

18121

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biokimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof.Dr.Nevzat Baban

**ÇÖZÜNÜR ELASTİN TÜREVİNİN  
İN VİTRO NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME  
ÖZELLİĞİ**

DOKTORA TEZİ

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

Biokimya Uzm.Hüseyin Sönmez

İstanbul - 1990

## TEŞEKKÜR

*Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda göreve başlamamdan itibaren gerek uzmanlık gerekse doktora eğitimim süresince yetişmemde sonsuz emeği olan değerli Hocam Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Nevzat Baban'a,*

*Çok değerli bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlanma olanağını bana sağlayan ve daimi desteğini benden esirgemeyen Hocam Prof.Dr. Emine Kökoğlu'na,*

*Her konuda yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm çok değerli hocalarımla Prof.Dr.Tülay Akçay'a, Prof.Dr.Gülde Candan'a, Doç.Dr.Safiye Dondurmacı'ya ve Prof.Dr.Ahmet Araz'a,*

*Tez çalışmam esnasında imkanlarından yararlanma iznini veren Türkiye Bilimsel Tetkik ve Araştırma Kurumu Beslenme ve Gıda Bölümü Başkanlığına,*

*Aynı bölümde görevli değerli bilim adamı Doç.Dr.sinan Ömeroğlu'na,*

*En içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç saymaktayım.*

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. ELASTİN	3
1.1. Genel Bakış	3
1.2. Elastinin Yapısı ve Biyosentezi	4
1.2.1. Elastinin Karşılaştırmalı Amino Asid Bileşimi ve Filogenetik Dağılımı	5
1.2.2. Elastinin Primer Yapısı	6
1.2.3. Elastinde Çapraz Bağlantı	11
1.2.4. Elastin Geninin Yapısı	14
1.2.5. Elastin Biyosentezi	15
1.2.6. Elastin Yıkılımı	17
2. PROTEİNLERİN GLİKOZİLLENMESİ	18
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
1. GEREÇLER	27
1.1. Materyal	27
1.2. Kimyasal Maddeler	27
1.3. Aletler	28
1.4. Çözeltiler	28
2. YÖNTEMLER	30
2.1. Elastin Eldesi	20
2.2. Çözünür Elastin Türevinin Eldesi	31
2.3. Selüloz Asetat Elktroforez Yöntemi	32
2.4. Amino Asid Analiz Yöntemi	33
2.5. Çözünür Elastin Türevinin İn Vitro Nonenzimatik Glükozillendirilme Yöntemi	33
2.6. Lowry Yöntemi İle Protein Tayini	35
IV. BULGULAR	37
1. Elastin ve Çözünür Elastin Türevine Ait Genel Bulgular	37
2. Çözünür Elastin Türevinin Selüloz Asetat Elektroforez Bulgusu	40
3. Çözünür Elastin Türevinin Amino Asid Bulgusu	41
4. Çözünür Elastin Türevinin İn Vitro Nonenzimatik Glükozillenme Bulguları	43

	<u>Sayfa</u>
V. İRDELEME VE SONUÇ	53
VI. ÖZET	58
VII. SUMMARY	60
VIII. KAYNAKLAR	62
IX. ÖZGEÇMİŞ	74



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Proteinlerin özel enzimler (glikozil transferaz) aracılığı ya da enzim aracılığı olmaksızın (nonenzimatik) karbohidrat moleküllerini bağlaması glikozillenme (glikozilasyon) olarak adlandırılır.

Nonenzimatik glikozillenme, proteinlerin N-terminal amino ve lizin aminoasitlerine ait  $\Sigma$ -amino grubuna şeker kalıntılarının (glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, fruktoz, riboz, sialik asidler) fosforillenmiş şekillerinin serbest karbonil grupları ile bağlanmasıdır. Proteinlerin non enzimatik glikozillenmesi onların yapı ve fonksiyonlarında çeşitli değişikliklere yol açması bakımından oldukça önem taşıyan bir reaksiyondur. Bu nedenle organizmanın çeşitli proteinlerinde nonenzimatik glikozillenme olayı, gerek in vivo gerekse in vitro olarak araştırılmıştır. Bu proteinler Tablo 4'de gösterilmiştir.

Kollajen ile birlikte bağ dokusunun major proteinlerinden olan elastin organizmada özellikle ligamanlarda ve büyük arter çeperlerinde yüksek oranda bulunur. Bir skleroprotein olarak suda çözünmez; çeşitli proteazlara asid ve alkalilere karşı dirençlidir.

Elastin uzun yıllardan beri bir çok araştırmacının ilgisini çekmiş, yapısı ve fonksiyonları üzerinde çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Son yıllarda özellikle ateroskleroz olmak üzere bir çok hastalıkla olan ilişkisi inceleme konusu olmuştur.

Yine proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesi günümüzde gerek diabet gerekse ileri yaşlarda görülen çeşitli metabolik bozuklukların önemli bir etkeni olarak görülmektedir.

Bu çalışmamızda elastinden kısmi hidroliz ile elde ettiğimiz çözünür elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliğini inceleyerek yukarıda kısaca bahsettiğimiz araştırmalara bir katkıda bulunmayı amaçladık.

Elde ettiğimiz bulguları sunmadan önce konu ile ilgili bazı genel bilgileri vermeyi uygun gördük.



## II. GENEL BİLGİLER

### 1. ELASTİN

#### 1.1. GENEL BAKIŞ

Omurgalı vücudunun çeşitli hareket fonksiyonlarında uzayıp, bükülebilmesi için içerisinde esneyebilir materyallere aşikar olarak ihtiyacı vardır. Bu nedenle omurgalıların vücudu elastik özelliğe sahip çeşitli dokular ihtiva eder. Dokuların bu özellikleri ekstrasellüler matriksde büyük oranda elastik lifler içermelerinden ileri gelir. Elastik lifler kantitatif olarak ufak miktarlarda olmalarına karşın deri, büyük arterler, akciğer parankiması ve bazı özelleşmiş ligamentlerde olduğu gibi bir kısım dokuda total ağırlığın önemli bir kısmını teşkil eder. Işık mikroskopunda elastik lifler yüksek oranda ışık kırıcı özelliğe sahiptir ve karakteristik boyama reaksiyonları ile teşhis edilebilirler. Bunların arasında orsin, rezorsin-fuksin, hematoksilin, anilin ya da diğer multikomponent boyalar sayılabilir. Bu boyalar elastik lifler için nispeten spesifik olmalarına karşın ultrastrüktürel analizler için belirli bir ayırım meydana getirmez. Elastik liflerin elektronmikroskopu ile yapılan incelemeleri morfolojik olarak ayırd edilebilen iki komponentten oluştuğunu göstermiştir. Bunlar amorf komponent ve mikrofibriler komponenttir. Amorf komponent düzenli olarak tekrarlayan birimlerden oluşmuş bir yapı göstermez, olgunlaşmış liflerin % 90'ından daha fazla bir kısmını oluşturan mikrofibriler komponent ise ortalama 10-12 nm boyunda küçük liflerden ibarettir. Amorf komponentin periferin-

de lokalize olmuştur.

Elastin adı yukarıda kısaca özellikleri belirtilen yapının amorf komponentini oluşturan ve elastik özelliklerden sorumlu olan protein için kullanılır(20,29,42,44,76,100).

## 1.2. ELASTİNİN YAPISI VE BİOSENTEZİ

Elastin organizmada kollajen ile birlikte bağ dokusunun major proteindir. Kollajenin beyaz bağ dokusunun ana proteini olmasına karşın elastin sarı bağ dokusunda hakim proteindir. Böylece kollajen Ashilles tendonunda elastinden 20 kere daha fazla bulunurken, sarı ligamentum nuchaeda elastin kollajenden 5 kez daha fazladır(100).

Elastin saf halde iken soluk sarı renktedir ve ultraviyole ışıkta mavimsi bir fluoresans gösterir.

Kollajen gibi mezenkimal kaynaklı bir proteindir. Fakat suda kaynatmak ile jelatin gibi suda çözünebilen bir şekle dönüşmez. Tripsin ve kimotripsin gibi proteazlara, ayrıca asid ve alkalilere karşı dirençlidir. Ancak elastaz adlı özel bir pankreas enzimi ile sindirilebilir. Pepsinin ise pH:1.2 de elastazın 1/8'i oranında elastoliz etkisi olduğu saptanmıştır(3).

Elastinin yapısının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar oldukça eski tarihlere kadar uzanır. Bu ilk çalışmalardan birinde 1902'de Richard ve Gies yayınladıkları bir raporda elastinin kaynar suya ve alkali etkisine karşı dirençli olduğunu ileri sürdüler(71). Bu araştırmacılar ayrıca elastin peptidlerinin ısıtıldıkları zaman agregatlar oluşturduklarını ve bunun elastinin içermiş olduğu yüksek orandaki non polar amino asidlerden kaynaklandığını belirttiler. Daha ilerki yıllarda yapılan bir araştırmada Lloyd ve Garrod elastin ve kauçuk arasında yapısal benzerlikler olduğunu ileri sürdüler(55).

Elastinin dokulardan izolasyonunda ilk olarak kullanılmaya baş-



lanan metodlar nispeten çok fazla spesifik olmayan ekstraksiyon yöntemleridir. Lansing ve arkadaşları bu şekilde aortik dokudan sıcak alkali muamelesi yolu ile saf elastin elde ederek özelliklerini belirttiler(54). Bu tür ekstraksiyon işlemleri elastini büyük miktarlarda içeren ligamentum nuchae ve büyük arterler gibi dokularda oldukça tatmin edici sonuçlar vermektedir ve hazırlanan preparatların elektron mikroskopu incelemeleri ile amino asid kompozisyonları bu görünüşü doğrulamaktadır(76). Buna karşılık fetal akciğer parenkimi gibi elastin miktarının az olduğu dokularda bu metodlar çok iyi sonuç vermemektedir. Elastinin bu gibi dokulardan kuvvetli ekstraksiyon işlemleri ile izolasyonu ise peptid bağlarında parçalanma, çapraz bağlı amino asitlerde değişiklik, mikrofibriler komponentte harabiyet gibi olaylara yol açmaktadır. Bunu önlemek amacı ile daha ılımlı metodlar geliştirilmiştir. Bu tür yöntemlerden biri dokuların 5M guanidin ile ekstraksiyonudur. Bu işlem ile çözünür kollajen, glikoproteinler ve proteoglikanlar ortamdan uzaklaştırılır; kollajenaz ile de geri kalan çözünür olmayan kollajen kontaminasyonu önlenir(75). Bu şekilde hazırlanan preparatların elektron mikroskopu incelemeleri, preparatların mikrofibriler komponent ve elastik fibrillerden oluştuğu, buna karşılık kollajen ve diğer proteinleri içermediğini göstermiştir. Merkaptotanol içeren 5 M guanidin ile yapılan ikinci bir ekstraksiyon işlemi çözünmeyen elastin kalıntısının periferindeki mikrofibrilleri çözünürleştirir. Bu çözünür fraksiyonun glikoprotein yapısında olduğu, ayrıca asidik ve diğer hidrofilik amino asitlerce zenginlik gösterdiği anlaşılmıştır(72,75,85).

### 1.2.1. Elastinin Karşılaştırmalı Amino Asid Bileşimi ve Filogenetik Dağılımı

Memelilerin aortalarından ya da ligamentum nuchae'larından izole edilen örneklerde yapılan çalışmalara göre elastindeki amino asitlerin yaklaşık olarak % 33'ü glisindir. Geriye kalan miktarın % 10-13'ü prolin, % 40 kadarı hidrofobik yan zincirli amino asitler, ayrıca çok küçük bir miktarı da hidrofilik amino asitlerdir.

Elastin polifonksiyonel amino asitler olan ve çapraz bağların yapımında görev yapan desmozin, izodesmozin, merodesmozin, lizinilnor-

l6sin gibi ender rastlanan bazı amino asidleri de içerir. Yapılan alışmalar aynı t6rlerin farklı dokularından hazırlanan elastinlerin çok benzer amino asid kompozisyonuna sahip olduğunu g6stermiştir. Yalnız elastik kıkırdak dokusu bu benzerliğin dışında kalmaktadır. Bu farklılığın nedeni kıkırdak elastinini oluşturan polipeptid zincirinin ayrı bir gen tarafından kodlanması veya kıkırdaktaki diğer proteinlerin kontaminasyonu olabilir. Bu doku daha ileri araştırmaları gerektirmektedir(76).

T6m omurgalılarda ve bir kısım omurgasızlarda elastinin amino asid kompozisyonu geniş olarak incelenmiş ve Agnatha t6r6 hariç omurgaluların hepsinde elastin saptanmıştır. Bu amino asid kompozisyonunun genelde benzer 6zelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır(41,76). T6m6 hidrofobik amino asidlerce zengin, hidrofilik amino asidlerce ise fakir bir bileşim g6stermektedir. Tablo 1'de bu dağılım g6sterilmiştir.

Evol6syon sırasında elastinin amino asid kompozisyonundaki değişiklikler g6z 6n6ne alındığında ilk elastinin siklostom ve grathosom'un ayrılmasından sonraki bir zamanda ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Ekolojik zaman ile hidrofobik amino asit d6zeyinde tedrici bir ilerleme g6r6lmektedir. Hidrofobik kalıntılardaki bu artış eğilimi sistolik kan basıncındaki paralel değişmeler ile ilişkili olabilir. Kan basıncı amfibi ve balıklardaki 30 mm cıva basıncından memeli ve kuşlarda 120-150 mm cıva basıncına y6kselmiştir. Omurgasızlarda abduktin(48,95), oktopus elastomer(87) gibi diğer elastiki proteinler de bulunmuştur; fakat bu proteinlerin elastin ile ilgileri yoktur. Karakteristik desmozin çapraz bağları ihtiva etmezler ve amino asid kompozisyonları farklıdır.

### 1.2.2. Elastinin Primer Yapısı

Elastinin yapısı 6zerindeki kimyasal çalışmalar 6z6n6r olmaması ve çapraz bağlar içermesi nedeni ile hayli zor ve yavaş olmuştur.

İlk olarak Emil Fisher ve çalışma arkadaşları, sığır lugamentum nuchaesinin elastininde Ala-Leu ve Leu-Ala dipeptidlerini saptadılar.

Tablo 1

Çeşitli Türlerin Aorta Elastini'nin Amino Asid Bileşimi(76)\*

Amino Asid	Domuz	Köpek	İnsan	Piliç	Kaplumbağa	Ton Balığı
Lizin	5,2	5,2	4	2	6,8	15
Histidin	1,0	1,9	0,5	0,7	3,6	2,6
Arginin	7,9	9,1	9	5	7,6	16
Treonin	15	24	12	9	18	63
Serin	12	16	8	6	11	34
Prolin	113	107	131	131	130	101
Glisin	313	314	295	338	319	391
Alanin	244	249	233	179	184	103
Valin	128	99	143	173	151	64
İzolösin	18	28	23	20	17	19
Lösin	54	46	58	56	58	45
Tirozin	19	29	23	13	34	37
Fenilalanin	33	25	22	19	13	28
Sistein	<1	2,3			<0,9	<1
Metyonin	<1	2,1			2,0	7,1
İzodesmozin	1,9	1,8	2,2	1,2	1,5	0,3
Desmozin	1,3	1,3	2,8	1,4	1,2	0,3

\*Kalıntı/1000

1960'larda diğ er bazı dipeptid sıralanmalarının varlığı (Val-Val, Leu-Val, Val-Pro) bulundu; fakat daha uzun amino asid diziliş sıraları tayin edilemedi. Bu tarihlerde elde edilen en önemli başarı Partridge, Thomas ve arkadaşları tarafından desmozin çapraz bağlarının yapısının açıklanması oldu(64,65,66,97).

Anwar elastin hidrolizatlarındaki peptid karışımından desmozin içeren peptidleri saflaştırarak, bunları ion-değ iş tirm e kromatografisi ile fraksiyonladı ve amino asid dizi tayini yaptı(1). Aşağıda bu diziler görülmektedir.

Domuz aorta	Sığı r aorta	İnsan aorta
Tyr-Gly-Ala-Pro-Gly-Ala-Gly	Phe-Gly-Ala-Ala	Tyr-Gly-Ala-Ala
Ala-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala	Ala-Gly-Tyr-Pro-Thr	Ala-Gly-Tyr-Pro-Thr
Leu-Gly-Ala-Ala	Leu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ala	Phe-Gly-Ala-Gly

Analizlerde tirozinin genellikle çapraz bağların karboksil tarafında yer aldığı saptanmıştır. Diğ er diziler çoğ u kez alanin ile ve bazı zamanlarda lösin ve izolösin ile başlamaktadır.

Elastinin yapısının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar sırasında bakır içermeyen diyetle beslenen hayvanlarda aorta anevrizması ve diğ er defektler ile elastin liflerinin amorf komponentlerinin miktarında azalma olduğu tespit edildi.

Bu bulguların ışığı altında Smith ve arkadaşları bakır eksikliği olan domuzların aortalarından bir çözü nür polipeptid izole ettiler(91). Bu çözü nür protein tropoelastin olarak adlandırıldı. Sandberg ve arkadaşları tarafından tropoelastin (çözü nür elastin) amino asid kompozisyonunun, çapraz bağları oluşturan amino asidlerin yokluğu dışında, çözü nür olmayan normal elastin ile aynı olduğu gösterildi(81). Tropoelastinde total lizin kalıntıları normal elastine oranla daha fazladır. Bu oran tropoelastinde 38 kalıntı/mol iken, normal elastinde 6 kalıntı/mol'dür. Tropoelastin molekülünün amino asid kompozisyonunun farklı türlerde benzerlik gösterdiği saptanmıştır(95,101). Tropoelastin molekülünün amino asit bileşimi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2  
Domuz Trapoelastini'nin Amion Asit Bileşimi(79)

<u>Amino Asid</u>	<u>Kalıntı/800</u>
Glisin	245
Alanin	187
Prolin	91
Valin	103
İzolösin	14
Lösin	41
Tirozin	14
Fenilalanin	24
Arjinin	4
Lizin	34
Aspartikasid	3
Treonin	10
Serin	8
Glutamik asid	12
Metionin, sistein	0-1
. Histidin	
Hidroksiprolin	7

Yapılan çeşitli incelemelerde tropoelastin için saptanan mol ağırlığı yaklaşık 72.000'dir(82,90).

Domuz tropoelastini tripsin ile parçalanarak, ortaya çıkan peptidler ion değiştirme kromatografisinden geçirilmiş ve bu saflaştırılan peptidlerde amino asid dizi tayini yapılmıştır. Elde edilen diziler Tablo 3'de gösterilmiştir(31,80).

Tablo 3  
Domuz Tropoelastininde Amino Asid Dizi Örnekleri(76)

<u>Tekrarlanan Üniteler</u>	<u>Büyük Triptik hidrofobik peptidler</u>
Tripeptid	<u>YVAGVPGVGVPGIGGVP GVP GVP</u> <u>GVP GVP GVP GVP GVP GVP</u> <u>GVP GVP GVP GVV GGVG PVG</u> V AA AA AAA
Tetrapeptid	<u>GGVP GAVP GGVP GGVPGGVFF</u> PGAGLGGL
Pentapeptid	<u>YGAAGGLVPGAPGFGPG VG VP</u> <u>GVGVP GVGVP GVGVP VP GVGVP</u>
Hexapeptid	<u>AAQFGZFPGIGVA PGI GVA</u>

Alanince Zengin Ufak Triptik Peptidler

<u>Dizi</u>	<u>mol/mol tropoelastin</u>
AAAK	6
AAK	6
SAK	2
APGK	1
AK	2
YGAK	

A:Alanin, F:Fenilalanin, G:Glisin, K:Lizin, P:Prolin, G:Glutamin, S:Serin, T:Treonin, V:Valin, Y:Tirozin, I:Izolösin.

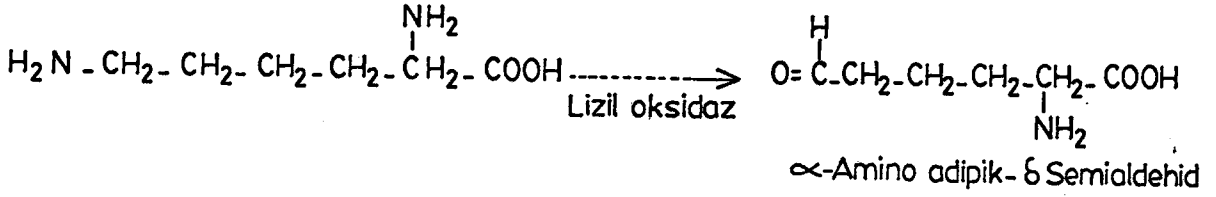
Kromatografi yolu ile iki sınıf triptik peptid elde edilmiştir. Bunlar büyük ve küçük peptidlerdir. Küçük olanlar arjinin, büyük olanlar ise hidrofobik amino asitlerce zengindir. Büyük peptidlerdeki amino asitlerin elastik özelliklerden sorumlu bölgelerden türedikleri anlaşılmaktadır.

Ufak peptidler arasında önemli yer tutanlar her tropoelastin molekülünde 6'şar kere tekrar edilen Ala-Ala-Ala-Lys ve Ala-Ala-Lys dizileridir. Büyük peptidler içersinde küçük peptid dizileri sınırlı olarak tekrar edilebilir. Bu gibi tekrarlayan diziler molekülün bazı kısımlarında elastine has bir sekonder helezon yapının varlığı ihtimalini arttırmaktadır(98). Ancak bugüne kadar elde edilen pek çok bulgu elastinin genellikle düzenli olmayan gelişigüzel bir yapı içerdiğini ortaya koymaktadır. Büyük peptidlerden elde edilen amino asit dizileri, elastinde glisinin amino asit kalıntılarının yaklaşık 1/3'ünü oluşturduğunu fakat kollajendeki durumun tersine olarak peptid zincirindeki dağılımının her zaman düzenli olmadığını göstermiştir. Bununla beraber diğer elde edilen bulgular primer yapı düzeyinde elastin ve kollajen arasında benzer bir akrabalık ilişkisi olduğu tezini güçlendirmektedir.

Elastinin karboksil ucunda prolin nisbeten seyrek bulunmasına karşın, amino uçta sıklıkla bulunur. Amino ucundaki prolinler elastinde kısmen hidrosillenmiştir. Kollajende hidrosipirolin üçlü helix yapısının sağlamlığında rol oynarken(47,78) elastinde hidrosipirolin için herhangi bir fonksiyon henüz bilinmemektedir.

### 1.2.3. Elastinde Çapraz Bağlar

Elastik liflerin en önemli özelliği, fonksiyon görmesi için çok gerekli olan polipeptid zincirlerindeki yüksek çapraz-bağlanma düzeyidir. Bu çapraz bağlar peptid zinciri içerisindeki lizin kalıntılarının peptidil lizin oksidaz (lizil oksidaz) enzimi etkisi ile  $\alpha$  amino adipik semialdehide (allizin) oksidasyonu ile oluşturulur (Şekil 1).



Şekil 1- Lizin'in lizil oksidaz enzimi etkisi ile  $\alpha$ -Amino adipik semialdehide dönüşümü(100)

Lizil oksidaz kollajen ve elastinde çapraz-bağ yapımı için bilinen tek enzimdir. Bir bakırlı metalloenzim olan lizil oksidaz ko-faktör olarak piridoksal fosfata ihtiyaç gösterir(9). Siegel tarafından bu enzim çeşitli bağ dokularından izole edilerek özellikleri geniş şekilde araştırılmıştır(88). Enzimin aktivitesi elastin ve kollajenin olgunlaşmamış fibrillerine karşı yüksektir.

Bağ dokularından elde edilen enzimin iyon değiştirme kromatografisi ile yapılan fraksiyonlama işlemi sonucu hem yükleri farklı hem de molekül ağırlıkları  $3 \times 10^4$  den  $3 \times 10^6$  ya kadar olan değişik enzim yapıları görülmüştür. En yüksek molekül ağırlıklı yapı benzer alt ünitelerden oluşmuş olabilir. Ancak bu heterojenitenin anlamı pek açık değildir; çünkü her enzim benzer aktivite sergiler. Elde edilen tüm enzim preparasyonları elastin ve kollajen substratlarına karşı eşit aktivite göstermiştir(76,94).

Enzimin bağ dokusu matriksinde bulunması, onun salgılanarak ekstraselüler boşlukta fonksiyon gösterdiği düşüncesini kuvvetlendirmiştir. İn vitro incelemelerde fibroblastlardan oluşan hücre kültürü ortamında büyük miktarda lizil oksidaz bulunmuştur(76).

Sığır Ligamentum Nuchaesinden elde edilen bir glikoproteinin lizil oksidaz aktivitesine benzer bir etkiye sahip olduğu görülmüş ise de bunun enzim ile yapısal bir benzerliği olmadığı anlaşılmıştır(86).

Elastinde çapraz bağ oluşumu üç istisna dışında kollajende olduğu gibidir. 1) Hidroksilizin kullanılmaz, elastinde hiç yoktur. 2) Histidin kullanılmaz, elastinde ya çok azdır ya da bulunmaz. 3) Aldol ve aldimin kondensasyonunun son ürünleri elastinde desmozin ve izodesmozin olarak karakterizedir.

Çapraz bağları oluşturan desmozinlerin oluşum şeması, Şekil 2'de gösterilmiştir.

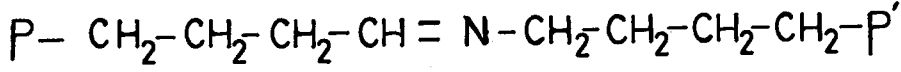




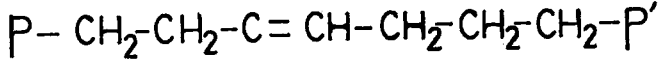
Şekil 2- Elastinde mevcut çapraz bağları oluşturan desmozinlerin oluşumu(28)

Şemada görüldüğü gibi dehidrolizinonor lösün bir allizin kalıntısı ile bir lizinden oluşur, allizin aldolu ise iki allizin kalıntısından meydana gelir. Dehidrolizinonorlösün indirgenmiş ve böylece stabilize olmuş sekonder amin lizinonorlösün olarak da ortaya çıkabilir.

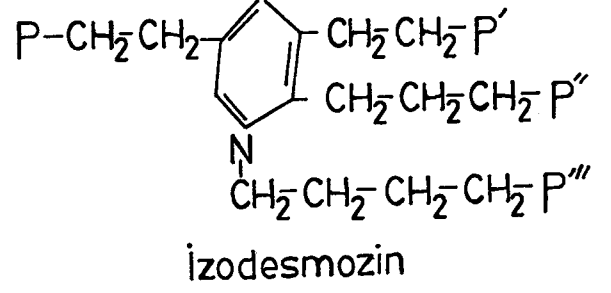
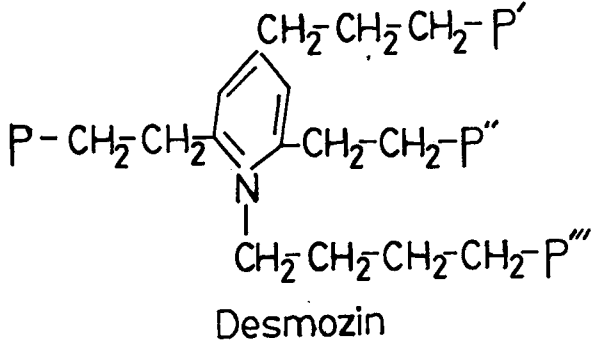
Desmozinler, allizin aldol ve dehidrolizinonorlösünün birleşmesinden ya da bir ara ürün olan dehidromerodesmozine tek bir lizin ya da allizin kalıntısının eklenmesi ile oluşur. Dehidromerodesmozin in vivo olarak indirgenmiş şekilde de bulunabilir. Bir çok durumda başlangıç kondensasyon ürünleri dehidrodesmozindir. Bu madde moleküler oksijen gerektiren bir mekanizma ile izodesmozin ve desmozin şekillerine okside olabilir(26,76). Tüm maddelerin yapıları Şekil 3'de gösterilmiştir.



Dehidrolizinonorlösün



Allizin Aldol



Şekil 3- Elastinde mevcut çapraz bağların yapıları (76)

Meydana gelen çapraz bağların net sonucu oldukça yüksek çözünmez özellikteki bir polimerdir. Bu polimerde bir kaç tipteki zincir içi bağ orjinal tropoelastin zincirleri boyunca sıklıkla oluşur. Çapraz bağ içeriğinden ve elastinin mekanokimyasal özelliklerinden yapılan hesaplamalar, lizin türevi çapraz bağlar arasındaki ortalama mesafenin yaklaşık 65-70 amino asit kalıntısı olduğunu göstermektedir(2).

#### 1.2.4. Elastin Geninin Yapısı

Elastin yapısının aydınlatılmasında alternatif bir yaklaşım elastin geninin DNA baz dizilerinin izolasyonu ve bunların tayinidir. Son yıllarda bu konu ile ilgili çalışmalarda insan, koyun, sığır gibi türlerde elastin geninin 3' bölgesinin önemli bölümleri elde edilmiştir(21,24,105). Geniş DNA dizileri, elastin geninin oldukça yayılmış genlerden bir tanesi olduğunu ortaya koymuştur. Intron, ekson oranı 15/1'dir. Diğer yayılmış genlerden Ör. Kollajen  $\alpha_2(1)$  geninde bu oran 8/1'dir. Tropoelastinin prokollajen zincirinin yarısı kadar olması, tüm elastin geni hakkında bir fikir verebilmektedir. Buna göre bu genin 40 kb'ın üstünde olduğu tahmin edilmektedir. Elastinin hidrofobik ve çapraz bağlı bölgeleri ayrı eksonlar tara-

findan kodlanmaktadır.

DNA dizilerinin saptanması ile elde edilen amino asid dizileri bakımından insan, sığır, koyun gibi türler arasında yaygın bir benzerliğin olduğu görülmüştür. Bununla beraber DNA dizilerinin çevirimi ile tespit edilen son 58 karboksi terminal amino asid triptik peptidlerde gösterilememiştir. Ancak son zamanlarda Gly - Gly - Ala - Cys - Leu - Gly - Lys - Ser - Cys - Gly - Arg - Lys - Arg - Lys ile sonlanan karboksi uçlar belirlenmiştir.

Primer yapı üzerinde daha önce yayınlanan çalışmalarda tropoelastinde sistein bulunduğu gösterilememiştir. Buna karşılık sisteinin in vitro bir çalışmada piliç aortasında translasyon esnasında inkorpore olduğu yayınlanmıştır(33). Tropoelastinin karboksi ucunda bazik kalıntıların ve sisteinin bulunması bu bölgenin asidik mikrofibriler komponent ile amorf elastin kısımlarının birleşmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir(1).

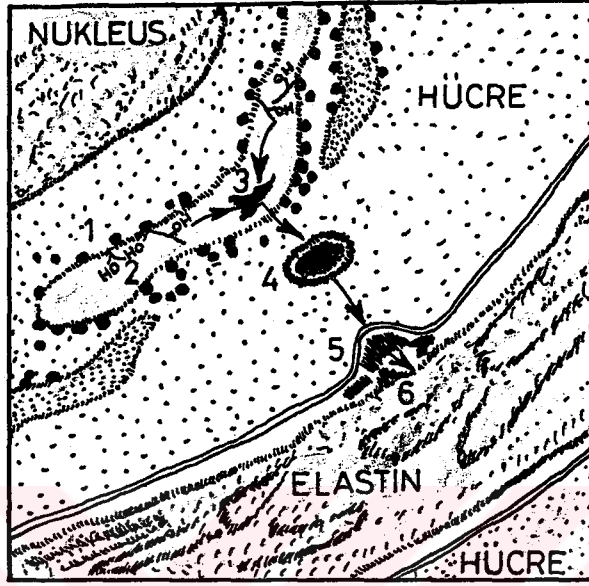
#### 1.2.5. Elastin Biosentezi

Elastin biosentezi çeşitli hücre kültürlerinde gösterilmiştir. Bunlar arasında endotelial hücreler, düz kas hücreleri, elastik kıkırdak dokunun kondroblast hücreleri, fibroblastları sayabiliriz(19,58,69,92,96).

Elastin biosentezinde (Elastogenesis) ilk aşama elastinin çözünür ön maddesi olan tropoelastinin sentezidir. Ancak Foster ve arkadaşları(32) latiritik civciv aortalarından molekül ağırlığı 130.00-140.000 olan çözünür bir elastin türü elde ettiler ve buna proelastin adını verdiler. Bu proteinin elastin biosentezinde ilk ön madde olabileceğini ve bunun proteolitik yıkımı ile tropoelastinin oluşabileceğini ileri sürdüler.

Elastin biosentezi Şekil 4'de şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre ilk aşamada tropoelastin granüllü endoplasmik retikulum da sentez edilerek, lümende birikir. Tropoelastin moleküllerinin sentezi için yaklaşık 20 dakikaya ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır. Tropoelastin molekülleri buradan küçük vesiküller içersine alınır. Bu ufak vesiküllerin bir kısmı bir-

birleri ile birleşerek büyük vesikülleri oluşturur. Bunlar depo fonksiyonu da görürler.



Şekil 4- Elastin biosentezinin şematik gösterimi (79)

Her iki tip vesikül hücrenin plazma membranı ile birleşerek ekso-sitotik bir işlem ile hücre dışına salgılanır. Salgılanan vesikül içeriğinin yalnızca elastinden ibaret olup olmadığı veya mikrofibriler komponent ve lizil oksidaz gibi diğer ekstraselüler matriks komponentlerini de içerip içermediği bilinmemektedir. Ancak elastinde çapraz bağ oluşumunun bu keseciklerde başlamış olduğunu ileri süren görüşler de vardır(79,83).

Tropoelastin sekresyon hızı, prokollajenden farklı olarak, peptidil prolin hidroksilasyonunun inhibisyonu ile değişmez(77,99). Buna karşılık kolşisin gibi mikrotubuller üzerine etkili maddeler sekresyonu anlamlı olarak inhibe eder.

Elastin sentez hızının kontrolü ile ilgili çalışmalar, dokularda sentez hızı ile fonksiyonel elastin mRNA düzeyi arasında kuvvetli bir ilişki ortaya koymuştur. Buna göre sentez hızı fonksiyonel mRNA düzeyi ile kontrol edilir(14,25,34).

Bağ dokusunun normal gelişimi ile ilişkili bir hormon olan somatomedin C (IGF-I)'nin elastin sentezi üzerine etkileri incelenmiş ve fonksiyonel tropoelastin mRNA ile tropoelastin sentezinde anlamlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. IGF-1'in bu etkisinin pretranslasyon düzeyinde olduğu anlaşılmaktadır(35).

Elastin biyosentezinin ikinci aşamasında ekstraselüler bölgede tropoelastin molekülleri mikrofibril dizilerinin arasında yer alarak çapraz bağlar oluşturmak sureti ile elastine polimerleşir (Şekil 5)(72).



Şekil 5- Mikrofibril dizileri arasında yer alan tropoelastin moleküllerinin elastine polimerleşmesi(72)

Ross ve Bornstein adlı araştırmacılar meydana gelen elastin polimerinin mikrofibriller aracılığı ile biçimlenmesi (fibrilogenesis) olayını, negatif yüklü mikrofibrillerin pozitif yüklü tropoelastin moleküllerini etkileyerek, polimer elastinin yapımı süresince onları fibriller biçiminde düzenlerler şeklinde açıkladılar(74,75).

#### 1.2.6. Elastin Yıkılımı

Mikrofibriler komponentin çeşitli proteazlar tarafından parçalanabilmesine karşın, elastin yalnızca spesifik elastazlara karşı hassastır. İlk elastazlar bakterilerden elde edilmiştir. Bunların içinde bir kaç tür insanlarda patolojik olarak rol oynayabilir. En önemlileri Pseudomonas

aeroginosadır. Bu organizma tarafından üretilen elastaz bir metalloenzim olup tercihli olarak lösin ve izolösin bağlarına etki eder. Ayrıca  $\alpha_1$ -proteinaz inhibitörünü inaktive eder(59).

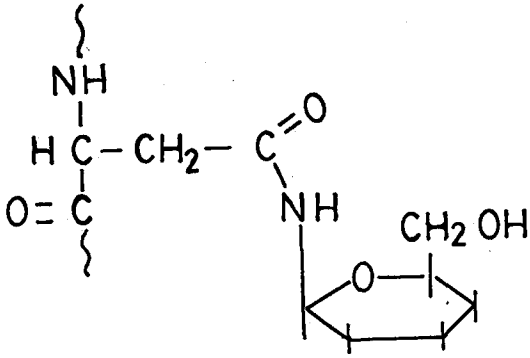
Omurgalılarda keşfedilen ilk elastaz domuz pankreasından izole edildi(15). Diğer türlerde de benzer enzimler saptandı. Bu enzimler  $\alpha_1$ -proteaz inhibitörü ve  $\alpha_2$  makroglobulin tarafından inhibe edilir. Pankreatik elastaz tercihli olarak elastinde alanın kalıntılarınin karboksil tarafına etki eder; fakat aynı zamanda diğer hidrofobik amino asitlerin peptid bağlarını da hidroliz eder.

Polimorfonükleer lökositlerde elastaz sentezleyerek salgırlar. Bu husus ilk olarak Janoff ve Scherer tarafından gösterilmiştir(46). Lökosit kaynaklı elastazda  $\alpha_1$ -proteinaz inhibitörü ve  $\alpha_2$  makroglobulin tarafından inhibe edilir(6).

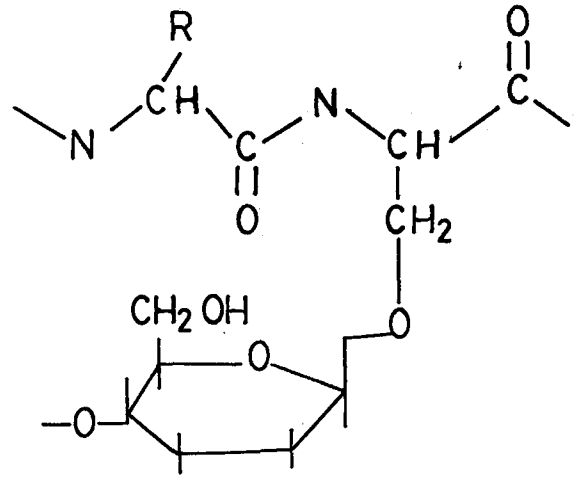
## 2. PROTEİNLERİN GLİKOZİLLENMESİ

Glikozillenme (Glikozilasyon) proteinlerin enzim aracılığı ya da enzim aracılığı olmaksızın (nonenzimatik) karbohidrat molekülleri ile bağlanmasıdır.

Protenilerin enzimatik glikozillenmesi, hücrede golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum lümeninin major metabolik aktivitelerinden biridir. Özel glikozil transferazların etkinliğinde yürüyen reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler glikoproteinler olarak adlandırılır. Glikoproteinlerde şeker kalıntıları (glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetilglukozamin, N-asetilmannozamin, sialik asitler) asparajın aminoasidine B-N-glikozid bağı ile bağlıdır (Şekil 6). Buna karşılık şeker kalıntıları serin, treonin, hidroksilizin amino asitlerinin hidroksil gruplarına O-Glikozid bağı ile bağlıdır (Şekil 7). Bu grup nispeten daha seyrekdir(16,70).



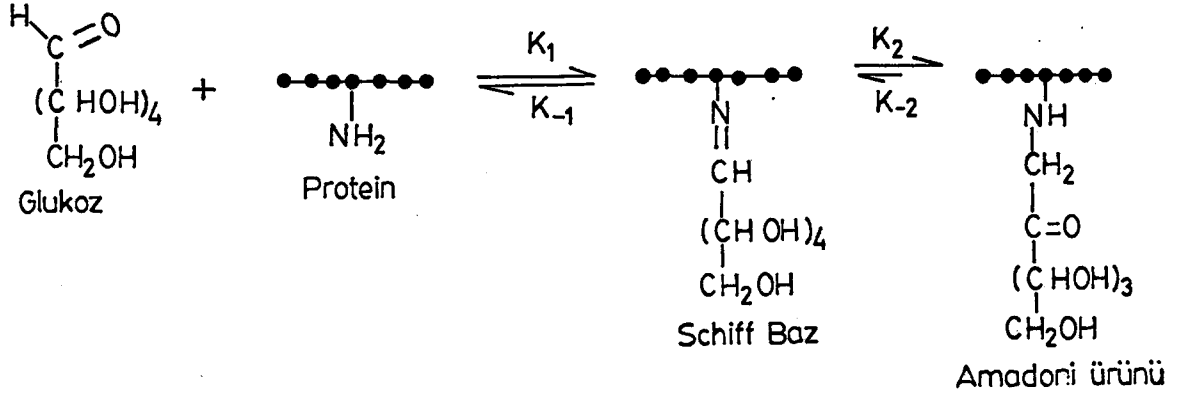
Şekil 6- Şeker kalıntıları ile peptid zinciri arasındaki N-glikozid bağı (70)



Şekil 7- Şeker kalıntıları ile peptid zinciri arasındaki O-glikozid bağı (3)

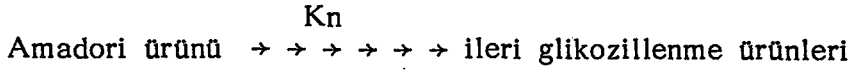
Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonunda proteinlerin N-terminal amino gruplarına ve lizin amino asidlerinin  $\Sigma$  amino grubuna şeker kalıntılarının fosforillenmiş şekilleri serbest karbonil grupları ile bağlanırlar. Enzim etkisi olmadan proteine bağlanan karbohidrat molekülü glukoz olduğu zaman bu durum nonenzimatik glukozillenme olarak da adlandırılır (16,50,57).

İn vivo ve in vitro olarak meydana gelebilen nonenzimatik glikozillenme Şekil 8'de formüllendirilmiştir. Reaksiyonun ilk basamağı proteinin amino grubuna glukozun nukleofilik bir atak yaparak aldimin yapılı Schiff bazı oluşturması ile başlar. Meydana gelen Schiff bazın oluşum sabiti ( $K_1$ ), disosiasyon sabitine ( $K_{-1}$ ) eşittir. Birinciye göre daha yavaş seyreden ikinci basamakta; Amadori çevirimi olarak adlandırılan bir reaksiyon ile Amadori ürünü adı verilen keto amin yapı oluşur. Bu ürünün geri dönüşüm hızı birinci ürüne göre daha yavaştır ( $K_2 > K_{-2}$ ). In vivo olarak organizmada yarı ömrü gün ya da haftalar ile ölçülebilen proteinlerin (Hemoglobin, Albumin) glikozillenmesi sonucu ketoamin ürünler birikir. Bunlar erken glikozillenme ürünleridir (10,12,49).



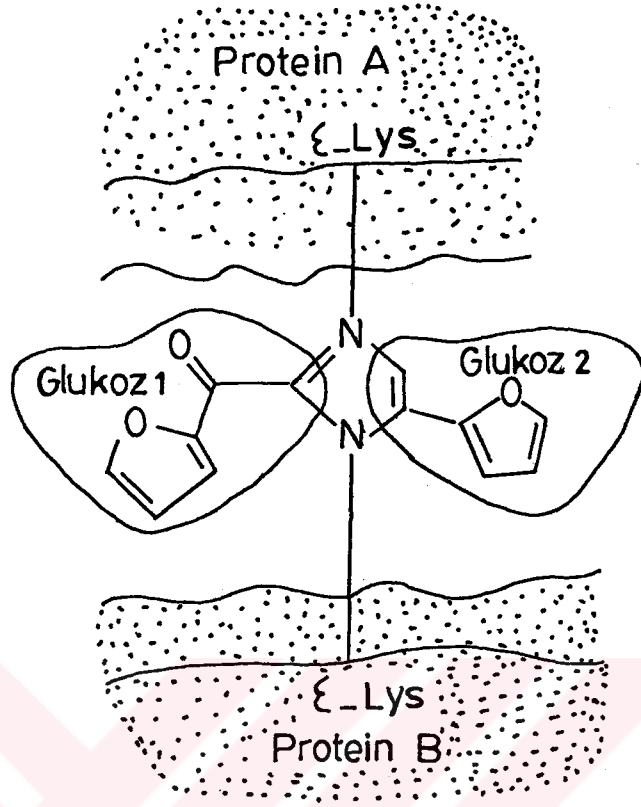
Şekil 8- Proteinlerin non enzimatik glikozillenme formülü(10)

Yarı ömrü kısa olan proteinlere zıt olarak kristallin, kollajen, elastin, myelin gibi dönüşüm hızı çok yavaş olan proteinler post Amadori nonenzimatik glikozillenme ürünleri olarak birikir. Bunlar keto aminin daha ileri dehidratasyona uğraması ile oluşur.



Kahverenkli, fluoresans veren ileri glikozillenme ürünleri protein molekülleri arasında çapraz bağlanmalara yol açarlar ve melanoidler olarak da adlandırılırlar(7,10,12,49). Çapraz bağlanmanın iki adet glukoz molekülü ile iki adet lizinin  $\Sigma$  amino grubu arasındaki heterosiklik kondensasyon ile olduğu gösterilmiştir (Şekil 9)(10,12).





Şekil 9- Protein molekülleri arasında meydana gelen çapraz bağlanmanın şematik yapısı (Bileşiğin adı: (2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazol)(12)

Fizyolojik koşullar altında bu ürünlerin yapım hızı çok yavaştır ve amadori ürünlerinden farklı olarak bir kere meydana geldikten sonra tekrar geri dönüşümleri yoktur. İleri glikozillenme ürünlerinin meydana gelme reaksiyonları "Maillard reaksiyonları" olarak da bilinir(12,30).

İn vivo ve in vitro olarak nonenzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinler Tablo 4'de gösterilmiştir. Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine in vivo ve in vitro ortamlarda etkili çeşitli faktörler vardır. Bunlar Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 4

In vivo ve In vitro olarak nonenzimatik glikozillenen proteinler(16)

<u>In vivo</u>	<u>In vitro</u>
Hemoglobin	Antitrombin III
Eritrosit membran proteinleri	Fibrin
Fibrinojen	Endotelyal hücre membranı
Albumin	HDL
LDL	Katepsin B
Kollajen	$\beta$ -N-asetil-D
Myelin proteinleri	glukozaminidaz
Periferik sinir proteini	Pankreatik ribonükleaz A
Tubulin	Ferritin
Lens kristallinleri	
Lens kapsül proteinleri	
Kemik proteinleri	
İnsülin	

Tablo 5

In vivo ve In vitro ortamlarda non enzimatik glikozillenme üzerine etkili faktörler(12)

<u>In vitro</u>	<u>In vivo</u>
pH	Sabit
Isı	Sabit
Protein konsantrasyonu	Sabit
Amino grubu yakın çevresi	Sabit
Glukoz konsantrasyonu	Ortalama kan glukoz düzeyi
İnkübasyon süresi	Hiperglisemi süresi ve protein yarı ömrü

Herhangi bir protein için nonenzimatik glikozillenmenin miktarı birbirinden bağımsız olarak etki eden değişkenlerin etkilerinin toplamı ile değerlendirilir. Bu değişkenlerin ilk dört tanesi canlı sistemlerde sabittir. İn vitro olarak pH'ın önemli etkisi vardır. Deneysel olarak Amadori ürünün pH'7'nin altında iyi bir şekilde meydana gelmediği görülmüştür. pH 7 ile 9 arasında ise Amadori ürünü dengeye erişerek artar. Bu gözlem sadece proteinler üzerindeki yüksüz amino asitlerin glukoz ile bu tip bir ekleme reaksiyonuna girebileceklerine dair kimyasal teori ile paralellik gösterir.

Isıyı arttırmak Amadori ürününün oluşum hızında diğer nonenzimatik kimyasal reaksiyonlardakine benzer şekilde nisbi bir artışa yol açar. İn vivo olarak sabit olan diğer iki faktör protein konsantrasyonu ve amino grubunun yakın çevresidir. Yüksek protein konsantrasyonunda glukoz ile potansiyel olarak reaksiyona girebilecek amino gruplarının sayısı artarken, her amino grubunu çevreleyen bölgelerdeki proteinlerin lokal çerçevesi bu amino gruplarının glukoz ile reaksiyona girmesi üzerine direkt etki yapar. Bu son faktörler belirli bir proteinde görülen ve tesadüfi olmayan amino grubu glikozillenmesini açıklamak ile kalmaz, aynı zamanda farklı proteinler arasında görülen non enzimatik glikozillenme hassasiyetindeki değişiklikleri de açıklar(12,37,38).

Glukoz konsantrasyonu ve inkübasyon zamanı nonenzimatik glikozillenmenin miktarını etkileyen klinik olarak en önemli değişkenlerdir.

Glukoz konsantrasyonunu arttırmak, proteinler üzerinde birikmiş Amadori ürünlerinin aynı oranda artmasına sebep olur. İnkübasyon zamanının uzunluğu iki nedenle önemlidir. Birincisi; Amadori ürünlerinin dengeye erişilene kadar zaman geçtikçe birikmeye devam etmesidir. Bu birikim bir çok kritik proteinin önemli fonksiyonel özelliklerini belirgin derecede bozmaya yetebilir. İkinci neden; Amadori ürünlerinin dengeye eriştikten sonraki sabit düzeyleri, dengenin ortalama kan glukoz düzeylerinde oluşabilmesi için gerekli zamanın ötesinde artmamasına rağmen, ileri glikozillenme ürünleri tekrar kullanılan proteinlerin tüm hayatı boyunca birikmeye devam eder. İleri glikozillenme ürünlerinin belirgin klinik sonuçları protein moleküllerinin arasında veya içinde yer alan artmış çap-

raz bağlanma ile ilişkili değişmiş fizyolojik olaylardan ve diğer glikozillenme ile ilişkili yapısal değişikliklerden kaynaklanır(12).

Nonenzimatik glikozillenme etkisi ile proteinlerde meydana gelen fizyolojik değişiklikler Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6  
Nonenzimatik glikozillenmenin çeşitli protein fonksiyonları üzerine etkisi(12)

Enzim aktivitesi  
Regülatör moleküllerin bağlanması  
Proteinlerin çapraz bağlanması  
Proteazlara karşı duyarlılık  
Makromoleküllerin hücre yüzey reseptörleri tarafından tanınması ve endositoz  
Immunolojik etki

Tabloda görüldüğü gibi bu fizyolojik değişikliklerin ilki enzim proteinlerinin aktivitesinde meydana gelen değişmedir. Ancak in vivo olarak nonenzimatik glikozillenme enzim proteinlerinde önemsenecek düzeyde meydana gelmez. Çünkü bu proteinlerin çoğu genellikle kısa yarı ömürlüdür. Bununun aberaber reversibl glukoz-protein Schiff baz bileşikleri oluşur ve in vivo olarak bu bileşiklerin konsantrasyonlarındaki artış enzimlerin katalitik özellikleri ile anlamlı olarak ilişkilidir. Bu inaktivasyon mekanizması aktif bölgede normal fonksiyonlar için gerekli lizin amino asidlerinin  $\Sigma$  amino gruplarının glukoz ile bağlanması sonucu oluşur(12). Örneğin ribonukleaz A; glukoz ile yirmi dört saat inkübe edilir ise enzim aktivitesini % 50 oranında kaybettiği saptanmıştır(27). Benzer sonuçlar katepsin B ve papain içinde alınmıştır(23).

Organizmada bazı proteinlerin fonksiyonu çeşitli regülatör moleküller ile düzenlenir. Regülatör moleküllerin bu proteinlere bağlanması üzerine nonenzimatik glikozillenmenin etkisi vardır. Regülatör moleküllerin bağlanması için gerekli terminal amino asidin  $\alpha$ -amino grubu ya da lizi-

nin  $\Sigma$  amino grubunun nonenzimatik glikozillenmesi ile bu moleküllerin bağlanmasını inhibe eder. Regülatör moleküllerin bağlanmalarına iyi bir model 2,3 DPG'nin hemoglobine reversibl bağlanmasıdır. 2,3 DPG'de bağlanma için gerekli pozitif yüklü grupların nonenzimatik glikozillenmesi bu molekülün hemoglobine bağlanmasını azaltır(67).

Nonenzimatik glikozillenmenin yol açtığı bir diğer fizyolojik değişim daha önce de kısaca bahsettiğimiz gibi proteinlerde meydana gelen çapraz bağlardır. Çapraz bağlanmaların yol açtığı agregatlaşma organizmada ilk olarak lens proteinleri olan kristallinler üzerinde incelenmiştir(93). Oluşan bu agregatlaşmalar proteinlerin normal fizyolojik fonksiyonlarını olumsuz olarak etkiler.

Nonenzimatik glikozillenen proteinlerde proteazlara karşı duyarlılıkta azalma görülmüştür. Buna iyi bir örnek fibrindir. Diabetli hastalarda nonenzimatik olarak glikozillenen fibrinin plazmine karşı duyarlılığının azaldığı saptanmıştır(11).

Nonenzimatik olarak glikozillenen makromoleküllerin hücre reseptörleri tarafından tanınması ve endositoza uğramaları da etkilenmektedir. Hücre yüzeleri çeşitli molekülleri yüksek affinite de bağlayabilen reseptörler içerir. Bu reseptörlere çeşitli moleküllerin bağlanabilmesi organizmada homeostazın muhafazasında önemlidir. Çeşitli proteinlerin nonenzimatik glikozillenme yolu ile modifikasyonları tanınmalarını ve endositozlarını anlamlı olarak değiştirir(89). Buna örnek olarak serum albumin ve LDL (düşük dansiteli lipoprotein) moleküllerini verebiliriz. Glikozillenen serum albuminin kapiler endotel hücreleri tarafından endositozu arttığı halde, yine glikozillenen LDL moleküllerinin fibroblastlar tarafından fagosite edilmeleri azalmıştır(39,102,103).

Yine nonenzimatik glikozillenmenin proteinler üzerinde yol açtığı bir başka modifikasyon, nonenzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinlerin antijenik karakter kazanarak otoantikor oluşumuna yol açabilmeleridir(12,104).

Proteinlerin glikozillenme hızında karbohidrat türlerinin de etki-

si olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan araştırmalarda aldozların, ketozlara göre proteinler ile daha hızlı reaksiyonlaştıkları gösterilmiştir(13,50). Bu farkın karbonil grubunun aldehid yapısı içinde daha elektrofilik olması ile olduğu düşünölmüştür(13). Buna karşılık Oimomi ve arkadaşları deney- sel olarak albüminin fruktoz ile glukozla oranla daha hızlı glikozillendiğini göstermişlerdir(60).

### III. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER

##### 3.1.1. Materyal

Araştırmada kullandığımız elastin Sütüce Et ve Balık Kurumunda, gerekli sağlık kontrollerinden geçerek kesimleri yapılan sığırlardan alınan 25 adet aorta thoracica'dan elde edildi.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

Aseton (Ataay), eter (Atabay), absolü alkol (99,9°Tekel), sodyum hidroksid (Merck), hidroklorik azid (Merck), sodyum azid Merck), sodyum klorür (Merck), glukoz (Merck), fruktoz (Merck), oksalik asid (Merck), triklor asetik asid (Merck), tiobarbitürik asid (Sigma), amonyum sülfat (Merck), Ponceaus (Gelman), sodyum dihidrojen fosfat (Merck), dipotasyum hidrojen fosfat (Merck), asetik asid (Merck), fosforik asid (Merck), potasyum hidroksid (Merck), bakır sülfat (Merck), sodyum karbonat (Merck), sodyum tartarat (Merck), Orto fosforik asid (Merck), litium sülfat (Merck), Brom (Merck).

### 3.1.3. Aletler

Çalkalama aygıtı	"Tabor"
Et kıyma makinesi kahve değirmeni	
Etüv	"Heraeus"
Manyetik karıştırıcı	"IKA"
Liyofilizatör	"Thermovac Industries Corp."
Elektroforez tankı	"Gelman"
Elektroforez güç kaynağı	"Gelman"
Dansitometre	"Gelman"
Amino asid analizörü	"Biotronik 5001"
pH metre	"PYE model 78"
Otoklav	"Veb"
Su banyosu	"Elektromag"
Spektrofotometre	"Bausch Lomb.Spectronic 70"

### 3.1.4. Çözeltiler

- % 0,9 NaCl: 9 g sodyum klorür destile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- 0,1 N sodyum hidroksid: 4 g sodyum hidroksid destile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- 0,5 N HCl-etanol: 4,14 ml derişik hidroklorik asid 99,9° lik etanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

- Tris-barbital tamponu: pH 8.8

- Selüloz asetat elektroforez boyama çözeltisi: 500 mg ponceau S % 5 (w/v) triklor asetik asid çözeltisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.



- Elektroforez yıkama çözeltisi: % 5 (w/v) asetik asid.

- Fosfat tampon çözeltisi

(PBS) (pH:7.4): 1.392 g  $K_2HPO_4$

0.276 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

8.76 g NaCl

900 ml destile suda çözüldü, pH: 7.4'e ayarlanarak 1000 ml'ye tamamlandı.

Doymuş amonyum sülfat çözeltisi: Sıcak destile su içerisine katı amonyum sülfat artık çözünmeyinceye kadar ilave edildi. Üç gün oda temperaturünde beklendi. Dipte oluşan kristalizasyonun üstündeki sıvı kısım doymuş amonyum sülfat çözeltisi olarak kullanıldı.

- 0,5 M oksalik asid çözeltisi: 6.3 g  $(COOH)_2 \cdot 2H_2O$  destile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- % 40 triklor asetik asid çözeltisi: % 100 triklor asetik asid çözeltisinden 40 ml alınarak destile su ile 100 ml'ye seyreltildi.

- 0,05 M tiobarbitürik asid çözeltisi: 0,721 g 2-tiobarbitürik asid destile suda çözülerek pH'ı 6'ya ayarlandı ve destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- 6N hidroklorik asid çözeltisi: 49,8 ml derişik hidroklorik asid destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- % 20 sodyum hidroksid çözeltisi: 20 g sodyum hidroksid destile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- Standart fruktoz çözeltileri:

a) Stok standart çözeltili (1 mM): 180 mg fruktoz 0,15 M NaCl içinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

b) Çalışma standart çözeltileri:

Stok standart çözeltilerinden

1- 0,5 ml alınarak 0,15 M NaCl ile 50 ml'ye tamamlandı (10 nmol/ml).

2- 1 ml alınarak 0,15 M NaCl ile 50 ml'ye tamamlandı (20 nmol/ml).

3- 2 ml alınarak 0,15 M NaCl ile 50 ml'ye tamamlandı (40 nmol/ml)

4- 3 ml alınarak 0,15 M NaCl ile 50 ml'ye tamamlandı (60 nmol/ml).

- Stok bakır sülfat çözeltisi (% 1): 1 g bakır sülfat destile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- Stok alkali tartrat çözeltisi: 20 g sodyum karbonat, 0,5 g sodyum tartrat 0,1 N sodyum hidroksid içinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

- Folin-Ciocalteu Fenol çözeltisi

25 g,  $\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  700 ml destile suda çözüldü, 50 ml orto fosforik asid, 100 ml hidroklorik asid ilavesi ile geri soğutucu altında on saat kaynatıldı. 150 g lityum sülfat, 50 ml su, 2-3 damla brom ilave edilerek on beş dakika daha kaynatıldı, soğutuldu ve 100 ml'ye tamamlandı.

## 4.2. YÖNTEMLER

### 4.2.1. Elastin Eldesi

Mezbahada kesimden hemen sonra serum fizyolojik içersine alınarak kandan temizlenen aorta thoracica (sığır) lardan elastinin elde edilmesinde Balo ve Banga tarafından önerilen yöntem uygulandı(7).

Buna göre, aortalar makroskopik olarak yeteri kadar temizlendikten sonra makasla ince bir şekilde doğranarak et kıyma makinesinden üç kez geçirildi. Elde edilen kıyılmış aortalar birer litrelik şişelere alınarak üzerlerine hacimlerinin 5-6 misli aseton ilave edildi ve çalkalama aygıtına yerleştirilerek iki saat çalkalandı. Bu süre sonunda süzgeç kağıdından süzülerek yine 5-6 misli aseton eklenmesi ile çalkalama işlemi yirmi dakika uygulandı. Tekrar süzülerek öncekilerin yarısı kadar aseton hacmi ile aynı işlem tekrarlandı. Süzgeç kağıdından süzülen aorta parçaları bu defa hacimlerinin 5-6 misli eter ilavesi ile çalkalama aygıtında yarım saat çalkalandı. Bu işlem yarı eter miktarı ile iki kez tekrarlandı. Kıyma halindeki aorta parçaları tüm işlemler sonucunda yağsızlaştırılmış ve suyu çekilmiş olarak süzgeç kağıdı üstüne yayıldı. Önce açık havada eter kokusu kalmayınca kadar bekletildi. Daha sonra vakumlu desikatöre konarak kurutuldu; kahve değirmeninden çekilerek yağsız aorta tozu elde edildi.

Elde edilen yağsız aorta tozunun 25 gr'ı 700 ml 0,1 N sodyum hidroksid içinde olacak şekilde 98°C'de 60 dakika süreyle ve arasıra karıştırılarak ısıtıldı. Bu süre sonunda nuçe yardımı ile çözünmeyen kısım çözünen kısımdan ayrıldı ve destile su ile yıkandı. Bu yıkama işlemi yıkama suyu alkali reaksiyon vermeyinceye kadar sürdürüldü. Son olarak % 96'lık alkolden geçirildi ve süzgeç kağıdı üzerine alınarak önce açıkta, daha sonra vakumlu desikatörde kurutuldu. Kahve değirmeninden çekilerek toz halde elastin elde edildi.

#### 4.2.2. Çözünür Elastin Türevinin Eldesi(45)

2,5 g elastin tozu 100 ml HCl-etanol çözeltisi içinde olacak şekilde süspansiyon hazırlandı.

Süspansiyon üç buçuk saat 65° de geri soğutucu altında manyetik karıştırıcı yardımı ile kaynatıldı. Bu şekilde elastinin parsiyel hidroliz yolu ile çözünürleştirilmesi sağlandı. Süre sonunda süzgeç kağıdından geçirilerek çok küçük miktar da olsa çözünmeyen kısım uzaklaştırıldı.

Elde edilen süzüntü buz banyosunda 10° ye kadar soğutularak ölçülen hacminin bir buçuk katı kadar eter ilave edildi. Oluşan çökelti santrifüj edilerek sıvı fazdan ayrıldı ve destile suda çözünülerek +4°C de destile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonucunda protein çözeltilisinin pH'ı kuvvetli asid reaksiyondan, hafif asid reaksiyonuna dönüştü. Bu çözelti daha sonra kapsül içerisine alınarak, liyofilizatörde suyu tamamen uçuncaya kadar liyofilize edildi. Bu işlem sonunda elastinin çözünür hidroliz ürünü elde edildi.

Elde edilen çözünür elastin türevi miktarı 2,5 g elastin başına yaklaşık 550 mg kadardı.

#### 4.2.3. Selüloz Asetat Elektroforez Yöntemi

Çözünür elastin türevinin selüloz asetat elektroforezine uygulanabilmesi amacı ile 50 mg/ml'lik bir numune hazırlandı.

Elektroforez tankı, elektroforez tampon çözeltisi ile dolduruldu. Selüloz asetat şeritleri numuneler uygulanmadan önce tampona yerleştirilerek beş dakika kadar bırakıldı. Bu süre sonunda bir pens yardımı ile şeritler kurutma kağıdına alınarak fazla tampon miktarı uzaklaştırıldı. Şeritler elektroforez tankına yerleştirilerek manyetik tutucular yardımı ile gerginleştirildi. Çözünür elastin türevi ve normal serum numuneleri ayrı ayrı şeritlerin katod tarafındaki ucuna aplikatör yardımı ile uygulandı. Tankın kapağı kapatıldı ve güç kaynağı 250 volta ayarlandı. Tank su soğutma sistemine bağlanarak içinde meydana gelebilecek terleme önlen- di.

30 dakika sonra güç kaynağı kapatıldı ve şeritler bir pens yardımı ile dikkatlice tanktan alınarak içinde boyama çözeltisi bulunan kaba bırakıldı; 10 dakika beklendi. Şeritler daha sonra içinde % 5 (w/v) asetik asid bulunan üç ayrı yıkama kabına alınarak bantlar haricindeki boyanın şeritlerden uzaklaştırılması sağlandı.

#### 4.2.4. Amino Asid Analiz Yöntemi

Çözünür elastin türevinin amino asid içeriği Türkiye Bilimsel Tetkik ve Araştırma Kurumu Beslenme bölümünde sıvı kolon kromatografi amino asit analizörü kullanılarak tayin edildi(8).

Yöntemin Prensipleri: Protein örneğinin 6N HCl de  $110^{\circ}\text{C} \pm 1$  de yirmi dört saat hidrolizi ile serbest olarak açığa çıkan amino asidler bir evaporatörde asidin uzaklaştırılmasından sonra pH değeri 2,2 olan sodyum tamponu çözeltisine alınarak amino asit analizörüne verilir ve bu örnekler alete daha önceden verilen yirmi adet amino asidi içeren standart örneğine karşı okunarak değerlendirilir. Amino asit analizörü amino asitleri katyon değiştirici reçine içeren kolonlar üzerinde kromatografik olarak ayırır. Kolonlarda yer alan reçine benzen halkalarına bağlanmış sülfonik asit taşıyan poli stenden oluşur. Amino asitlerin ayırımı eksi yüklü sülfonik asitle olan elektrostatik etkileşimler ve apolar benzen halkaları ile olan hidrofobik etkileşimlerin gücüne göre olur. Amino asitleri kolondan almak için gittikçe artan pH değerlerine sahip olan tampon sistemleri kullanılır. Bu durumda kolondan önce en asidik amino asit olan aspartik asit ve en son olarak da en bazik amino asit arjinin ayrılmaktadır. Her bir amino asidin verdiği piklerden oluşan üçgen alanı o amino asidin miktarını göstermektedir(5).

#### 4.2.5. Çözünür Elastin Türevinin İn Vitro NonEnzimatik Glikozillendirilme Yöntemi

Çözünür elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillendirilmesinde kullanılan yöntem daha önce gerçekleştirilen çeşitli ön deneylerin sonuçları göz önüne alınarak geliştirildi.

##### Kontrol Deneyleri

10 mg çözünür elastin türevi, 2,8 mM konsantrasyonda sodyum asid içeren pH'ı 7,4 olan PBS'in 5 ml'sinde çözülerek  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde 24,

48, 96 saatlik sürelerde inkübe edildi.

- Glukozlu ortamda glikozillendirme deneyleri:

Bu deneylerde iki seri kullanıldı. Birinci seride 10 mg çözünür elastin türevi 2,8 mM konsantrasyonda sodyum azid ve 27,7 mM konsantrasyonda glukoz içeren pH'ı 7,4 olan PBS'in 5 ml'si içinde çözülerek 37°'lik etüvde 24, 48, 96 saatlik sürelerde inkübe edildi.

İkinci seride 10 mg çözünür elastin türevi, 2,8 mM konsantrasyonda sodyum azid ve 55,5 mM konsantrasyonda glukoz içeren pH, 7,4 olan PBS'in 5 ml'si içinde çözülerek 37°C'lik etüvde 24, 48, 96 saatlik sürelerde inkübe edildi.

İnkübasyon süreleri sonunda tüm numunelere eşit miktar doymuş amonyum sülfat ilave edilerek çözünmüş halde bulunan çözünür elastin türevinin çökmesi sağlandı. Çökelti santrifüj edilerek (10 dakika, 2000 rpm) sıvı kısımdan ayrıldı ve beş kez doymuş amonyum sülfat çözeltisi ile yıkandı. Bu şekilde çökelti proteine bulaşık kalmış glukozun uzaklaştırılması sağlandı. Çökelti daha sonra serum fizyolojik içersinde çözülerek amonyum sülfatın uzaklaştırılması amacı ile destile suya karşı +4°C de diyaliz suyunda amonyum sülfat kalmayınca kadar diyaliz edildi.

Diyaliz işlemi sonunda tüm numunelerde protein konsantrasyonu Lowry yöntemi kullanılarak tayin edildi.

Protein tayin sonuçlarına göre diyaliz işlemi sonucu eldeki numunelerdeki protein konsantrasyonunun başta alınan miktarı % 70-80 arasında muhafaza ettiği anlaşıldı.

Çözünür elastin türevinde glikozillenme değerleri Parker ve ark. tarafından önerilen kolorimetrik yöntem(62) uygulanarak tayin edildi.

Yöntemin prensibi: 100°C'de ve oksalik asid varlığında proteine bağlı karbohidrat kalıntısının 5-hidroksimetil furfural oluşturması ve meydana gelen bu 5-hidroksimetil furfuralin tiobarbitürik asid ile renk reaksi-

yonu vermesidir.

Diyaliz edilen ve içlerindeki protein konsantrasyonu tayin edilen numunelerden 2'şer ml alınarak cam kapaklı tüplere konuldu. Standart olarak işaretlenen tüplere ise her bir çalışma standart çözeltisinden ayrı ayrı 1'er ml konuldu.

Numune tüplerine 0,5 M oksalik asid çözeltisinden 2'şer ml, standart tüplerine ise 1'er ml ilave edildi. Kapaklar sıkıca kapatılarak otoklavda 1 Atmosfer basınç altında 120°Cde 60 dakika süre ile tutuldu.

Bu süre sonunda tüpler otoklavdan alınarak oda ısısında soğumaları beklendi. Soğuyan tüplere % 40 triklor asetik asidden numunelere 2'şer ml, standartlara 1'er ml katılarak, karıştırıldı. 15 dakika beklendikten sonra tüpler süzöldü.

Süzölen her bir numuneden 1,5'ar ml iki ayrı tübe konuldu. Süzölen standartların her birinden 1,5 ar ml alınarak iki ayrı tüpe kondu. Her konsantrasyona ait iki tüpten geriye kalan miktarlar karıştırılarak, bu karışımdan 1,5 ml üçüncü bir tüpe kondu (standart körü).

Numune körü ve standart körü olarak işaretlenen tüplere 0,5 ml destile su, diğerlerine 0,5 ml tiobarbitürik asid ilave edildi, karıştırıldı ve 40°C lik su banyosunda 30 dakika tutuldu. Bu süre sonunda su banyosundan çıkartılarak 15 dakika oda ısısında bekeltildi ve tüm tüplerin optik dansiteleri suya karşı 443 nm dalga boyunda ölçöldü.

Tüm numunelerin glikozillenme değerleri standartlar ile mukayese edilerek hesaplandı ve sonuçlar proteine oranlanarak nmol fruktoz/mg protein olarak verildi.

### 3.2.6. Lowry Yöntemi İle Protein Tayini(56)

Stok bakır sülfat çözeltisi, stok alkali tanyrat çözeltisi ile 1:9

oranında seyreltildi. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı. Seyreltilmiş bakır sülfat çözeltisinden numune, standart ve kör olarak ayrılan tüplere 5'er ml konuldu. Numune tüplerine 0,1 ml proteini tayin edilecek numune, standart tüpüne 0,1 ml protein standart çözeltisinden (% 100 mg) ilave edildi. Kör tüpüne ise 0,1 ml destile su katıldı. Oda ısısında 15 dakika beklendi. Bu süre sonunda tüm tüplere yarı yarıya seyreltilmiş folin çözeltisinden 0,5 ml ilave edilerek tüm tüpler şiddetli olarak karıştırıldı ve 30 dakika beklendi. 750 nm dalga boyunda köre karşı numune ve standartların optik dansiteleri ölçüldü. Numunelerin protein konsantrasyonları standart ile oranlanarak saptandı.

Nonenzimatik glikozillenme deneylerinin değerlendirilmesinde student's t formülünden yararlanıldı.



## IV. BULGULAR

### 4.1. ELASTİN VE ÇÖZÜNÜR ELASTİN TÜREVİNE AİT BULGULAR

Sığırların aorta thoracicalarından Balo ve Banga tarafından önerilen yönteme göre elde edilen aorta tozundan bir örnek Resim 1'de, elastin tozundan bir örnek ise Resim 2'de gösterilmiştir. Aorta tozunun beyaz renkte olmasına karşın buradan saflaştırılan elastin hafif soluk sarı renk göstermektedir ve bu elastinin karakteristik görünümüne uymaktadır.

Elastinin 0,5 N HCl-etanol içinde geri soğutucu altında 65°C'de 3,5 saat hidrolizi sonucu elde edilen berrak süzüntü Resim 3'de gösterilmiştir. Bu hidroliz işlemi ile elastinin tortu bırakmayacak şekilde çözüldüğü görülmektedir.

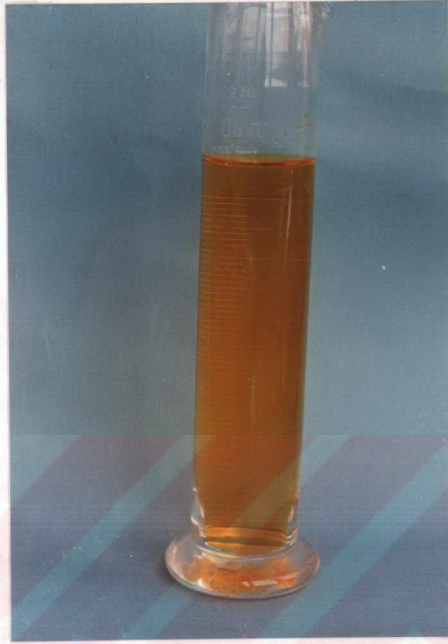
+ 10°C'de eter ile çöktürülen, daha sonra destile suya karşı diyaliz edilen ve liyofilize edilerek toz haline getirilen çözünen elastin türevi Resim 4'de görülmektedir. Çözünen elastin türevinin elastine göre daha beyaz renkte olduğu gözlenmektedir.



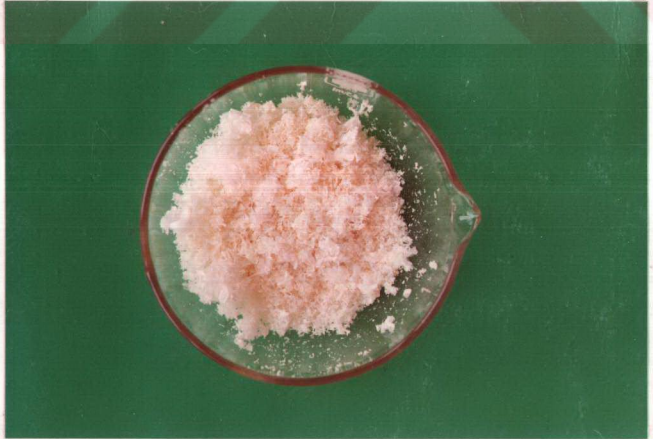
Resim 1- Sığır aorta thoracicasından elde edilen aorta tozu



Resim 2- Sığır aorta thoracicasından elde edilen elastin tozu



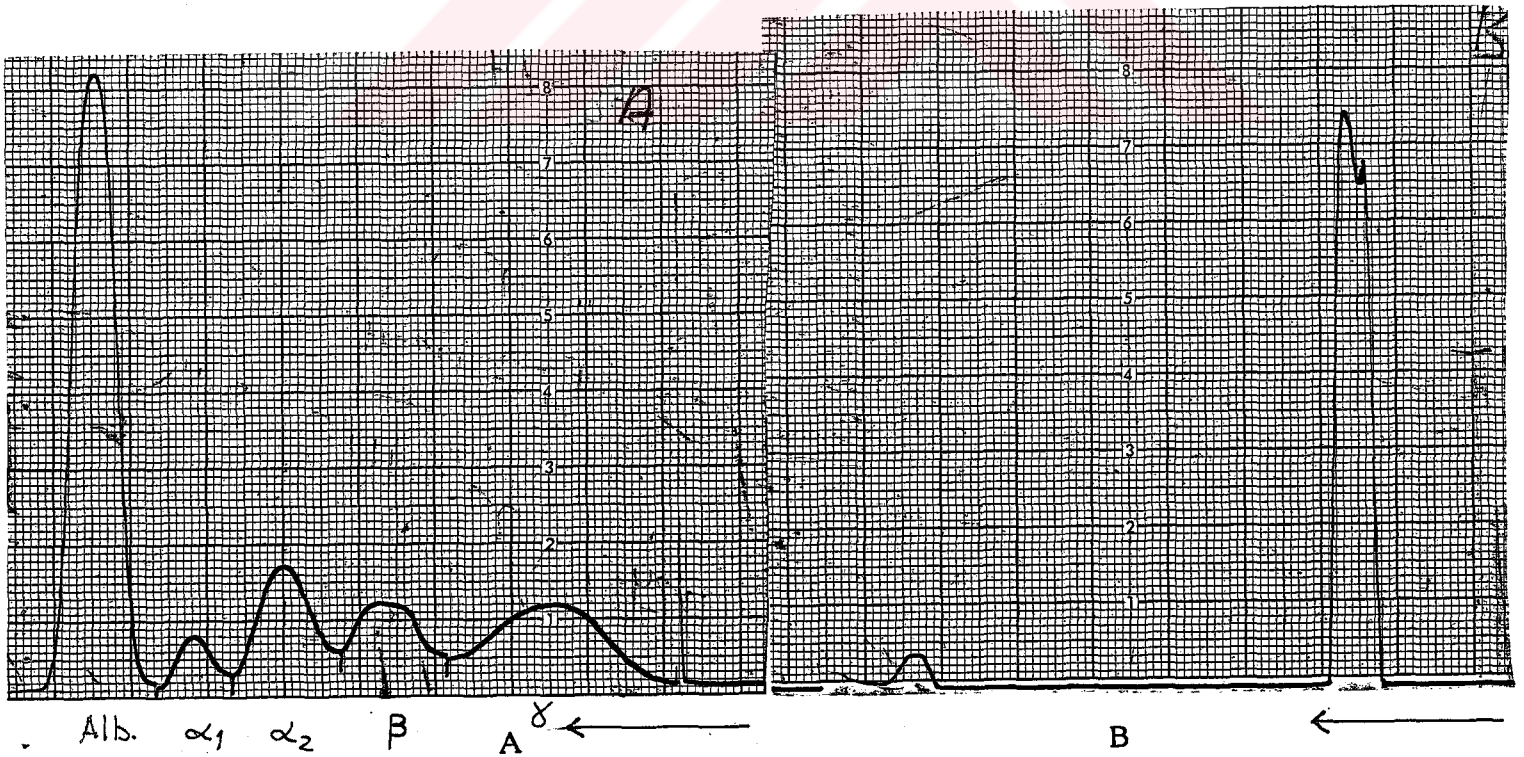
Resim 3- Elastinden 0.5 N HCl-etanol hidrolizi ile elde edilen berrak süzöntü



Resim 4- Elastinden 0,5 N HCl-etanol hidrolizi ile elde edilen liyofilize çözümlü elastin türevi

## 5.2. ÇÖZÜNÜR ELASTİN TÜREVİ SELÜLOZ ASETAT ELEKTROFOREZ BULGUSU

Çözünür elastin türevinin normal insan serumu ile karşılaştırılması olarak yapılan selüloz asetat elektroforezine ait elektroforegram Şekil 10'da gösterilmiştir. Buna göre çözünür elastin türevinde büyük fraksiyonun serumun gamma globulin fraksiyonuna benzer bir mobiliteye sahip olduğu, bunun yanında ikinci bir ufak fraksiyonun ise serum albumin fraksiyonunun mobilitesine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 10- Normal serum ve çözünür elastin türevinin selüloz asetat elektroforezine ait elektroforegram

A: Normal serum; B: Çözünür elastin türevi

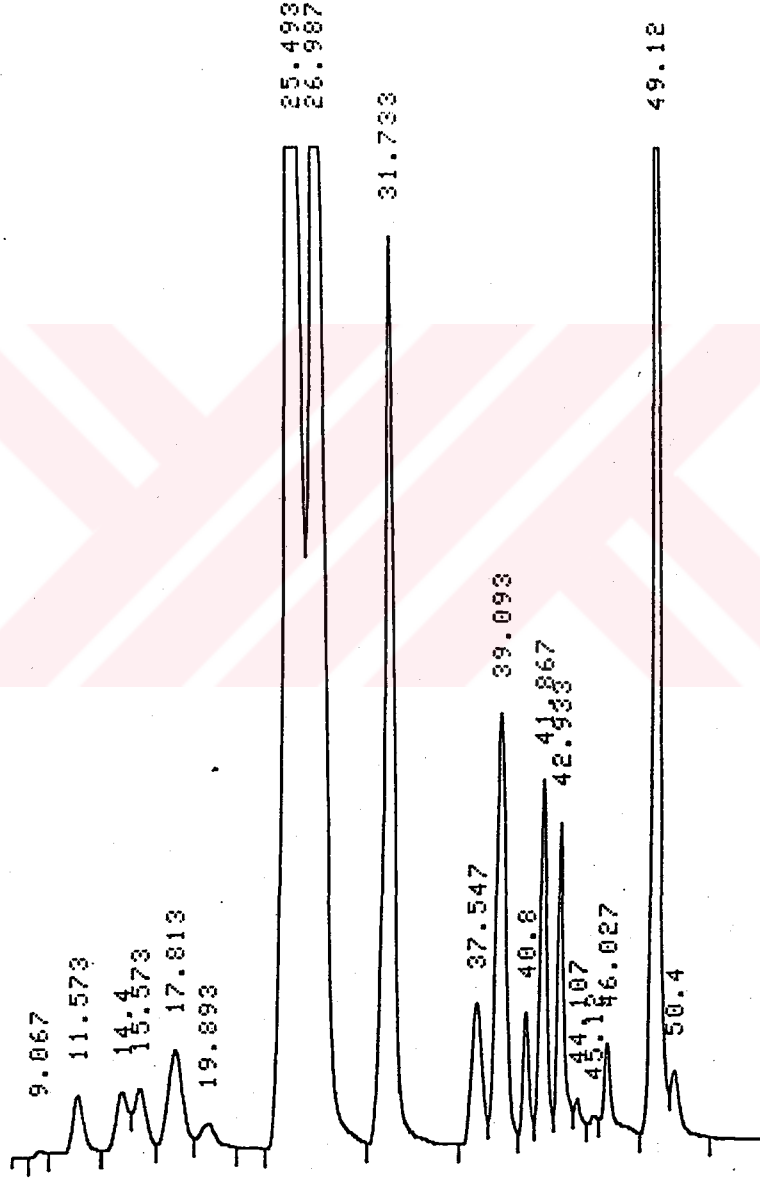
→ Proteinlerin şeritler üzerindeki yürüme yönü

### 5.3. ÇÖZÜNÜR ELASTİN TÜREVİNİN AMİNO ASİD İÇERİĞİNE AİT BULGU

Çözünür elastin türevinin Türkiye Bilimsel Tetkik ve Araştırma Kurumu Beslenme Bölümünde yapılan amino asid analiz sonucu Tablo 7'de gösterilmiştir. Aynı tablo'ya ait kromatogram Şekil 11'de gösterilmiştir. Tablo ve kromatogramda görüldüğü gibi total amino asidler arasında en büyük oranı glisin, alanin, lösin, prolin amino asidleri oluşturmaktadır.

Tablo 7  
Çözünür Elastin Türevinin Amino Asid Bileşimi

Amino Asid	% g
Aspartikasid	1,200
Treonin	1,108
Serin	0,938
Glutamik asid	2,700
Prolin	8,577
Glisin	21,417
Alanin	20,745
Valin	4,971
İzolösin	2,800
Lösin	10,167
Tirozin	1,772
Fenilalanin	4,971
Histidin	3,090
Lizin	1,019
Arginin	1,202



Şekil 11- Çözünür elastin türevi amino asid bileşimine ait kromatogram

#### 5.4. ÇÖZÜNÜR ELASTİN TÜREVİNİN İN VİTRO NON ENZİMATİK GLİKOZİLLENME BULGULARI

Tablo 8'de çözünür elastin türevinin kontrol grubuna ait glikozillenme değerleri gösterilmiştir. 24, 48 ve 96 saatlik inkubasyonlara ait kontrol grubu değerlerinin tümü aynı tabloda gösterilmiştir.

Tablo 8  
Çözünür Elastin Türü Kontrol Grubu Glikozillenme Değerleri

<u>n</u>	<u>nmol Fruktöz/mg Protein</u>
1	1,88
2	1,80
3	1,98
4	1,96
5	1,85
6	1,95
7	1,95
8	1,96
9	1,93
10	2,05
11	2,06
12	1,75
13	2,02
14	1,95
15	2,05
16	2,05
17	2,0
18	2,15
19	2,10
20	1,78
	1,96
SD	± 0,10

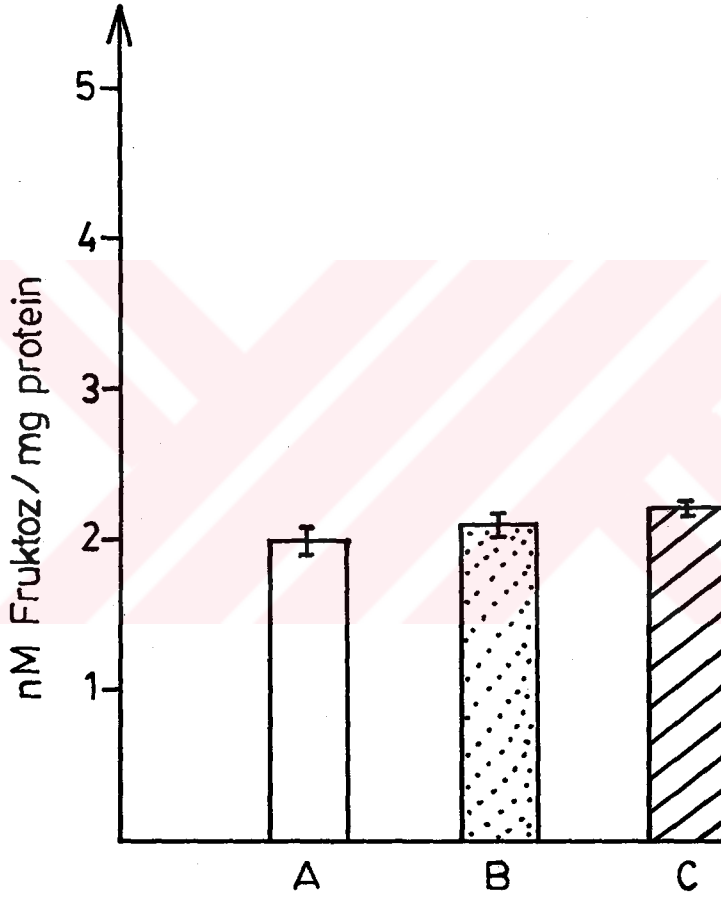
Tablo 9'da çözüner elastin türevinin 27,7 ve 55,5 mM konsantrasyonlarındaki glukoz ile 24 saat inkübasyonuna ait glikozillenme değerleri gösterilmiştir. Aynı tabloya ait değerlerin kontrol grubu ile mukayeseli histogramı Şekil 12'de gösterilmiştir. Her iki konsantrasyona ait bulguların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılmasında 27,7 mM glukoz konsantrasyonunda anlamlı bir fark olmadığı ( $p > 0.05$ ), ancak 55,5 mM konsantrasyonda ileri derecede anlamlı fark olduğu ( $p < 0.01$ ) anlaşılmıştır. Yine her iki grubun kendi aralarında yapılan istatistiksel karşılaştırmasında da anlamlı bir fark ( $p < 0.01$ ) bulunmuştur.

Tablo 9

Çözüner Elastin Türevinin Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında  
24 Saat İnkübasyon İle Elde Edilen Glikozillenme Değerleri  
(nmol Fruktöz/mg protein)

n	27.7 mM Glukoz	55.5 mM Glukoz
1	2,10	2,20
2	2,06	2,10
3	1,95	2,15
4	1,98	2,08
5	2,20	2,12
6	2,15	2,25
7	1,92	2,22
8	1,90	2,25
9	2,12	2,30
10	<u>2,05</u>	<u>2,18</u>
$\bar{x}$	2,043	2,18
SD±	0,10	0,07





A: Kontrol grubu; B: 27,7 mM Glukoz ile inkübasyon grubu;  
C: 55,5 mM Glukoz ile inkübasyon grubu

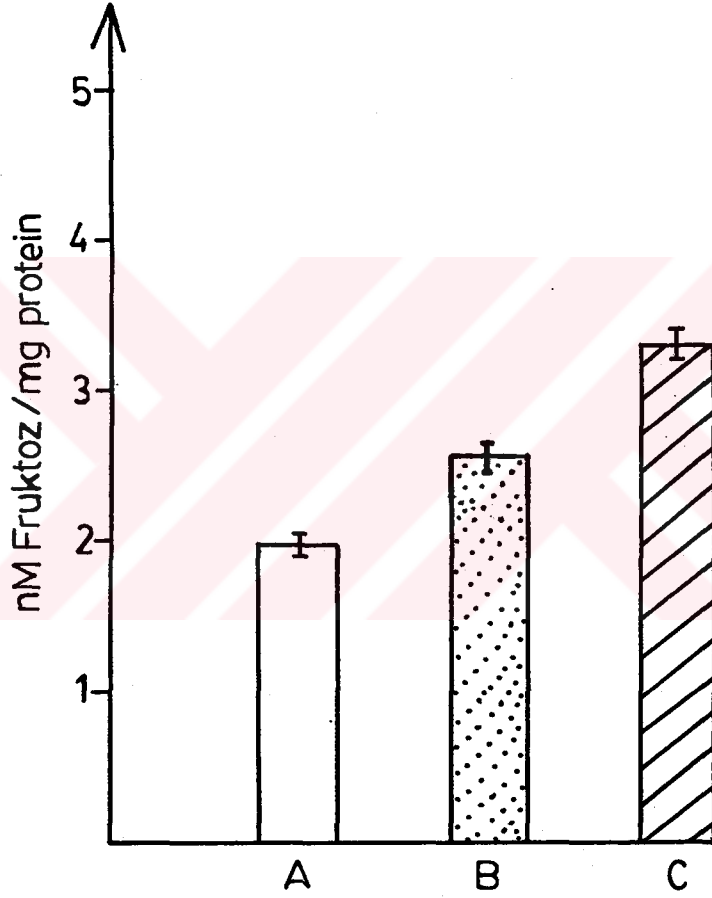
Şekil 12- Çözünür elastin türevinin farklı glukoz konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyonu ile elde edilen glikozillenme değerlerine ait histogram

Tablo 10'da çözümlü elastin türevinin 277 ve 55.5 mM konsantrasyonlarındaki glukoz ile 48 saat inkübasyonuna ait glikozillenme değerleri gösterilmiştir. Aynı tabloya ait değerlerin kontrol grubu ile mukayeseli histogramı Şekil 13'de gösterilmiştir. Her iki konsantrasyona ait bulguların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılmalarında aralarında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu ( $p < 0.001$ ) saptanmıştır. Her iki grubun kendi aralarında yapılan istatistiksel karşılaştırmasında yine ileri derecede anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

Tablo 10

Çözümlü Elastin Türevinin Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında 48 Saat Inkübasyonu İle Elde Edilen Glikozillenme Değerleri  
(nmol Fruktöz/mg protein)

n	2,7 mM Glukoz	55,5 mM Glukoz
1	2,30	3,25
2	2,45	3,33
3	2,71	3,30
4	2,65	3,40
5	2,28	2,90
6	2,36	3,83
7	2,90	3,48
8	3,08	3,60
9	2,40	3,35
10	<u>2,53</u>	<u>3,20</u>
$\bar{x}$	2,56	3,36
SD $\pm$	0,26	0,24



A: Kontrol grubu; B: 27,7 mM Glukoz ile inkübasyon grubu;  
C: 55,5 mM Glukoz ile inkübasyon grubu

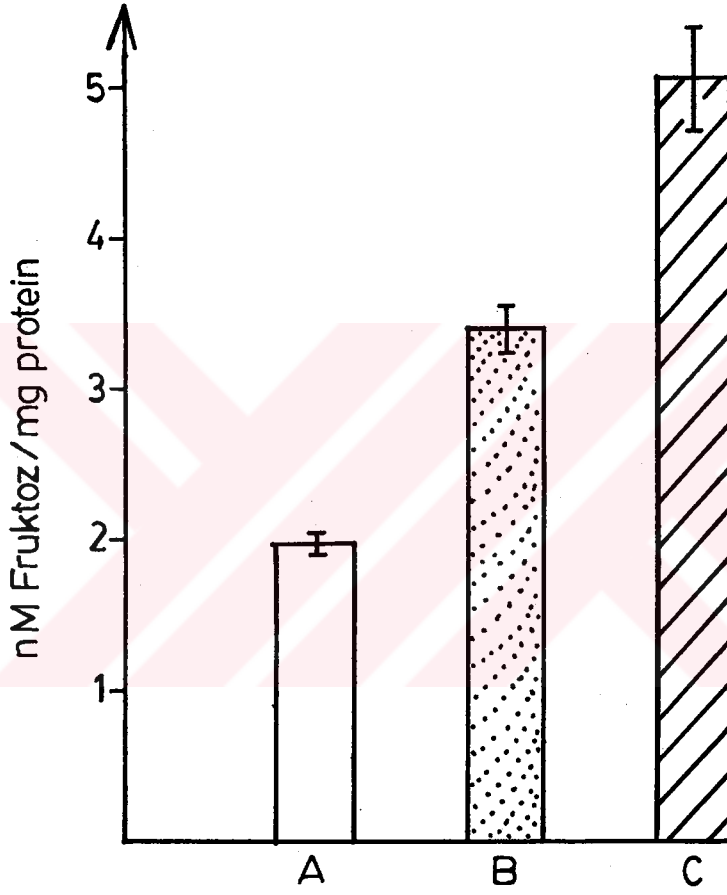
Şekil 13- Çözünür elastin türevinin farklı glukoz konsantrasyonlarında 48 saat inkübasyonu ile elde edilen glikozillenme değerlerine ait histogram

Tablo 11'de çözüdür elastin türevinin 27.7 ve 55.5 mM konsantrasyonundaki glukoz ile 96 saat inkübasyonuna ait glikozillenme değerleri gösterilmiştir. Şekil 14'de aynı tabloya ait değerlerin kontrol grubu ile mukayeseli histogramı gösterilmiştir. Her iki konsantrasyona ait bulguların kontrol grubu ile yapılan istatistiksel karşılaştırılmasında aralarında ileri derecede anlamlı bir fark ( $p < 0.001$ ) saptanmıştır. Her iki grubun kendi aralarında yapılan istatistiksel karşılaştırmasında yine ileri derecede anlamlı fark vardır ( $p < 0.001$ ).

Tablo 11

Çözüdür elastin türevinin farklı glukoz konsantrasyonlarında 96 saat inkübasyonu ile elde edilen glikozillenme değerleri (nmol Fruktöz/mg protein)

n	27,7 mM Glukoz	55,5 mM Glukoz
1	3,15	4,10
2	3,19	4,26
3	3,10	4,94
4	3,52	4,60
5	3,80	4,85
6	3,15	3,90
7	3,28	5,80
8	3,75	5,72
9	3,50	5,88
10	<u>3,12</u>	<u>6,10</u>
$\bar{x}$	3,35	5,01
SD $\pm$	0,26	0,80

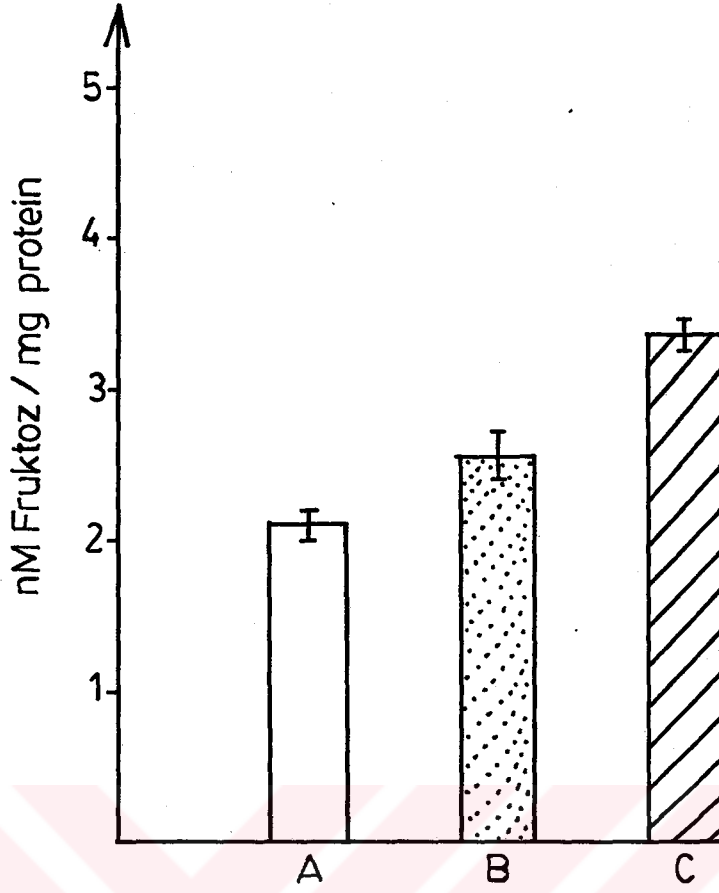


A: Kontrol Grubu; B: 27,7 mM Glukoz ile inkübasyon grubu;  
C: 55,5 mM Glukoz ile inkübasyon grubu

Şekil 14- Çözünür elastin türevinin farklı glukoz konsantrasyonlarında 96 saat inkübasyonu ile elde edilen glikozillenme değerlerine ait histogram

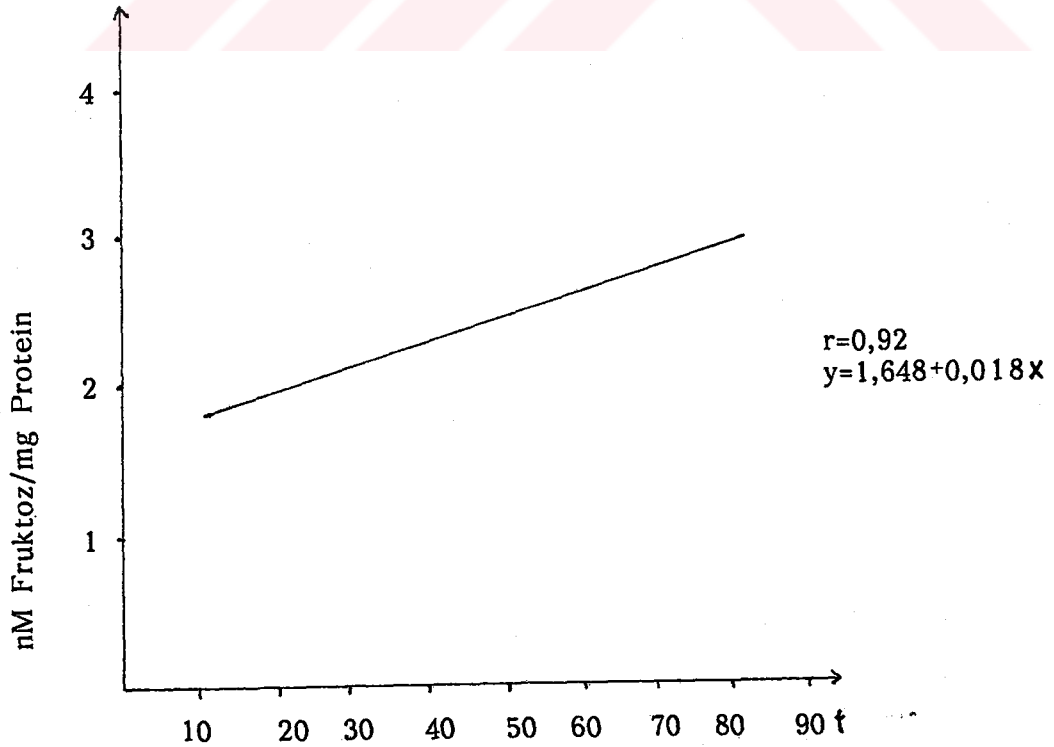
Çözünür elastin türevinin 27.7 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonlarına ait glikozillenme değerleri Şekil 15'deki histogramda birlikte gösterilmiştir. Görüldüğü gibi glikozillenme değerleri aynı glukoz konsantrasyonunda zamana göre artış göstermektedir. Her grubun kendi aralarında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarında ileri derecede ( $p < 0.001$ ) anlamlı fark mevcuttur. Yapılan korelasyon değerlendirmesinde 27,7 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlerde elde edilen glikozillenme değerleri ile zaman arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $r:0.927$ ). Korelasyon eğrisi Şekil 16'da gösterilmiştir.

Yine çözünür elastin türevinin 55,5 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonlarına ait glikozillenme değerleri Şekil 17'deki histogramda birlikte gösterilmiştir. Aynı glukoz konsantrasyonunda zamana bağlı olarak artan glikozillenme değerleri burada da görülmektedir ve her grubun kendi aralarında yapılan istatistiksel karşılaştırılmasında ileri derecede ( $p < 0.001$ ) anlamlı fark vardır. Bu konsantrasyonda glikozillenme değerleri ile zaman arasındaki korelasyon eğrisi Şekil 18'de gösterilmiştir. Korelasyon katsayısı ( $r$ ) 0,922 olarak bulunmuştur ve buna göre aralarında anlamlı bir ilişki mevcuttur.

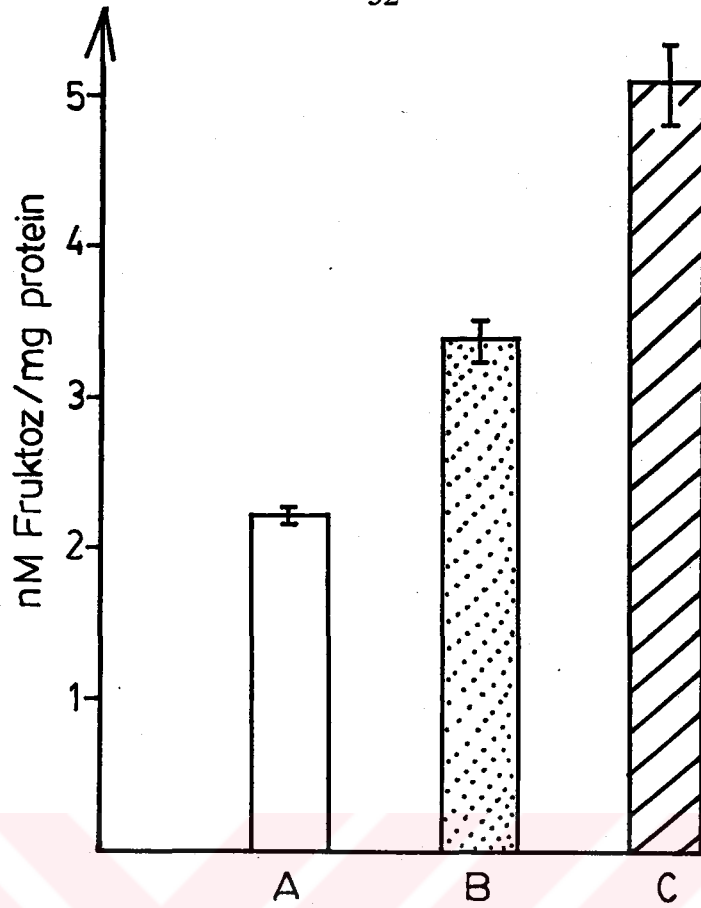


A: 24 saatlik inkübasyon grubu; B: 48 saatlik inkübasyon grubu;  
C: 96 saatlik inkübasyon grubu

Şekil 15- Çözünür elastin türevinin 27,7 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonlar ile elde edilen glikozillenme değerlerine ait histogram

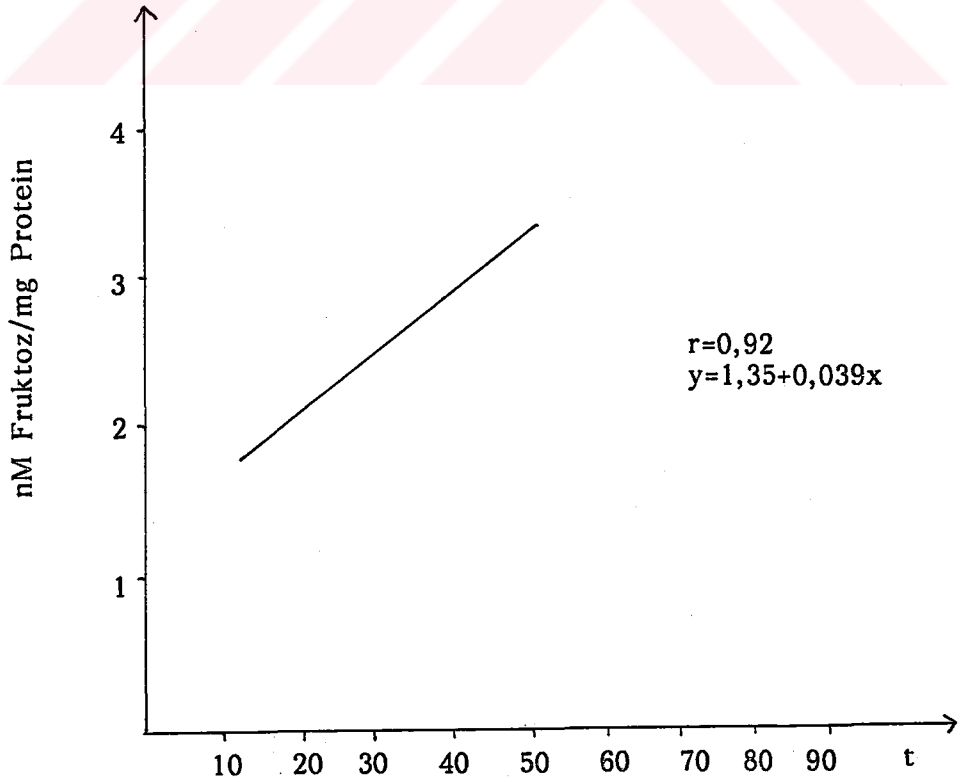


Şekil 16- Çözünür elastin türevinin 55,5 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonlarına ait glikozillenme değerleri ile zaman arasındaki korelasyon eğrisi



A: 24 saatlik inkübasyon grubu; 48 saatlik inkübasyon grubu;  
C: 96 saatlik inkübasyon grubu

Şekil 17- Çözünür elastintürevinin 55,5 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonları ile elde edilen glikozillenme değerlerine ait histogram



Şekil 18- Çözünür elastin türevinin 55,5 mM glukoz konsantrasyonunda 24, 48, 96 saatlik inkübasyonlarına ait glikozillenme değerleri ile zaman arasındaki korelasyon eğrisi



## V. İRDELEME VE SONUÇ

Proteinlere çeşitli karbohidratların enzim aracılığı olmaksızın bağlanması olan nonenzimatik glikozillenme çeşitli araştırmacılar tarafından organizmanın farklı protein türlerinde in vivo ve in vitro olarak incelenmiştir. Bu proteinler Tablo 4'de toplu olarak gösterilmiştir. Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri onların doğal yapı ve özelliklerinde bir takım değişimlere yol açması bakımından üzerinde oldukça önemle durulan reaksiyonlardır. Biz bu çalışmamızda sığırların aorta thoracicalarından elde ettiğimiz elastinin çözünür bir türevinde, literatürde benzer bir proteinle yapılmış çalışma olmayışını da dikkate alarak in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliğine inceledik.

Elastin omurgalı vücuduna elastik özellik kazandıran çeşitli dokulardaki elastik lifler içinde büyük oranda bulunur. Bir skleroprotein olan elastin suda, sulu çözeltilerde çözünmez, çeşitli proteazlara, asid ve alkalilere karşı dirençlidir(82).

Biz çalışmamızda sığır aorta thoracicasından elastin elde edilmesinde Balo ve Banga tarafından(83) önerilen yöntemi uyguladık. Aortik dokudan sıcak alkali muamelesi yolu ile saf elastin eldesine dayanan bu metodun elastini büyük miktarda içeren dokularda örneğin aortada tatmin edici sonuçlar verdiği farklı araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır(36,40,42,52,53,76). Bizim bulgularımıza göre de elde ettiğimiz elastinin gerek makroskopik görünümü gerekse bundan elde ettiğimiz çözünür

elastin türevinin amino asid kompozisyonu (Tablo 7) bu görüşleri doğrulamaktadır.

Elastinden çözünür elastin türevinin elde edilmesinde ılımlı bir hidroliz sağlayan etanol-HCl karışımı kullanılmıştır. Bu metod derişik asid ve alkali hidrolizine oranla elastinden kendine daha yakın özelliklere sahip bir türevin elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

Partridge ve arkadaşları(63) elastinden 0,25 M oksalik asid ile 100° de hidroliz yöntemi uygulayarak  $\alpha$  ve  $\beta$  elastin adı verilen iki çözünür türev elde etmişlerdir.

Bizim etanol-HCl karışımı kullanarak elde ettiğimiz çözünür türevin normal serum proteinleri ile yapılan mukayeseli selüloz asetat elektroforezinde, büyük oranının serumun gamma globulin mobilitesine sahip olduğu, ufak bir kısmının ise serum albumin mobilitesinde olduğu görülmektedir. Elektroforezde düşük bir mobiliteye sahip olması ayrıca ilerde bahsedeceğimiz gibi in vitro nonenzimatik glikozillenme deneyleri esnasında yarı doymuş amonyum sülfat içinde çökmesi molekül ağırlığının yüksek olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Çözünür elastin türevinin içerdiği aminoasidler ile "intakt" elastinin içerdiği amino asidler Tablo 12'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Tabloda da görüldüğü gibi çözünür elastin türevinin amino asid içeriği elastinle büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bazı amino asitlerin yüzdelerinde görülen ufak farklılıkların ise elastinden çözünür elastin türevinin elde edilmesi esnasında uygulanan yöntemlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elastinin amino asid içeriği elde edildiği kaynağa ve kullanılan yöntemeye göre de farklılıklar göstermektedir.

Tablo 12  
Elastin İle Çözünür Elastin Türevinin  
Karşılaştırmalı Amino Asid Bileşimi  
(g/100 g)

<u>Amino Asid</u>	<u>Elastin(4)</u>	<u>Elastin</u>	<u>Çözünür Elastin Türevi</u>
<b>I. Hidrofil amino asitler</b>			
Aspartik asid	1,06	1,0	1,20
Glutamik asid	2,76	2,4	2,70
Lizin	0,97	1,1	1,01
Arjinin	0,12	0,8	1,20
Histidin	0,02	0,1	3,09
Serin	0,85	1,0	0,93
Treonin	0,94	1,0	1,18
Tirozin	6,35	1,8	1,77
<b>II. Hidrofob amino asidler</b>			
Alanin	19,48	22,2	20,74
Valin	19,28	16,7	4,97
Izolösin	2,91	3,8	2,8
Lösin	8,49	9,0	10,16
Metiyonin	0,09	-	-
Prolin	14,14	14,0	8,57
Fenilalanin	5,63	5,3	4,97
Glisin	24,98	26,8	21,41

Yine Tablo 12'de çözüner elastin türevi amino asid bileşiminin % 73,62'ünü hidrofob amino asitlerin, % 13.08'si hidrofil amino asidlerin oluşturduğu görülmektedir.

Çözüner elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenme yöntemi bu konuda daha önce yaptığımız deneyler dikkate alınarak geliştirildi. Yöntem çözüner elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenmesinde, glukoz konsantrasyonu ve zamanın etkileri birlikte incelenebilecek şekilde düzenlendi.

Glikozillendirme işlemi sırasında çözüner elastin türevinin çözünmüş halde olduğu tampondan çöktürülerek uzaklaştırma işleminde, en çok kullanılan tekniklerden biri olan yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürme işlemi uygulandı. Çöktürmede kullanılan tuzların etkinliği anyonun yükü ile ilgilidir ve en çok sülfat, fosfat ve sitrat tuzları kullanılır. Katyonun cinsi daha az etkili ise de bir değerlikli tuzların kullanılması tercih edilir. Etkinlik sırası  $NH_4 > K^+ > Na^+$  dır. Bu durum dikkate alınarak çöktürme işlemi için amonyum sülfat kullanıldı. Amonyum sülfatın diğer bir avantajı da proteinleri stabilize etmesidir.

Çöktürme işlemi ile geri elde edilen proteinin başta kullandığımız protein imktarını % 70-0 oranında olduğu tespit edildi. Aradaki farkın amonyum sülfat ilavesi ile çökmeyen kısım "ki bu selüloz asetat elektforezinde görülen ve serum albumin mobilitesine sahip olan fraksiyon olabilir" ile dializ esnasında kaybedilebilen kısımdan alabileceği düşünülmüştür.

Çözüner elastin türevinin glikozillenme değerlerinin ölçüldüğü kolorimetrik yöntem Parker ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Yöntem her tür proteinin glikozillenme düzeyinin tayininde kullanılmaya uygundur.

Elde ettiğimiz bulgular çözüner elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenmeye müsait bir protein olduğunu göstermektedir. Glikozillenme düzeyinin ortamın glukoz konsantrasyonuna ve zamanına bağlı

olarak arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu araştırmacılar tarafından organizmanın çeşitli proteinlerinde yapılan in vitro non enzimatik glikozillenme deneyleri ile saptanan sonuçlara uymaktadır(12).

Proteinlerin in vitro nonenzimatik glikozillenmeleri üzerinde ayrıca ortamın pH'ı temperatüründe etkili olduğu bilinmektedir. Biz çalışmamızda fizyolojik bir pH olan 7.4 ve yine fizyolojik bir temperatür olan 37° yi uygun görerek uyguladık.

Bağ dokusu proteinleri ile ilgili nonenzimatik glikozillenme araştırmalarının daha ziyade kollajen üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir(22,43,51,68,73,84,106). Literatürde in vitro nonenzimatik glikozillenme ile ilgili olarak "intakt" elastinle yapılan az sayıda çalışma vardır(17,18,61). Bu çalışmalarda "intakt" elastinin in vitro nonenzimatik glikozillenmesinde anlamlı sonuçların uzun bir zaman sürecinde alınabildiği anlaşılmıştır. Biz elastinden elde ettiğimiz çözünür elastin türevinin intakt elastine oranla çok daha kısa sürede ve daha yüksek oranda glikozillenebildiğini ortaya koyduk.

Bu bulgu elastine oranla elastinden oluşan türev ürünlerin daha kolay glikozillenebildiğini göstermektedir. Bu durum elastin yıkılımının artmış olduğu organizmalarda etkili olabilir. Elastin yıkılımı ile oluşacak elastin türevi peptidlerin nonenzimatik glikozillenmeye uğramalarının kendilerine karşı organizmada otoantikör yapımına ya da yapımın artmasına yol açabileceği düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda nonenzimatik glikozillenen proteinlerin antijenik özellik kazanarak oto antikör oluşumuna neden oldukları saptanmıştır(11,96).

Sonuç olarak biz bu çalışmada elastinden etanollü-HCl hidrolizi ile elde ettiğimiz çözünür elastin türevinin in vitronun enzimatik glikozillenebildiğini, glikozillenme düzeyinin glukoz konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak arttığını saptamış bulunuyoruz.

## ÖZET

Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesi özellikle son yıllarda üzerinde önemle durulan bir reaksiyondur. İn vivo ve İn vitro ortamlarda meydana gelebilen bu olay çeşitli araştırmacılar tarafından organizmanın farklı proteinlerinde incelenmiştir. Biz bu çalışmada su ve sulu ortamlarda çözünmeyen bir skleroprotein olan elantinden elde ettiğimiz çözünür elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliğini inceledik.

Çalışmamızda elastin sığır aortasından Balo ve Banga tarafından önerilen yöntemle izole edildi. Elastin 0,5 N HCl-etanol çözeltisinde 3,5 saat 65°C de hidroliz edilerek suda ve sulu ortamlarda çözünebilen bir türev protein elde edildi. Bu çözünür elastin türevinin selüloz asetat elektroforezi biri büyük diğeri çok küçük iki fraksiyondan oluştuğunu, büyük fraksiyonun serum gammaglobülin, küçük fraksiyonun ise serum albumin mobilitesine sahip olduğunu gösterdi. Yine yapılan amino asid analizi amino asid bileşiminin büyük oranda elastinle uyum içinde olduğunu ortaya koydu.

Çözünür elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliği gerçekleştirilen ön deneylerce saptanan bir yönteme göre incelendi. Buna göre çözünür elastin türevi, pH:7.4 olan ve 27.7 mM ile 55.5 mM konsantrasyonunda glukoz içeren iki farklı fosfat tamponu içinde 24, 48 ve 96 saat sürelerle 37°C de inkübe edildi. Kontrol deneyleri glukoz içermeyen fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirildi. Çözünür elastin türevi-

nin glikozillenme değerleri Parker ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle göre kolorimetrik olarak saptandı. Bu yöntem glikozillenmiş hemoglobin dahil tüm proteinler için kullanılabilme özelliğini taşımaktadır.

Elde edilen bulguların sonuçları, çözünür elastin türevinin ortamın glukoz konsantrasyona ve zamana bağlı olarak in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliği gösterdiğini ortaya koymuştur.

## SUMMARY

The nonenzymatic glucosylation of proteins is a reaction that has been followed up with interest in the last years. This reaction which may be produced in vivo and in vitro medias, has been examined by many investigators in different proteins of the organism.

In this study we investigated, the in vitro nonenzymatic glucosylation characteristic of soluble elastin derivative, we have obtained from elastin, a scleroprotein which is insoluble in water and aqueous solution.

In our study, elastin has been isolated from bovine aorta thoracica with the procedure Balo and Banga. We had hydrolized elastin for 3,5 hours at 65°C in 0,5 NHCl-etanol solution and obtained a protein derivative which is soluble in water and aqueous solutions.

The cellulose acetate electrophoresis of this soluble elastin derivative showed that it was composed of two fractions, one is big and the other is too small. The big fraction has gammaglobuline and the small fraction has serum albumin mobility. In addition to that the amino acid anlysis showed that, amino acid composition was in a harmony with elastin.

The in vitro nonenzymatic glucosylation property of soluble elastin derivative was investigated in respect to a method that was determined with recent experiments. In this method, the soluble elastin derivative was



incubated in 37°C for 24, 48 and 96 hours intervals, in two different phosphate buffers which possess 27,7 mM and 55,5 mM glucose respectively and in pH: 7.4. The glycosylation values of the soluble elastin derivative was determined colorimetrically according to the method suggested by Parker et al. This method can be used for all proteins including glucosylated hemoglobin.

The results of our findings showed that the soluble elastin derivative exhibited an in vitro nonenzymatic glycosylation characteristic according to the glucose concentration of the media and time.

## K A Y N A K L A R

- 1- Aswar,R.A.: Elastin and Elastic tissue. Plenum, New York, p:329, 1977.
- 2- Auron,B.B., Gosline,J.M.: Optical properties of single elastin fibers indicate random protein conformation. Nature, 287(5785):865-867, 1980.
- 3- Baban,N.: Protein Biokimyası. Nazım Terzioğlu Araştırma Enstitüsü, s.47-48, 58, 1980.
- 4- Baban,N., Güner,G.: Amino acid composition of Bovine Aortic Elastin and its Soluble Derivative. Balkan Biochemical and Biophysical days, İstanbul, 1981.
- 5- Bağcı,H.: Protein zincir dizisi analizi. Protein Yapısı ve Fonksiyonu, editör, A.Telefoncu, s.128-130, 1988.
- 6- Banda,M.J., Clark,E.J., Werb,Z.: Limited proteolysis by macrophage elastase inactivates human alpha-1- proteinase inhibitör. J.Exp.Med., 152(6):1563-1570, 1980.

- 17- Candan,G., Baban,N., Ahbap,E.: Elastinin in vitro glikozillenmeleri. Biokimya dergisi kongre özel sayısı, XII(2): 183, 1987.
- 18- Candan,G., Baban,N., Civelek,S., Ahbap,E.: Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine  $ZnCl_2$ 'nin etkileri. Cerrahpaşa Tıp Fak. Dergisi. 1989 (baskıda).
- 19- Cantor,J.O., Keller,S., Parshley,M.S., Darnule,T.V., Darnule,A.T., Cerreta,J.M., Turino,G.M., Mandl,I.: Synthesis of crosslinked elastin by in endothelial cell culture. Biochem.Biophys. Res. Common, 95(4):1381-1386, 1980.
- 20- Charles,W.: The micro structure of collagen and elastin. Ear Nose and Throat Journ. 66:431-435, 1987.
- 21- Cicila,G., May,M., Goldstein,N., İndik,Z., Morow,S., Yeh,H.S., Rosenbloom,J., Yoon,K.: Structure of the 3' portion of the bovine elastin gene. Biochemistry, 24(13):3075-3080, 1985.
- 22- Cohen,M.P., Urdaniva,E., Surma,M.: Nonenzymatic glycosylation of basement membranes. In vitro Studies. Diabetes, 30:367-371, 1981.
- 23- Coradello,H., Lubec,G., Pollah,a., Sternberg,M.: Enzyme activities of native non-enzymatically glycosylated tripsin, chymotripsin and papiin. Pediatr.Patol, 17:457-464, 1982.
- 24- Davidson,J.M., Hill,K.E., Mason,M.L., Giro,M.G.: Longitudinal gradients of collagen and elastin gene expression in the porcine aorta. J.Biol.Chem. 260(3): 1901-1908, 1985.
- 25- Davidson,J.M., Smith,K., Shihara,S., Tolstoshev,P., Crystal,R.G.: Regulation of elastin synthesis in developing sheep nuchae ligament by elastin mRNA levels. J.Biol.Chem.257(2): 747-754, 1982.

- 7- Banga,I., Balo,J., Horvath,M.: Nephelometric determination of elastase activity and method for elastoproteolytic measurements. *Biochem.J.*, 71:544-551, 1959.
- 8- Biotronik Wissenschaftliche Gerate GmbH Hand book. LC 5001, 1983.
- 9- Bird,T.A., Levene,C.I.: Lysyl oxidase: evidence that pyridoxal phosphate is a co factor. *Biochem Biophys. Res. Common.*, 108(3): 1172-1180, 1982.
- 10- Brownlee,M., Cerami,A., Vlassara,H.: Advanced glycosylation and product in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N.Eng.J.Med.*, 318(20): 1315-1321, 1988.
- 11- Brownlee,M., Vlassara,H., Cerami,A.: Nonenzymatic reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes*, 32:630-634, 1983.
- 12- Brownlee,M., Vlassara,H., Cerami,A.: Nonenzymatic glycosylation on the pathogenesis of diabetic complications. *Ann.Intern.Med.*, 101:527-537, 1984.
- 13- Bunn,H.F., Higgins,P.J.: Reactions of monosaccharides with proteins. Possible evolutionary significance. *Science*, 213:222-224, 1981.
- 14- Burnett,W., Eichner,R., Rosenbloom,J.: Correlation of functional elastin messenger ribonucleic acid levels and rate of elastin synthesis in the developing chick aorta. *Biochemistry*, 19(6): 1106-1111, 1980.
- 15- Burret,A.J., Mc Donald,J.K.: Mammalian proteases.Endopeptidases. Vol.1. Academic. Press. New York, 1980.
- 16- Candan,G.: Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri. Editör: Hate-mi,H., *Diabetes Mellitus*, 117-125, 1988.

- 26- Davis,N.R., Anwar,R.A.: On the mechanism of formation of desmosine and isodesmosine Cross-links of elastin. *J.Amer.Chem.Soc.*, 92:3778-3781, 1970.
- 27- Eble,A.S., Thorpe,S.R., Bagnes,J.W.: Nonenzymatic glucosylation and glucose dependent cross-linking of protein. *J.Biol.Chem.*, 258:9406-94112, 1983.
- 28- Eyre,D.R., Paz,M.A., Gallop,P.M.: Cross-linking in collagen and elastin. *Ann.Rev.Biochem.*, 53:717-748, 1984.
- 29- Fahrenbahc,W.H., Sandberg,L.B., Cleary,E.G.: Ultra structural studies on early elastogenesis. *Anal.Rec.*, 155:563-575, 1986.
- 30- Firat,P.A.: Nonenzymatic browning-products physiologic effects and metabolic transit in relations to chemical structure a review. *Diabetes*, 31:22-28, 1982.
- 31- Foster,J.A., Bruenger,E., Gray,W.R., Sandberg,L.B.: Isolation and amino acid sequences of tropoelastin peptides. *J.Biol.Chem.*, 248:2876-2879, 1983.
- 32- Foster,J.A., Mecham,R.P., Franzblau,C.: A high molecular weight species of soluble elastin. *Biochem.Biophys.Res. Commun*, 72: No.4, 1399-1406, 1976.
- 33- Foster,J.A., Rick,C.B., Fletcher,S., Karn,S.R., Desa,M.D., Oliver,T., Przybyla,A.: Elastin biosynthesis in chick embryonic lung tissue. Comparison to chick aortic elastin. *Biochemistry*, 20(12): 3528-3535, 1981.
- 34- Foster,J.A., Rich,L.B., Fletcher,S., Karr,S.R., Przybyla,A.: Translation of chick aortic elastin messenger ribonucleic acid. Comparison to elastin synthesis in chick aorta organ culture. *Biochemistry*, 19(5): 857-864, 1980.

- 35- Foster, J., Rich, C.B., Florini, J.R.: Insulin-like Growth factor I, Somatomedin, C., Induces the synthesis of Tropoelastin in aortic tissue. *Collagen Rel. Res.* 7:161-169, 1987.
- 36- Fromageot, H.P.M., Slusarezuk, M.S.: Removal of adsorbed elastase from partially digested elastin. *Biochem. J.*, 155:705-707, 1976.
- 37- Garlich, R.C., Muzer, J.S.: The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* 258:6142-6146, 1983.
- 38- Garlich, R.C., Muzer, J.S., Higgins, P.J., Bunn, H.F.: Characterization of glycosylated hemoglobins: relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins. *J. Clin. Invest.*, 71:1062-1072, 1983.
- 39- Gonen, B., Baenziger, J., Schunfeld, G., Jacobson, D., Farror, P.: Nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro effects on cell-interactive properties. *Diabetes*, 30:875-878, 1981.
- 40- Gotte, L., Stern, P., Elsdon, D.F., Partridge, S.M.: The chemistry of connective tissues. The composition of elastin from three bovine tissues. *Biochem. J.*, 87:344-351, 1963.
- 41- Grant, R.A.: Variations in the amino acid composition of aortic elastin from different species. *Brit. J. Exp. Path.*, 47:163-167, 1966.
- 42- Greenle, T.K., Ross, R., Hartman, J.L.: The fine structure of elastic fibers. *J. Cell. Biol.*, 30:59-71, 1966.
- 43- Guitton, J.D., Le Pape, A., Sizaret, P.Y., Muh, J.P.: Effects of in vitro N-glycosylation on type-I collagen fibrillogenesis. *Biosci. Rep.*, 1:945-954, 1981.

- 44- Hall,D.A.: The fibrous components of connective tissue with special reference to the elastic fiber. *Intern.Rev.Cytol.*, 8:211-256, 1959.
- 45- Hall,D.A., Czerkawski,J.W.: The reaction between elastase and elastic tissue. 4.Soluble elastins. *Biochem.J.*, 80:121-128, 1961.
- 46- Janoff,A., Scherer,J.: Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. VII. observations on mast cell-rupturing agents in different species. *Lab.Invest.*18:196-202, 1968.
- 47- Jimenez,S., Harsch,M., Rosenbloom,J.: Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 52, 106-114, 1973.
- 48- Kelly,R.E., Rice,R.V.: Abductin: A rubber like proetin from the internal triangular hinge ligament of pecten. *Science*, 155:208-210, 1967.
- 49- Kennedy,L., Ragnes,W.: Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes.An overview. *Dibatology*, 26:93-98, 1984.
- 50- Kirschenbaum,D.M.: Glycosylation of proteins: It's implications in diabetic control and complications. *Ped.Clin.North.Am.* 31(3):611-621, 1984.
- 51- Kohr,R.R., Cerami,A., Monniver,V.M.: Collagen aging in vitro by nonezymatic glycosylation and browning. *Diabetes*, 33:57-59, 1984.
- 52- Labella,F.S.: Studies on the soluble products released from purified elastic fibers by pancreatic elastase. *Arch.Biochem.Biophys.*, 93:72-79, 1961.
- 53- Labella,F.S., Vivian,S.: Amino acid composition of elastin in the developing human aorta. *Biochem.Biophys.Acta.* 133:189-194, 1967.

- 54- Lansing,A.I.: Chemical morphology of elastic fibers. Transsecond Conf. New York, 45-86, 1951.
- 55- Lloyd,D.J., Garrod,M.: The rubber like condition of the fibers of animal skin.J.Soc.Dyers.Col. Sympon Fibrous Proteins, 24-29, 1946.
- 56- Lowry,O.H., Rosebrough,N.S., Farr,A.L., Kandall,R.S.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275, 1951.
- 57- Means,G.E., Chang,M.K.: Non enzymatic glycosylation of proteins. Glycosylation and function changes. Diabetes, 31:1-4, 1982.
- 58- Mecham,R.P.: Effects of extracellular matrix upon elastogenesis. Connect. Tissue.Res., 8(3-4):241-244, 1981.
- 59- Nishiro,N., Powers,J.C.: Pseudomonas aeruginosa elastase. Development of a new substrate, inhibitors, and an affinity ligand. J.Biol.Chem., 255(8):3482-3486, 1980.
- 60- Oimomi,M., Nakamichi,T., Ohan,T., Sakai,M., Igaki,N., Hata,F., Baba,S.: Fructose related glycation. Diabetes Resarch and. Clinical practice., 7:137-139, 1989.
- 61- Özkök,E.: Elastinin nonenzimatik glikozillenmesinin 60 günlük inkübasyon süresince incelenmesi. Yük.Lis. Tezi, İstanbul, 1990.
- 62- Parker,M.K., England,J.D., Costa,J.D., Hess,R.C., Goldstein,D.E.: Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin Cein.Chem. 27(5): 669-672, 1981.
- 63- Partridge,S.M., Davis,H.F.: The chemistry of connective tissues. II.- Soluble protein derived from partial hydrolysis of elastin. Biochem.J., 61:11-21, 1955.



- 64- Partridge,S.M., Elsden,D.F., Thomas,J.: Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature*, 197:127-128, 1963.
- 65- Partridge,S.M., Elsden,D.F., Thomas,J., Dofma,A., Telser,A., Peillee,H.: Biosynthesis of the desmosine and iso desmosine cross-bridges in elastin. *Biochem.J.*, 93:30-33, 1964.
- 66- Partridge,S.M., Elsden,D.F., Thomas,J., Darfman,A., Telser,A., Peillee,H.: Incorporation of labelled lysine in to the desmosine cross-bridges in elastin. *Nature*, 209:399-400, 1966.
- 67- Peratz,M.F.: Regulation of oxygen affinity of hemoglobin. *Annv.-Rev.Biochem.*, 48:327-386, 1979.
- 68- Perejda,A.J., Zaragoza,E.J., Eriksen,E., Vitto,S.: Nonenzymatic glucosylation of lysyl and hydroxylysyl residues in type I and type II collagenes. *Collagen. Rel.Res.*, 4:427-439, 1984.
- 69- Quintarelli,G., Starcher,B.C., Vocaturo,A., Di Gianfilipo,F., Gotte,L., Mecham,R.P.: Fibrogenesis and biosynthesis of elastin in cartilage. *Connect.Tissue.Res.* 7(1):1-19, 1979.
- 70- Rawn,J.D.: *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers, burlington, North Carolina, 878\_887, 1989
- 71- Richards,A.N., Gies,W.J.: Chemical studies of elastin. Mucoïd and other proteïds in elastic tissue, with some notes on ligament extractives. *Am.J.Physiol.*, 7:93-134, 1902.
- 72- Robert,L., Robert,B., Robert,A.M.: Molecular biology of elastin an related to aging and atherosclerosis. *Exp.Geront.*, 5:339-356, 1970.
- 73- Rosenberg,H., Modrak,J.B., Hassing,J.M.: Glycosylated collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91:498-501, 1979.

- 74- Ross,R., Bornstein,P.: Elastic fibers in the body. *Sci. Am.* 224:44-50, 1971.
- 75- Ross,R., Burnstein,P.: The elastic fiber. I.The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J.Cell.Biol*, 40:366-381, 1969.
- 76- Rosenbloom,J.: Elastin: An overview. *Methods in Enzymology*, 144:172-196, 1987.
- 77- Rosenbloom,J., Cywinski,A.: Inhibition of proline hydroxlation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS lett.*, 65(2):246-250, 1976.
- 78- Rosenbloom,J., Harsch,M., Jimenez,S.: Hydroxyproline content determines the denaturation temperature o chick tendon collagen. *Arch.Bi-ochem.Biophys.*, 158:478-484, 1973.
- 79- Sandberg,L.B., Soskel,N.T., Leslie,J.G.: Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states. *N.Eng.J.Med.* 304(10), 565-579, 1981.
- 80- Sandberg,L.B., Weissman,N., Gray,W.R.: Structural features of tropo elastin related to the sites of cross-links in aortic elastin. *Biochemistry*, 10:52-56, 1971.
- 81- Sandberg,L.B., Weissman,N., Smith,W.: The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta. *Biochemistry*, 8:2940-2945, 1969.
- 82- Sandberg,L.B., Zeikus,R.D., Coltrain,I.M.: Tropoelastin purification from copper-deficient swine: a simplified method. *Biochim. Biophys. Acta.*, 236:542-545, 1971.
- 83- Saunders,N.A., Grant,M.E.: The secretion of tropoelastin by chick embryo artery cells. *Biochem.J.*, 230:217-225, 1985.

- 84- Schnider, S.L., Kohn, R.R.: Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J.Clin.Invest.* 67:1630-1635, 1981.
- 85- Sear, H.J., Kewley, M.A., Jones, J.D., Grant, M.E., Jackson, D.S.: The identification of glycoproteins associated with elastic -tissue microfibrils. *Biochem.J.*, 170:715-718, 1978.
- 86- Serafini, A., Ventrella, G., Field, M.J., Hinnil, S., Griffiths, R.: Characterization of a structural glycoprotein from bovine ligamentum nuchae exhibiting dual amine oxidase activity. *Biochemistry*, 20(19):5424-5429, 1981.
- 87- Shadwick, R.E., Gosline, J.M.: Elastic arteries in vertebrates: Mechanics of the octopus aorta. *Science*, 213(4509): 759-761, 1981.
- 88- Siegel, R.C.: Lysyl oxidase. *Int.Rev.Connect. Tissue Res.*, 8:73-118, 1979.
- 89- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohnz, A.: Endocytosis. *Annv.Rev.Biochem.*, 46:669-722, 1977.
- 90- Smith, D.W., Brown, D.M., Carnes, W.H.: Preparation and properties of salt soluble elastin *J.Biol.Chem.*, 247:2427-2432, 1972.
- 91- Smith, D.W., Weissman, N., Cornes, H.: Cardiovascular studies on copper deficient swine. XII Partial purification of a soluble protein resembling elastin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31:309-315, 1968.
- 92- Snider, R., Faris, B., Verbitzki, U., Mascaritolo, R., Salcedo, L.L., Franzblou, C.: Elastin biosynthesis and cross-link formation in rabbit aortic smooth muscle cell cultures. *Biochemistry*, 20(9):2614-21618, 1981.

- 93- Stevens, V.J., Rovzer, L.A., Monnier, U.M., Cerami, A.: Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:2918-2922, 1978.
- 94- Sullivan, K.A., Kagan, H.M.: Lysyl oxidase preparation and role in elastin biosynthesis. *Methods Enzymol.*, Pt: A: 637-650, 1982.
- 95- Sykes, B.C., Partridge, S.M.: Salt soluble elastin from lathyrctic chicks. *Biochem. J.*, 141(2): 567-573, 1974.
- 96- Taselli, D., Salcedo, L.L., Oiver, P., Franzblau, C.: Formation of elastic fibers and elastin in rabbit aortic smooth muscle cell cultures. *Connect. Tissue Res.*, 8(3-4):231-239, 1981.
- 97- Thomas, J., Elsdon, D.F., Partridge, S.M.: Degradation products from elastin: Partial structure of two major degradation products from the cross-linkages in elastin. *Nature*, 200:651-652, 1963.
- 98- Urny, D.W., Long, M.M.: Conformations of the repeat peptides of elastin in solution: an application of proton and carbon-13 magnetic resonance to the determination of polypeptide secondary structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 4(1):1-45, 1976.
- 99- Vitto, J., Haffman, H.D., Prockop, D.J.: Synthesis elastin and procollagen by cells from embryonic aorta. Differences in the role of hydroxyproline and the effects of proline analogs on the secretion of the two proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173(1): 187-200, 1976.
- 100- White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R.: Principles of Biochemistry. Altıncı basım, N.Graw.Hill. Inc. s:1143-1145, 1978.
- 101- Whiting, A.H., Sykes, B.E., Partridge, S.M.: Isolation of salt soluble elastin from ligamentum nuchae of copper -deficient calf. *Biochem. J.*, 141(2):573-575, 1974.

- 102- Willams, S.K., Devenny, J.J., Bitensky, M.W.: Micropinocytic ingestion of glycosylated albumin by isolated microvessels: Possible role in pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 78:2393-2397, 1981.
- 103- Witztum, J.C., Mahoney, E.M., Branks, M.J.: Nonenzymatic glucosylation of low density lipoprotein alters biologic activity. *Diabetes*, 31:283-291, 1982.
- 104- Witztum, J.L., Steinbrecher, U.P., Fisher, M., Kseaniemi, A.: Nonenzymatic glucosylation of homologous low density lipoprotein and albumin renders them immunogenic in the guinea pig. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 80:2757-2761, 1983.
- 105- Yoon, K., Davidson, J.M., Boyd, C., May, M., Luvalle, P., Ornstein, N., Smith, J., Indik, Z., Ross, A., Golub, E.: Analysis of the 3' region of the sheep elastin gene. *Arch. Biochem. Biophys.*, 241(2): 684-691, 1985.
- 106- Yue, D.K., Mc Lennan, S., Delbridge, L., Handelsman, D.J., Reeve, T., Turtle, J.R.: The thermal stability of collagen in diabetic rats: Correlation with severity of diabetes and non-enzymatic glycosylation. *Diabetologic*, 24:282-285, 1982.

## ÖZGEÇMİŞ

1959 yılında İskenderun'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da tamamlayarak, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi'nde yüksek tahsilime başladım. Buradan mezun olduktan sonra İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık öğrencisi olarak görev aldım. 1986 yılında Biyokimya uzmanı oldum ve aynı yıl Doktora çalışmalarına başladım. 12.6.1989 tarihinde doktora yeterlilik sınavını verdim. İngilizce bilmekteyim.

**Y. G.**  
**Yükseköğretim Kurulu**  
**Dokümantasyon Merkezi**