=0,1$) (Şekil 14). Bu durum, gümüş boyadan kaynaklanan koyu renk arka planın etkisiyle, "Phast" Sistemde çalışılan jellerde altı siyalik asitli izoformların iyi değerlendirilememesinden kaynaklanabilir. Yine yöntem karşılaştırma amaçlı yapılan t testinde, tüm izoformlar değerlendirildiğinde iki cihaz arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 14).

Transferrin izoformlarının oransal dağılımı ve oransal CDT için belirlenen referans ve eşik değerleri kullanılan yöntemle bağı olarak değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda kontrol grubunda saptadığımız izoform dağılım yüzdeleri, daha önceki çalışmalarda kontroller için verilen değerle kıyaslandığında genel olarak a- ve disialotransferrin düzeylerinin biraz daha yüksek, tetrasialotransferrin düzeylerinin ise biraz daha düşük olduğu gözlenmektedir.

Bu durum İEF yönteminin a-, mono- ve disiyalo-TRF için analitik duyarlılığının daha fazla olmasına bağlı olabilir. Bunun yanı sıra tüm TRF izoformlarının saptanabilmesine olanak sağlayan serum miktarı jele uygulandığında tetrasiyalotransferrin açısından aşırı bir yüklenme olur. Dolayısıyla bu ana izoforma ait bandın intensitesi bu bandı oluşturan TRF miktarı ile korele olamayabilir. Bu durum da tetrasiyalotransferrin oranındaki düşüklüğü açıklayabilir. Nitekim TRF izoformları ile toplam TRF düzeyi arasındaki ilişki incelendiğinde TRF'nin disiyalotransferrin ve CDT ile olumlu buna karşın tetrasiyalotransferrin ile olumsuz korelasyon göstermesi de bu analitik koşullara bağlı olabilir. Sağlıklı insanlarda toplam serum transferrininin; % 1,5'inden azının hepta- (7SA), % 1-3'ünün hekza- (6SA), % 12-18'inin penta- (5SA), % 64-80'inin tetra- (4SA), % 4.5-9'unun tri- (3SA), % 2,5'inden azının disiyalotransferrin (2SA) olarak bulunduğu bildirilmiştir. A-, mono- ve oktasiyalotransferrin ise saptanamadığı ya da asiyalotransferrin % 0,5'in, monosiyalotransferrin ise % 0,9'un altında olduğu rapor edilmiştir (7, 84). Belirtilen analitik nedenler dışında bu çalışmaların az sayıda ve erişkin yaştaki olguların üzerinde yapılmış olması bu değerlerin bizim kontrol grubu değerlerimizle karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. İEF, özellikle CDG tanısında referans yöntem olarak oldukça yaygın kullanılmasına rağmen transferrin izoform oranları ile ilgili çocukluk yaş grubuna ait yayınlanmış referans değerlerine rastlanmamıştır. Bunun nedeni bu hasta grubunda değerlendirmenin genel paternler üzerinden yapılması olabilir (Şekil 4). Diğer taraftan oransal CDT tayini için de birçok farklı yöntemin kullanılması ve standardizasyonun sağlanamamış olması yine kontrol grubumuzda a-, mono- ve disiyalotransferrinin toplamı olarak ifade ettiğimiz oransal CDT değerini başka çalışmalarla kıyaslamamızı güçleştirmektedir. Yayınlarda CDT özellikle kronik alkol kullanımının bir göstergesi olarak kullanılmakta ve % 0,8'den % 6'ya kadar değişen çok farklı eşik değerler tanımlanmaktadır (89). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu oransal CDT değeri $5,91 \pm 1,47$ olarak bulunmuştur (Tablo 16).

Şimdiye kadar katabolik sürecin hakim olduğu klinik durumlarda yapılan çalışmalarda bu hasta grubunda değişmesi en muhtemel izoformların CDT' yi oluşturan a-, mono- ve disiyalotransferrin olduğu öne sürülmüştür (13, 14). Bu nedenle biz tekrarlanabilirlik ve doğruluk sonuçlarımızı serumda en çok bulunan TRF izoformu olan tetrasiyalotransferrin ve CDT'nin en büyük kısmını oluşturan disiyalotransferrin izoformlarını kullanarak hesapladık. Bu iki parametre için iki yöntem arası yüksek korelasyon, düşük % CV ve düşük % bias sonuçları malnutrisyonda doğru değerlendirme yapmamıza olanak sağladığını düşünmekteyiz.

Malnutrisyon her yıl yaklaşık 300.000 ölüme direkt olarak yol açarken, beş yaş altı ölümlerin de yaklaşık % 50'sinden indirekt olarak sorumludur (Şekil 28) (55). Çocukluk çağında morbidite ve mortalitenin önemli bir kısmından sorumlu olan malnutrisyon büyüme geriliğinin de en sık sebebidir (53). Bu nedenle malnutrisyonlu hastanın beslenme durumunun doğru değerlendirilmesinde, antropometrik ölçümler yanısıra serum protein konsantrasyonları, vitamin seviyeleri ve bu ölçümlerin çeşitli kombinasyonlarının kullanması çok önemlidir (57).



Şekil 28. Dünyada 5 yaş altı çocuklarda görülen ölüm sebepleri (55)

Malnutrisyonun değerlendirilmesinde, başta karaciğer proteinleri (albumin, prealbumin, transferrin) olmak üzere birçok biyokimyasal belirteç üzerinde çalışmalar yapılmış ve bunların seviyelerindeki değişiklikler gösterilmiştir. Albumin, prealbumin, retinol bağlayıcı protein, IGF-1, TRF (67, 70), esansiyel yağ asitleri, vitaminler (67), çinko, bakır ve demir (68) malnutrisyonlu hastalarda şimdiye kadar en çok araştırılan biyokimyasal belirteçlerdir. Son zamanda yapılan çalışmalarda; albumin, prealbumin ve TRF gibi biyokimyasal belirteçlerin altta yatan hastalığın ciddiyetiyle, malnutrisyonun antropometrik göstergelerine oranla daha iyi korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür. Literatürde bu üç proteinden birindeki ve/veya birkaçındaki düşüklüğün protein enerji malnutrisyonu göstergesi olduğunu gösteren birçok yayın vardır. Malnutrisyonlu hastalarda karaciğer proteinlerinin serumda düşük düzeylerde bulunmasının nedeni olarak, bu proteinlerin üretim azlığı öne sürülmüştür (70). Prealbumin beslenme durumundaki değişikliklere erken yanıt vermesi nedeniyle iyi bir protein-enerji malnutrisyonu belirtecidir (58). Prealbuminin tek başına ya da

CRP ile birlikte, besin desteği monitörizasyonunda en duyarlı parametre olduğu (54) ve konsantrasyonunun protein-enerji nutrisyonunun derecesiyle korelasyonu birçok çalışmada gösterilmiştir (70). Moskowitz ve ark. (91) premature infantlarda yaptıkları bir çalışmada; prealbuminin nutrisyonel değerlendirmede bu yaş grubunda da antropometrik ölçümlere ve albumine oranla daha duyarlı bir belirteç olduğunu göstermişlerdir. Bir diğer karaciğer proteini olan TRF'nin, ağır protein enerji malnutrisyonunda serum düzeylerinin düştüğüne dair kesin kanıtlar olsa da ılımlı, subklinik malnutrisyonda geniş değer aralıklarının rapor edildiği farklı çalışmaların varlığı nedeniyle bu konuda net bir kanı yoktur. Ayrıca serum TRF düzeyleri karaciğer hastalıkları, nefrotik sendrom, neoplastik hastalıklar ve anemi gibi birçok durumdan etkilenir (91). Demir eksikliğinde düzeyinin artışı, TRF'nin bir beslenme belirteci olmasını zorlaştırmaktadır. Besin eksikliğine sıklıkla eşlik eden demir eksikliğinde karaciğer TRF sentez ve salınımını artırır. Hasta demir ve protein düzeyleri yönünden eksikse transferrin düzeyleri normal referans aralığında kalır (69). Serumdaki miktarı diyetle düzenlendiğinden beslenmenin değerlendirilmesinde birçok çalışmada IGF-1 düzeylerine de bakılmıştır (71). Prepubertal dönemde sağlıklı çocuklarda yapılan bir çalışmada IGF-1 düzeylerinin BMI ile korelasyon gösterdiği ve bu popülasyonda beslenmenin değerlendirilmesinde kullanımı için uygun bir biyokimyasal belirteç olduğu gösterilmiştir (92). Kwashiorkor ve Marasmusta IGF-1 düzeylerinin düşüklüğu ve besin desteğinden sonra düzeylerinin protein ve enerji alımı ile korele bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir (71). Ayrıca IGF-1, inflamasyon, enfeksiyon, demir eksikliği anemisi gibi durumlardan daha az etkilendiği için diğer plazma proteinlerine oranla daha duyarlı bir beslenme belirtecidir (93).

Serum karaciğer protein seviyelerinin, beslenme durumu ile doğrudan ilişkili olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Malnutrisyona ancak enflamasyonla seyreden kronik bir hastalık eşlik ettiğinde karaciğer proteinlerinde düşüklük (enflamasyona sekonder başta IL-6 olmak üzere sitokinlerin artışına bağlı) gözlenebileceği öne sürülmüştür. Ancak bu protein düzeylerinin ciddi kronik hastalıklarda mortalite ve morbidite ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (66). Bizim alışmamızda da serum prealbumin ve TRF düzeyleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir (sırasıyla $p=0,412$ ve $p=0,213$) (Tablo 15). Ancak orta ve ağır malnutrisyonlu hastaları aynı grup altında toplayarak yaptığımız karşılaştırmada bu hastaların TRF düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunması ($p=0,018$) (Tablo 15) hafif malnutrisyonda TRF düzeylerinin daha az etkilendiğini düşündürür. Serum IGF-1 düzeyleri ise hem tüm malnutrisyonlu hastaları içeren

grupta hem de ağır ve orta derecede malnutrisyonlu hastaları içeren grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,009$ ve $p= 0, 007$) (Tablo 15). IGF-1'in hem tüm beslenme belirteçleri (Tablo 18) ile hem de BGA (Tablo 17) ile anlamlı korelasyon gösterdiği de saptanarak IGF-1 in malnutrisyon göstergesi olarak daha duyarlı olduğu kanısına ulaşılmıştır.

Beslenmenin değerlendirilmesinde, vücut demir durumunu zayıf ölçüde yansıttığı bilinse de demir ölçümü hala sıklıkla kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda serum demiri malnutrisyonlu grupta, kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,006$) (Tablo 15). Ayrıca demir ile BGA arasında olumlu yönde, orta derecede ve anlamlı korelasyon bulunması hastalardaki düşük serum demir düzeyini destekleyen bir bulgudur. Yine çalışmamızda demir ile TDBK ve TRF arasında olumlu yönde, orta derecede ve anlamlı korelasyon bulunmuştur. Demir eksikliği anemisinin aksine; hasta grubunda serum demiri düşerken, TRF ve TDBK düzeylerinin artmamasının nedeni, malnutrisyonda bu proteinlerin sentezinin yeterli olmamasına bağlı olabilir.

Ferritin de kısa ömürlü olması nedeniyle iyi bir beslenme belirteçidir fakat hem demir eksikliği hem de (akut faz reaktantı olduğu için) infeksiyon, karaciğer hastalığı veya çeşitli inflamatuvar durumlardan etkilenir (93). Protein-enerji malnutrisyonunda ise ferritin düzeylerinin yükseldiği ve transferrin ile negatif korelasyon gösterdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Yaşları 15-72 ay arasında olan 17 ağır ödematöz malnutrisyonlu çocukta yapılan bir çalışmada ferritin konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (94). Bir yıl boyunca tedavi alan AN'li 14 adolesanda yapılan bir çalışmada ise başlangıçta yüksek olan ferritin düzeylerinin giderek düştüğü fakat kontrole kıyasla yüksek kaldığı saptanmıştır (95). Bizim çalışmamızda da hasta grubu serum ferritin düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Fakat bu yükseklik, hasta ve kontrol grubunun ortalamaları arasında oldukça fazla fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun sebebi olguların ferritin düzeylerinin çok geniş bir aralıkta dağılması olabilir. Ağır ve orta malnutrisyonlu hastaları bir grup altında toplayarak yaptığımız karşılaştırmada ise hasta grubunda ferritin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Serum ferritin ile TRF düzeyleri arasında olumsuz yönde, orta derecede ve anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($r= - 0,442$ ve $p= 0,001$) (Tablo 18). Bu bulgular ferritin yüksekliğinin malnutrisyonun ile ilişkisini desteklemektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda besinsel çinko eksikliği olan topluluklarda çinkonun lineer büyüme üzerinde etkili bir mikrobesein olduğu ileri sürülmüştür. Çinko eksikliği olan çocukların özellikle okul ve okul öncesi dönemde beslenmelerine yapılan çinko ilavesinin, hem lineer büyümeyi arttırdığı hem de diyare ve respiratuvar sistem enfeksiyonlarının görülme sıklığını ve şiddetini azalttığı gösterilmiştir (68). 0-13 yaş arası çocuklarda yapılan 22 ayrı çalışmadan oluşturulan bir meta-analizde çinko replasman tedavisinin büyüme üzerine etkisinin çinko eksikliğinin derecesine ve çinko desteğinin dozu ve süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ortaya konmuştur (74). Thakur ve ark. (75) yaşları 3 ay -5 yaş arası olan ağır malnutrisyonlu çocuklarda yaptıkları çalışmada, serum çinko ve bakır düzeylerinin malnutrisyonlu grupta (n= 80), kontrol grubuna (n= 37) göre anlamlı ölçüde düşük olduğunu göstermişlerdir. Malnutrisyonlu çocuklarda hipoproteinemi ile serum bakır ve çinko seviyelerinin düşüklüğü birliktelik göstermiştir (75). Bizim çalışmamızda ise malnutrisyonlu çocuklardaki serum çinko düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük olmakla beraber aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,221) (Tablo 15). Bu durum bizim hasta grubumuzda az sayıda ağır malnutrisyonlu çocuk bulunmasına bağlı olabilir.

Yirmi yılı aşkın bir süredir alkol tüketiminin biyokimyasal belirteci olarak kullanılan CDT, katabolik hasta grubunda ilk kez 2001 yılında yapılan bir çalışmayla gündeme gelmiştir. Reif ve ark.'ın yaptıkları bu çalışmada, üçünü anoreksiya nervozalılarının oluşturduğu, yeme bozukluklarına bağlı kilo kaybı olan katabolik süreçteki 12 psikiyatri hastasında oransal CDT düzeyleri % CDT-TIA yöntemiyle analiz edilmiştir. CDT'nin hasta grubunda ortalaması % 6,7 olarak bulunmuş ve eşik değer % 6 alındığında CDT'nin tanısal duyarlılığı % 63 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu ise alkol almayanlar/sosyal içiciler ve ağır içiciler olmak üzere ikiye bölünmüştür. Kontrol gruplarında ortalama sırasıyla %4,4 ve % 5,8 olarak bulunmuştur. Ağır içicilerin oluşturduğu grupta CDT'nin tanısal duyarlılığı ise katabolik hasta grubundan oldukça düşük (% 33) bulunmuştur. Bu çalışmadan çıkan sonuç, katabolik sürecin CDT düzeylerini etkilediği ve bu parametrenin bu hasta grubunda alkol kullanımını değerlendirmede tek başına güvenilir bir parametre kabul edilemeyeceğidir (14). Fakat hasta sayısının azlığı ve kullanılan yöntemin geçerliliğinin İEF, HPLC ve CE gibi yöntemlere kıyasla düşük olması bu çalışmanın güvenilirliğini azaltmaktadır.

Yine aynı ekibin 2005 yılında yaptıkları araştırmada CDT'nin AN'nin ciddiyeti ve prognozu ile ilişkisi araştırılmıştır. Anoreksiyalı hastaların % 57'sinde CDT yüksek bulunmuştur. CDT seviyesi başlangıçta yüksek olan grubun, tedaviye daha zayıf cevap verdiği, daha kötü prognoza eğilimli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hastaların BMI'leri ile CDT düzeyleri arasında negatif korelasyon saptanmış, tedavi ile CDT'deki düşüşe paralel BMI'lerinin de normale döndüğu gösterilmiştir (13). Fakat burada çalışılan yöntemin belirtilmemesi ve sonuçların CDT'nin üst eşik değerinin yüzdesi olarak verilmesi bu çalışma verilerinin, diğer araştırmalarda bulunan sonuçlarla karşılaştırılmasını güçleştirmektedir (87).

Bu konuda 2007 yılında Arndt ve ark.'ın (12) yaptığı en son araştırmada ise anoreksiyalılarda CDT düzeyleri üç farklı yöntem ile ölçülmüştür. HPLC ve CE yöntemleriyle CDT'yi oluşturan en önemli izoform olan disiyalotransferrin saptanabilmiş, a- ve monosiyalotransferrin izoformları saptanamamış olup disiyalotransferrin total CDT olarak kabul edilmiştir. Her iki yöntemle CDT normal olarak değerlendirilmiştir. HPLC yönteminde trisiyalotransferrin hastaların % 67'sinde yüksek bulunmuş, bu serumlarda TİA yöntemiyle oransal CDT ölçüldüğünde % 44'ünde eşik değer olarak kabul edilen % 2,6 nın üzerinde yükseklik saptanmıştır(12). Bu durum % CDT-TİA yönteminde ayırımın anyon alişverişi prensibine dayalı kolonlarda gerçekleştirilmesi nedeni ile trisiyalotransferrinin CDT'den ayrılmasına bağlanmıştır. Fakat HPLC yöntemi ile trisiyalotransferrin yüksekliği gösterilmiş olan örneklerin %CDT-TİA yönteminde sadece % 44 ünde CDT'nin yüksek bulunması çelişkilidir. Bu çalışmada HPLC ve CE yöntemleri ile analiz edilen serumlarda trisiyalotransferrin düzeylerinin yüksek bulunması, hipokalorik malnutrisyonda bu izoformunun olası değişiminin daha ileri çalışmalarla araştırılabileceğini düşündürmüştür.

Malnutrisyonun glikozilasyon üzerine olası etkisini ortaya koymak için tüm transferrin izoformlarının dağılımını incelediğinde karbohidratı eksik olarak bilinen a-, mono- ve disiyalotransferrin izoformlarının dağılım yüzdeleri, malnutrisyonlu grupta kontrol grubuna göre yüksek bulunsa da bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (Tablo 16). Ağır ve orta malnutrisyonlu olguları bir grupta toplayarak yaptığımız değerlendirmede ise bu hastalarda oransal a- ve disiyalotransferrin değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunması (sırasıyla p= 0,046 ve p= 0,036) (Tablo 16), olguların malnutrisyon derecesi arttıka glikozilasyon açasından anlamlı bir fark bulunabileceğini işaret etmektedir. Yanı sıra monosiyalotransferrin düzeyleri açasından ağır malnutrisyonlu hasta grubu ile hem kontrol grubu hem de hafif malnutrisyonlu hasta grubu arasında anlamlı fark

bulunmuştur (sırasıyla $p=0.049$, $p= 0,041$) (Şekil 25). Daha önce bu hasta grubunda tüm izoformların dağılımının ayrı ayrı değerlendirildiği bir çalışma olmadığından monosiyolotransferrin düzeyleri ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Hasta ve kontrol grubu trisiyalotransferrin düzeyleri açısından değerlendirildiğinde ise Arndt ve ark'ın yaptığı çalışmanın aksine hasta grubunda bu izoform açısından anlamlı olmayan çok az bir düşüklük saptanmıştır (Tablo 16). A-,mono- ve disiyalotransferrin toplanarak bulunan CDT değerleri anlamlı olmamakla beraber hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (Tablo 16). Malnutrisyonun şiddeti ile transferrinin glikozilasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde ise BGA ile disiyalotransferrin ve CDT arasında olumsuz yönde, orta derecede ve anlamlı korelasyon ($p= 0,017$ ve $r= -0,292$, $p= 0,007$ ve $r= -0,328$) (Tablo 17) bulunması, bu belirteçlerin katabolik süreç ile ilişkisini destekleyen bir bulgudur.

Kronik alkol alımında CDT'nin artış mekanizması henüz tam anlaşılmamakla birlikte etanol veya onun metaboliti olan asetaldehitin, golgide, N-glikan zinciri sentezini etkilediği düşünülmektedir. Stibler ve Borg (10) , alkoliklerin serumunda galaktozil transferaz ve N-asetilglukozaminiltransferaz aktivitelerinin azaldığını ve bu örneklerle in-vitro asetaldehit eklenmesinin enzim aktivitesini ayrıca düşürdüğünü göstermişlerdir. Katabolik süreçte oransal CDT'nin artmasında olası mekanizmanın açlığa bağlı olarak kanda artan asetoasetatın alkol metaboliti olan asetaldehite yapısal benzerliği nedeni ile enzim inhibisyonu yapması olabileceği ileri sürülmüştür (14). Katabolik süreçte protein glikozilasyonunda değişikliklere yol açan olası mekanizmalar hakkında ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları;

1. Yöntem performansını analitik açıdan değerlendirmeye yönelik olarak TRF izoformları ve % CDT için standart materyal olmayışı
2. Ağır malnutrisyonlu grubun az sayıda çocuktan oluşması
3. Bu yaş grubunda TRF izoformları ve % CDT için bilinen referans aralıklarının olmayışı

5.2. SONUÇ VE ÖNERİLER

Katabolik hasta gruplarında CDT izoform analizi yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması ve farklı yöntemlerle yapılan çalışmalarda farklı izoformların yüksek bulunması nedeniyle katabolik sürecin transferrin izoformları ile ilişkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Malnutrisyon da katabolik sürecin hakim olduğu bir durumdur ve bu konuda olgu grubunu sadece malnutrisyonlu hastaların oluşturduğu bir çalışma yoktur. Ayrıca katabolik hastalarda yapılan çalışmalarda genellikle oransal CDT üzerine yoğunlaşmış, CDG'li hastalarda olduğu gibi referans yöntem olan İEF ile tüm izoformların değerlendirildiği bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamız malnutrisyonlu hastalarda tüm TRF izoformlarının referans yöntem olan İEF ile değerlendirildiği ilk çalışmadır. İEF yönteminde %CDT yi oluşturan a-, mono- ve disiyalotransferrin bantları net olarak ayrılabilmekte ve trisiyalotransferin ile interferans söz konusu olmamaktadır. Malnutrisyonlu olguların tümünü içeren hasta grubunda oransal CDT ve onu oluşturan izoformların kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunun gözlenmesi, ayrıca ağır ve orta malnutrisyonlu olguları kapsayan grupta a- ve disiyalotransferrin oranlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksek olması bu konuda daha geniş gruplarda daha ileri çalışmalara zemin oluşturmaktadır. Daha ağır malnutrisyon olgularında ya da katabolik süreç ile seyreden diğer hastalıklarda İEF yöntemi ile yapılacak çalışmalar glikozilasyon değişikliklerini ortaya koyabilir.

6.KAYNAKLAR VE EKLER

6.1. KAYNAKLAR

1. Gu J, Taniguchi N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell Adh Migr* 2008;2:243-5.
2. Grunewald S. Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early Hum Dev* 2007;83:825-30.
3. Pamela C. Champe RAH, Denise R. Ferrier. Glycosaminoglycans and Glycoproteins. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry Vol.*, 2007:155-71.
4. O'Brien JF. Methods for detection of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes. *Semin Pediatr Neurol* 2005;12:159-62.
5. Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:434-9.
6. Marklova E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 2007;385:6-20.
7. van Eijk HG, van Noort WL, de Jong G, Koster JF. Human serum sialo transferrins in diseases. *Clin Chim Acta* 1987;165:141-5.
8. Pronicka E, Adamowicz M, Kowalik A, Ploski R, Radomska B, Rogaszewska M, et al. Elevated carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its normalization on dietary treatment as a useful biochemical test for hereditary fructose intolerance and galactosemia. *Pediatr Res* 2007;62:101-5.
9. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, De Backer D, Su F, Wang Z, et al. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock* 2005;24:48-52.
10. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13-27.
11. Stibler H, Borg S. Carbohydrate composition of serum transferrin in alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:61-4.
12. Arndt T, Erkens M, Holtkamp K, Keller T, Gressner AM. High prevalence of increased trisialotransferrin concentrations in patients with anorexia nervosa: implications for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chim Acta* 2007;379:150-3.
13. Reif A, Fallgatter AJ, Schmidtke A. Carbohydrate-deficient transferrin parallels disease severity in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 2005;137:143-6.
14. Reif A, Keller H, Schneider M, Kamolz S, Schmidtke A, Fallgatter AJ. Carbohydrate-deficient transferrin is elevated in catabolic female patients. *Alcohol Alcohol* 2001;36:603-7.
15. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR. Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcoI.D. assay. *Clin Chem* 2000;46:483-92.
16. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *J Neurol Sci* 1976;30:269-85.
17. David A. Bender PAM, Kathleen M. Botham, Robert K. Murray. Glycoproteins. In: Murray RK, ed. *Harper's Illustrated Biochemistry*, Vol. 26 ed, 2003:514-35.

18. Jaeken J. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis* 2003;26:99-118.
19. Biffi S, Tamaro G, Bortot B, Zamberlan S, Severini GM, Carrozzi M. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a biochemical tool for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDGs). *Clin Biochem* 2007;40:1431-4.
20. <http://sites.google.com/site/biyokimyadersleri/modifikasyon2.ppt>.
21. Fang J, Peters V, Assmann B, Korner C, Hoffmann GF. Improvement of CDG diagnosis by combined examination of several glycoproteins. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:581-90.
22. Matthijs G. Research network: EUROGLYCANET: a European network focused on congenital disorders of glycosylation. *Eur J Hum Genet* 2005;13:395-7.
23. Helander A, Bergstrom J, Freeze HH. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. *Clin Chem* 2004;50:954-8.
24. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029-37.
25. Arndt T, Guessregen B, Hallermann D, Nauck M, Terjung D, Weckesser H. Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by HPLC--statistics and extreme CDT values. *Forensic Sci Int* 2008;175:27-30.
26. Arndt T, Meier U, Nauck M, Gressner AM. Primary biliary cirrhosis is not a clinical condition for increased carbohydrate-deficient transferrin: experience with four independent CDT analysis methods. *Clin Chim Acta* 2006;372:184-7.
27. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent JL, et al. Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med* 2003;31:2156-62.
28. Dobrowolski SF, Banas RA, Suzow JG, Berkley M, Naylor EW. Analysis of common mutations in the galactose-1-phosphate uridyl transferase gene: new assays to increase the sensitivity and specificity of newborn screening for galactosemia. *J Mol Diagn* 2003;5:42-7.
29. Robert M. Kliegman REB, Hal B. Jenson, Bonita F. Stanton. Defects in Metabolism of Carbohydrates In: Priya S. Kishnani Y-TC, ed. *Nelson Textbook of Pediatrics*, Vol. 18th ed: saunders Elsevier, 2007:601-20.
30. Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, et al. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* 2005;15:1268-76.
31. Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B. Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. *Glycobiology* 1998;8:351-7.
32. Murawaki Y, Sugisaki H, Yuasa I, Kawasaki H. Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with nonalcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1997;259:97-108.
33. Ramdani B, Nuyens V, Coddén T, Perpete G, Colicis J, Lenaerts A, et al. Analyte comigrating with trisialotransferrin during capillary zone electrophoresis of sera from patients with cancer. *Clin Chem* 2003;49:1854-64.
34. Sillanauke P, Strid N, Jousilahti P, Vartiainen E, Poikolainen K, Nikkari S, et al. Association of self-reported diseases and health care use with commonly used laboratory markers for alcohol consumption. *Alcohol Alcohol* 2001;36:339-45.

35. Feelders RA, Vreugdenhil G, de Jong G, Swaak AJ, van Eijk HG. Transferrin microheterogeneity in rheumatoid arthritis. Relation with disease activity and anemia of chronic disease. *Rheumatol Int* 1992;12:195-9.
36. de Jong G, van Noort WL, Feelders RA, de Jeu-Jaspars CM, van Eijk HG. Adaptation of transferrin protein and glycan synthesis. *Clin Chim Acta* 1992;212:27-45.
37. AM J. Amino acids, peptides, and proteins. In: Burtis CA AE, Bruns DE, ed. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, Vol. 4th ed ed: Elsevier Saunders Press, 2006:533-95.
38. Bean P, Peter JB. Allelic D variants of transferrin in evaluation of alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing-immunoblotting-laser densitometry. *Clin Chem* 1994;40:2078-83.
39. Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1347-55.
40. Stibler H, Borg S, Joustra M. Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption (Swedish Patent 8400587-5). *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:535-44.
41. Arndt T, Hackler R, Kleine TO, Gressner AM. Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDtect assay. *Clin Chem* 1998;44:27-34.
42. Hackler R, Arndt T, Kleine TO, Gressner AM. Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. *Anal Biochem* 1995;230:281-9.
43. Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19:3033-9.
44. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993;39:2115-20.
45. Renner F, Kanitz RD. Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clin Chem* 1997;43:485-90.
46. Wada Y. Mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;838:3-8.
47. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:261-78.
48. Westermeier R. Isoelectric focusing. *electrophoresis in practice*, Vol. 4th ed: Wiley-VCH Verlag mbH & Co. KGaA, 2005:51-67.
49. Raymond Karcher JPL. Electrophoresis. In: Carl A. Burtis ERA, David E. Bruns, ed. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, Vol. 4th ed: Elsevier Saunders Press, 2006:121-41.
50. G. T. Protein izolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması. In: Temizkan G. AN, ed. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Vol. 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti, 2008:161-273.
51. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-39.
52. <http://www5.gelifesciences.com>.

53. Kumar S, Olson DL, Schwenk WF. Part I. Malnutrition in the pediatric population. *Dis Mon* 2002;48:703-12.
54. Barbosa-Silva MC. Subjective and objective nutritional assessment methods: what do they really assess? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:248-54.
55. Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ* 2005;173:279-86.
56. Kliegman RM, Jenson HB, Behrman RE, Stanton BF. Food insecurity, Hunger, and Undernutrition. In: Heird WC, ed. *Nelson Textbook of Pediatrics*, Vol. 18th ed: Saunders Elsevier, 2007:225-32.
57. Seres DS. Surrogate nutrition markers, malnutrition, and adequacy of nutrition support. *Nutr Clin Pract* 2005;20:308-13.
58. Devoto G, Gallo F, Marchello C, Racchi O, Garbarini R, Bonassi S, et al. Prealbumin serum concentrations as a useful tool in the assessment of malnutrition in hospitalized patients. *Clin Chem* 2006;52:2281-5.
59. Dogan Y, Erkan T, Yalvac S, Altay S, Cokugras FC, Aydin A, Kutlu T. Nutritional status of patients hospitalized in pediatric clinic. *Turk J Gastroenterol* 2005;16:212-6.
60. Shaaban SY, Marzouk D, Nassar MF, Ezzat NI, Mohamed I. Early detection of protein energy malnutrition in Sharkia Governorate. *J Egypt Public Health Assoc* 2005;80:665-85.
61. de Onis M, Blossner M. The World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition: methodology and applications. *Int J Epidemiol* 2003;32:518-26.
62. Feferbaum R, Delgado AF, Zamberlan P, Leone C. Challenges of nutritional assessment in pediatric ICU. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:245-50.
63. Samour PQ, King K. Nutritional Assessment. In: Corrales KM, Utter SL, eds. *Handbook of Pediatric Nutrition*, Vol. 3rd ed: Jones and Bartlett Publishers, 2005:391-406.
64. Gomez F, Ramos Galvan R, Frenk S, Cravioto Munoz J, Chavez R, Vazquez J. Mortality in second and third degree malnutrition. 1956. *Bull World Health Organ* 2000;78:1275-80.
65. Marshall WJ. Nutritional assessment: its role in the provision of nutritional support. *J Clin Pathol* 2008;61:1083-8.
66. Fuhrman MP, Charney P, Mueller CM. Hepatic proteins and nutrition assessment. *J Am Diet Assoc* 2004;104:1258-64.
67. Samour PQ, King K. Nutritional Assessment. In: Bessler S, ed. *Handbook of Pediatric Nutrition*, Vol. 3rd ed, 2005:11-35.
68. Bhan MK, Sommerfelt H, Strand T. Micronutrient deficiency in children. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S199-203.
69. Burtis CA AE. Nutritional assessment, therapy, and monitoring. In: M.S. V, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry Vol. 3rd ed*: W.B. Saunders Company, 1999:1359-95.
70. Myron Johnson A, Merlini G, Sheldon J, Ichihara K. Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:419-26.
71. Unterman TG, Vazquez RM, Slas AJ, Martyn PA, Phillips LS. Nutrition and somatomedin. XIII. Usefulness of somatomedin-C in nutritional assessment. *Am J Med* 1985;78:228-34.

72. Caregaro L, Favaro A, Santonastaso P, Alberino F, Di Pascoli L, Nardi M, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a nutritional marker in patients with eating disorders. *Clin Nutr* 2001;20:251-7.
73. Weisstaub G, Medina M, Pizarro F, Araya M. Copper, iron, and zinc status in children with moderate and severe acute malnutrition recovered following WHO protocols. *Biol Trace Elem Res* 2008;124:1-11.
74. Bhandari N, Bahl R, Taneja S. Effect of micronutrient supplementation on linear growth of children. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S131-7.
75. Thakur S, Gupta N, Kakkar P. Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. *Eur J Pediatr* 2004;163:742-4.
76. Robert K. Murray DKG, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell,. Harper's Illustrated Biochemistry. In: Murray RK, ed. *Plasma Proteins & Immunoglobulins* Vol. twenty-sixth ed, 2003:580-98.
77. Cook JD, Skikne BS. Serum ferritin: a possible model for the assessment of nutrient stores. *Am J Clin Nutr* 1982;35:1180-5.
78. D'Alessandro AM, D'Andrea G, Oratore A. Different patterns of human serum transferrin on isoelectric focusing using synthetic carrier ampholytes or immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9:80-3.
79. de Jong G, van Eijk HG. Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9:589-98.
80. Pascali VL, Dobosz M, Destro-Bisol G, D'Aloja E. Characterization of genetic variants of human serum transferrin by isoelectric focusing: comparison between conventional and immobilized pH gradients, and application to a protocol for paternity testing. *Electrophoresis* 1988;9:411-7.
81. Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L, Bjellqvist B, Gorg A. Effect of salt on the performance of immobilized pH gradient isoelectric focusing gels. *Electrophoresis* 1988;9:74-80.
82. Petren S, Vesterberg O. Separation of different forms of transferrin by isoelectric focusing to detect effects on the liver caused by xenobiotics. *Electrophoresis* 1989;10:600-4.
83. Nenad Blau MD, K.Michael Gibson. Congenital Disorders of Glycosylation. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics, Vol.*, 2008:379-417.
84. van Eijk HG, van Noort WL. The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis* 1992;13:354-8.
85. Özlem BOSTAN SÖ, Gülnur TOKUÇ, Fatma K. NARTER,, Engin TUTAR NG, Kamil ESMER. The Sociodemographic features of the patients that admitted to the pediatric clinics of our hospital. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2003.
86. Arndt T. Valid carbohydrate-deficient transferrin testing. *Clin Chim Acta* 2006;364:367-8.
87. Arndt T, Keller T. Carbohydrate-deficient transferrin and anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 2006;144:245-6; author reply 7-8.
88. Perez-Cerda C, Quelhas D, Vega AI, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem* 2008;54:93-100.

89. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, Helander A. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:558-62.
90. Ross GA. Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation *Accred Qual Assur* 1997;2:275-84.
91. Haider M, Haider SQ. Assessment of protein-calorie malnutrition. *Clin Chem* 1984;30:1286-99.
92. Martinez de Icaya P, Fernandez C, Vazquez C, del Olmo D, Alcazar V, Hernandez M. IGF-1 and its binding proteins IGFBP-1 and 3 as nutritional markers in prepubertal children. *Ann Nutr Metab* 2000;44:139-43.
93. Christopher Duggan WAW, John B Watkins. Nutrition in Pediatrics. In: Clifford W.Lo AOb, ed. Laboratory assessment of nutritional status, Vol. 3rd ed, 2003:17-32.
94. Adelekan DA, Thurnham DI, Adeodu OO, Ojofeitimi EO. Plasma ferritin concentration in relation to vitamin A and E status of children with severe oedematous malnutrition. *Ann Trop Paediatr* 1991;11:175-80.
95. Nova E, Lopez-Vidriero I, Varela P, Toro O, Casas JJ, Marcos AA. Indicators of nutritional status in restricting-type anorexia nervosa patients: a 1-year follow-up study. *Clin Nutr* 2004;23:1353-9.

6.2. EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU (Gönüllü)

Sayın anne / baba,

Malnutrisyon vücutta besin yetmezliği sonucu oluşan ve vücutta yıkım sürecinin (katabolik süreç) arttığı bir durumdur. Çocuklarda malnutrisyon doğrudan beslenme eksikliğine bağlı olabileceği gibi, kronik ishal veya kronik hastalık sonrasında da gelişebilir. Bu çocuklarda malnutrisyonun tanısı ve şiddeti, sağlıklı yaşlılarının boy ve kiloları göz önüne alınarak belirlenir.

Bu çalışmada, malnutrisyonda gelişen katabolik sürecin vücutta önemli işlevleri olan glikoproteinlerin yapımını nasıl etkilediği incelenecektir. Bu amaçla bir glikoprotein olan transferrinin izoformlarındaki değişim analiz edilecektir. Transferrin izoformlarındaki değişim beslenme durumunun göstergesi olan diğer parametreler ile de karşılaştırılacaktır. Böylece beslenme yetersizliğinin şiddeti ile glikoproteinlerin yapımı arasındaki ilişki ortaya konacaktır. Bu çalışma ile beslenme yetersizliğinde ortaya çıkan metabolik değişiklikler ve bunların olası mekanizmaları daha iyi anlaşılacak olacaktır. Bu çalışmanın katılan kişilere doğrudan ve kısa vadede tıbbi bir yararı olmayacaktır, ancak beslenme durumunun göstergesi olan tüm parametreler ölçüleceğinden hastanın ayrıntılı bir değerlendirmesi yapılmış olacaktır.

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Gastroenteroloji ve Beslenme polikliniğine zayıflık yakınması ile getirilen, öyküsünde beslenme bozukluğu veya kronik ishali olan 0-5 yaş arası 30 çocuk alınacaktır. Kontrol grubu olarak da hasta grubuna benzer yaş ve cinsten rutin sağlık kontrolü için çocuk polikliniğine başvuran sağlıklı 30 çocuk alınacaktır.

İlk başvuruda tüm hastalardan rutin olarak tam kan sayımı, rutin idrar analizi, serum IgA düzeyi ve çölyak antikorları (antiigliadin antikor IgA ve IgG, antiendomisyum antikoru IgA), dışkıda parazit, yağ ve indirgeyici madde istenecektir.

Hastalardan, rutin istenen tetkiklere ek olarak bu çalışma kapsamında sadece ilk başvuru anında, transferrin izoformlarını ve beslenme belirteçleri olan transferrin, prealbumin, IGF-1, çinko, demir, demir bağlama ve ferritin düzeylerini değerlendirmek için 5 ml kan alınacaktır..

Bu araştırma kapsamında rutin incelemeler için yapılan kan alımı dışında başka bir girişim yapılmayacaktır. Rutin kan testleriniz için alınacak kanın bir bölümünü (1/2 tüp; 5 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz. Bu çalışma için kan sadece bir kez alınacaktır. Bu işlem gönüllülerin ortalama 10 dakikasını alacaktır. Gönüllünün çalışma için ikinci bir kez hastaneye gelmesine gerek yoktur. Kan alma sırasında, kan alınan bölgede hematoma (cilt altı kanama) görülebilir. Bunu önlemek için pamukla bası yapılacaktır. Bunun haricinde bir problem görüldüğünde aşağıda verilen telefon numarasından sorumlu hekim Öznur ERSOY'a ulaşılacaktır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında çocuğunuzun ismi kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün (veli)

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Adres:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı:Öznur

Soyadı:BİLEN

Tarih:

Tel: 0 505 430 24 55, 0 232 412 25 59

Adres: 1710 sokak no:58 Kat:3 Karşıyaka / İzmir

İmza:

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU (Sağlıklı Gönüllü)

Sayın anne / baba,

Malnutrisyon vücutta besin yetmezliği sonucu oluşan ve vücutta yıkım sürecinin (katabolik süreç) arttığı bir durumdur. Çocuklarda malnutrisyon doğrudan beslenme eksikliğine bağlı olabileceği gibi, kronik ishal veya kronik hastalık sonrasında da gelişebilir. Bu çocuklarda malnutrisyonun tanısı ve şiddeti, sağlıklı yaşlılarının boy ve kiloları göz önüne alınarak belirlenir.

Bu çalışmada, malnutrisyonda gelişen katabolik sürecin vücutta önemli işlevleri olan glikoproteinlerin yapımını nasıl etkilediği incelenecektir. Bu amaçla bir glikoprotein olan transferrinin izoformlarındaki değişim analiz edilecektir. Transferrin izoformlarındaki değişim beslenme durumunun göstergesi olan diğer parametreler ile de karşılaştırılacaktır. Böylece beslenme yetersizliğinin şiddeti ile glikoproteinlerin yapımı arasındaki ilişki ortaya konacaktır. Bu çalışma ile beslenme yetersizliğinde ortaya çıkan metabolik değişiklikler ve bunların olası mekanizmaları daha iyi anlaşılmış olacaktır. Bu çalışmanın katılan kişilere doğrudan ve kısa vadede tıbbi bir yararı olmayacaktır, ancak beslenme durumunun göstergesi olan tüm parametreler ölçüleceğinden çocuğunuzun ayrıntılı bir değerlendirmesi yapılmış olacaktır.

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Gastroenteroloji ve Beslenme polikliniğine zayıflık yakınması ile getirilen, öyküsünde beslenme bozukluğu veya kronik ishali olan 0-5 yaş arası 30 çocuk alınacaktır. Kontrol grubu olarak da hasta grubuna benzer yaş ve cinsten rutin sağlık kontrolü için çocuk polikliniğine başvuran sağlıklı 30 çocuk alınacaktır.

Hastalardan, bu çalışma kapsamında sadece ilk başvuru anında, transferrin izoformlarını ve beslenme belirteçleri olan prealbumin, IGF-1, çinko, demir, demir bağlama ve ferritin düzeylerini değerlendirmek için 5 ml kan alınacaktır..

Bu araştırma kapsamında kan alımı dışında başka bir girişim yapılmayacaktır. Bu araştırmaya yardımcı olmak üzere, alınacak olan kanı (1/2 tüp; 5 ml) kullanabilmek için müsadenizi istiyoruz. Bu çalışma için kan sadece bir kez alınacaktır. Bu işlem sağlıklı gönüllülerin ortalama 10 dakikasını alacaktır. Sağlıklı gönüllünün çalışma için ikinci bir kez hastaneye gelmesine gerek yoktur. Kan alma sırasında, kan alınan bölgede hematoma (cilt altı kanama) görülebilir. Bunu önlemek için pamukla bası yapılacaktır. Bunun haricinde bir problem görüldüğünde aşağıda verilen telefon numarasından sorumlu hekim Öznur ERSOY'a ulaşılabılır

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında çocuğunuzun ismi kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün (veli)

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Adres:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı:Öznur

Soyadı:BİLEN

Tarih:

Tel: 0 505 430 24 55 , 0 232 412 25 59

Adres: 1710 sokak no:58 Kat:3 Karşıyaka / İzmir

İmza: