

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

5254

STZ İLE DİYABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDAN
ELDE EDİLEN DİŞETİ BAĞ DOKUSU VE KUYRUK TENDON
KOLLAGENLERİNİN NONENZİMATİK GLİKOZİLASYONUNUN
İNCELENMESİ VE GLİKOZİLLENMİŞ HEMOGLOBİN İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

Yüksek Kimya Mühendisi Aysen Yarat

Danışman
Doç.Dr.Nesrin Emekli
Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

İstanbul - 1988

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dişhekimliği Anabilim Dalı Başkanı

TEŞEKKÜR

Fakültemizde rutin ve araştırmaya yönelik çalışmaların yapılabileceği bir biyokimya laboratuvarının kurulmasına dolayısıyla bu çalışmayı yapabilme imkanını sağlayan Sayın Dekanımız Prof.Dr.İlhan Çuhadaroğlu'na, çalışmamın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında her türlü teşvik, katkı ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Doç.Dr.Nesrin Emekli'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuvarının her türlü araç ve gereçlerinden yararlanmama izin veren Sayın Doç.Dr.Turay Yardımcı ve şahsında Biyokimya Birimi değerli çalışanlarına, aynı şekilde Pakize İ. Terzi Kliniği Biyokimya Laboratuvarı şefi Uzman Nezh Hekim ve şahsında biyokimya laboratuvarında çalışan arkadaşlara, dişeti dokusunun alınmasında yardımını gördüğüm Periyodontoloji birimi Arş.Grv.Ülkü Noyan'a ve istatistiksel hesaplamalarımı M.Ü.Bilgisayar Eğitim Müdürlüğünde yapmama imkan sağlayan Sayın Prof.Dr.Ateş Vuran ve Yrd.Doç.Dr.Ahmet Orkan'a teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
I- GENEL BİLGİLER	
1. BAĞ DOKUSU	6
a) Yapısı	6
Aramadde	7
Fiberler	9
Hücreler	11
b) Tipleri	17
c) Fonksiyonları	19
d) Hastalıkları	20
2. KOLLAGEN	21
a) Yapısı	21
b) Biyosentezi	31
c) Yıkılışı	38
d) Turnover'ı	41
e) Kollagen Metabolizma Bozuklukları	41
3. DİŞETİ KOLLAGENİ	43
4. NONENZİMATİK GLİKOZİLASYON VE ÖNEMİ	50
5. KOLLAGEN-TROMBOSİT İLİŞKİSİ	61
6. DENEYSSEL DİYABET	65
II- ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	
1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	70
2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER	70
3. DENEY HAYVANLARIN ÖZELLİKLERİ VE BESLENMELERİ	71
4. HEMOGLOBİN TAYİNİ	72
5. KAN ŞEKERİ TAYİNİ	74
6. HEMOGLOBİN GLİKOZİLASYONUNUN TAYİNİ	74
7. KUYRUK TENDON KOLLAGENİNİN ELDESİ	78
8. DİŞETİ KOLLAGENİNİN ELDESİ	80
9. HİDROLİZATIN HAZIRLANMASI	81
10. HİDROKSİPROLİN TAYİNİ	82
11. KOLLAGENİN NONENZİMATİK GLİKOZİLASYONUNUN TAYİNİ	85
12. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ	87
13. GLİKOPROTEİN BOYAMASI	93
14. DAVIS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ	95
15. KOLLAGEN İLE TROMBOSİT AGREGASYONU	98
III- BULGULAR	100
IV- TARTIŞMA	123
V- ÖZET	136
VI- SUMMARY	138
VII- KAYNAKLAR	141
VIII- EKLER	165
IX- ÖZGEÇMİŞ	168

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet; özellikle bazal membranlarda ve hücreler arası matrikslerde mevcut olan makromoleküllerin metabolizmasında önemli değişiklikler meydana getirir(168). Diabetin kollagen metabolizmasına etkisini araştıran çeşitli çalışmalar, bütün bağ dokularının cevabının aynı olmadığını, başka bir deyişle, diyabetin bazı dokularda net kollagen artışına, bazılarında ise net kollagen kaybına sebep olduğunu ileri sürmektedir(157).

Diyabetik insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar; bir taraftan kollagen fiberlerin sertleştiğini(8,168), çözünürlüğünün ve elastikiyetinin azaldığını(64,65,118,168, 192) gösterirken; diğer taraftan enzimatik yıkıma karşı dayanıklılığın(65,93,160,168), termal stabilitenin(30,168,191, 192,193), çapraz bağlanmaların(65,74,107,168,193), nonenzimatik glikozilasyonun(18,29,87,104,118,152,168,191,193) ve trombosit agregasyonu meydana getirme yatkınlığının arttığını(105,106,1068,192) göstermektedir.

Kollagende meydana gelen bu değişikliklerin mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Fakat kollagen sentezi ve yıkılması ile ilgili çeşitli mekanizmalar ortaya atılmıştır. Kollagen molekülünde görülen bu tür değişimler, damar geçirgenliği, glomerular süzme ve yaraların iyileşmesi gibi olayları etkileyebilmektedir. Şimdiye kadar yapılan gözlemler diyabetik kişilerde bir taraftan kollagenin sertleşmesi

sonucunda eklem hareketlerinin azaldığını diğer taraftan mikrovasküler hastalıkların geliştiğini göstermektedir(168,193).

Günümüzde diyabet, bazal membran fonksiyonlarının ve yapısının önemli ölçüde değiştiği bir hastalık olarak kabul edilir. Bilindiği gibi bu membranlar kollagen ve kollagen olmayan proteinlerden oluşur. Fakat buradaki proteinlerin çoğu kollagendir. Kollagen tipleri ise IV ve V'dir. Kollagen tip IV'ün miktarı daha fazladır(77). Diyabette bazal membranlarda kollagen sentezinin, tip IV ve tip V'in, arttığı gösterilmiştir. Kollagen tip IV'ün disülfid bağı ile bağlı kısmına 7S-kollageni de denilmektedir(170). Bu kısım bazal membranlardan protoelizle ayrılabilir(149). Bazal membranlardan ayrılan, serum ve diğer biyolojik sıvılara karışabilen 7S-kollageni radyoimmünassay ile bu sıvılarda ölçülebilmektedir(148). Serum 7S-kollagen konsantrasyonunun ve bazal membran sentezinin deneysel diyabette korrelasyonlu olarak önemli derecede arttığı gösterilmiş ve serum 7S-kollageninin bazal membranlardaki tip IV Kollageninin sentezindeki değişimleri yansıtabileceği ileri sürülmüştür(77).

Diyabetli kişilerde glomerular bazal membran kollageninin kütlesi artmış, glomerul normalden daha fazla ağırlaşmış ve kalınlaşmıştır. Hidroksiprolin miktarı da artmıştır. STZ ile diyabet yapılmış sıçanlarla bu sonuçlar teyit edilmiştir. Deneysel diyabette böbrek ağırlığı artarken, vücut ağırlığı azalmıştır. kollagen biyosentezinde translasyon sonrası görev alan enzimlerin spesifik aktiviteleri artmıştır. Bazı çalışmalarda ise azalma görülmüştür(168).

Diyabetin periodontal hastalığın şiddetini arttırdığı ve ağız boşluğundaki yaraların iyileşmesini geciktirdiği görülür. Dişeti kuru ağırlığının % 30-50'sini oluşturan kollagen, sert ve yumuşak periodontal dokuların asıl proteindir. Periodontal hastalıkların gelişmesinde kollagenin bozuk organizasyonu ve kollagen bozunması önemli ölçüde rol oynar. Pe-

riodontal hastalık ve diyabetes-mellitus arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli çalışmalarla, diyabetik kişilerde özellikle yaşlılarda periodontal yıkım şiddetinin arttığı gösterilmiştir(21,123).

Alloksanla diyabet yapılmış sıçanların dişetinde asidde çözünen kollagen konsantrasyonunun azaldığı, serum ve idrardaki hidroksiprolin konsantrasyonunun arttığı, bu değişimlerin yaşlı hayvanlarda daha belirgin olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir(145).

Deneyssel olarak oluşturulan iltihap, normal sıçanların dişetinde çözünür olmayan kollagen miktarında azalmaya neden olurken diyabetik sıçanların dişeti kollageninde bir azalmaya sahip olmadığı görülmüştür(64). Diyabetli kişilerde sağlıklı kişilerden farklı olarak ağız kuruluşunun görülmesi, tükürük salgılanmasının azlığına bağlıdır(45). Yapılan araştırmalar diyabetlilerde submandibular bezlerdeki kollagen miktarının da azaldığını göstermiştir(91).

Hiperglisemi esnasında glikozun insüline bağımlı olmayan dokularda birikmesi ve fazla kullanılması zararlı etkiler oluşturabilmektedir(182). Glikoz nonenzimatik reaksiyonla proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin de değişmesine sebep olmaktadır(87,88,107,112,119,182). Bu mekanizmaya bağlı olarak hemoglobinin nonenzimatik glikozillenmiş türevleri olan minor hemoglobinlerin bulunması, uzun süreli glisemi kontrolünde önemli bir indeks olarak kabul edilir(17, 56,63,75,84,87,92,95,127,166,171,182,185). Bu ise klinik biyokimya yönünden yararlı bir reaksiyondur. Fakat araştırmalar yalnız hemoglobinin değil, kanda ve dokularda bulunan birçok proteinlerin de nonenzimatik reaksiyonla glikoz bağladıklarını göstermektedir. Böyle bir glikozillenmenin proteinlerin yapılarında ve fonksiyonlarında değişimlere neden olabileceği ve buna bağlı olarak, çeşitli klinik komplikasyonların ortaya çıkabileceği ileri sürülmektedir(87,182). Örneğin; lens gli-

koz alımında insüline bağımlı değildir. Dolayısıyla yüksek konsantrasyonda glikoza maruz kalır. Diyabette katarakt oluşum hızının arttığı, yaşlı ve kataraktlı lenslerde sarı kahverenkli floresans veren ve çok çapraz bağ ihtiva eden proteinler oluştuğu görülmüştür. Yapılan araştırmalar ise, bunun sebebinin proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu olduğunu ortaya koymuştur(87,182,124).

Nonenzimatik glikozilasyon reaksiyonu ile meydana gelen ketoamin oldukça kararlı bir bileşik olup, proteinin yaşam süresi boyunca ona eşlik eder. Kollagen yaşam süresi en uzun olan proteinlerden biridir. Devamlı olarak vasküler ve ekstravasküler sıvılarda bulunan glikozla karşı karşıyadır. Ortamdaki glikozla, kollagenin lizin ve hidroksilizin gibi amino asitlerinin serbest amino gruplarının bloke edilmesi, yani nonenzimatik reaksiyonla glikozun kollagene bağlanması, yapısal değişikliğe, buna bağlı olarak da fonksiyon bozukluklarına neden olur(87,182). Kollagende meydana gelen değişiklikler çeşitli fizyolojik olayları etkileyebilir(31,87,104,107,113,114,160,178,182,191,192,193).

Histolojik ve histokimyasal çalışmalar dişetinın kollagen içeriği fazla olan fibröz bir doku olduğunu ve kollagen miktarının yaşla arttığını göstermiştir. Ayrıca dişeti kollagen turnover hızı da diğer dokulara göre yüksektir(69,99,162).

Deneysel veriler insanlarda ve sıçanlarda diyabetin doku kollagenaz aktivitesini arttardığını göstermektedir(66). STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların derilerinde kollagen metabolizmasının arttığı ve dişetinde yeni oluşmuş kollegenin yıkılmasının hızlandığı gözlenmiştir(158,159). Buna karşın, barsak ve glomerular bazal membranında kollagen kaybı yerine kollagen birikmesi görülmüştür(157,158).

Biz de bu bilgilerin ışığı altında, dişeti bağ dokusu kollageninin diyabetli deney hayvanlarında glikozilasyon yönünden ne gibi değişimler gösterebileceğini araştırmak istedik. Yaptığımız literatür taramasında dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Ağız ortamı ile ilgili olarak sadece submandibular kollagenin nonenzimatik glikozilasyonu araştırılmıştır(118).

Amacımız diyabetli kişilerin dişeti bağ dokusu kollageni ile diğer doku kollagenleri arasında nonenzimatik glikozilasyon yönünden bir farklılık olup olmadığına bilimsel yönden açıklık getirmek ve bu parametreleri kontrol grubu ile karşılaştırmaktır.

Bu çalışmamız, bir taraftan diyabetli olguların dişeti ve kuyruk kollagenin yapısına bilimsel açıklık getirirken diğer taraftan uygulama açısından da önem taşımaktadır. Çünkü çalışma esnasında amacımıza ulaşmak için kuyruk tendonundan elde ettiğimiz kollagen, trombosit agregasyonu için önemli bir test materyelidir. Bu da ülkemize ticari bir kazanç sağlayabilir.

GENEL BİLGİLER

1- BAĞ DOKUSU

a) Yapısı

Bağ dokusu, bütün vücutta yaygın halde bulunan diğer doku ve organları destekleyen veya bağlayan çok önemli bir dokudur. Bir dokunun kan dolaşımı ve fonksiyon yapan paraneşimal hücreleri arasında yer alır(76).

Bağ dokusunun çok çeşitli fonksiyonları vardır. En dikkati çeken yapısal fonksiyonudur. Hücreleri ve organları çevreleyen kapsüller, tendonlar, ligamentler, organlar arası boşlukları dolduran doku, bağ dokusundan oluşmuştur. Kemik, diş ve kırık ise bağ dokusunun özel şelidir(86,99,181, 189).

Bağ dokusu embriyonik dokunun her üç tabakasından özellikle ortadaki mesoderm'den türeyen mesenşimden gelişir. Mesenşim, bol miktarda amorf intersellular madde içinde gömülü dallanmış hücreler olarak karakterize edilir. Mesenşimal hücrelerin iyi gelişmiş çekirdekçiği ve kromatin ağı olan oval çekirdekleri vardır. Üç ana germ yaprağından biri olan mesenşim fetusun oluşumu boyunca gelişen organları çevreleyerek yayılır(86,180,189).

Bütün bağ dokuları aynı temel bileşenlerden oluşur; Hücreler, fiberler ve ara madde (ground substance). Fakat bu bileşenler buldukları yerin özelliğine ve fonksiyonuna göre değişen miktarda mevcuttur. Bağ dokusunun ekstrasellular matriksini ise hücreler hariç, yani fibriller, ara madde ve doku sıvısı oluşturur(86,99,180).

Ara madde; renksiz, geçirgen ve homojendir. Bağ dokusunun fiberleri ve hücreleri arasındaki boşluğu doldurur. Vizkozdur. Yağlayıcı madde gibi davranır. Yabancı maddelerin doku içine nüfuzunu önleyen bir engel olarak rol oynar. Fazla miktarda su ihtiva eder. Elektron mikroskopunda granüler halde görünür. Ara madde de başlıca iki bileşen sınıfından oluşur. Glikoz aminoglikanlar (GAG) ve yapısal proteinler(86, 180).

GAG'lar uronik asit ve hegzaminden oluşan tekrarlanan disakkarid birimlerinden meydana gelmiş lineer bir polisakkarittir. Hegzamin, glikozamin veya galaktozamin, uronik asit ise glukuronik asit veya iduronik asit olabilir. GAG'lar, Hyaluronik asit hariç bir proteine (kollagen olmayan) bağlanarak proteoglikan moleküllerini oluştururlar. Kıkırdakta proteoglikan moleküllerinin hyaluronik aside bağlı olduğu gösterilmiştir. Böylece daha büyük moleküllü proteoglikan agregatlarını oluştururlar. Çoğu proteoglikanlar, karbonhidrat kısımlarındaki hidroksil, karboksil ve sülfat gruplarının fazla olması nedeniyle hidrofilitirler. ve dolayısıyla polianyon gibi davranırlar. Proteoglikanlarda karbonhidrat kısmı çoğunluğu teşkil eder ve molekül ağırlığının % 80-90'ını oluşturur. Proteoglikanlar çok sayıda kationun (genellikle sodyumu(86) ve Ca^{+2} (189) bağlayabilirler. Molekül etrafında kalın su tabakası vardır. Fazla miktarda su bağlarlar. Böylece dokunun su metabolizmasını düzenlerler. Proteoglikanlar, proteinle birlikte başlıca dermatan sülfat, kondroitin sülfat ve heparan sülfat ihtiva ederler. Bunların dışında keratan sülfat ve hyalunorik asit ihtiva edenler de vardır(86,180).

Dermatan sülfat; en çok deride, tendonda ligamentlerde, fibroz kıkırdaklarda, akciğer bağ dokusunda ve kollagen tip I fiberleri ihtiva eden yapılarda bulunur(86,180). Az miktarda dişetinde de olduğu ileri sürülmektedir.

Kondroitin sülfat, kollagen tip II'ce zengin olan elastik kıkırdak ve hyalinde(86) kemik ve kan damarlarında bulunur. Dişetinde, deride ve korneada da olduğu gösterilmiştir(180).

Heparan sülfat, kollagen tip III ihtiva ettiği düşünülen retiküler fiberler ile ilgili görülür(86). Daha çok yumuşak bağ dokusunda(99), aortta, karaciğer ve akciğerde bulunmuştur(180). Dişetinde ise az miktarda vardır.

Keratan sülfat, Kornea, kıkırdak ve nükleusdan ekstre edilmiştir(180). Ayrıca sıçan ve tavşanların dişlerinde bulunduğu gösterilmiştir(99).

Hyaluronik asit, kıkırdak, kan damarları, deri, göbek kordonunda, dişetinde bulunur. Sinoviyal sıvının ve gözün camsı cisminin esas bileşenidir.

Proteoglikanların sentezi endoplazmik retikulumda protein sentezi ile başlar. Glikozilasyonu ise retikulumda başlar, golgide tamamlanır. Golgide sülfatasyon da olur. Proteoglikan sentezini, fibroblastlar, kondroblastlar, osteoblastlar, sinoviyal hücreler, yumuşak adele hücreleri, mast hücreleri vs yaparlar. Proteoglikanların bozunması lizozomal enzimlerin varlığına bağlı olarak çeşitli hücre tiplerinde yapılır. Proteoglikanların turnover'ları hızlıdır. Lizozomal enzimlerin yetersizliği, GAG'ların bozunmalarının bloke edildiği ve bu bileşiklerin dokularda birikmesi ile ilgili çeşitli hastalıklar mevcuttur.

GAG'lar bağ dokusunda yağlama (kayganlık) fonksiyonuna sahiptirler. Asıl fonksiyonu yapısaldır. Yapıları birbirine bağlamak için kollagen liflerle iş görür(86,99,180).

Yapısal glikoproteinler, karbonhidrat ihtiva eden proteinlerdir. Proteoglikanlara ters olarak esas protein olup az miktarda dallanmış karbonhidrat içerirler. Çeşitli glikoproteinler izole edilmiştir. Bunlar yalnız komşu hücrelerle ilişkilerde değil, hücrelerin substratlarına yapışmasında da önemli rol oynarlar. Glikoproteinler ayrıca kollagen liflere hücrelerin bağlanmasında yardımcı olurlar. Birer glikoprotein olan fibronektin deriden, kondronektin kıkırdaktan, laminin ise membrandan izole edilmişlerdir.

Bağ dokusunda ara maddeye ilaveten çok az miktarda doku sıvısı diye adlandırılan sıvı vardır. Bileşimi kan plazmasına benzer. Doku sıvısı az miktarda düşük molekül ağırlıklı plazma proteinlerini de ihtiva eder. Bu proteinler kanın hidrostatik basıncı nedeniyle kapiler duvardan geçerler. Normal durumlarda doku sıvısının miktarı önemsizdir(86).

Fiberler

Bağ dokusunun başlıca üç tip fiber'i vardır. Kollagen fiberler, retiküler fiberler ve elastik fiberler. Bilinen bu üç fiber dışında birde oksitalan (oxytalan) fiberlerden bahsedilir. Oksitalan fiberlerin kimyasal bileşimi henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. kollagen fiberlerin yığınları arasında yer aldığı bulunmuştur. Elastik fiberlere benzerler. Kollagen ayrışması sonucunda arttıkları ileri sürülmüştür(70, 99).

Kollagen ve retiküler fiberler kollagen proteininden, elastik fiberler ise başlıca elastinden oluşurlar. Bu fiberler farklı bağ dokularında farklı olarak dağılmış haldedirler. Miktarca fazla olan fiber dokuya belirli spesifik özellikler kazandırır(86).

Retiküler Fiberler; çapları 0.5 ve 2 nm arasında değişen oldukça ince fiberlerdir. Gümüş tuzları ile kolayca siyaha boyanırlar. Gümüş tuzlarına karşı affinitelerinden dolayı argirofilik fiberler de denir. PAS pozitiflerdir. Pas pozitif ve argirofilik olmaları çok sayıda glikoprotein ihtiva ettiklerini düşündürür. Retiküler fiberler gevşekçe yanyana gelmiş ortalama 45 nm incelikteki fibrillerden oluşmuşlardır. Fibriller arası bağlar glikoprotein ve proteoglikanlarla sağlanır. Retiküler fiberler özellikle yumuşak adelede, endoneuriumda ve hematopoetik organların (dalak, lenf nodülleri, kemik iliği) kafesinde çok bulunur. Paraneşimal organların (karaciğer, böbrek, endokrin bezler) çevresinde de ağ oluşturur. Embriyogenez, iltihap olayları, iyileşme esnasında bağ dokuları fazla miktarda retiküler fiberlere sahiptir. Fakat bunlar sonradan düzenli kollagen fiberlerle yer değiştirirler. Retiküler fiberlerin küçük çaplı ve gevşek yapıda olması arterler, dalak, karaciğer uterus ve barsak adele tabakaları gibi hacim ve şekil değişikliğine maruz kalan organlarda esnek bir ağ meydana getirirler. Yakın zamana kadar retiküler fiberler kollagen fiberlerin olgunlaşmamış şekli olarak düşünülmüştür. retiküler fiberlerin biyokimyasal, morfolojik, fonksiyonel ve patolojik özellikleri kendilerine özgüdür(86, 99).

Elastik Fiberler; kauçuğa benzer özelliklere sahiptir. Uzunluklarının tam 1 veya 1.5 katı gerilmeye dayanırlar. Çekme kuvveti kalkınca tekrar eski haline dönerler. Kollagen fiberlerden daha ince ve daha gergindirler. Dallanma yaparak düzgün olmayan bir ağ oluştururlar. Tazeyken ve çok miktarda sarı renklidirler. Elastik fiberler, gerilmeye ve çeşitli kuvvetlere maruz kalan dokularda örneğin, arterlerde, ses tellerinde, plevrada, trakeada, bronşlarda, bazı ligamentlerde, deride vs bulunur(86,180).

Elektron mikroskopu ile incelemeler, elastik fiberlerin 2 bileşenden; fibriller halinde agregate olan 110 \AA çapın-

daki mikrofibriller ve amorf bileşen olan elastinden teşkil ettiğini göstermiştir. Elastin, elastik fiberlerle aynı şey değildir. Fakat fiberlere elastik özelliği veren maddedir. Bu fiberlerde elastin mikrofibriller zarfı ile çevrilidir. Embiryogenezis esnasında önce sadece mikrofibrillerden oluşmuş fiberler meydana gelir. Zamanla elastin komponenti artar. Yapılan araştırmalar, mikrofibrillerin glikoproteinlerden meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır.

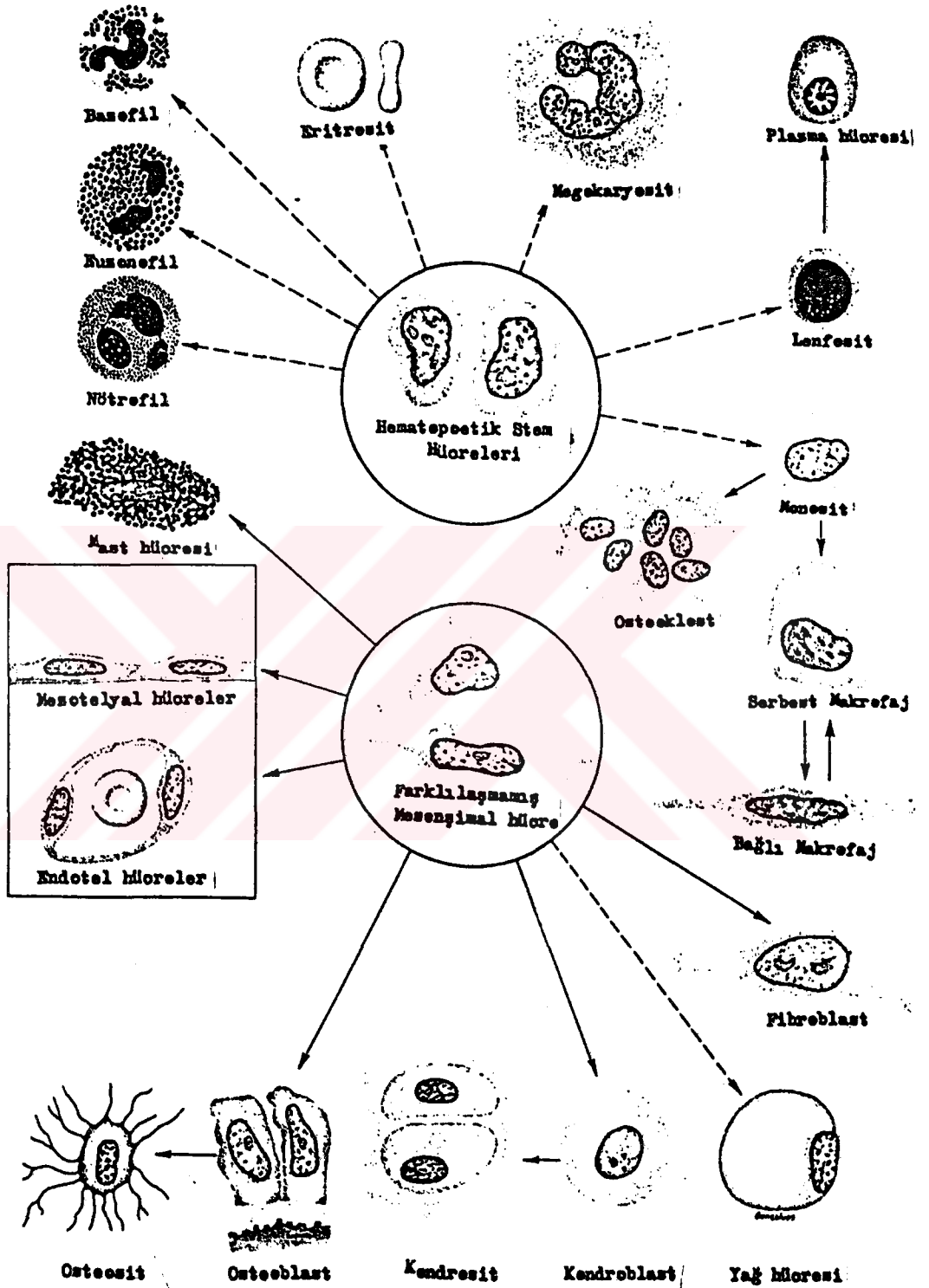
Elastin proelastin olarak salgılanır. Molekül ağırlığı 76.000 civarındadır. Polimerize olarak elastin adı verilen amorf, kauçuk benzeri sklero proteini meydana getirir. Elastin kaynamaya, seyreltik asit ve alkali ekstraksiyonlara dayanıklıdır. Tripsinle parçalanmaz sindirilmez. Bu dayanaklılığı polar olmayan hidrofobik bağlanmalarla stabilize edilen 3. ve 4.cül yapısından dolayıdır. Bu elastinin lipidlere karşı affinitesini açıklar. Pepsin pH 2'de elastin üzerinde yavaş etki eder. Fakat pankreatik enzim olan elastaz ile kolayca hidroliz olur. Elastin kollagen gibi glisin ve prolince zengindir. Fakat daha çok miktarda valin ve alanin ihtiva eder. Kollajenden farklı olarak polar olmayan hidrofobik amino asitler ihtiva eder. hidroksilizin ihtiva etmez çok az miktarda hidroksiprolin ihtiva eder. Elastinde kollajende olmayan desmosin ve izodesmosin vardır. Bu iki amino asit kovalent çapraz bağların oluşmasında yardımcı olurlar. Elastin fiberler, fibroblastlar ve yumuşak adele hücreleri tarafından sentez edilirler(76,86,99,180,189).

Hücreler

Bağ dokusunun fibroblast adipoz ve mast hücreleri gibi bazı hücreleri oluştuğu bölgede kalırlar. Fakat lökosit gibi diğer bazı hücreleri başka bölgelerden geçici zaman için gelen hücrelerdir. Bağ dokusu hücreleri (Şekil 1) ve bunların fonksiyonları Tablo 1'de özetlenmiştir.

TABLO 1- Bağ Dokusu Hücrelerinin Fonksiyonları(86)

HÜCRE TİPİ	ASILI ÜRÜNÜ VEYA AKTİVİTESİ	ASIL FONKSİYONU
Fibroblast Kondroblast Osteoblast Odontoblast	Fiberler ve ara madde üretimi	Yapısal
Plazma Hücreleri Lenfositler Eosinofiller	Antikor (humoral immünite) ve İmmüno Komponent Hücrelerinin (hücre sel immünite) üretimi,	İmmüno lojik
Makrofajlar Nötrofiller	Bakteri ve yabancı maddelerin fagositozu	Savunma
Mast hücreleri Bazofiller	Farmakolojik aktif maddelerin serbestleştirilmesi	Farmakolojik aktif maddelerin bırakılması
Adipoz Hücreleri	Nötral yağların depolanması, ısı üretimi	Enerji deposu



ŞEKİL 1- Bağ dokusu hücrelerinin şematik gösterilişi (noktalı oklar, ara basamaklar olduğunu gösterir)(86).

Fibroblastlar; bağ dokusunda en çok bulunan hücrelerdir. Ara maddenin ve fiberlerin sentezinden sorumludurlar, iki morfolojik tipi vardır. Sentetik aktiviteli genç fibroblastlar ve yaşlı fibroblastlar. Bazı histolojistler fibroblast terimini genç fibroblastlar için, fibrosit terimini de yaşlı fibroblastlar için kullanırlar.

Fibrositler hareketsizdir. Ekstrasellular matriksde dağınık halde bulunurlar. Genç fibroblastlardan küçüktürler ve iğ şeklindedirler. Nükleusları daha küçük, daha koyu ve uzundur. Stoplazmaları asidiktir. Endoplazmik retikulum ve golgi cihazları daha az gelişmiştir. Nükleusları oval ve geniştir. Hafif boyanan iyi kromatin ağılıdır. Belirli nükleusları vardır. Stoplazmaları endoplazmik retikulum bakımından zengindir. Golgi aygıtı iyi gelişmiştir. Fibrositler uygun şekilde uyarılınca fibroblast haline dönerler ve tekrar aktifleştirilirler. Bu durum iyileşen yaralarda görülür. Fibroblastların bağ dokusunun farklı moleküllerini sekresyon hızı, yaşa veya hormonal etkiye göre değişebilir. Yetişkinlerde bağ dokusundaki fibroblastlar nadiren bölünmeye uğrarlar. Mitoz sadece, organizma ilave fibroblast istediğinde, örneğin bağ dokusu hasar görünce olur(86,180).

Makrofajlar; bölünerek monositleri oluşturan kemik iliğindeki ön hücreden türeler. Monositler kanda bulunurlar. Bağ dokusuna gelen monositler makrofaj adını alır. Makrofajlar bütün organlarda mevcuttur. Doku makrofajları lokal olarak çoğalabilirler. Mononükleer fagositik sistem adı verilen diffuze sistemi oluştururlar. Mononükleer fagositler fonksiyonel aktivitelerinin durumuna ve buldukları dokuya göre morfolojik özelliklere sahiptir. Pileli, çıkıntılı, çentikli düzgün olmayan yüzey ve fagositik ve pinositik aktiviteleri ile karakterize edilirler. İyi gelişmiş golgi aygıtı, birçok lizozom, kaba endoplazmik retikulumları vardır. Mono-

sitten makrofaja transformasyonunda protein sentezinde bir artış ve hücrede büyüme vardır. Golgi aygıtı sayısında da artış olur. Oval veya böbrek şeklinde nükleusları vardır. Nükleus eksentrik olarak yerleşmiştir. Makrofajlar uzun yaşarlar. Bir dokuda aylarca kalabilirler. Uygun bir uyarı ile bu hücreler hacimlerini arttırır veya birkaçı multi nüklear dev hücreleri oluşturmak için yapışabilirler. Dev hücreler sadece patolojik durumlarda bulunur.

Makrofajların asıl fonksiyonu partikülleri içine almak ve lizozomlarla parçalamaktır. İçine alma pinositoz veya fagositozla olur. Makrofajlar ayrıca vücudun immun sistemine de katılırlar. Bu hücrelerin immun cevabı arttırıcı etkisini gösteren deliller vardır. Bakteri, virüs, protozoa, fungi vs gibi organizmalarla olan enfeksiyonlara ve tümörlere karşı hücrel mücadelede de katılırlar.

Makrofajlar yabancı maddelerin enfeksiyonu veya enjeksiyonu ile uyarılınca morfolojilerini ve metabolizmalarını değiştirirler. Aktive edilmiş makrofajlar adını alırlar. Böylece hücre içi sindirim ve fagositoz kapasiteleri artar. Bunun yanında artan metabolik ve lizozomal enzim aktivitesi gösterirler. Aktive edilmiş makrofajlar kollagenaz üretir ve salgırlar. Makrofajlar ayrıca C_2 ve C_4 gibi komplement sistem proteinlerini, projen (ateş düşürücü protein), elastaz, plazminojen aktivatörü vs gibi maddeleri de salgırlar(86, 180).

Mast Hücreleri; insan vücudunda oldukça yaygındır. Özellikle deride, sindirim ve solunum bölgelerinde kan damarlarına yakın olarak bulunur. Yaşam süreleri oldukça uzundur. Lokal olarak etki eden farmakolojik aktif kimyasal maddeleri salgılayan ve bu yüzden parakrin hücreler olarak sınıflandırılan tipik hücrelerdir. Mast hücreleri başlıca, heparin, histamin, ECF- (anafilaksinin euzonofil kemotaktik faktörü), SRS-A (anafilaksinin yavaş reaksiyona giren) gibi maddeleri

salgılar. SRS-A hücrede depolanmaz, yapılıp yapılmaz hemen salgılanır. Mast hücresinden salgılanan maddeler, ödem, ağrı, şok, hipersensivite ve ateş gibi olaylara neden olurlar. Salgılama olayı enerji gerektiren bir işlemdir. İnsanlar hariç bazı hayvanlarda mast hücreleri serotonin de ihtiva ederler.

Histamin kan kapillerlerini genişleterek geçirgenliğini arttırır. Serbestleştirilen histamin bırakıldıktan hemen sonra inaktiftir. ECF-A kan eozonofillerini çeker. Yüksek ateşte nasal mukozâ, astımda bronşiyal mukozâ, parasitik istilalarda gut submukozâ gibi allerjik reaksiyon bölgelerinde euzonofillerin artması ECF-A'nın serbestleştirilmesine atfedilmiştir. SRS-A yumuşak adelede yavaş kasılma oluşturur ve damar geçirgenliğini arttırır. Heparin ise kan antikuagulanıdır.

Mast hücrelerinin yüzeyinde immunglobin E molekülleri (IgE) için spesifik reseptörler vardır. IgE'nin kan plazmasındaki konsantrasyonu çok düşüktür. IgE moleküllerinin çoğu, mast hücrelerinin ve bazofillerin yüzeyinde bağlı olarak bulunur.

Mast hücrelerinde depo edilmiş kimyasal maddelerin bırakılması, çabuk hipersensivite reaksiyonları olarak bilinen allerjik reaksiyonları arttırır. Daha önceden aynı veya benzeri antijene hassasiyet kazanılmış antijenin içeri nüfuzuyla birkaç dakikada reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonlara bir örnek anafaktik şoktur, öldürücüdür(86,180).

Plazma Hücreleri; bağ dokusunda sayıca azdır. Barsak mukozası gibi, yabancı proteinlerin ve bakterilerin nüfuzuna elverişli kısımlarında ve kronik iltihaplanmanın olduğu kısımlarda çoktur.

Plazma hücreleri kanda bulunan antikorların sentezinden sorumludurlar. Antikorlar, antijenlerin girmesine karşılık organizma tarafından meydana getirilen spesifik globulinlerdir. Plazma hücreleri tarafından sentezlenen birçok antikor, bakteriyel antijenler için spesifiktir. Böylece vücudu bu mikroorganizmalara karşı korurlar(86).

Adipoz hücreleri; diğer bir adıyla adipositler, nötral yağları depolayan ve ısı oluşumu için spesifik hale gelen bağ dokusu hücreleridir(86).

Lökositler; genellikle kapilerden ve ven cidarından geçerek bağ dokusuna gelen hücrelerdir. Bağ dokusu ve kan arasında devamlı lökosit geçişi vardır. Bu işlem iltihaplanma esnasında artar. Normal bağ dokusunda nötrofillere ilaveten sıklıkla karşılaşılan lökositler, euzonofiller, bazofiller ve lenfositlerdir.

Eozonofiller, allerjik ve parasitik hastalıklarda artar. Oluşan antijen-antikor kompleksi eozonofiller tarafından çabucak fagosite edilir. Yabancı madde ve bakterilerin fagositozunda ise çok aktif değildirler. Euzonofiller allerjik reaksiyonlarda arilsülfataz ve histaminaz gibi enzimleri ortalama verirler. Bu enzimler SRS-A ve histamine etkilidir. Bu maddeleri hidroliz ederek reaksiyonu kontrol altına alırlar.

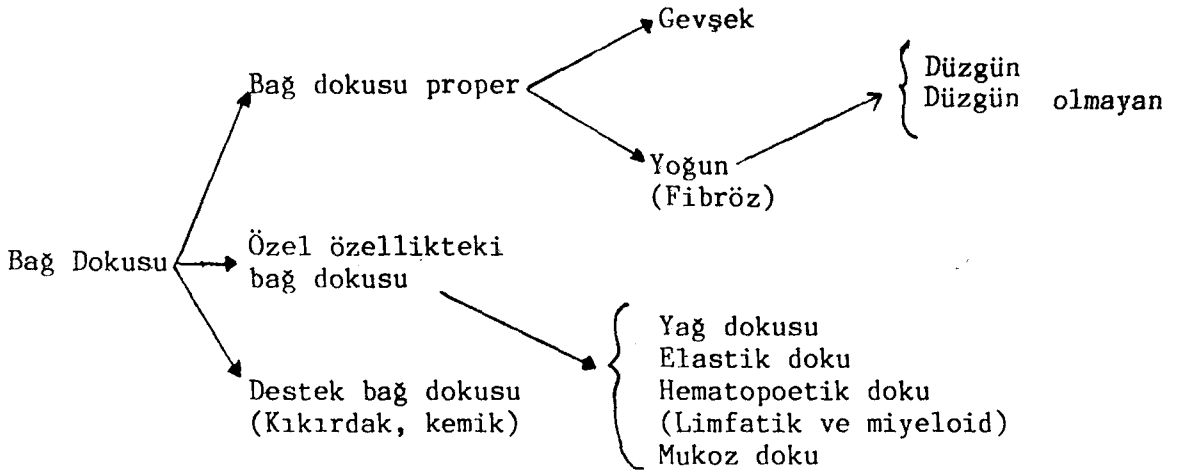
Bazofillerin mast hücrelerine benzer fonksiyonları vardır. Sadece histamin salgılayıp ECF-A gibi maddeleri de salgırlar.

Lenfositlerin ise T ve B lenfositler olmak üzere iki fonksiyonel tipi vardır. T lenfositlerin yaşama süreleri daha uzundur. Hücrel immun cevabı başlatırlar. B lenfositleri ise bölünerek plazma hücrelerini meydana getirirler. Humoral immun cevabı başlatırlar(86).

b) Bağ Dokusu Tipleri

Bağ dokusu sınıflandırılması basitçe Şekil 2'deki gibi yapılabilir. bu sınıflandırma bütün bağ dokusu tiplerini içine almaz. Bağ dokusu tiplerine verilen isimler ya bağ dokusundaki üstün bileşeni veya dokunun yapısal karakterini gösterir.

Gevşek bağ dokusu areolar doku olarak da bilinir. Yoğun bağ dokusuna nazaran daha fazladır. Epitel dokuya destek



ŞEKİL 2- Bağ dokusu tipleri(86)

olur. Kaslar ve fiberler arasındaki boşluğu doldurur. Kan ve lenf damarlarını saran bir tabaka oluşturur. Gevşek bağ dokusunun ana bileşeni ara maddedir. Fibroblast ve makrofaj miktarı fazladır. kollagen, elastik ve retiküler fiberler mevcuttur. Retiküler fiberler daha azdır. Retiküler fiberler bağ dokusunun diğer yapılarla temas ettiği yerlerde toplanmaya meyillidirler. gevşek bağ dokusu, derinin papiller tabakasında hipodermisde peritoneal ve plevral kavitelerin serosal astarlarında epitel hücrelere destek olan mukoz membranlarda bulunur. Gevşek bağ dokusu, baskıya dayanıklı değildir.

Yoğun bağ dokusunda fazla olan bileşen kollagen fiberlerdir. Hücreler gevşek bağ dokusundan daha azdır. Hücreler içinde en fazla olanı fibroblastlardır. Yoğun bağ dokusunun düzenli veya düzensiz olmak üzere iki tipi vardır. Düzensiz yoğun bağ dokusunda kollagen fiberlerde belirli bir yönlenme yoktur. Dolayısıyla az bükülebilir ve baskıya dayanıklılığı azdır. Bu doku tipi ganglia, lenf nodülleri, dalak gibi organların etrafında bulunan bağ dokusu kapsüllerinde, sindirim kanalı submukozasında ve derinin dermisinde bulunur. Düzgün yoğun bağ dokusunun kollagen fiberleri ise muntazam olarak düzenlenmiştir. Çekme kuvvetlerine büyük dayanıklılık gösterir.

rirler. Bu tip bağ dokusu için en güzel örnek tendonlardır. Kemiklere ilgili kasların yapışmasını sağlarlar. Tendonlar kollagen fiberlerce zengindirler. Tendonlardaki kollagenler kan damarları ve sinirleri ihtiva eden gevşek bağ dokusu ile sarılırlar.

Elastik doku elastik fiberlerden oluşmuştur. Kalın elastik fiberler etrafında az miktarda gevşek bağ dokusu vardır. Elastik doku vertebralarda, kolonda ve penisin asıcı ligamentinde mevcuttur.

Retiküler doku özelleşmiş gevşek bağ dokusudur. Lenfoid, hematopoetik ve miyeloid organları oluşturarak yapısal kafesi sağlar.

Mukoz doku başlıca hyaluronik asit ihtiva eden fazla miktarda ara maddeye sahiptir. Jele benzer dokudur. Kollagen fiberler ve az miktarda elastik ve retiküler fiberler ihtiva ederler. En çok bulunan hücreler fibroblastlardır. Mukoz doku göbek kordonunun asıl bileşenidir. Genç dişlerin pulpasında da bulunmuştur(86).

c) Bağ Dokusu Fonksiyonları

Bağ dokusunun daha önce bahsettiğimiz yapısal fonksiyonun yanında depolama, transport, savunma ve tamir gibi çok çeşitli fonksiyonları da vardır. Önemli tabii besinler olan lipidler adipoz dokuda depolanırlar. Gevşek bağ dokusunda ise GAG'lar fazla olduğundan su ve elektrolitler depolanır.

Makrofaj ve plazma hücreleri gibi vücut savunmasında önemli rol alan hücreleri ihtiva ederler. Bağ dokusu matriksi, vizkoz olduğundan bakteri ve inert partiküllerin içeri girmesini engelleyen bir bariyer gibi davranır. Kan kapillerleri ve lenf kapillerleri ile bağ dokusu arasında yakın ilişki vardır. Sinir dokusu ve damarları hariç diğer damarlar bağ

dokusu ile çevrilidir. Dolayısıyla bağ dokusu besin maddelerini kandan diğer dokulara taşır ve metabolik artıkların ise hücrelerden kana geçmesini sağlar.

Bağ dokusu aynı zamanda rejeneratif kapasiteyede sahiptir. İltihap veya travma ile bozulmuş kısımlar kolaylıkla tamir edilir. Yaralanmaların dokuda bıraktıkları boşluklar yara izi bırakan bağ dokusu ile doldurulur.

Çeşitli hormonlar bağ dokusu metabolizmasına etki ederler. Adrenal bezinin korteksinden salgılanan glikokortikoidler bağ dokusu hücrelerine etki ederek fiberlerin sentezini inhibe ederler. Bu da yaraların ve kırıkların iyileşmesini olumsuz etkiler. hipofiz tarafından salgılanan ve glikokortikoidlerin üretimini düzenleyen ACTH'da aynı etkiye sahiptir. Bu hormonlar aynı zamanda iltihaplanma olaylarını bastırır veya azaltırlar. Hipotiroidizm, GAG'ların bağ dokusunda birikmesine neden olur. Yetişkin hipotiroidizm miksödem olarak bilinir(86).

d) Bağ Dokusu Hastalıkları

Dokunun kimyasal, fiziksel veya enfekte edici bir ajanla yaralanması iltihabı oluşturur. İltihaplanma olayında mast hücreleri tarafından kapiler ve venlerin geçirgenliği değiştirilir. Kan damarlarından lökositlerin göçü başlar. Lökositler ve makrofajlar enfeksiyonu durdurmaya çalışır. Fibroblastlar yaralama bölgesinde çoğalarak kollagen ve proteoglikanları salgırlar. Doku noksanlığı kollagen fiberlerce sağlanır.

Bağ dokusu ile ilgili bozuklukların bir kısmı ise kollagen metabolizması ile ilgilidir. Örneğin skorbit hastalarında vitamin C eksikliği fibroblastların hatalı kollagen sentez etmesine neden olur. Bağ dokusu bozulur, yaralar iyileşmez, eklemlerde ağrı ile, mukozalarda, zarlarda, deri ve

kaslarda, dişetinde kanamalar görülür. Raşitizm, Ca^{+2} ve D vitamini eksikliği nedeniyle kemiklerin yumuşadığı ve daha kolayca kırıldığı önemli bir bağ dokusu hastalığıdır. Bağ dokusunun diğer önemli yapısal bir hastalığı da romatoid artittir. Bu özellikle kıkırdak, krişler ve kemik başta olmak üzere bağ dokusu türlerinin pek çoğunu etkiler. Otoimmunité veya diğer bazı nedenler sonucu ortaya çıkabilen bu hastalık kollagenin parçalanmasından ileri gelir(86,140,180).

Bağ dokusu kalıtsal hastalıklarından en çok bilineni lizil hidroksilazın genetik eksikliğidir. Lizil hidroksilaz eksikliğinde kollagenler arasında yeterli çapraz bağ kurulmadığından kemik bozuklukları, eklem çıkıkları derinin gevşemesini, göz hücresinin narinliği (fragility) gibi aksaklıklar ortaya çıkar. Proteoglikanları parçalayan enzimin genetik eksikliğinde ise dokularda proteoglikan birikmesi görülür (Tablo 3)(86,134,180).

2- KOLLAGEN

a) Yapısı

Kollagen, vücudumuzda bulunan proteinlerin yaklaşık % 30'dan fazlasını, dolayısıyla vücut ağırlığının % 6'sını oluşturan başlıca yapısal fonksiyonu olan çok önemli bir proteindir. Molekül ağırlığı 300.000 civarındadır(181). Fibröz bir proteindir. Güç çözünür. Bazı hayvanların sindirim kanalında kollageni hidroliz edebilen kollagenaz enzimi vardır. Kollagen pepsin ve klorür asidi tarafından yavaş yavaş sindirilebilir. Fakat tripsin tarafından pepsinle işlem gördükten sonra veya $40^{\circ}C$ 'nin üstündeki ısılarda sindirilebilir. Kollagen soğuk suda çözünmez, sıcak suda seyreltik asit ve alkallerle kaynatılınca jelatine dönüşür. Jelatin ise suda kolayca çözünür(76,189).

Metodolojinin gelişmesi ile omurgalılardaki kollagenin morfolojik özellikleri, patolojik karakterleri, dokulardaki dağılımları, fonksiyonları ve kimyasal bileşimleri farklı olan çeşitli hücreler tarafından üretilen bir protein ailesi olduğu gösterilmiştir(86). Çok sayıda kollagen tipleri(168) tarif edilmesine rağmen en önemlileri ve üzerinde en çok çalışılan kollagen tipleri 5 tanedir. Bunlar kollagen tip I, II, III, IV, V olarak adlandırılırlar(60,86,122,180,181,189).

Kollagen tip I, en çok ve en yaygın olanıdır. Dokularda kollagen fiberleri halinde bulunurlar. Bu kollagen fiberler, kemik, dentin, tendon, organ kapsülleri, deri, fibröz kıkırdak, fascia, sklera gibi dokuları oluştururlar. Fibroblast, osteoblast, odontoblast ve kondroblastlar tarafından sentez edilirler. GAG'lardan başlıca dermaten sülfatla birlikte bulunurlar. Her zincirde % 10'dan az hidroksilizin vardır. Karbonhidrat miktarı düşüktür. Buldukları dokuya gerilme kuvvetine karşı dayanıklılık kazandırırılar.

Kollagen tip II, başlıca hyalin ve elastik kıkırdakta bulunur. İnce fibriller halindedir. Kondroblastlar tarafından sentez edilir. GAG'lardan en çok kondroitin sülfatla ilişkileri vardır. bu tip kollagen karakteristiği olarak, tip I'e nazaran daha fazla glikozillenmiş hidroksilizin ihtiva eder(180). Buldukları dokunun arada sırada gelen baskılara dayanmasını sağlarlar.

Kollagen tip III, genellikle tip I ile birlikte görülür. Muhtemelen retiküler fiberlerin kollagen kısmını oluşturur. Yumuşak adele, endoneurium, arterler, uterus, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerlerde vardır. Gevşekçe paketlenmiş ince fibriller halindedir. Çapları çoğunlukla aynı büyüklüktedir. Yumuşak adele hücreleri, fibroblastlar, retiküler hücreler, schwann hücreleri ve hepatositler tarafından sentez edilirler. GAG'dan başlıca heparan sülfatla ilişkileri var-

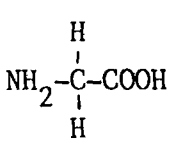
dır. Diğerlerinden farklı olarak fazla hidroksiprolin(60) ve karboksi terminalinde yarım sistin kalıntısı ihtiva ederler(180). Genişleyebilen organların yapısal devamlılığını sağlarlar.

Kollagen tip IV, epitel ve endotel bazal laminalarda ve bazal membranlarda bulunurlar. Fiber veya fibril oluşturmazlar. Amorf haldedirler. Epitel ve endotel hücreler tarafından sentez edilirler. Diğerlerine göre molekül ağırlığı % 10-20 oranında fazladır, daha fazla yarım sistin ve glikozillenmiş hidrosilizin kalıntısı, 4.hidroksiproline ilaveten önemli miktarda 3.hidroksiprolinde ihtiva ederek glikoproteine kovalent bağla bağlanmışlardır(180). Buldukları yere destek ve filtrasyon yapma özelliği kazandırırılar.

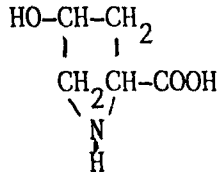
Kollagen tip V, plesental membranlarda kan damarlarında ve az miktarda diğer dokularda vardır. Yapısı ve fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır(86,122,180).

Kollagen'in yapısına giren başlıca amino asitler, glisin (% 33-35), prolin (% 6-13) ve hidroksiprolin (% 9-17)'dir. Bir kollagen polipeptidinin amino ve karboksi terminali hariç hemen hemen her üç amino asidinden biri glisin (Gli)'dir. Kollagenin 3'lü amino asit kalıntısı genellikle -Gli-X-Y şeklinde gösterilir. Burada X ve Y glisin hariç diğer amino asitleri temsil eder. 3'lü amino asit kalıntılarının en çok Glisin-X-prolin, Glisin-X-hidroksiprolin, Glisin-prolin-hidroksiprolin şeklinde olduğu bulunmuştur(24,86,122). Diğer proteinler arasında kollagenden başka çok miktarda glisin ihtiva eden protein elastindir. Hidroksiprolin ve hidrosilizin kollagen için karakteristiktir. Bu amino asitler kollagen biyosentezi sırasında prolin ve lizin amino asitlerinin hidrosilasyonu ile oluşurlar. Elastin kollagenden daha az miktarda hidroksiprolin ihtiva eder, fakat hidrosilizin ihtiva etmez. Kompleminin Clq komponenti hidrosilizin ihtiva eder. Dokudaki kollagen miktarı hidroksiprolin miktarının ölçülmesi ile tayin

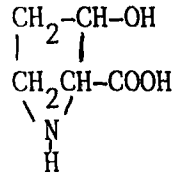
edilebilir. Kollagende bulunan hidroksiprolin 4-hidroksiprolin halindedir. Bazı kollageler az miktarda 3-hidroksiprolin de ihtiva ederler(86,122,181).



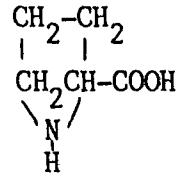
Glisin



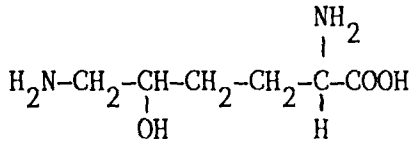
4-hidroksiprolin



3-hidroksiprolin



Prolin



5-hidroksilizin

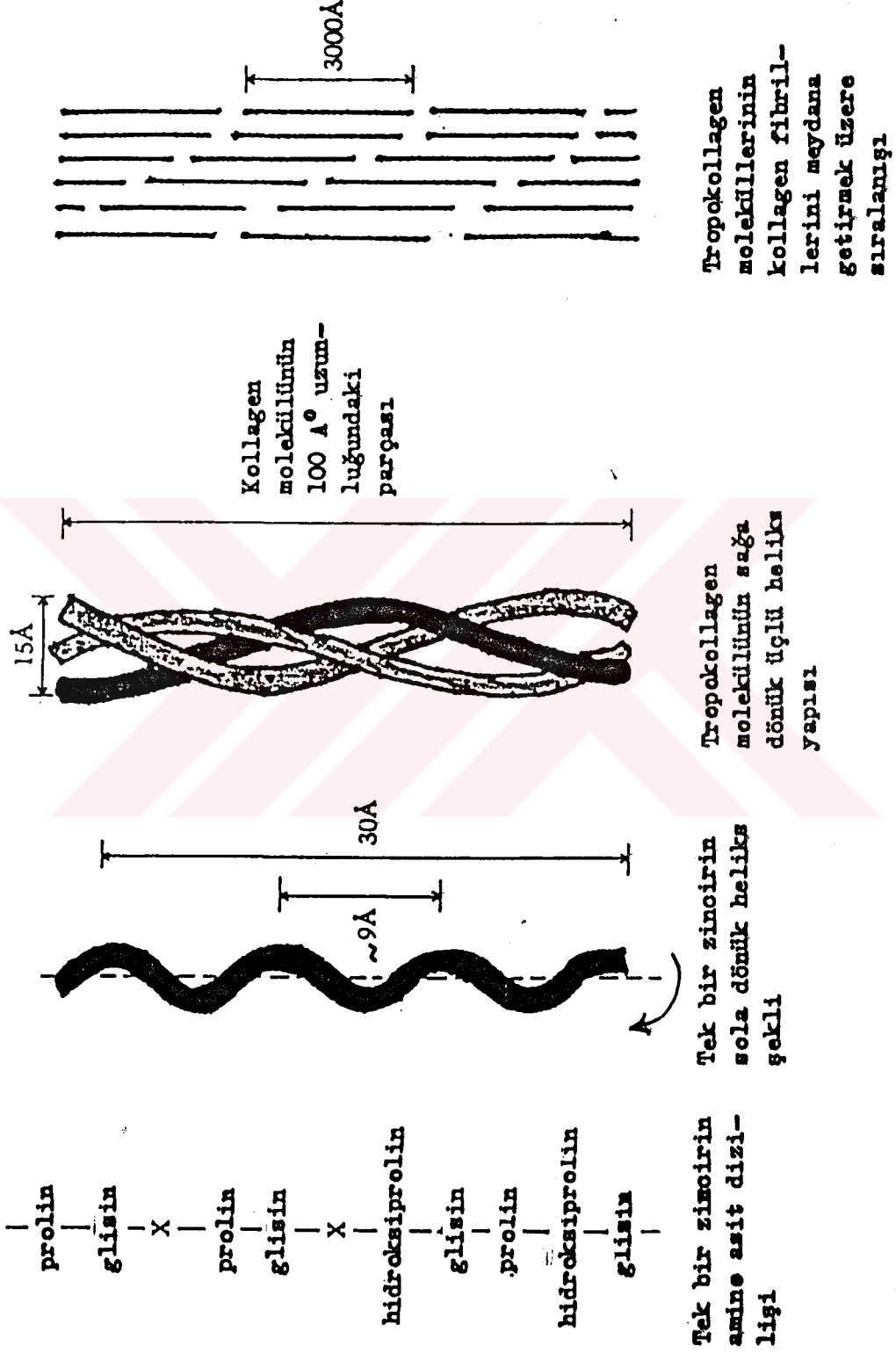
Kollagenin yapısında çok az miktarda tirozinde bulunur. Esansiyel amino asit olan triptofan bulunmaz. Bu yüzden kollagenin biyolojik değeri sıfırdır(125). Kollagende bulunan başlıca karbonhidratlar galaktoz ve glikozdur. Bunlar hidroksilizine bağlıdırlar.

Kollagen fibrillerini oluşturmak için polimerize olan protein birimi tropokollagen molekülüdür(86). Büyümekte olan hayvanların bağ dokusu, soğuk tuz çözeltileri veya seyreltik asit çözeltileri ile muamele edildiğinde tropokollagen molekülleri ekstrakte edilebilir(180,181). Yapılan analizler, tropokollagenin molekül ağırlığınının 300.000 civarında, 280-300 nm uzunluğunda ve 1.4-1.5 nm genişliğinde olduğunu göstermiştir. Tropokollagen molekülü, molekül ağırlıkları yaklaşık 100.000 olan birbirine benzer 3 polipeptid zincirinden oluşmuştur. Herbir polipeptid zinciri ortalama 1000 amino asit kalıntısı içerir. Önce, zincirler ayrı ayrı 3 amino asit kalıntılı kıvrımlardan oluşan sola doğru yönelik helezon (heliks) meydana getirirler. Sonra bu 3 helezon biraraya gelerek organ örgüsü oluşturacak şekilde birbiri üzerine bükülerek hafif sağa dönük 3 sarımlı heliksi yaparlar. Üç zincirin de

amino asit terminali molekülün aynı tarafındadır (Şekil 3)(24, 60,83,86,99,125,180,181,189).

Tropokollagen molekülünde 3'lü heliksin stabilizesi zincirler arasında kurulmuş hidrojen bağları ve bazı kovalent çapraz bağlarla sağlanır. Tropokollagende daha öncede belirtildiği gibi fazla miktarda glisin ve imino asit (hidroksiprolin) vardır. İmino asitlerin pirrolidin halkaları zincirin bükülmesini sınırlayan stereokimyasal özelliğe sahiptir. Tropokollagenin 2 cil yapısının, yani 3 sarımlı heliksin tanziminde yardımcı olurlar. Hidroksil grupları ile zincirler arası hidrojen bağları kurularak yapının stabilize olmasını sağlarlar. Glisinin her üç amino asitden biri olması, zincirin 3 amino asitli kıvrımlarının oluşmasında ana faktörü teşkil eder. Glisin yan zincir olarak sadece hidrojen atomu ihtiva eder. α C atomu molekülün içine doğru yöneliktir. Glisin, zincirdeki kıvrımların yeterli derecede yakın olmasını ve zincirler arasında hidrojen bağlarının kurulmasını sağlar. 3 zincir arasındaki hidrojen bağları yakın zincirlerin peptid bağlarının $-C=O$ ve $HN-$ grupları arasında meydana gelir. Diğer amino asitler heliks yapının oluşması için çok önemli değildir. Bunların polar ve apolar yan zincirleri merkezden dışarı doğru yönelmiştir. Böylece diğer kollagen molekülüleri ve kollagen olmayan moleküllele etkileşebilirler. Tropokollagende bulunan hidroksilizinine ise iki önemli fonksiyonu vardır; çapraz bağ oluşumunu sağlamak, karbonhidratların bağlanma yerlerini teşkil etmek(24,99,122,180,181).

Tropokollageni oluşturan polipeptid zincirlerin kimyasal yapısındaki farklılıklar, farklı kollagen tiplerinin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Her polipeptid zincirinin aminoasit dizilişleri ayrı bir gen tarafından kontrol edilir(181). Dokuz tip kollagen vardır (Tablo 2). Bunlar kollagen I, II, III,....IX olarak adlandırılırlar. Her kollagen tipi üç polipeptidten oluşmuştur. Bazı kollagen tiplerinde bu üç polipeptid birbirinin aynıdır. Bazılarında ise ikisi veya üçüde farklıdır. Yapısı bilinen kollagen tipleri I, II ve



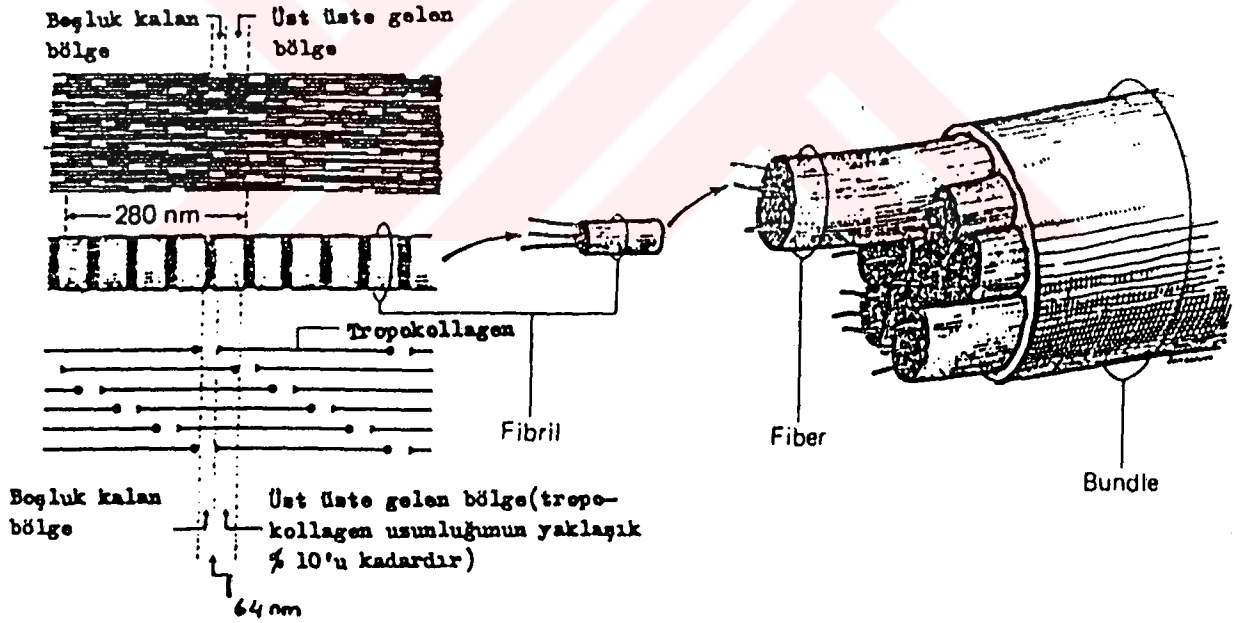
ŞEKİL 3- Kollagen yapısının şematik gösterilişi(24)

TABLO 2- Kollagen tipleri, molekül formülleri, özellikleri ve bulunduğu dokular. SC: Kısa zincirli kollagen, LC: Uzun zincirli kollagen, EC: Erdotel kollagen(168)

Kollagen Tipi	Molekül Formülü	Doğal Polimerik Yapısı	Özellikleri	Bulunduğu Dokular
I	$\alpha_1(I)_2\alpha_2(I)$	Fibril	Hidroksilizin miktarı az. Birkaç tane disakkarit bağlı hidroksilizin	Deri, tendon, fascia, dentin, kornea, arter
II	$\alpha_1(II)_3$	Fibril	Tip I'den daha ince fibriller, fazla miktarda hidroksilizin ve disakkarit bağlı hidroksilizin	Kıkırdak
III	$\alpha_1(III)_3$	Fibril	Fazla miktarda 4-hidroksiprolin, az miktarda hidroksilizin ve disakkarit bağlı hidroksilizin, uzun karboksi teleopeptidi, karboksi ucunda zincirler arasında disülfid bağı	Deri, uterus, arterler, karaciğer, dalak
IV	$\alpha_1(IV)_3$ veya $\alpha_2(IV)_3$ veya $\alpha_1(IV)_2\alpha_2(IV)$	Bazal membran	Çok fazla miktarda hidroksilizin ve disakkaritler, 3-hidroksiprolin, az miktarda alanin	Glomerular bazal membran, lens kapsülü, epitel ve endotel hücrelerin bazal membranları
V	$\alpha_1(V)_2\alpha_2(V)$ veya $\alpha_1(V)_3$?	Çok fazla miktarda hidroksilizin ve disakkarit birimleri, az miktarda alanin	Glomerular bazal membran, yumuşak adele bazal membranları.
VI	SC_1, SC_2, SC_3	?	Sistein, disakkarit bağlı hidroksilizin ve glikozamin miktarı fazla, disülfid bağlı kısa zincirler.	Damar cidarlarının intimasında.
VII	$(LC)_3$	L	Hidroksilizin miktarı fazla	Amniyotik membranlarda
VIII	EC_1, EC_2, EC_3	?	Pepsine duyarlı, Disülfid bağları yok.	Bovine endotel hücrelerinde, insan fibroblastlarında, insan Ewing sarkoma, astrositoma, hepatosellüler veya alveolar hücre karsinomasında
IX	?	?	Kısa disülfid bağlı zincirler	Kıkırdak?

III'dür(168-181). Kollagen tip I'de 2 tane α_1 ve 1 tane α_2 zinciri, tip II'de 3 tane α_1 (II) zinciri ve tip III'de ise 3 tane α_1 (III) zinciri vardır.

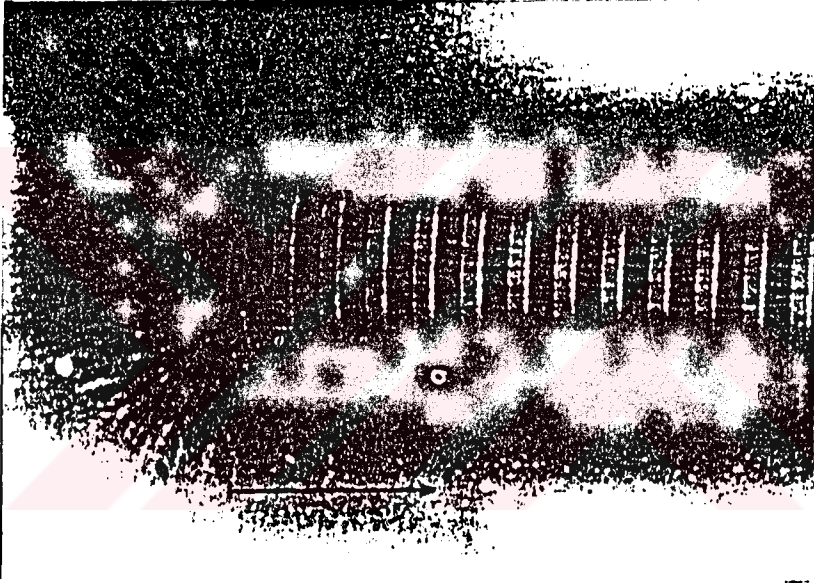
Tropokollagen molekülleri hem uç uca hem de birbirine paralel olacak şekilde yan yana gelerek önce mikrofibrilleri sonra da fibrilleri oluşturmak üzere agrege olurlar. Kollagen fibrilleri ince, uzamış yapılardır. Çapları 20-90 nm arasında değişir. kollagen tip 1,2,3 fibril oluşturabilirler. Kollagen fiberler ise çapları 75 nm olan yan yana gelmiş fibrillerden oluşmuş çubuklardır. Fiberlerin çapı ihtiva ettikleri fibril sayısına bağlıdır. Fiberler çelikten daha dayanıklıdır. Fiberler de bir araya gelerek daha kalın olan bundle adı verilen yapıları oluştururlar (Şekil 4)(60,86,189).



ŞEKİL 4- Kollagen fibril, fiber ve bundle'larının şematik gösterilişi(86)

Doğal fibrillerin elektron mikrografları incelendiğinde açık koyulu bantlar halinde periodik olarak 64 nm'lik tekrarlanan birimlerden oluşmuş dikey çizgili yapılar görülür (Şekil 5). Tropokollagen molekülleri muntazam olarak dü-

zenlenmiştir. Tropokollagen molekülünün her iki ucunda ve uzunluğu boyunca 64 nm'lik aralıklarla polar bölgeler vardır. Bu polar bölgelerin birbirleri ile etkileşmesi ve bir tropokollagenin polar bölgesinin, ona paralel olan diğer tropokollagenin polar bölgesi ile belirli bir mesafe farkla kayarak üst üste gelmesi sonucu çizgili yapı meydana gelir. Üst üste gelen bölgenin uzunluğu tropokollagen molekülünün uzunluğunun % 10'u kadardır. Dolayısıyla boşluklar oluşur (Şekil 4)(86, 125,181).



ŞEKİL 5- Sıçan kuyruk tendon kollagen fibrilinin elektron mikroskopunda görünüşü. Ok işareti 3000 Å uzunluğundaki kollagen molekülünü gösterir(60)

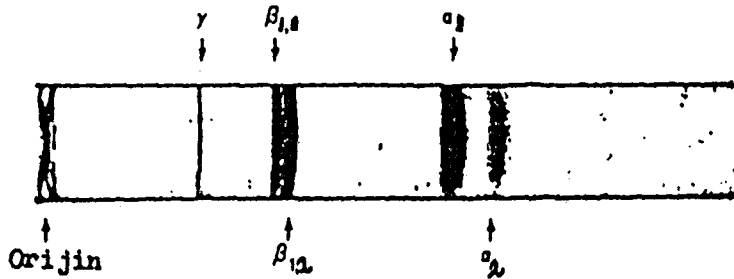
Bu boşlukların kemik oluşumu için gerekli hidroksiapatit kristalleri için bir yuva vazifesi gördüğüne inanılır(125).

Yukarıda anlatılanlar kollagen fiberlerin üçlü boyutta nasıl düzenlendiğini açıklamaz. Kollagen fiberlerin 3 boyutlu yapısı hakkında çeşitli teoriler ileri sürülmüştür(60,83,134).

Kollagen fiberler seyreltik asitlerle hafifçe ısıtıldıklarında çözünürler. Bu çözeltiler soğutulursa fiberler

tekrar oluşur. Fakat fiberler hafifçe ısıtılmayıp kaynatılırsa jelatin meydana gelir ve denatürasyon irreversibil olur. Jelatin çözeltileri tropokollagen zincirlerini ve bu zincirlerin parçalarını ihtiva eder. Jelatin ısıtılırsa jel'e dönüşür(125,181). Özellikle genç dokularda yeni oluşmuş kollagenin seyreltik asitdeki çözeltilerine belirli maddeler ilave edilerek kollagen, fiberler halinde çöktürülebilir. Çöktürücü madde olarak % 1 NaCl kullanıldığında oluşan fiberler, elektronmikrorafalarda doğal kollagen gibi 64 nm'lik periodik bantlar ihtiva ederler. % 2'lik NaCl kullanıldığında tekrarlanan band uzunluğu 21 nm'dir. % 0.1'lik glikoprotein kullanıldığında ise band uzunlukları 260-300 nm arasında değişir(83).

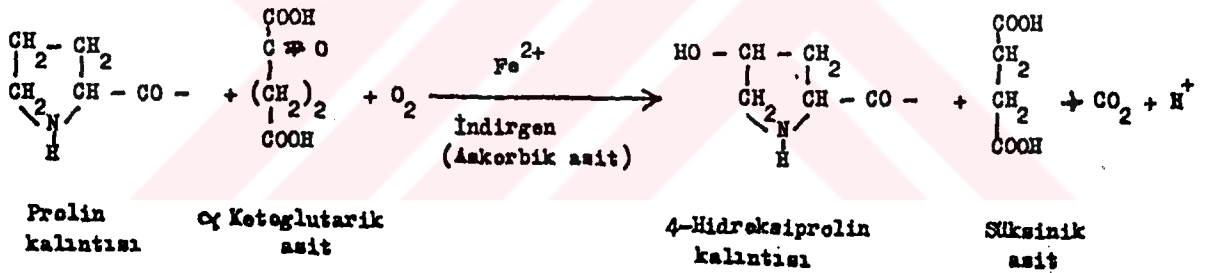
Kollagen tip I'in SDS poliakrilamid jel elektroforez bantları incelendiğinde başlıca 3 fraksiyon göze çarpar. Proteinler, SDS poliakrilamid jellerde molekül ağırlıkları ile ters orantılı olarak hareket ederler. Başlangıçtan en uzak band molekül ağırlığı en düşük olana aittir. Kollagen tip I'de en uzak band α_2 ve α_1 bandlarıdır. Bunlar tropokollageni oluşturan polipeptid zincirlere aittir, ortadaki β fraksiyonu bu polipeptidlerin (iki polipeptid) çapraz kovalent bağla bağlanmış dimerik şeklidir. İlk fraksiyon olan α fraksiyonu ise polipeptid zincirlerin (3 tane) çapraz kovalent bağlı trimerik şeklidir (Şekil 6)(125).



ŞEKİL 6- Kollagen tip I'in (gine domuzundan elde edilen) SDS-poliakrilamid jel elektroforezi(125)

b) Kollagen Biyosentezi

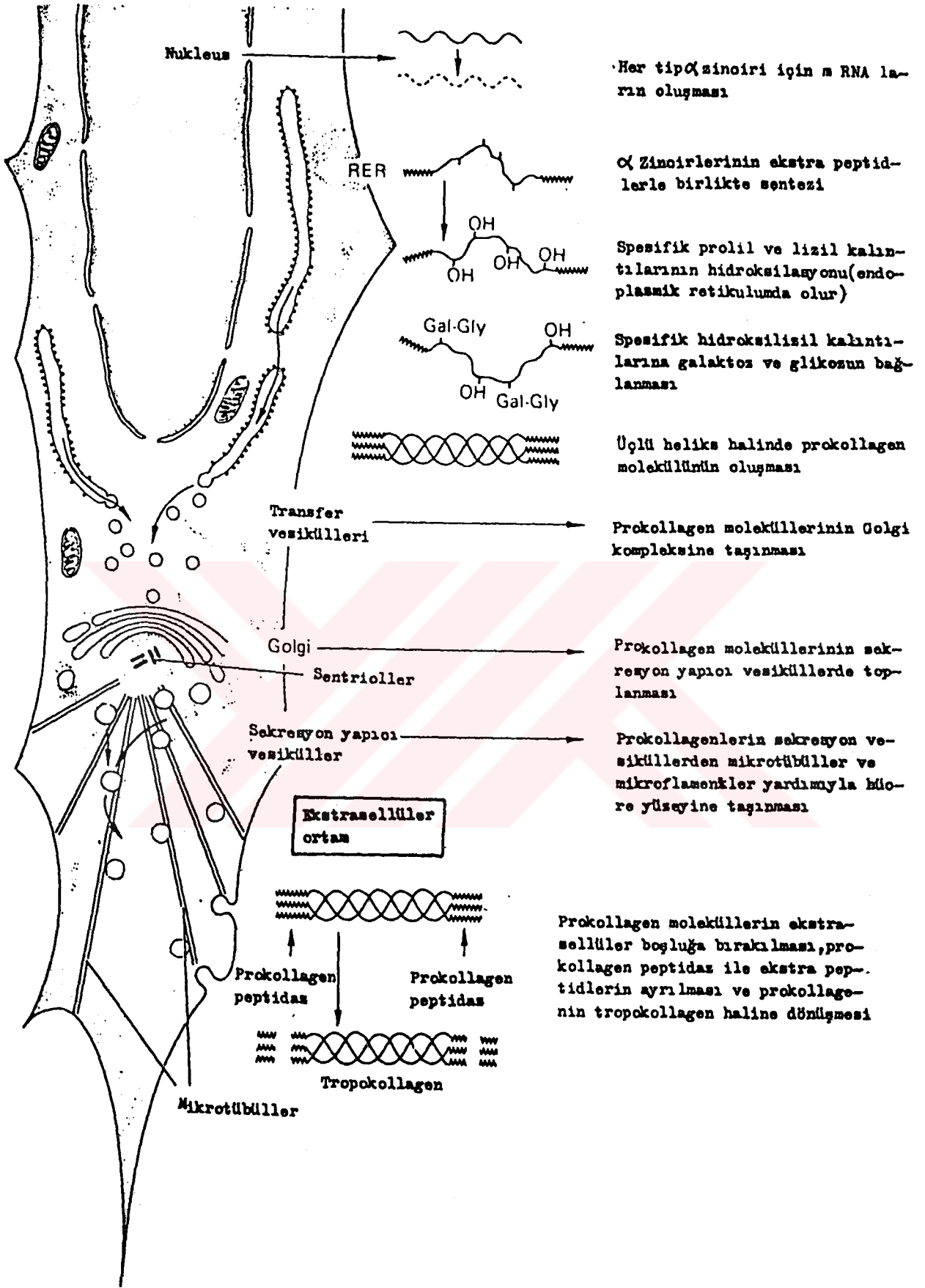
Kollagen biyosentezi diğer proteinler gibi kollagen için spesifik m.RNA sentezi ile başlar (Şekil 7). Önce endoplazmik retikuluma bağlı polizomlarda gerekli amino asitlerin birleşmesi ile sisterna içine doğru yönelmiş polipeptid zincirler oluşur. Prolin ve lizinin hidroksilasyonu bu amino asitlerin polipeptid zincirlere katılmasından sonra olur. Serbest hidroksiprolin ve hidroksilizin direkt olarak zincire bağlanmaz. Hidroksilasyon peptid zinciri belirli uzunluğa eriştikten sonra, henüz ribozomlara bağlı iken başlar. Hidroksilasyon, prolinhidroksilaz ve lizilhidroksilaz gibi enzimlerin yardımlarıyla olan enzimatik bir reaksiyondur. Bu enzimatik hidroksilasyon reaksiyonu için, moleküler oksijen, α ketoglutarik asit, demir (+2) ionları ve askorbik aside (C vitamini) gerek vardır.



Hidroksiyasyon 3'lü helix yapının oluşmasından sonra durur.

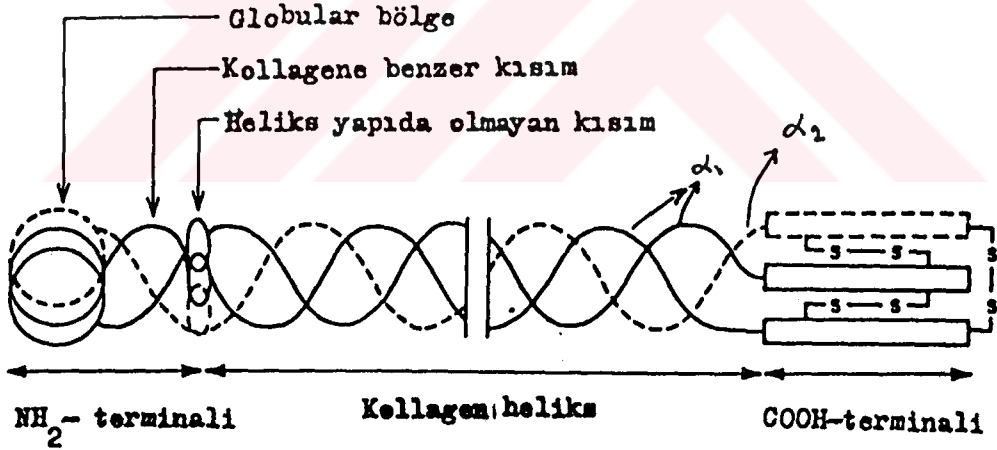
Üridindifosfat-galaktozil-glikozil transferazlar da enzimatik glikozilasyon reaksiyonunu kataliz ederler. Galaktoz ve glikoz gibi karbonhidratların spesifik hidroksilizin kalıntısına bağlanmasını sağlar(27).

Zincirler daha sonra bazı hidroksilasyon ve glikozilasyon reaksiyonlarının tamamlandığı kaba endoplazmik retikulumun sisternasına atılırlar. Aralarında hidrojen bağları ve kovalent bağlar kurularak 3'lü sarmal yapıyı meydana getirirler. Bu oluşan yüksek molekül ağırlıklı moleküle prokollagen adı verilir. Tropokollagen molekülünün öncül maddesidir.



ŞEKİL 7- Kollagen biyosentezinin şematik gösterilişi(86)

Prokollagen molekülünü oluşturan herbir zincirin amino ve karboksi terminallerinde propeptid, ekstrapetid veya registration peptid de denilen, 3'lü heliks yapıda olmayan düz peptidler vardır. Amino terminalindeki ekstra peptidin mol ağırlığı yaklaşık 20.000 ve karboksi terminalindeki ekstra peptidin mol ağırlığı ise yaklaşık 35.000 civarındadır(181). Bu peptidlerin görevi; doğru pozisyonlara uygun α zincirlerinin gelmesini ve oluşan prokollagen moleküllerinin çözünür halde kalmasını sağlamak, kollagenin fibriller halinde çökmesini, zamansız olarak hücre içinde toplanmasını önlemektir. Aksi takdirde kollagen güç çözüldüğünden hücre dışına transportu zor olur(83). Amino terminal ekstrapetidleri, kollagene benzer amino asit dizilişi gösteren küçük kısımlar ihtiva ederler. Sadece karboksil terminalinde ekstrapetid zincirleri arasında disülfid bağları vardır (Şekil 8).



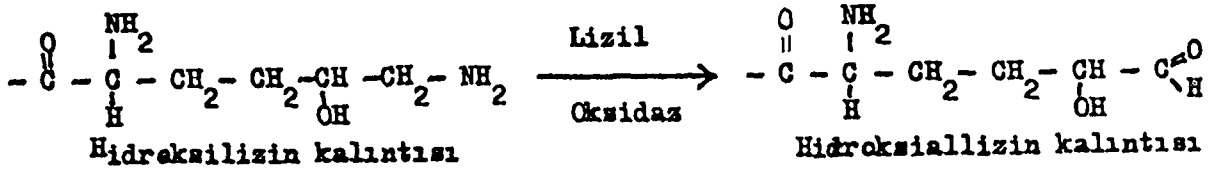
ŞEKİL 8- Tip I prokollagen molekülünün yapısının şematik gösterilişi(134,181)

Sisternada toplanmaya başlayan prokollagenler kaba endoplazmik retikulumun geçişi sağlayan elemanları ile golgi kompleksine gönderilirler. Düz ekstrapetidlerde de bağlı karbonhidrat kalıntılarına rastlanır. Bu belki golgi kompleksinde ekstra enzimatik glikozilasyon reaksiyonların olduğunu gösterir. Prokollagen molekülleri daha sonra golgi komp-

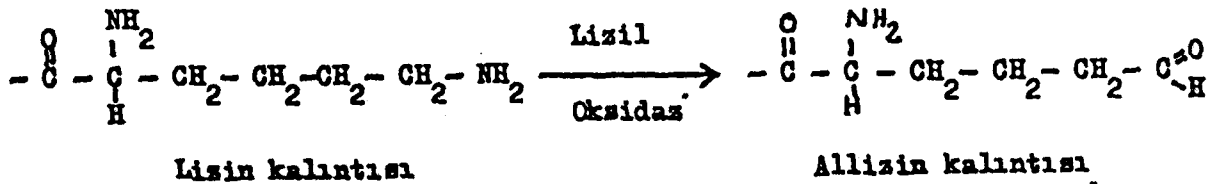
leksinin sekresyon yapan vesikülleri vasıtasıyla hücre yüzeyine, oradan da hücre dışına ekstrasellular matrikse taşınırlar. Prokollagenin sekresyonu enerji gerektirir.

Hücre dışındaki özel proteazlar (prokollagen peptidazlar) enzimatik olarak ekstreptidlerin büyük bir kısmını kopararak prokollageni tropokollagen molekülüne dönüştürürler. Tropokollagen molekülleri amino ve karboksil terminallerinde kısaltılmış düz zincirler (teleopeptidleri) ihtiva ederler. Tropokollagen molekülleri muntazam yapılar halinde agregre olarak kollagen fibrillerini meydana getirirler. Proteoglikanlar ve yapısal glikoproteinler tropokollagen moleküllerin fibril ve sonradan fiber oluşturmasında önemli rol oynarlar(83,86,99,122,180,181).

Fibriler yapı, tropokollagen molekülleri arasında kovalent çapraz bağların oluşması ile kuvvetlendirilir. Fibroblastlar tarafından salgılanan bakır ve pridoksal fosfat ihtiva eden spesifik amin oksidaz (lizil oksidaz) adlı enzim tropokollagenin teleopeptidindeki lizil ve hidroksilizil kalıntılarının yan zincirlerini (ϵ -NH₂) oksidadif deaminasyonuna sebep olur. Deaminasyondan sonra bu yan zincirler aldehid gruplarına dönüşerek allizin veya hidroksiallizin meydana gelir(125,180,181).

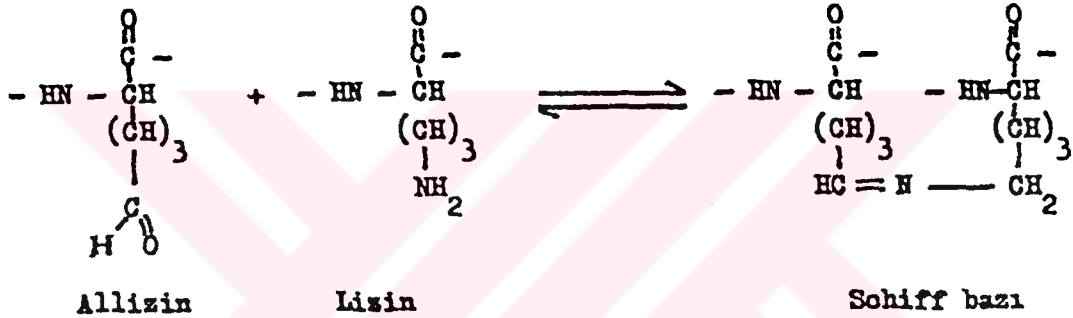


veya



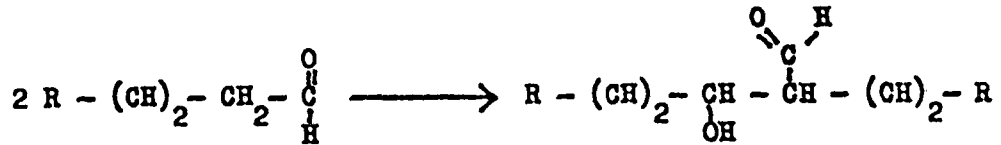
Bu aldehit grupları çok yavaş enzimatik olmayan reaksiyonlarla çapraz bağları oluştururlar, iki tip reaksiyon mümkündür(125,181).

Birincisinde aldehitler komşu zincirlerin lizil ve hidroksilizil kalıntılarının epsilon amino (ϵ -NH₂) grupları ile reaksiyona girerek bir aldimin olan schiff bazlarını meydana getirirler. Kararsız olan schiff bazları daha sonra kararlı sekonder aminleri oluşturmak üzere indirgenebilirler(125).



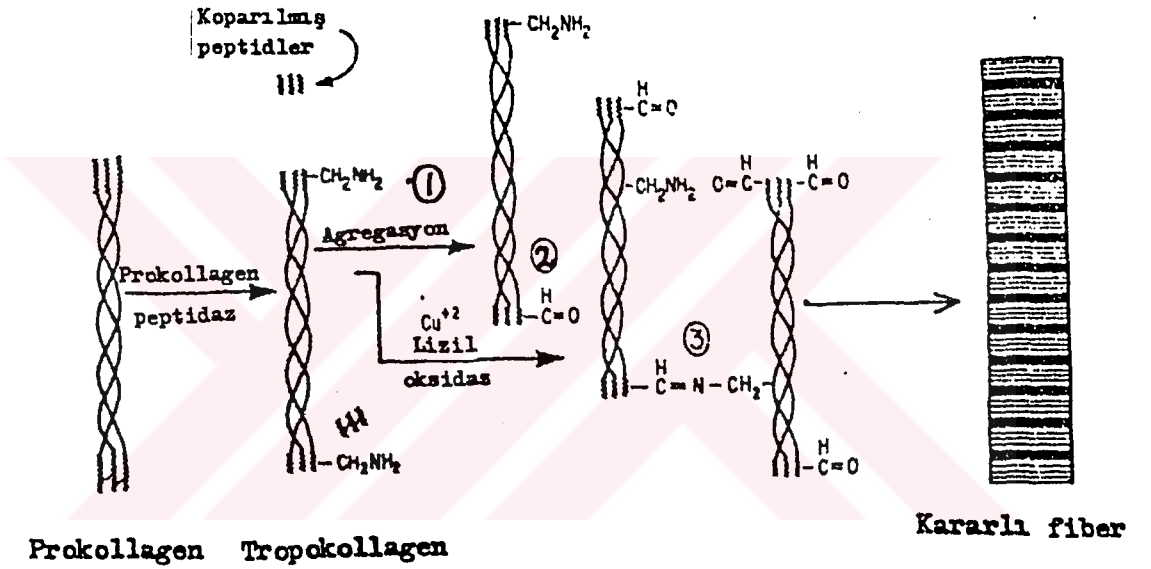
Schiff bazları dehidrolizinorlösin veya dehidrohidroksilizinorlösin yapısındadır(181).

İkincisinde ise, iki aldehid kondensasyon reaksiyonu ile aldoller oluştururlar. Aldoller daha stabildir(15,25).



Aldehit grupları histidin kalıntılarının imidazol grupları ile de reaksiyona girerek bağ oluştururlar(122,134, 181). Böylece tropokollagen molekülleri kovalent çapraz bağlarla bağlanarak stabil fibril ve fiberleri meydana getirirler.

Çapraz bağların oluşması ekstrasellular bir olaydır. Lizin ve hidroksilizin kalıntılarının oksidatif deaminasyonun, prokollagen peptidazın prokollagenden ekstrepeptidleri ayırmasından hemen sonra meydana geldiği düşünülür. Kovalent olmayan bağlanmalar, tropokollagen moleküllerinin uç uca ve birbirine paralel belirli bir mesafe kayma yaparak yan yana dizilmelerini dolayısıyla aldehit ve ϵ NH_2 gruplarının karşılıklı gelmesini sağlar. Sonuçta bu gruplar arasında çapraz bağlar enzimatik olmayan reaksiyonla oluşur (Şekil 9).



ŞEKİL 9- Kollagen biyosentezinin ekstrasellüler olaylarının şematik gösterilişi. 1- Tropokollagen moleküllerinin agregasyonu, 2- Lizin ve hidroksilizinin oksidatif deaminasyonu ile aldehit gruplarının oluşması, 3- Schiff bazlarının meydana gelmesi(180)

Kovalent çapraz bağlar fiberlerin gerilmeye karşı kuvvetini, proteolitik yıkıma karşı direncini artırır, çözünürlüğünü azaltır. Çapraz bağ oluşumu çok iyi kontrol edilir. Çünkü özel dokuların kollagen fiberlerinin çapraz bağ miktarları farklıdır. Eğer yeterli miktarda çapraz bağ oluşmaz veya fazla miktarda oluşursa çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkar. Örneğin deride kollagen fiberler arasında yeterli çapraz bağ oluşmazsa deri hiperesneklik kazanır, kolay hasar görür(180).

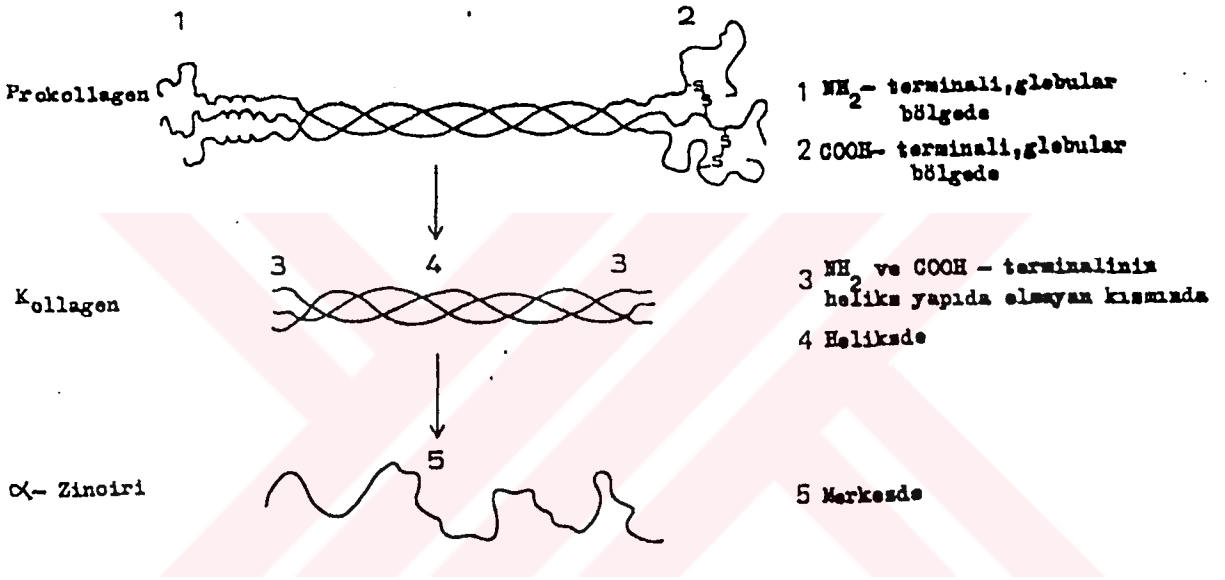
Kovalent çapraz bağlı dimerik α zincirleri de izole edilmiştir. İki α zincirinden oluşmuş β zincirlerinin oluşması, tiosemikarbazid ve penicillamin ile önlenabilir. Bu maddeler 3'lü heliks yapıyı bozmadan fibrillerin agregasyonunu önlerler. β -aminopropionitril ($H_2N-CH_2-CH_2-CN$); bakır ihtiva eden, plazmada bulunan amino oksidaz ve kemik ve bağ dokusunda bulunan lizil oksidazın inhibitörüdür. Lizil ve hidroksilizil kalıntılarının NH_2 gruplarının aldehit gruplarına oksidasyonunu önler. Latirizm denilen, tropokollagen molekülleri arasında çapraz bağların oluşmamasına sebep olur(134,181).

Kollagende çapraz bağlanmaların ne zaman son bulduğunu söylemek mümkün değildir. Bazı araştırmacılara göre çapraz bağların oluşması hiç bitmez yavaş yavaş yaşam süresi boyunca devam eder, deri, kan damarları ve diğer dokuların kalınlaşması sertleşmesi gibi tıbbi problemlerinin ortaya çıkmasına sebep olur(125).

Kollagen sentezinde hormonlarda etkilidir. Adrenal korteksin glikokortikoidleri insuline zıt olarak kollagen oluşumunu inhibe ederek yaraların ve kemik kırıklarının iyileşmesini önlerler. ACTH'dabenzer etkiye sahiptir. Mineralokortikoidler ise fibroblastları uyarak kollagen oluşumunu kolaylaştırırlar(83).

Yapılan immunokimyasal çalışmalar kollagende ve prokollagende antijenik determinantların olduğunu göstermiştir. Prokollagende antijenik determinantlar amino ve karboksi terminalinin globular kısmında lokalize olmuştur. Kollagende ise amino ve karboksi terminalinin heliks yapıda olmayan düz kısımlarında ve heliks yapısında bulunur(60,134) (Şekil 10). Kollagen molekülünden heliks yapıda olmayan bölgelerin suni olarak ayrılması, bu bölgelerde özellikle karboksi terminalinde bulunan determinantların immunolojik karakterini azaltmıştır(60). Prokollagen, kollagena nazaran daha çok immunojendir(60,134). Bu da prokollagende tirozin miktarının daha

fazla olmasına atfedilir(134). İmmunizasyon için seçilen hayvan türleri antijenik kısımların tayinine yardım edebilir. Tavşanlar kollagenin terminal determinantlarına karşı fazla miktarda antikor oluştururken, sıçanlar, gine domuzları ve fareler heliks yapıda bulunan determinantlara karşı antikor oluştururlar. Tavuklar ise kollagendeki bütün determinantlara karşı antikor oluştururlar(60).

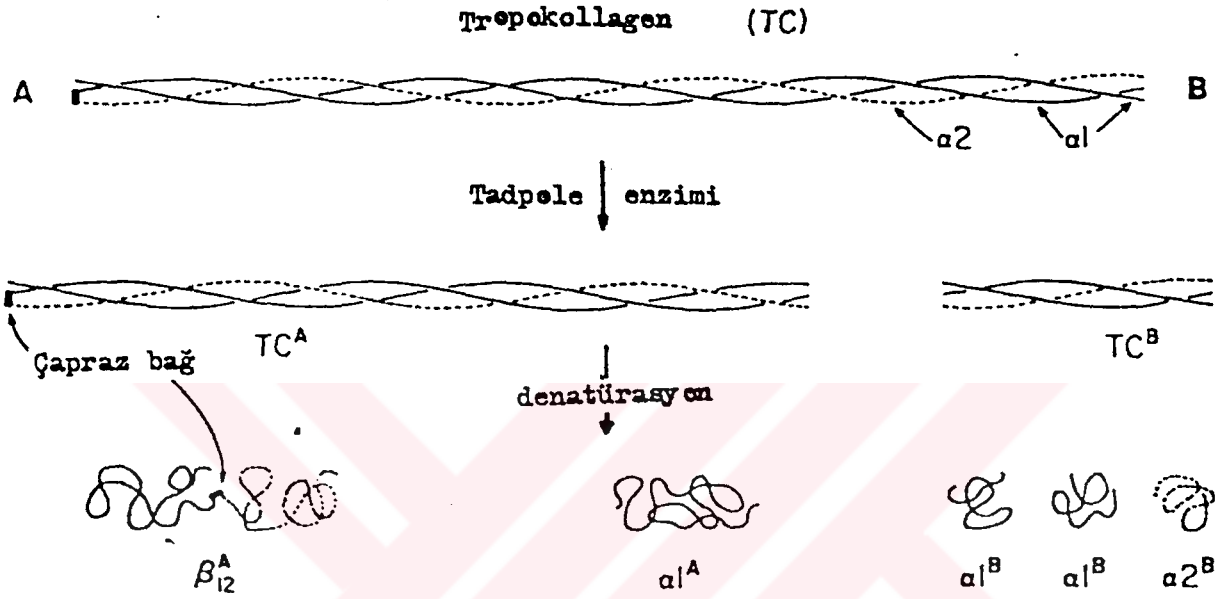


ŞEKİL 10- Procollagen (1-2 nolu) ve kollagendeki (3,4,5 nolu) 5 farklı antijenik determinantın bulunduğu bölgeler(60)

c) Kollagenin Yıkılışı

Kollagenin bozunması glikozil-galaktozil-hidroksilizin glikohidrolaz, spesifik kollagenazlar ve fagositozla olur(168). Doğal kollagen spesifik olmayan proteazlardan pek etkilenmez. Sadece spesifik olan doku kollagenazın etkisi ile yavaş yavaş molekülün bir ucundan yıkılır. Spesifik kollagenazlar, fizyolojik pH ve sıcaklıkta fiberlerin tropokollagen moleküllerini karboksi terminalinden 750 Å uzaklıkta belirli kısmından molekül yapısını bozmadan koparırlar. Böylece 3'lü heliks yapı-

ya sahip küçük ve büyük olmak üzere 2 parçaya ayırırlar. Karboksi terminalinin olduğu küçük parça orijinal molekülün % 25'i, amino terminalinin olduğu büyük parça ise % 75'i- dir (Şekil 11).



ŞEKİL 11- Tropokollagen molekülüne Tadpole kollagenazının etkisinin şematik gösterilişi. A: Amino, B: Karboksi terminal ucunu gösterir. Çapraz bağlar tropokollagenin her iki ucunda da olmasına rağmen, çözünür kollagenin ekstraksiyonunda karboksi terminal ucunun çapraz bağlı bölgesi elde edilmez. Denatürasyon ürünlerinde yukarıda gösterilenlere ilaveten α_2^A ve β_{11}^A ürünleri de vardır(134)

Bir ihtimal kollagenaz büyük parçayı da ikiye böler. Eğer kopan parçalar fiberin öteki molekülleri ile çapraz bağlarla bağlı değilse çözülür ve diffüze olur. 3'lü helikse sahip parçalar, asıl molekülden daha düşük erime noktasına sahiptir. Dolayısıyla vücut sıcaklığında denetüre olurlar. Bir ke-re denaturasyon olunca kollagenazla veya ekstrasellular mat-riksdeki diğer proteazlarla parçalanırlar, ilaveten bu parça-lar veya kısmen parçalanmış fibriller makrofajlar tarafından fagosite edilebilirler ve sekonder lizozomlarda proteazlarla asit pH'da bozulurlar. Serbestleşen prolin tekrar kullanılır.

Fakat hidroksprolin kollagen yapımında tekrar kullanılmaz. Di ve tri peptidler halinde ve çok az miktarda serbest halde idrarla atılır. Serbest hidroksprolinin çoğu hidroksprolin oksidazla yıkılır. Karaciğer ve böbrek hücrelerinin mikrozom fraksiyonunda 3-hidroksi- Δ^1 -prolin-5-karboksilik aside dönüşür, bu da ara ürünler üzerinden pirüvik asit ve glioksilik aside yıkılır. Ara ürün olan eritro- α -hidrokşi-L glutamik asitten bir kısmının beyinde malik aside dönüştüğü de saptanmıştır. Hidroksprolin yıkılışı ile oluşan glioksilik asid, oksidasyon yolu ile oksalik aside dönüşebilir. Bu bakımdan böbrek ve diğer dokularda ileri derecede kalsiyum okzalat birikimi ile kendini gösteren primer hiperoksalüride hidroksprolin metabolizması büyük önem taşır.

Normal ve yaralanmış dokulardaki çeşitli farklı hücre tipleri kollagenezları sentezleyebilirler. Bunlar fibroblastlar, polimorfonüklear lökositler, makrofajlar, derinin squamo epiteli ve sinovial epitel hücreleridir. Büyüme esnasında veya yaralanmaları takiben iyileşme esnasında bağ dokusunun normal oluşması için kollagen fiberlerin sentezi ve resorbsiyonu arasında denge olması gerekir. bu dengenin nasıl sağlandığı hakkında henüz detaylı bilgiler mevcut değildir(14,99, 150,153,168,180).

Kollagenazlar zincirindeki glisin-lösin ve glisin-illösin bağlarına etki ederler. Bunun sebebi henüz bilinmemektedir. Kollagen tip III'de, kollagenazın etki ettiği bölgeden yaklaşık 8 aminoasit sonra tripsinin etkili olduğu bir bölge olduğu ileri sürülmektedir. Bu bölgede Arginin-Glisin bağı mevcuttur. Tip I kollagen tripsinden etkilenmez. Bu belkide tip I'de, tripsinin tip II'de etkili olduğu bölgede, Anginin-Glisin bağının olmamasından dolayıdır. Bu da kollagenin fizyolojik şartlar altında bozunmasında, kollagenazdan başka proteolitik enzimlerin de etkili olabileceğini gösterebilir(134).

Kollagenazlar EDTA, 1.10 fenantrolin, penisilamin, sistein ve ditioritol ile inhibe edilebilir. İnkubasyonun

geri dönüşü kollagenazların elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişebilir. Aktivasyonu ise heparin ve p.kloramerhuri-benzoat ile sağlanabilir. Etki mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Serum da çeşitli kollagenazlar üzerine inhibitör etki yapar. Serumda inhibitor etki yapan makromolekül, α_2 -makroglobulindir. Lizozom, histon ve protamin gibi proteinler de kollagenin kollagenazla parçalanmasını inhibe ederler. Buna zıt olarak polianiyorik makromoleküller yani heparin, dekstran sülfat ve polietilen sülfonit asid ise kollagenolitik aktiviteyi arttırır(134).

d) Kollagen Turnover'ı

Kollagen önceleri tamamiyle inert olarak düşünülüyordu. Kollagen metabolizmasının incelenmesi ve spesifik aktivite çalışmaları kollagenin metabolik olarak aktif olduğunu göstermiştir. kollagen turnover'ı çözünürlüğüne, dokudaki durumuna ve canlı türüne bağlı olarak değişir. Yüksek turnover hızı, daha az çapraz bağlanmaları, gerilme kuvvetinde azalma, daha aktif doku oluşumu (reorganization) anlamına gelir. Örneğin periodontal ligamentler ve dişeti kollageninin turnover hızı yüksektir. Buna karşıt daha fazla gerilme kuvvetine ihtiyaç gösteren tendonlarda ise turnover hızı düşüktür. Turnover yaş ilerledikçe azalır(99).

e) Kollagen Metabolizma Bozuklukları

Kollagen sentezinde translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonlar kollagen yapısı ve fonksiyonu için çok önemlidir. Bu modifikasyonlar bir seri farklı enzimlerle yapılır. Herbirinin son ürünün oluşmasında özel rolleri vardır. Kollagen biyosentezi çok basamaklıdır. Bu basamakların herhangi birinin aksaması, eksik veya hatalı olması yetersiz ve anormal kollagenlerin sentezlenmesine sebep olur.

TABLO 3- Bağ dokusu ve kollagen kalıtsal hastalıklarının klinik belirtileri ve biyokimyasal defektleri(134,181)

Hastalık	Klinik Belirtileri	Kalıtsal Geçiş Şekli	Biyokimyasal Defektleri
Ehlers-Danlos I	Deri hiperesnekliği, kırılğanlığı, kolay çürümesi, incinmesi, belirgin eklem hipermobilitesi, yetersiz gelişim	Baskın geçişli	Bilinmiyor
Ehlers-Danlos II	I'e benzer belirtiler, fakat daha hafif olarak, gelişim yetersizliği yok.	Baskın geçişli	Bilinmiyor
Ehlers-Danlos III	Belirgin eklem hipermobilitesi, deride hafif değişimler, iskelet bozukluğu yok.	Baskın geçişli	Bilinmiyor
Ehlers-Danlos IV	Arterlerde kopma, şiddetli çürüme, incinme, çok ince deri, minimal eklem gevşekliği.	Resesif geçişli	Tip III kollagenin hatalı sentezi
Ehlers-Danlos V	Orta derecede eklem hipermobilitesi, ve deri esnekliği, kısa boy, kalp kapakçığı defektleri.	X'e bağlı resesif	Lizil oksidaz eksikliği
Ehlers-Danlos VI	Bel kemiğinde normalden farklı aşırı eğrilik, kırılğan deri, eklemlerde hipermobilitate, okuler kopma ve retinal ayrılma.	Resesif geçişli	Lizil hidrok-silaz eksikliği
Ehlers-Danlos VII	Kısa boy, aşırı eklem gevşekliği, doğuştan eklem çıkıklığı, ince ve esnek deri.	Resesif geçişli	Prokollagen proteaz eksikliği
Konjenital Osteogenizis imperfekta	Aşırı kemik kırılğanlığı	Resesif geçişli	Tip I kollagenin hatalı sentezi
Cutis laxa	Gevşek deri, eklem hipermobilitesi, üriner sistemde divertiküller oluşu.	X'e bağlı resesif	Lizil oksidaz eksikliği
Marfan's Sendromu	Uzun ince parmaklar, lens oynaması, iskelette deformasyon, kalb hastalığı, aortik anevrizma.	Baskın geçişli	Bilinmiyor

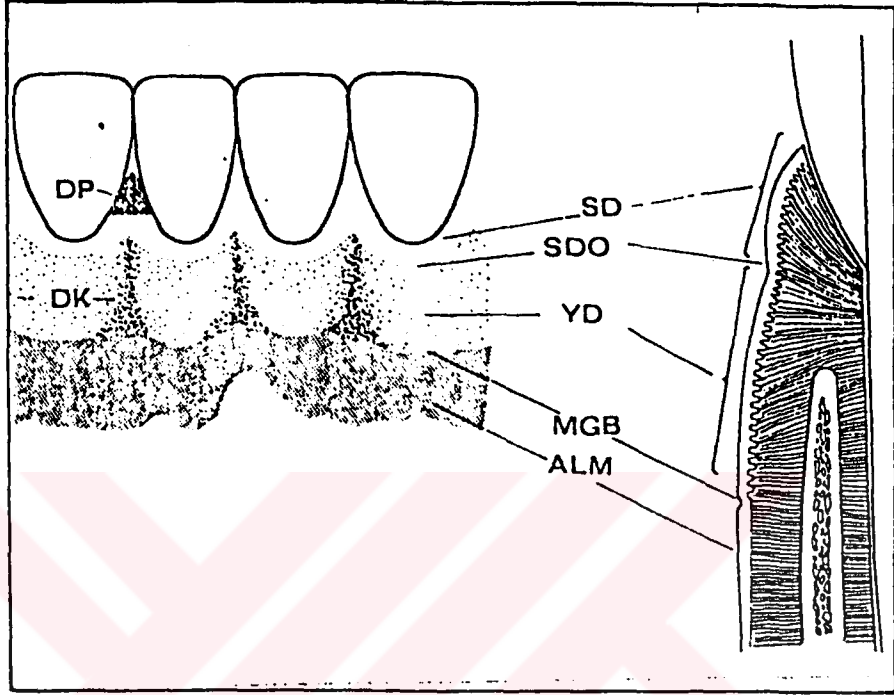
Vitamin C (askorbik asit) eksikliği sonucunda oluşan scurvy ^(skorbüt) adı ile bilinen hastalıkta kollagen fiberlerin sentezi bozulur. Vitamin C, lizil ve prolin kalıntılarını hidrolizleyen hidroksilaz enzimlerinin kofaktörüdür. Hidroksiprolin ihtiva etmeyen bir pokollagen molekülü, kararlı olmayan 3'lü heliks yapıya sahip olur. Hidroksilizin eksikliğinden dolayı tek tük oluşan fiberlerde çapraz bağlar tam anlamıyla oluşmaz. Kemik ve dentin anormaldir, yaralar, kesikler iyileşmez, ince kan damarları zayıflar ve kopabilir. Kanamalar özellikle dişeti ülserleşmesi ve kanamaları görülür. Dişler kaybedilir(86,122,180). Ehlers-Danlos sendromları ise kollagen sentezinin bozuk olduğu kalıtsal hastalıklardır (Tablo 3)(86, 122,134,180-182).

3- DİŞETİ VE DİŞETİ KOLLAGENİ

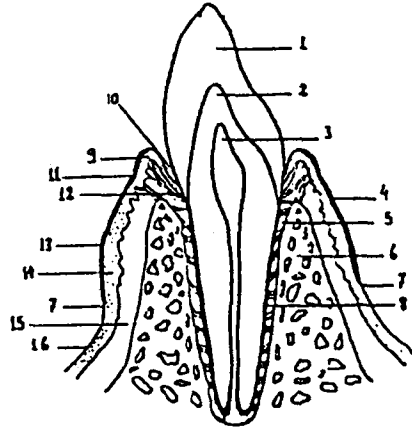
Mukoza, vücut içersindeki bütün boşlukları ve bunların dışarıya açılan kısımlarını örten bir dokudur. Ağız mukozası da ağız boşluğunu örter. Fizyolojik ihtiyaçlara uyacak şekilde ağızın çeşitli kısımlarında değişikliğe uğrayarak yerleşmiştir(155). Ağız mukozası, anatomik olarak çiğneme mukozası ve astar mukoza olarak iki kısma ayrılır. Dişeti ve serbest damağı içine alan çiğneme mukozası sert olup, deformasyona dayanıklıdır. Dil, ağız tabanı, yumuşak damak ve alveolar mukozayı içine alan astar mukoza ise daha fleksibil ve deformasyona daha yatkındır(99).

Periodonsiyumun (dişeti dokusu, periodontal membran, sement ve alveol kemiği) bir kısmını teşkil eden dişeti dokusu, ağız mukozasının dişlere yakın olan bölümünü meydana getirir. Başlıca fonksiyonları; doku tonunu muhafaza etmek, dişe yumuşak dokunun yapışmasını sağlamak, kök yüzeyi boyunca epitelin apikal göçünü önlemek ve dişeti kenarının altındaki dokularla birleşmesini sağlamak^{olan} dişeti(99), yüzey özelliklerine göre üç kısma ayrılır (Şekil 12, 13).

- 1- Serbest dişeti veya dişeti kenarı
- 2- Yapışık dişeti
- 3- Dişeti papili



ŞEKİL 12- Dişetin çeşitli kısımları ve alveol mukozası ile hududu. DP: Dişeti papili, SD: Serbest dişeti, SDO: Serbest dişeti oluğu, YD: Yapışık dişeti, MGB: Mukogingival birleşim, ALM: Alveol mukozası, DK: Dişeti konveksliği(155)



ŞEKİL 13- Vestibül ve oral düzlemde diş ve dişin destek dokularının şematik gösterilişi: 1- Mine, 2- Dentin, 3-Pulpa, 4- Dişeti, 5-Periodontal membran, 6- Alveol kemigi, 7- Mukogingival birleşim, 8- Sement, 9- Dişeti kreti, 10- Dişeti oluğu, 11-Serbest dişeti oluğu, 12- Epitalyal ataşman, 13- Yapışık dişeti, 14- Dişeti epiteli, 15- Dişeti bağ dokusu, 16- Alveol mukozası(155)

Serbest dişeti, dişetinin dişlere en yakın bölümünü teşkil ederek ince bir şerit halinde uzanır. Bu kısım ile yapışık dişeti arasındaki girintiye serbest dişeti oluğu adı verilir. Bu oluk ekseriya belirli değildir. Yapışık dişetin aksine serbest dişeti biraz oynaktır ve üzerinde ptrler ihtiva etmez. Diş yüzeyine yaklařtıķa dişeti kenarının rengi de açılmaya başlar ve en uçta şeffaf bir durum alır. Bunun nedeni, bu bölgenin epitel tabakası altında bağ dokusunun olmamasıdır.

Yapışık dişeti genişliği, 1-9 mm arasında değişir. Mukogingival birleşim ile dişeti kenarının apikal istikametteki hududunu yapan serbest dişeti oluğu arasında yeralır. Yapışık dişetin, altındaki alveol kemiğine ve sementin bir kısmına çok sıkı bir bağlantısı vardır. Bu nedenle yapışık dişetini sement ve alveol kemiğine ait dişeti diye iki kısma ayırmak mümkündür. Klinik görünüş bkımından, yapışık dişeti üzerinde, bir portakalın üzerindeki ptrleri andıran ufak noktacıklar halinde çıkıntılar bulunur. Dişetin bu kısmının başka bir özelliği de pigmentasyonun mevcudiyetidir. Yapışık dişeti üzerinde, dişler arasına rastlayan kısımlarda, serbest dişetinden mukogingival birleşime kadar uzayan dikey oluklar da mevcuttur.

Dişler arası dişeti papili diye de isimlendirilen dişeti papili, dişler arasını dolduran dişeti kısmıyla komşu iki dişin dişeti kenarlarının ortasından çizilen hayali bir hatın arasında kalır. Böylece dişlere bakan iki tarafı hafifçe konkav olan ve dişeti kenarının bazı kısımlarını içine alan bir üçgen şeklinindedir. Dişeti papilinin vestibül ve lingual yöndeki vestibul ve lingual papiller arasındaki çukurluğa "col" adı verilmektedir. Periodontal hastalığın başlangıç yeri olarak bu kısmın üzerinde önemle durulmaktadır.

Sıhhatli dişeti dokusu genel olarak açık pembe veya gl pembesi renginde tarif edilir. Dişetin rengi, epitelin

kalınlığı, keratinizasyon derecesi ve kalınlığı, derin bağ dokusu tabakalarındaki kan damarlarının zenginliği ve pigment ihtiva eden hücrelerin miktarı ile değişiklik gösterir.

Sıhhatli dişeti sıkı, elastiki ve serbest dişeti hariç altındaki kemiğin periostuna ve dişin sement dokusuna sıkıca bağlanmıştır. Dişetin sıkı kıvamını lamina propia içerisindeki kollagen fibrilleri ve muko-periostal yapışma temin eder.

Dişeti, histolojik olarak incelendiğinde başlıca epitel ve bağ dokusu kısımlarından oluştuğu görülür. Bu iki tabaka birbirinden bazal zar (kaide zarı) ile ayrılmıştır.

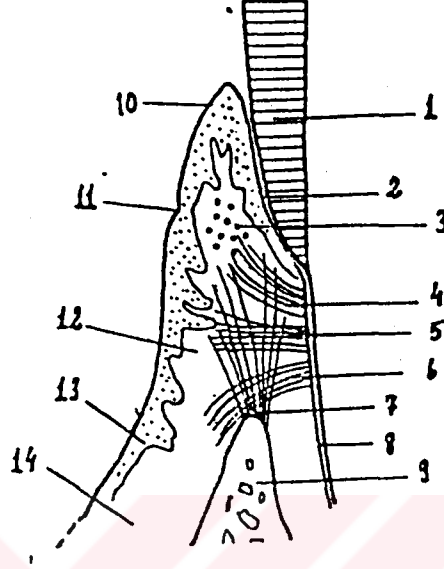
Dişeti yüzeyi çok katlı yassı epitele bağlanmıştır. Çok katlı yassı epitel tabakası, sebest dişetin diş yüzeyi ile temasta olan kısmı dışında, diğe kısımlar üzerinde keratinize olmuş durumdadır. Epitel hücreleri dişeti yüzeyine yaklaştıkça olgunlaşp yassılaşırlar.

Bazal zar 300,400 A⁰ kalınlığındadır. Lamina densa ve lamina lucida olmak üzere iki kısımdan oluşur.

Epitel tabakasının altında, bazal zardan sonra lamina propria adı verilen bağ dokusu uzanır. Bu doku yoğun kollagen fibillerden, bağ dokusu hücrelerinden ve ara maddeden oluşmuştur. Kollagen fibrilleri dişetini, diş ve alveole sıkıca tespit eder. Dişetin dişeti papilindeki kret şeklini, çeşitli gruplar halinde seyreden fibril demetleri yaparlar. Dişetinde bulunan kollagen fibriller 4 gruba ayrılırlar.

- 1- Dişeti fibril demetleri: 1.grup, 2.grup, 3.grup
- 2- Transseptal fibriller
- 3- Sirküler fibriller
- 4- Alveolo-gingival fibriller

Diş ve dişeti üzerinde yapılan uzunlama bir kesitte dişeti fibrillerini görmek mümkündür (Şekil 14).



ŞEKİL 14- Dişetinde bulunan fibril demetleri. Bu resimde bağ dokusunda bulunan belli başlı fibril grupları gösterilmiştir. 1- mine, 2- dişeti oluğu, 3- sirküler fibriller, 4- birinci grup dişeti fibril demetleri, 5- ikinci grup dişeti fibril demetleri, 6- üçüncü grup dişeti fibril demetleri, 7- alveolo-gingival fibriller, 8- periodontal membran, 9- alveol kemiği, 10- dişeti kenarı, 11- serbest dişeti oluğu, 12- yapışık dişeti, 13- mukogingival birleşim, 14- alveol mukozası(155)

Birinci grup dişeti fibrilleri, sementten başlayarak dış ve okluzal yöne doğru dişeti içersinde ilerleyerek sonlanır. İkinci grup fibriller ise sementten çıkıp apikal yönde ilerleyerek dişeti kenarına doğru yayılırlar. Üçüncü grup dişeti fibrilleri ise sementten çıktıktan sonra alveol kretinin üstünden geçerek apikal yöne ilerler ve kemiğin dış yüzeyinde bulunan fibrillerle birleşirler.

Sirküler fibriller, dişeti fibrillerini destekleyerek onların arasında dairesel olarak yol alırlar. Dişin etrafını sararak dişeti kenarının dişle sıkı olarak tutunmasını sağlarlar.

Transseptal fibriller komşu iki dişin sement dokuları arasında uzanırlar ve dişeti oluğu epitelinin apikal yöne ilerlemesini önlerler.

Alveolo-gingival fibriller ise alveol kemiği kretinden çıkarak kuronal yöne doğru bağ dokusu içersinde yayılırlar. Bütün bu fibrillerin dizilişleri, diş alveol boşluğunda hareketsiz tutabilecek yapı ve özelliktedir.

Dişeti bağ dokusunda kollagen fibrillerin yanında az miktarda retiküler, elastik ve oksitalan fibrillerin de mevcut olduğu gösterilmiştir. Oksitalan fibrillerinin elastik fibrillerle ilgili olduğu zannedilmektedir(70,99,155).

Sağlıklı kişilerin dişeti immunofloresan tekniklerle incelendiğinde kollagen tip I'in çoğunluğu oluşturduğu ve dişetin her tabakasında yer aldığı, kollagen tip III'ün daha çok dişeti epitelinin altındaki tabakalarda bulunduğu, kollagen tip IV ise bazal membranda özellikle dişetindeki sinirlerin, kan damarlarının kapillerlerin endotel hücrelerinin bazal membranlarında bulunduğu görülmüştür(43,44).

Histolojik ve histokimyasal çalışmalar dişetin, kollagen miktarı fazla olan fibroz bir doku olduğunu ve kollagen konsantrasyonunun yaşla arttırdığını göstermiştir. Dişetin yaş ağırlığının % 11-13'ü, kuru ağırlığının ise % 30-40'ını kollagen oluşturur. Total kollagenin % 3.5 nötral tuz çözeltilerinde çözünebilen, % 24.5 asitte çözünebilen ve % 72'si çözünmeyen kollagendir(99). Diğer dokularla karşılaştırıldığında, çözünebilir kollagen kısmının fazla olması dolayısıyla dişeti kollageninin turnover hızının daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür(69,99,162). Bu da dişetin yeni sentezlenmiş henüz çapraz bağları tam kurulmamış kollagence zengin olması demektir. Radyoaktif maddelerle yapılan çalışmalarla çeşitli dokularda (genç, yaşlı, hastalıklı) kollagen biyosentezi ve bozunması incelenmiş ve genellikle büyümekte olan hayvanların

bağ dokularındaki kollagenin oluşum ve bozunma hızının yetişkin hayvanlara nazaran daha yüksek olduğu bulunmuştur(69). Hatta periodontal ligamentteki kollagen ve diğer proteinlerin metabolizmasının dişetinden ve diğer dokulardan daha hızlı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir(163, 164). 1978'de Orłowski dişeti kollagen metabolizmasını incelemiş ve daha önceki çalışmalardan farklı olarak dişeti kollageninin daha kararlı olduğunu, kollagen metabolizmasında belirli bölgesel değişimlerin olabileceğini ve kollagenin metabolik pool'un birden fazla olabileceğini ileri sürmüştür. Periodontal ligament ve dişetinde tip I'den başka kollagen tip III'ünde olması, birden fazla metabolik pool'un olduğu fikrini kuvvetlendirir. Farklı metabolik pool'lar genetik olarak kollagenlerin metabolizmasını etkileyebilir(135).

Dişeti kollageninin turnover hızının yüksek olması dişetin yenilenme ve iyileşmeye olan yatkınlığını açıklamakta yardımcı olabilir. Ayrıca iltihaplı dişeti hastalıklarının erken safhasında hızlı kollagen kaybını da açıklayabilir(69).

İltihaplı dişeti hastalıklarında kollagen kaybına etki eden mekanizmalar incelenmiş ve başlıca 2 sebep üzerinde durulmuştur. 1- Kollagen sentezinde azalma, 2- Mevcut kollagenin hidrolitik enzimlerle parçalanması. Fizyolojik şartlarda kollagen, hidrolitik enzimlere karşı dayanıklıdır. Fakat periodontal hastalıklarda meydana gelen kollagen kaybına, oluşan plakta aktive edilen spesifik endojen kollagenazın sebep olduğu ileri sürülmüştür. Dişeti dokularının çeşitli kısımlarında kollagenolitik aktivite incelenmiş ve dişeti kollagenolitik enziminin spesifik kollagenaz olduğu moleküler ağırlığının 40.000 civarında olduğu, EDTA, sistin, serum ile inhibe edildiği ve Ca^{+2} ionu gereksiniminin fazla olduğu, pH 7-9.5 arasında aktif olduğu gösterilmiştir(57,150).

Dişeti kollagen metabolizmasını etkileyen önemli bir hastalıkta diyabettir. Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş sıçanların derilerinde kollagen metabolizmasının arttığı(158) ve dişetinde yeni oluşmuş kollagenin bozunmasının çok hızlandığı(159) gösterilmiştir. Buna karşılık barsak (intestine) ve glomerular bazal membranda kollagen kaybı yerine kollagen birikmesi görülmüştür(157,158).

İnsanlarda ve sıçanlarda diyabetin doku kollagenaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Dişeti doku kültürlerinde de bu etki görülmüştür. Yarı sentetik tetrasiklin olan monosiklinin, diyabetin oluşturduğu dişeti kollagenolitik aktiviteyi azalttığı, periodontal hastalıklarda ve diğer patolojik durumlarda ortaya çıkan fazla kollagen resorpsiyonunu baskılayarak tedavi ettiği ileri sürülür(66). Diğer tetrasiklinlerin de insan crevicular sıvısında kollagenaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir(67).

3- NONENZİMATİK GLİKOZİLASYON VE ÖNEMİ

Glikoz, hiperglisemi esnasında retina, sinirler, glomeruli, eritrositler ve diğer insüline bağımlı olmayan dokularda birikerek fazla kullanılması sonucunda zararlı olabilir. Glikozun kullanılması ve zararlı etkileri başlıca aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1- Hiperglisemi sırasında UDP-hegzos ve UDP-hegzonuratların yapımının artması, glikojen, glikoprotein ve glikoaminoglikanların fazla oluşması,

2- Glikozun, aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz ile enzimatik dönüşümü sonucunda, hücre içi sorbitol ve fruktoz birikmesi ve dolayısıyla osmotik hasarın meydana gelmesi,

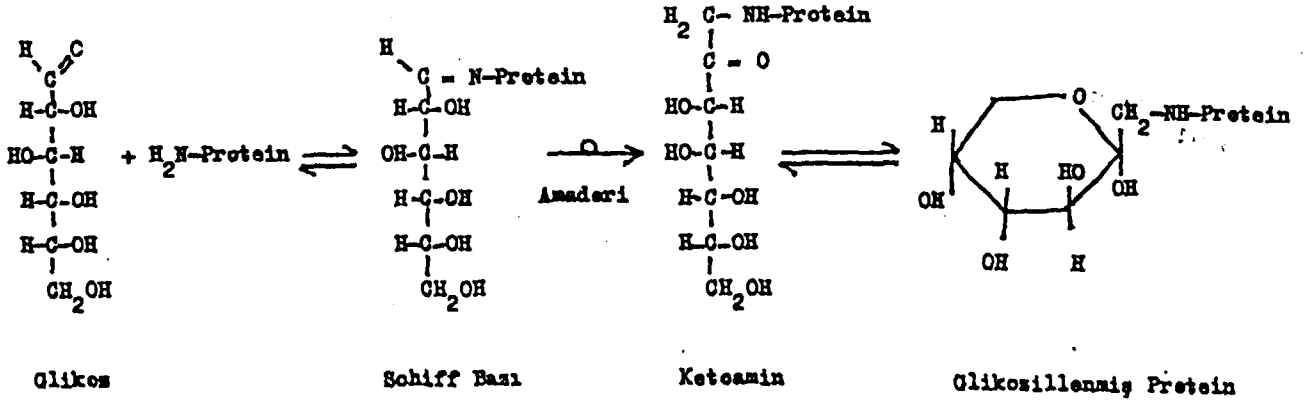
3- Glikozun, nonenzimatik reaksiyonla proteinlerin serbest amino gruplarına bağlanması ve proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde değişikliklere sebep olabilmesi.

Nonenzimatik glikozilasyonla protein modifikasyonuna sebep olan bu son mekanizma, diyabette görülen retinopati, nefropati, aterosklerozis, miyokardiyal enfarktüs, nöropati ve diğer komplikasyonların patojenezinde rol oynayabileceği düşünüldüğünden beri çok önem kazanmıştır(182).

Fizyolojik şartlar altında nonenzimatik glikozilasyon ilk olarak, Allen ve arkadaşları tarafından 1958'de glikozun hemoglobinin NH_2 -terminalindeki valine bağlanması olarak gösterilmiştir(5). 1966'da Holmquist ve Schroeder tarafından teyid edilmiştir(81). Bunn ve arkadaşları 1978'de yaptıkları biyokinetik çalışmalarla glikoz bağlanmasının nonenzimatik olduğunu(32), Bookchin ve Gallop 1968'de, Bunn ve arkadaşları 1975 ve 1978'de yaptıkları kimyasal çalışmalarla glikozun kararlı ketoamin bağı ile bağlandığını göstermişlerdir(25,32,33).

İlk olarak 1972'de kollagende yaşa bağlı değişikliklerin incelenmesi sırasında Robins ve Bailey tarafından fizyolojik şartlarda proteinin polipeptid zincirinde bulunan lizinin amino grubuna glikoz bağlandığı gösterilmiştir. Bu çalışmaları diğerleri takip etmiştir(151).

Kimyasal olarak nonenzimatik glikozilasyon, translasyon sonrası, proteinlerin serbest amino grubuna glikozun karbonil grubunun herhangi bir enzim yardımı olmadan bağlanmasıdır. Hemoglobinde glikoz, β zincirinin valin amino asidinin amino grubuna, kollagende ise lizin ve hidroksilizin amino asitlerinin serbest amino gruplarına bağlanır. İlk olarak, aldimin yapılı kararsız schiff bazı oluşur. Sonra amadori düzenlenmesi ile kararlı kateomin yapılı bileşik oluşur(87,88, 107,112,119,182) (Şekil 15).



ŞEKİL 15- Proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonunun gösterilmesi(182)

Bu tip reaksiyona ilk olarak yiyecek endüstrisinde rastlanılmıştır. Ortamda indirgeyici şeker bulunduğunda, proteinlerin uzun süreli saklanması sırasında, sıcaklığa bağlı olarak kahverengin oluşması ve proteinlerin besinsel değerinin azalması, o zamanda yaşamış, yiyeceklerle uğraşan bilim adamları için ciddi bir problem teşkil etmiştir. Daha sonraları bu olayın şekerle, proteinin serbest amino grubu arasındaki bir reaksiyon sonucunda meydana geldiği, oluşan ürünün de çeşitli reaksiyonlardan sonra kahverenkli maddeye dönüştüğü ileri sürülmüş, protein ve karbonhidrat arasındaki bu reaksiyona yiyecek endüstrisinde Millard reaksiyonu adı verilmiştir(19,154).

Nonenzimatik glikozilasyon Millard reaksiyonunun ilk basamağıdır. Millard reaksiyonunun sonraki basamağı ise nonenzimatik browning'dir(124).

İn vitro çalışmalar ketoamin bileşiğinin browning reaksiyonu ile (dehidratasyon, tekrar düzenleme, kopma vs gibi reaksiyonlarla) melanoidler adı verilen çok çapraz bağlı, çözünmeyen, pigmente olmuş, floresan, karbonhidrat-protein polimerleri haline dönüştüğünü göstermiştir. İn vivo da ise browning reaksiyonunun meydana gelip gelmediği henüz tam olarak bilinmemektedir. Fakat, Millard reaksiyonunun sonraki basamağı olan nonenzimatik browning'in in vivo'da da olabileceği ve yaşam süresi uzun olan lens kristalini ve kollagen gibi proteinlerin de bundan etkilenebileceği ileri sürülmektedir(87,124).

Hemoglobinin nonenzimatik glikozillenmiş türevleri olan minor hemoglobinlerin bulunması, diyabetik komplikasyonların oluşumunda tartışmalı olan hipergliseminin rolüne yeni bir boyut kazandırmıştır. Nonenzimatik glikozillenmiş hemoglobinlerin varlığı, diyabetik hastalarda glikozillenmiş hemoglobinlerin normal kişilere oranla birkaç kat arttığı, glikozillenmiş hemoglobinlerin, glikozla hemoglobin arasındaki reaksiyon sonucunda meydana geldiği ve glikozillenmiş hemoglobin ölçümünün uzun süreli glisemi kontrolünde önemli bir indeks olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir(17,56,63,75,84,87,92,95,127,166,171,182,185). Diyabette, glikozillenmiş hemoglobinin 2-3 difosfogliserata duyarlılığının azaldığı, oksijene karşı affinitesinin arttığı, bununda dokunun hipoksisine ve dolayısıyla hücre sel hasara neden olabildiği düşünülmektedir(121,182).

Sonraları, sadece hemoglobinin değil diğer çeşitli proteinlerin de nonenzimatik reaksiyonla glikoz bağladıkları gösterilmiş, bu proteinlerin glikozillenmesinin, yapılarında ve fonksiyonlarında değişimlere ve buna bağlı olarak çeşitli klinik komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olabileceklere ileri sürülmüştür. Bunları kısaca aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

Glikozillenmiş albümin ve serum proteinleri diyabetli kişilerde normallere oranla daha fazla bulunur. Glikozillenmiş albümin ve serum proteinlerinin ölçümü, glikozillenmiş hemoglobinden farklı olarak, 1 veya 2 haftalık ortalama kan glikozunu yansıttığından kısa süreli glisemi kontrolünde kullanılabilir(88,98,121,131,194). Albüminin glikozilasyonu çözünürlüğünü azaltır(88). Glikozillenmiş albüminin ilaç ve bilirubin bağlama kapasitesinin azaldığı in vitro olarak gösterilmiş, in vivo olarak henüz doğrulanmamıştır(87). Nonenzimatik glikozillenmiş serum proteinlerinin devamlı enjeksiyonla oniki hafta boyunca farelere verilmesi glomerular bazal membranda kalınlaşmaya sebep olmuştur (McVerry ve ark. 1980). Bu sonuç glikozillenmiş serum proteinlerinin diyabetik nöfropatinin gelişmesinde rol aldıklarını gösterebilir. Diyabette böbrek bazal membranında albümin ve immunglobinlerin birikmesi bilinmesine rağmen, bu birikimlere glikozillenmiş albümin veya serum proteinlerinin sebep olup olmadıkları henüz kesinlik kazanmamıştır(87,182).

Fibrinojen yarı ömrü 3-4 gün olan, hemostazda önemli rol oynayan bir proteindir. Fibrinojen molekülünün lizin amino asidinin ϵ -amino grubu fibrin monomerlerinin çapraz bağlanmasında ve fibrinolizde önemlidir. Fibrinojenin nonenzimatik glikozilasyonunun diyabetlilerde artması, fonksiyonu ve bozunması açısından önem taşır. Brownlee ve arkadaşları, fibrinojeni in vitro glikozillemişler ve plazmine hassasiyetinin azaldığını görmüşlerdir(112).

Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) glikozilasyonu, bu proteinlerin kültür edilmiş insan fibroblastları tarafından alım ve bozunma hızını değiştirir. Bu etkiler, kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde görevli yüksek affinite- li LDL bağlayıcı reseptörün inhibisyonu sonucunda oluşur. LDL katabolizmasında reseptöre bağımlı bozukluk ortaya çıkar. Reseptör aracılığı ile glikozillenmiş LDL alımı fibroblastlar tarafından azalır. LDL'ye zıt olarak HDL'nin katabolizması

glikozilasyonla hızlanır. Diyabette bu proteinlerinin glikozilasyonunun artması, damar hastalıklarının gelişmesi ve aterosklerotik riskin artması için yeterli olabilir(87,182).

Glikozillenmiş eritrosit membran proteinlerinin, diyabetik durumda artması, eritrosit zarının geçirgenliğini değiştirerek ve hemolize karşı direncini arttırarak, normalden fazla ADP'nin serbest kalmasına sebep olabilir. Serbest kalan ADP yeterli konsantrasyona ulaşına trombosit agregasyonunu başlatarak çeşitli damar lezyonlarını meydana getirebilir. Eritrosit zarının deformasyonunun azalması ve endotel hücrelere adhezyonunun artması damar lezyonlarının gelişmesine yardımcı olabilir. Bu değişiklikleri membran proteinlerinin glikozilasyonunun neden olup olmadığı henüz açıklığa kavuşmamıştır(87,182).

1981'de Vlassara ve arkadaşlarının diyabetik sıçan ve köpeklerde periferik sinir proteinlerinin glikozilasyonunun(177), daha sonra da sıçan periferik ve merkezi sinir sistemi miyelin komponentlerinin glikozilasyonunun diyabette çok fazla arttığını(176) ve 1982'de Vost ve arkadaşlarının diyabetli kişilerde glikozillenmiş periferik sinir proteinlerini göstermesi(182), diyabetik nöropati patogeneğinde nonenzimatik glikozilasyonun rolü üzerinde çeşitli tahminlerin yapılmasına yol açılmıştır. Miyelin glikozilasyonu, miyelinin makrofajlar tarafından tanınmasına ve yakalanmasına neden olan bir sinyal oluşturabilir. Böylece diyabette, miyelin turnover'ı ve demiyelizasyon artabilir. Sinir hücrelerinin yapısı ve iletkenliği bozulabilir(87,182).

Lens, glikoz alımında insüline bağımlı değildir, dolayısıyla yüksek konsantrasyonda glikoza maruz kalır. Diyabette, katarakt oluşum hızının arttığı, yaşlı ve kataraktlı lenslerde sarı-kahve renkli, floresan ve çok çapraz bağlı proteinlerin oluştuğu görülmüştür. İlk defa 1978'de Stevens ve arkadaşları in vivo olarak lens kristallerinin nonenzimatik glikozilasyonu göstermiştir. Daha sonraları in vivo ola-

rak diyabetik sıçanlarda lens kristallerinin nonenzimatik glikozilasyonun arttığı Monnier ve arkadaşları tarafından (1979), insanlarda ise Pande ve arkadaşları (1979) ve Arseri ve arkadaşları (1980) tarafından gösterilmiştir. Lens kristallerinin glikozla inkubasyonu sonucunda nonenzimatik glikozilasyonu ve disülfid bağlarının oluşumu artmış, daha uzun süreli inkübasyonlarda ise, yaşlıların lenslerinde görülenlere benzeyen sarı-kahve pigmentler meydana gelmiştir. Bütün bunlardan, lens kristallerinin nonenzimatik glikozilasyonunun diyabetik kataraktın gelişmesine, yaşlı ve kataraktlı lenslerde nonenzimatik browning ürünlerinin oluşmasına neden olabileceği ileri sürülmüştür(87,124,182).

Çeşitli doku proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu da incelenmiş, diyabetik sıçanların karaciğer, böbrek ve kalp dokusu proteinlerinin nonenzimatik glikozilasyonunun normalere oranla arttığı(190), diyabetik kişilerden alınan tırnakların nonenzimatik glikozilasyonunun normallere göre daha fazla olduğu(16) gösterilmiştir.

Hormonların ve enzimlerin nonenzimatik glikozilasyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. 1979 Dolhofer ve Wieland, in vivo olarak insulinin glikozilasyonunu ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Fakat in vivo olarak denenmemiştir. Yine Dolhofer ve arkadaşları sığır böbrek N-asetil- β -D-glikozaminidaz'ın nonenzimatik glikozilasyona duyarlı olduğunu ve enzim aktivitesinin azaldığını, enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişmeler meydana getirdiğini gözlemişlerdir(107,182).

Hiperglisemi esnasında nükleik asitlerin de nonenzimatik glikozilasyonu artabilir. Glikoz, nükleik asitlerin amino grupları ile birleşerek uzun ömürlü makro bileşikleri oluşturabilir. Bu bileşiklerin oluşması ile genetik bilgileri taşıyan nükleik asit parçaları görevlerini yapmaz duruma gelirler. Örneğin eğer glikoz, herhangi bir enzimin bilgilerini ta-

şıyan DNA parçacığı ile bileşik oluştursa, bu DNA parçasından bilgiler, mRNA ile iletilemez; sonuçta gerekli enzim ribozomlarda sentezlenemez. Enzim olmayınca o enzime bağlı canlılık olayları da meydana gelemez(30,138).

Diyabette, kollagende görülen değişiklikler, gerek nonenzimatik glikozilasyon gerekse diğer değişiklikler diyabet komplikasyonlarının patalojisi açısından çok önem taşır.

Diyafamatik tendon ve deri kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun diyabetli kişilerde ve yaşlanma ile arttığı(93,160), diyabetli kişilerin böbreklerinden elde edilen tip 4 kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun normallere oranla daha fazla olduğu(172) gösterilmiştir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. STZ ile diyabet yapılmış sıçanların tendon kollageninin(104,107,191,192,193), toraks aorta kollageninin(152), glomerular bazal membran kollageninin(87), in vitro glikozilasyon sonucu tavşan ön kol tendon kollageninin termal stabilitesinin ve nonenzimatik glikozilasyonunun(89) arttığı tespit edilmiştir. Koyun karotid arter kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu jugular ven kollageninki ile karşılaştırıldığında, arter kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun ven'den daha fazla olduğu bulunmuştur(47).

STZ ile diyabetik yapılmış sıçanların kuyruk tendon kollageninin termal stabilitesinin, nonenzimatik glikozilasyon, glikozillenmiş hemoglobin ve yaşla korrelasyonlu olarak arttığı(191), termal stabilitedeki ve nonenzimatik glikozilasyondaki artışın, in vitro aspirin ve sodyum salisilatla inkubasyondan sonra önlenemediği, fakat in vivo olarak aspirin ve sodyum salisilat verilmesinin nonenzimatik glikozilasyonu değiştirmeden sadece termal stabilitedeki artışı önlediği belirtilmiş ve nonenzimatik glikozilasyonun in vivo'da kollagen özelliklerinin düzenlenmesinde esas faktör olmadığı, salisilatların diyabet komplikasyonlarının önlenmesinde yeni bir terapik seçim olabileceği ileri sürülmüştür(193).

Bir başka çalışmada da kollagendeki lizin ve hidroksilizin nonenzimatik glikozilasyonunun termal stabiliteye etki etmediği gösterilmiştir(9).

Antiprostaglandin aktiviteli maddelerin sıçan tendon kollageninin termal stablitesi ve nonenzimatik glikozilasyonu üzerine etkileri incelenmiş, bu maddelerin normal kollagende bir değişiklik meydana getirmediği halde, diyabetlilerde termal stabilitedeki artışı önlediği, nonenzimatik glikozilasyon üzerinde etkili olmadığı, in vitro'da ise tamamiyle etkisiz olduğu gösterilmiştir. Araşidonik asit metabolizmasının, normalde kollagen özelliklerinin tayininde çok az rol oynadığı, fakat diyabette önemli olduğu ileri sürülmüştür(192).

Normal kişilerden elde edilen deri kollageninin kollagenaza karşı dayanıklılığı üzerine in vitro nonenzimatik glikozilasyonun etkisi araştırılmış, normal ve glikozillenmiş kollagenlerin kollagenaz karşısındaki davranışlarında bir farklılık görülmemiştir. Nonenzimatik glikozilasyonun enzimatik yıkıma karşı, dayanıklılığını artırmadığı ileri sürülmüştür(113). Bu daha önceki çalışmalara(93,160) uygunluk sağlamaz.

Tip I diyabetli hastaların deri kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyonu ile sınırlı eklem hareketi arasındaki ilişki araştırılmış; kollagenin nonenzimatik glikozilasyonunun sınırlı eklem hareketinin gelişmesinde önemli rol oynamadığı açıklanmıştır(114).

Glikozillenmiş kollagenlerin trombosit agregasyonu oluşturma potansiyelinin, normal kollagenlere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir(105,106). Glikozillenmiş kollagenin diyabette önemli bir trombotik risk olabileceği ileri sürülmüştür(104).

Diyabette artan kollagen nonenzimatik glikozilasyonu, çözünürlüğün, elastikiyetin azalması ve proteazlara karşı dayanaklılığın artması ile korrelasyonludur(87).

Sığır retina kapillerinin perisit kültürlerinde çözünür kollagen sentezinin ve nonenzimatik glikozilasyonun, artan glikoz konsantrasyonu ile arttığı, çözünür olmayan kollagenin sentezinin ise azaldığı(111), in vitro olarak yapılan diğer çalışmada ise sığır retina mikro damarlarının bazal membran kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyonunun arttığı ve bu artışın aspirinle inkubasyondan sonra inhibe edildiği gösterilmiştir(110).

Glikozillenmiş kollagenin antijenik karakterde olduğu ve otoimmün cevabı başlatabileceği ileri sürülmüştür(18).

Proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu ile oluşan ketoamin bileşikler zamanla çeşitli bozunma, dehidratasyon ve yeni düzenlemelerle nonenzimatik browning ürünlerini oluştururlar ki, bunlar oldukça reaktif karbonil gruplar ihtiva ederler. Nonenzimatik glikozilasyonun son ürünleri olan bu karboniller diğer proteinlerin amino grupları ile moleküller arası çapraz bağları oluştururlar(29). Plazma proteinlerinin nonenzimatik glikozilasyon son ürünleri (ileri glikolizasyon ürünleri) ile tuzaga düşürülmeleri, diyabette ekstra vasküler olarak protein birikmesine sebep olabilir. Bağlanan bu proteinler de antikor, antijen gibi davranıp immun kompleks oluşturabilirler. Buna açıklık kazandırmak amacıyla yapılan çalışmada; in vitro glikozillenmiş kollajenin, amino asitleri, albümin ve IgG gibi proteinleri bağlama kapasitesinin normallere oranla çok fazla olduğu, oluşan kompleks molekülün de immunojen karakterde olduğu, antijen veya antikor olarak davrandıkları gösterilmiştir. Diyabette görülen damar geçirgenliğinin artması fazla miktarda plazma proteinlerinin kaçmasına, glikozillenmiş proteinlerle bağlanarak immun kompleks oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmüştür(29).

İlerlemiş nonenzimatik glikozilasyon reaksiyonunun biyolojik etkileri; enzim inaktivasyonları, regülatör molekül bağlanmasının inhibisyonu, glikozillenmiş proteinlerin çapraz bağlanmaları, glikozillenmiş ekstraselluler matriksin çözünür proteinleri bağlaması, proteazlara karşı artan dayanıklılık, nükleik asit fonksiyonlarında anormallikler, makromolekülleri tanımada ve endositozis'de değişme, immunojenitenin artışını içine alır(30).

İnsan ateroslerotik lezyonlarında oluşana benzer şekilde, kollagen üzerinde oluşan ileri nonenzimatik glikozilasyon ürünlerinin LDL bağlama kapasiteleri in vitro olarak incelenmiştir. Kollagen ileri glikozilasyon ürünlerinin ve LDL konsantrasyonunun artması ile, kollagen ileri nonenzimatik glikozilasyon ürünlerine LDL'nin bağlanmasının arttığı gösterilmiştir. Bu durumun diyabetli kişilerde aterosklerozun gelişmesini hızlandırabileceği ileri sürülmektedir(31).

İleri glikozilasyon son ürünlerinin ekstrasvasküler matrikste ekstrasvaze olmuş serum proteinlerini kovalent bağlarla bağlayarak retina ve glomerullarda, kapillerlerin kapanmasına, periferal, serebral ve kronik arterlerde daralmalara sebep olabilirler. Makrofaj reseptör sistemi, glikozilasyon sonucu proteinlerin birikmesini önleyebilir ve ileri glikozilasyon son ürünlerini tanıyıp yok edebilir. Fakat diyabette bu proteinlerin fazlaca oluşması makrofaj sisteminin kapasitesini aşabilir(178).

Yaptığımız literatür taramasında dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu ile ilgili çalışmalara rastlamadık. Sadece submandubular kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun diyabette arttığı gösterilmiştir(118).

5- KOLLAGEN-TROMBOSİT İLİŞKİSİ

Trombositler hemostatik sistemde kanamaların durdurulmasında önemli rol oynayan hücrelerdir. Çeşitli şekillerde uyarıdan sonra adezyon, agregasyon ve sekresyon fonksiyonlarını yapmaya başlarlar. Bilindiği gibi kollagen, trombositlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin fonksiyonlarını başlatan bir bağ dokusu proteini'dir. Herhangi bir yaralanma sebebi ile damar endoteli yırtıldığında, bir taraftan trombositler endotelin altında yer alan subendoteldeki ve/veya daha derin tabakalarda bulunan kollagen liflere yapışarak kanama olayında bir tıkaç vazifesini görürken diğer taraftan faktör XII kollagenle temas edince aktifleşir ve pıhtılaşma olayı bir dizi reaksiyon sonunda gerçekleşir(22,23).

Trombositlerin subendotele yapışmaları için ortamda, fibrinojen, von willebrand faktörü (vWF), divalen katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2}) ve ADP gerekmektedir. Kollagene yapışması için hiçbir ara maddeye gerek yoktur(23).

Trombositler kollagen, trombin, adrenalin ve ADP gibi maddelerle uyarıldıklarında birbirlerine yapışır (adezyon), kümeleşirler (agregasyon) ve sahip oldukları ADP, serotonin, 5-hidroksitriptamin trombosit faktör-3,4 vs gibi maddeleri ortama verirler (sekresyon)(23). Bu fonksiyonlarından biri bozuk olursa çeşitli trombosit hastalıkları ortaya çıkar(35,36,37). Bu fonksiyonların yapılamaması veya normalden aktif bir şekilde görev yapması durumunda ise ateroskleroz da olduğu gibi(54,73,120) hiperadezyon, hiperagregasyon, hipersekresyon ortaya çıkar. İşte bu nedenlerle olabilecek, trombositlerin hipo ve hiperagregasyonu çeşitli maddeler (kollagen, ADP, adrenalin) kullanılarak ölçülmektedir.

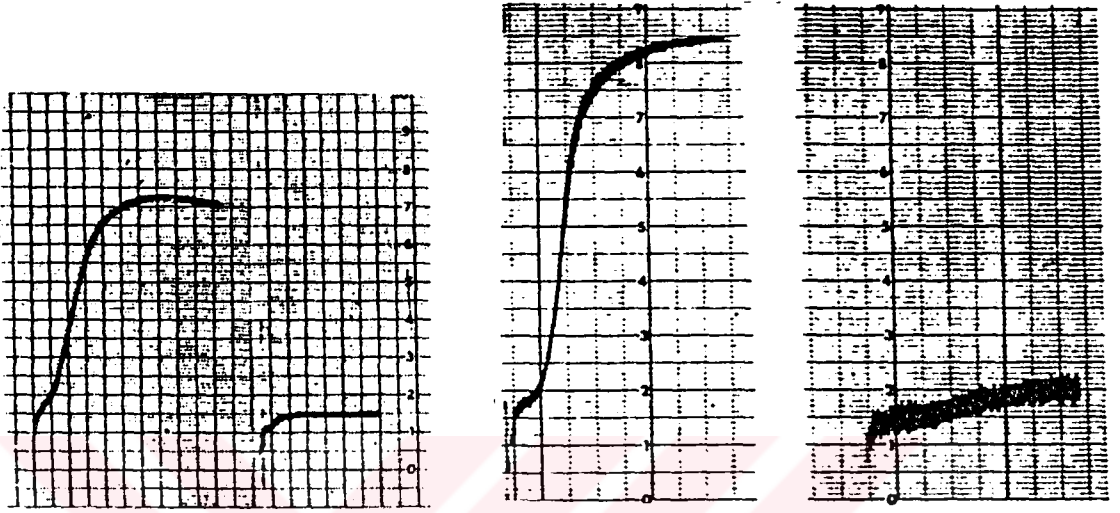
İn vitro trombosit agregasyon testlerinin in vivo trombosit işlevlerini ne derece yansıttığı bilinmemektedir.

Bunların içinde kollagenle yapılan testin, bu madde bağ dokusunda bulunduğu için gerçeğe en yakın değerleri vereceği düşünülebilir(136).

Agregasyon testleri, trombositte zengin plazmanın optik yoğunluğundaki değişiklikleri saptayıp kaydetmeye dayanmaktadır. Boin ve Cross'un geliştirdikleri yöntemde, devamlı karıştırılan plazma, trombositlerin diole benzer şekilleri nedeniyle girdaplar oluşturmakta; buna agregasyon yapıcı maddeler ilave edildiğinde trombositler kümeleşmekte ve plazmadan ışığın geçmesi artmaktadır(22,26).

Agregasyon testleri genellikle kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilir. Bazı hastalıklarda trombopati, trombasteni, lösemi, albinizm, karaciğer hastalıkları ve ilaçlara bağlı olarak (aspirin) agregasyon değişimine rastlanır (Şekil 16). Trombastenide, ADP, kollagen ve noradrenalin ile agregasyon görülmez. Trombopati de ise, kollagen ve noradrenalin ile agregasyon görülmemekle beraber ADP ile cevap alınır. Akut lösemilerde agregasyon, trombopatideki duruma benzer(22,69).

Legnard ve Nurden, trombosit fibrinojen reseptörlerinin kollagenle ilişkisini araştırmak için bazı kalıtsal trombosit hastalığı olan kişilerin trombositlerine kollagen yardımıyla fibrinojen bağlanmasını incelemişlerdir. Normal trombositlere kollagen yardımıyla fibrinojen bağlanmasının, trombosit membranındaki GPIIb-IIIa kompleksinin mevcudiyetinin ve sekrete olmuş ADP'nin gerekli olduğunu, fakat bunun granül release'inden bağımsız olduğunu; diğer bir deyişle kollagenle oluşturulan trombosit agregasyonunun, GPIIb ve GPIIIa kompleksine fibrinojen bağlanmasına bağlı olduğunu, bunda dens granüllerinin sekresyonuna bağlı fakat α granül komponentlerine bağlı olmadığını ileri sürmüşlerdir(103).

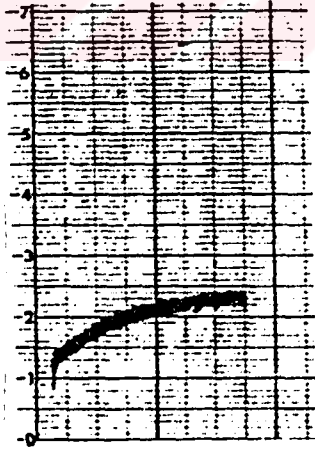


Kontrol

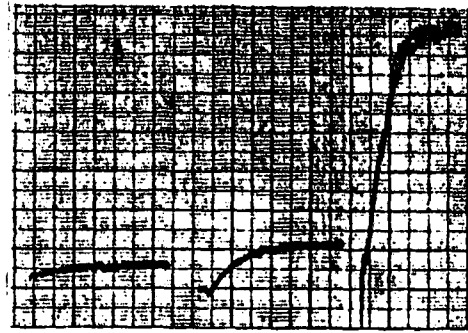
Trombopati

Kontrol

Karaciğer sirozu



Albinizm



Epinefrin ile Kollagen ile Bovine Fibrinojen ile

Trombasteni

ŞEKİL 16- Bazı hastalıklarda kollagenle elde edilen trombosit agregasyon eğrileri(175)

Trombosit membranında yerleşmiş olan glikoproteinlerden GPI'in trombin reseptörü, GPIIb'nin ise ADP reseptörü olduğu bilinir. Yine yapılan çalışmalardan aterosklerozlu kişilerin trombosit membranındaki trombin ve ADP reseptöründe bir artış olduğu anlaşılmaktadır(49,50,51).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda trombosit membranında bulunan GPIIb'nin kollagen içinde reseptör olarak hareket edebileceği söylenmiştir(173). In vitro çalışmalarda, trombositlerin kollagene adhezyonunda birçok parametrenin etkili olduğu ve en önemlisinin kollagenin konformasyonunun(161) ve von willebrand faktörünün olduğu gösterilmiştir(126). Subendotelin kollagenazla etki ettirilmesinden sonra trombosit toplanması görülmemiştir. Trombositlerin kollagenaza dayanıklı subendotel mikrofibrillerine yapıştığı ve kollagen olmayan mikrofibrillere de vWF mevcudiyetinde bağlandığı ileri sürülmüştür. Perret ve arkadaşları (1986), yaptıkları çalışmada vWF ile subendotel arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve vWF'nin, fikse olmuş trombositlerin sıgır aortasından elde edilen kollagen fibriller üzerine yapışmasına yardım ettiğini bulmuşlardır(141).

FVIII/vWF proteini normal trombositlerin subendotele yapışması için gereklidir. Bu in vitro perfüzyon deneyleri ile gösterilmiştir. FVIII/vWF proteininin trombosit adhezyonu başlatmadan önce subendotele bağlanmasının gerekli olduğu ve bunun da FVIII/vWF'nin yüksek molekül ağırlıklı multimerleri ile daha kolay meydana geldiği ileri sürülmüştür. Plazma ve saf FVIII/vWF preparatlarındaki FVIII/vWF aktivitelerinin fibroz kollagen agregatlarına adsorbe olduğu belirtilmiştir. Kessler ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tip I fibriller kollagene saf FVIII/vWF preparatları veya çeşitli tip plazmalar ile inkübe etmişlerdir. Kollagenin, FVIII/vWF aktivitelerini normal plazmalardan ve saf FVIII/vWF preparatlarından benzer zaman ve konsantrasyonda adsorbe ettiğini gözlemişlerdir. FVIII/vWF proteinin oligomer büyüklüğünün, tip I kollagen

fibrillerine bağlanmada en önemli büyüklük olduğunu bulmuşlardır(90).

6- DENEYSEL DİYABET

Deney hayvanlarında diyabet meydana getiren maddelere "diyabetojenik ajanlar" adı verilir. Diyabetojenik ajanlar iki genel sınıf içinde toplanabilirler.

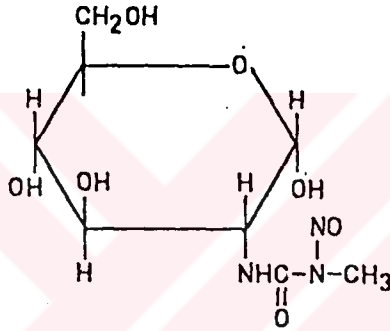
1- Beta hücrelerinin hasarı ve insülin yetersizliği ile sürekli diyabet meydana getiren maddeler (streptozotocin, Alloxan, Quinoline ve Dithizone),

2- Beta hücrelerinde reversible hasar ile insulin seviyesinde geçici bir azalma meydana getiren maddeler (cyproheptadine, Benzothiodiazine ve Asparaginase)(2).

Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bugün en çok kullanılan diyabetojenik ajanlar streptozotocin ve Alloxandır(80,117,147). Streptozotocin (STZ), alloxan'dan daha az toksiteye sahip olup, beta hücreleri üzerinde daha selektif bir özelliğe sahiptir. Ayrıca STZ ile oluşturulan deneysel diyabet modeli insanda meydana gelen diyabete çok benzemektedir. Dolayısıyla STZ,alloxan'dan daha kullanışlıdır(117, 147).

STZ'nin diyabetojenik etkisi ilk olarak Rakieten(142) ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bugüne kadar; sıçanlar(53), köpekler(59), maymunlar(82), çin hamsterleri(61), kuzular(4), fareler, kobaylar(27) ve tavşanlar(102) üzerinde denenmiştir. Tavşan, kobay, morina balığı ve piliç gibi hayvanlarda STZ ile diyabet oluşturmanın güç olduğu belirtilmiştir(96,97,102).

STZ ilk olarak 1959'da bir mantar türü olan streptomycetes achromogenes'in kültürlerinden elde edilmiştir. Açık sarı renkte olup suda ve alkolde kolayca çözünebilen bir maddedir. Suda çözündüğünde pH= 4.5'da stabil kalmakta, bu pH'nın dışında molekül derhal parçalanmaktadır. Molekül ağırlığı 265.22'dir. 2-deoksi-2-(3 metil-3 nitroz ureido)-Dglukopiranoz yapısında olan bu maddenin kapalı formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ 'dir. İçindeki karbon %'si 36.23, hidrojen % 70, oksijen % 42.23'dür. etkin grup olan metilnitrozüre glikoza 2-karbonundan bağlanmıştır. Molekül yapısı aşağıdaki gibidir.



Streptomyces achromogenes kültürlerinden STZ eldesi güç olduğundan daha sonraları sentetik olarak elde edilmeye başlanmıştır. Sentetik STZ, kültürden elde edilenle aynı biyolojik etkiye sahiptir(78).

STZ, gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine etkili olması sebebiyle önceleri uzun bir süre antibiyotik olarak kullanılmıştır(109,165). Antibakteriyel etkisi yanında antitümeral(13,53,129) etkiye de sahip olduğu ve bazı dokular üzerinde de karsinojen(12) rol oynadığı gösterilmiştir(142).

STZ'nin diyabetojenik özellikte olduğu anlaşıldıktan sonra antibiyotik olarak önemi azalmış fakat deneysel diyabet çalışmaları için önemli bir madde haline gelmiştir.

STZ'nin diyabetojenik etkisi pankreasın beta hücrelerini tahribine dayanmaktadır. Beta hücrelerinin harabiyeti

ile insülin yapımı azalmakta ve giderek yok olmaktadır. Bunun sonucunda kan glikozu yükselmekte ve Diyabetes-Mellitus ortaya çıkmaktadır.

STZ'nin etkisi ile meydana gelen diyabetin şiddeti verilen doza ve deney hayvanlarının türüne bağlıdır. 10-20 mg/kg STZ dozlarının kan glikozunda önemli değişikliğe sebep olmadığı, 20 mg/kg'dan daha büyük dozların kan glikozunda ilerleyici artışa sebep olduğu gösterilmiştir(11,48,58,137). Kan glikozunu en yüksek düzeye çıkaran STZ dozu genellikle 65 mg/kg'dır. Bunun üzerindeki dozlarda STZ verilmesi kan glikozunda önemli farklılıklar meydana getirmemektedir(58).

STZ'nin diyabetojenik dozu türlere göre değişmektedir. Örneğin kedi, köpek, sıçan ve farelerde 50 mg/kg doz diyabet meydana getirmeğe yeterli olurken(142) tavşanlarda 300 mg/kg(100), piliçlerde 130 mg/kg'ın üstündeki STZ dozları ile(97) diyabet meydana getirilebilmektedir. Kuzularda ise bu doz 203 mg/kg olarak tespit edilmiştir(4).

Diyabetojenik dozda STZ verilmiş hayvanlarda genellikle 24 saatten sonra kalıcı bir diyabet meydana gelmektedir(53,62). STZ verilmesinden sonra kan şekerinde 3 devreye ayrılabilen bir durum tespit edilir. 1- 1-2 saat sonra kan şekeri yükselir, 2- 6-12 saatleri arasında belirgin bir hipoglisemi, 3- 18-24 saat sonra kalıcı bir hiperglisemi görülür(85,142).

Süratle gelişen ilk hipergliseminin nedenleri, dokuların glikoz kullanmasına yapılan inhibisyon, karaciğerde aşırı glikoz serbestleştirilmesi veya sürrenal'den salgılanan adrenalin olabilir(58,80).

Sonra görülen hipogliseminin, glikozun dokular tarafından kullanılmasının artması, glikozun dokulardan kana geçmesinin baskılanması, glikozun böbreklerden atılımının

artması, STZ'nin beta hücrelerini tahrip etmesi sırasında serbestleşen insülin kaynaklandığı ileri sürülmektedir(34).

Kalıcı hiperglisemi ise STZ ile beta hücrelerinin nekroze olması ile insülin salgılanmasının azalması sonucunda oluşur.

STZ'nin pankreas üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. STZ'nin yapısındaki glikoz molekülü nedeniyle beta hücre membranındaki glikoz reseptörüne bağlanarak hücreye girdiğini, bunun sonucunda membranı ve hücreyi bozarak nekroza sürüklediği ileri sürülmüştür. Fakat bazı çalışmalarda beta hücrelerinde glikoz reseptörünün bulunmadığı öne sürülmektedir(38,116).

STZ'nin, beta hücresi NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) seviyelerindeki azalmayla etkili olabileceği görüşü de mevcuttur. STZ verilmiş hayvanlarda NAD biyosentezinde azalma ve NAD yıkımda artış olduğu bulunmuştur(42,79).

Daha sonraki çalışmalarda, STZ'nin DNA kırılımı yaptığı(183,187,188) ve bunun sonucu nukleer poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin DNA'yı tamir edebilmek amacıyla, hücrenin NAD'larını kullanarak solunum substratı yetersizliğinden ölme sürüklediği ileri sürülmektedir(187,188). Bu hipotez poli (ADP-riboz) sentetaz enzimi inhibitörleri ile yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Bu inhibitörlerin STZ'nin toksik etkilerine karşı koruyucu bir etki göstererek, NAD tüketimini engellediği açıklanmıştır(2).

STZ'nin diğer dokularda da yaptığı değişimler çeşitli çalışmalarla değerlendirilmektedir(6,7,41,68,130). Fakat deneysel veriler beta hücrelerinde seçimli bir birikim yaptığını gösterir. Bunun nedeni ise beta hücresinin özelliğine bağlı olabilir. Beta hücrelerinde hücre içi pH'nın değişik olması, Beta hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı glikoz konsant-

rasyonlarının farklı oluşu, Beta hücrelerinde glutatyon düzeylerinin önemi, beta hücrelerinin indirgen gücünün durumu bugün etki mekanizmasını anlamak için yapılan çalışmalar arasındadır. Yapılan çalışmalardan Beta hücresinde dehidrojenaz ve koenzimlerinin düşük konsantrasyonda olduğu görülmektedir. Bu durum STZ'nin bu dokuda daha etkili olmasını kolaylaştırır. Zaten düşük olan koenzim düzeyi daha da süratle azaldığı için beta hücresi insulin salgısını yapamamaktadır (NAD düzeyinin azalması)(101,136).

Bazı araştırmacılar bu tür diyabetojenlerin metalloenzimleri inhibe edebileceğini ileri sürmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda STZ verildikten kısa süre sonra çinko miktarında bir değişim görülmemiştir. Daha sonra görülen değişimlerin nekroza bağlı olduğu düşünülmektedir(6,80).

ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Streptozotocin, Commasie Brilliant Blau, Sucrose, Sigma firmasından, Glikoz oksidaz kiti Bohrienger firmasından, Hemogloblin standardı, Hemoglowiener firmasından, Bisakrilamid, metanol BDH firmasından, Hypronosticon kiti Organon firmasından, diğer maddeler ise Merck firmasından satın alınmıştır.

KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Agregometre (Lumi Aggregometer, Model 400), Beckman High Speed Santrifüj (J21 B model, J20 A rotorlu), Distile su cihazı (Elektromag, M₃), Diyaliz Tübü (Sigma, Dialysis Sacks, Lot 71 F 6081, 250-11), Derin Soğutucu (Soğuk Teknik, yerli, -28°C), Elektroforez Güç Kaynağı (Elektromag PS 350/50 ve pharmacia EPS 500/400), Gel Dansitometresi (Otomatik tara-yıcılı, Helena Gr, TCL), Gel Boya Çıkarma Güç Kaynağı (Pharmacia, DPS), Gel Boya Çıkama Cihazı (Parmacia GD-H, 92291), Homojenizatör (IKA-WERK, RW 14H), Hematokrit Santrifüj (MLW-TH12), Hassas Terazı (Sartorius), Liyofilizatör (Lyovac, GT 2, Leybold-Heraeuos), Otoklav (Yarı otomatik, 15x30'luk), Otomatik Pipetler (Gilson), pH metre (LCS, Digital), Spektro-

fotometre (Bausch-lomb, Spectronic 20), Su Banyosu (37°C'lik ve 60°C'lik, Nüve, BT400), UV Lambası (Phillips, TUV - 30 w lamba), Vorteks (Fete, UM 20).

DENEY HAYVANLARININ ÖZELLİKLERİ VE BESLENMESİ

Çalışmalarımızda Çapa Deneysel Araştırma Merkezinden (DETAM) alınan aynı jenerasyondan Wistar Albino türü 48 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, kontrol edilmiş çevre şartlarında ve metabolik kafeslerde muhafaza edildi. Sıçanların beslenmesinde İstanbul Topkapı Yem Sanayi Fabrikalarında üretilen ve kapsamı;

Ham protein	:	(en az)	%	23.0
Ham Sellüloz	:	(en çok)	%	7.5
Ham kül	:	(en çok)	%	10
Su	:	(en çok)	%	13
Kalsiyum	:	(en az)	%	0.8
Fosfor	:	(en az)	%	0.7

olan pellet tipi sıçan yemi kullanıldı. Hergün özel şişelerde taze musluk suyu verildi.

Sıçanlar, 24 tanesi diyabet, 24 tanesi de kontrol grubu olmak üzere ayrılarak işaretlendi. Diyabet oluşturmak için streptozotocin (STZ) kullanıldı. Tüm sıçanların deney öncesinde ve sonunda ağırlıkları tesbit edildi. STZ verilmeden önce sıçanlar eterle bayıltılarak kuyruk ucundan hematokrit tüplerine kan alındı. Daha sonra bu kanlar açlık kan şekeri ve hematokrit tayininde kullanıldı. Diyabet grubu sıçanlarına pH'sı 4,5 olan sitrat tamponu ile taze hazırlanmış STZ çözeltisinden 80 mg/kg olacak şekilde, tek dozda, intraperitoneal olarak enjekte edilerek diyabet oluşturuldu.

Deney sonunda, onyediyedi gün sonra, diyabetik sıçanlar, yirmi gün sonra kontrol grubu sıçanları eterle bayıltıldı. Kalplerinden, hematokrit, açlık kan şekeri ve hemoglobin A_{1c} tayinleri için kan alındıktan sonra fazla eter verilerek sıçanlar öldürüldü. Kuyrukları kesilerek derin soğutucuda saklandı. Bir tek sıçanın dişeti dokusu çok az olduğundan, birkaç sıçanın dişeti birlikte alındı ve bekletilmeden hemen işleme tabi tutuldu.

Diyabetik sıçanlardan sekiz tanesi sekiz gün sonra, kanları alınmadan öldürüldü. Onyediyedi gün sonunda ise kalan on tanesinin öldürmeden önce kanları alınabildi. Altı tanesinin de kanları alınamadı. Dişetleri, üçer, dörder ve beşer tanesinin birlikte olmak üzere altı grup halinde biriktirildi. Kontrol grubu sıçanlarının dişetleri ise altışar tanesinin birlikte olmak üzere dört grup halinde biriktirildi. Bütün sıçanların kuyrukları ise ayrı ayrı numaralandırılarak derin soğutucuda saklandı.

Öncelikle dişeti kollagenleri sonra da kuyruk tendon kollagenleri elde edildi. Liyofilize kollagenler hazırlanarak buzdolabında saklandı. Hidroksiprolin, nonenzimatik glikozilasyon, agregasyon ve elektroforez işlemleri için liyofilize kollagenlerden belirli tartımlar alınarak kullanıldı.

SİYANMETHEMOGLOBİN METODU İLE HEMOGLOBİN TAYİNİ(19)

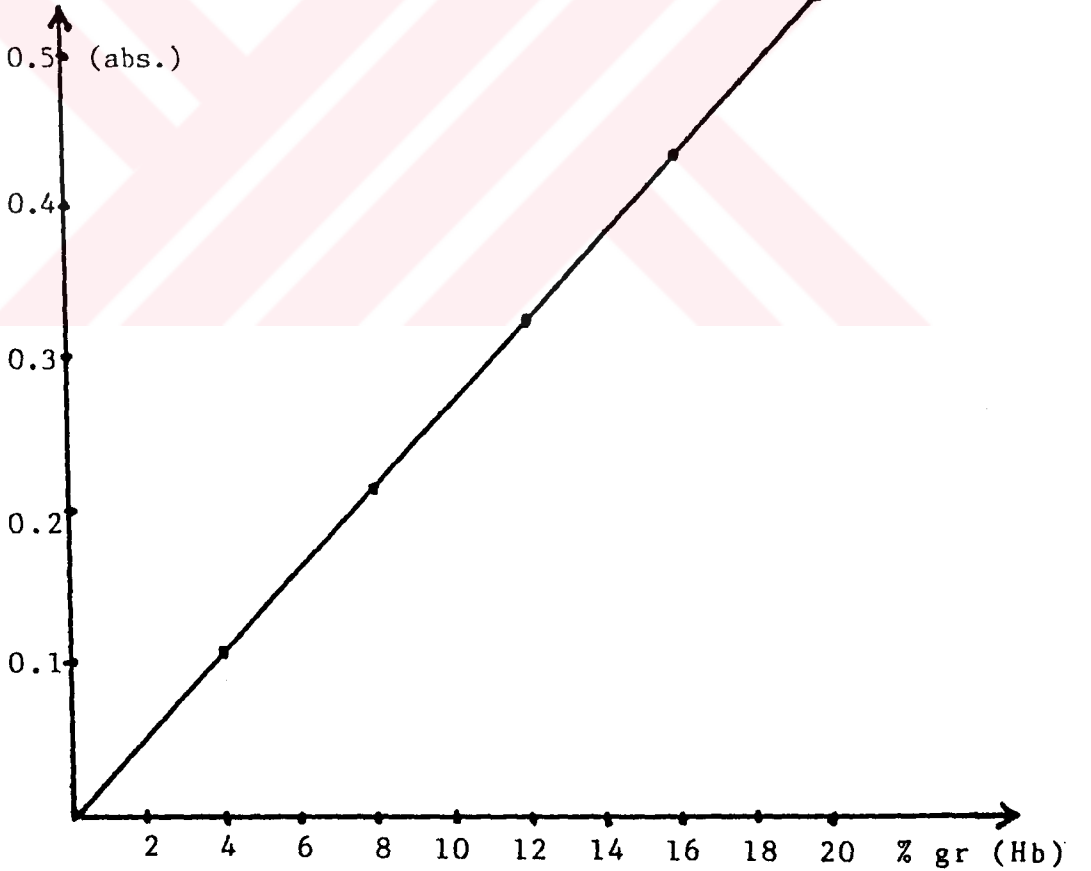
Kullanılan Çözeltiler:

1- Drabkin çözeltisi: 1 gr sodyumbikarbonat, 0,2 gr potasyumferrisiyanür, 0,05 gr potasyum siyanür biraz distile suda çözülüp 1000 ml'ye tamamlandı (Buzdolabında saklanır).

2- Hemoglobin standart çözeltisi: Hemoglowiener hemoglobin standardı kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: Numune ve kör olarak işaretlenmiş deney tüplerine 5'er ml Drabkin çözeltisinden konuldu. Nümune tübüne 0.02 ml kan ilave edildi. Çözelti, pipetle birkaç kere çekip bırakılarak temizlendi. İyice karıştırıldı. 10 dak. oda sıcaklığında bekletildi. 540 nm'de köre karşı absorbansı okundu. Standart grafiğinden hemoglobin yüzdesi bulundu.

Standart grafiği için beş ayrı tübe 5, 10, 15, 20, 25 ml drabkin çözeltisinden konuldu. Herbirine 0,02 ml standart hemoglobin çözeltisinden ilave edildi. Yukarıdaki gibi devam edildi. Elde edilen absorbanlarla hemoglobin miktarı arasında aşağıdaki grafik çizildi (Şekil 17).



ŞEKİL 17- Hemoglobin standart grafisi

KAN ŞEKERİ TAYİNİ

Kan Şekeri tayini için Böhrienger'in Glikoz Oksidaz Testi kullanıldı. Hematokrit tüplerine alınan kan 5 dak. santrifüj edildi. Hematokrit değerleri tesbit edildikten sonra Hamilton enjektörü ile plazmaları alınarak eppendorf tüplerine konuldu. Numune, standart ve kör olarak işaretlenen deney tüplerine sırasıyla 25 µl plazma, 25 µl kitin standart glikoz çözeltilisinden ve 25 µl'de distile su konuldu. Herbirine reaktif çözeltilisinden 2,5 ml ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dak. bekletildi. 546 nm'de köre karşı absorbansları okunarak kaydedildi. % mg glikoz miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\% \text{ mg Glikoz Miktarı} = \frac{\text{Numune absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times 100$$

TIYOBARBITÜRİK ASİT METODU (TBA) İLE HEMOGLOBİN A_{1c} TAYİNİ(17,139)

Kullanılan Çözeltiler:

1- Serum fizyolojik: 8,76 gr sodyum klorür distile suda çözümlü 1000 ml'ye tamamlandı.

2- Karbontetraklorür (CCl₄): Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.

3- Oksalik asid. 2H₂O (0,5 mol/lt): 6,3 gr oksalik asit bir miktar distile suda çözümlenerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltili oda sıcaklığında iki hafta stabildir.

4- 2-Tiyobarbitürik asit (TBA, 0,05 mol/lt): 0,721 gr 2-tiyobarbitürik asit bir miktar distile su içine alındı. Karıştırarak çözünönceye kadar 5N sodyum hidroksit azar azar ilave edildi. pH'sı, 5N sodyum hidroksit ile 6'ya ayarlandı.

Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5- Sodyum hidroksit çözeltisi (5N): 4 gr sodyum hidroksit biraz distile su içinde çözülüp hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

6- Triklorasetik asit (TCA, % 40): 40 gr triklorasetik asit biraz distile suda çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

7- Standart çözeltisi (stok, Fruktöz 1 mmol/lt): 0,18 gr fruktoz serum fizyolojik içersinde çözülerek hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Deneme sırasında bu stok çözelti, serum fizyolojikle seyreltilerek 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 μ mol/lt'lik çalışma standartları hazırlanarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: EDTA'lı tübe 2 ml kan alındı. 800 x g'de 10 dak. santrifüj edildi. Plazmaları ayrıldı. Eritrositler oda sıcaklığında serum fizyolojikle üçer defa yıkandı (yaklaşık 2 ml kan için toplam 10 ml serum fizyolojik kullanıldı). Yaklaşık 2 ml kandan elde edilen eritrosit paketi üzerine 2 ml kadar distile su ilave edilerek hemoliz edildi. Hemolizatüzerine 0,5 ml karbontetraklorür ilave edilerek vortex de iyice karıştırıldı. 1500xg'de 15 dak. süreyle santrifüj edildi. Berrak hemolizat dikkatlice ayrıldı. Üst fazdan alınan berrak hemolizatta siyanmethemoglobin metoduna göre hemoglobin tayini yapıldı. Hemolizat, hemoglobin değeri % 1 gr olacak şekilde distile su ile seyreltildi. Seyreltilmiş hemolizat +4°C'de 1 hafta saklanabilir.

Hemolizat yukarıdaki gibi hazırlandıktan sonra numune, kör ve standart tüpleri de aşağıdaki gibi hazırlandı. Numuneler çift çalışıldı.

Reaktifler	T ü p l e r		
	Numune	Kör	Standart
Hemolizat	2 ml	-	-
Oksalik asit	2 ml	2 ml	2 ml
Serum fizyolojik	-	2 ml	-
Çalışma standartı (10 µmol/lt	-	-	2 ml
(20 µmol/lt)			2 ml
(90 µmol/lt)			2 ml

Numune, kör ve standart tüpleri vorteks de iyice karıştırıldı. Ağzuları sıkıca kapatılarak tüplerin hava almalarına dikkat edildi. Otoklavda 60 dak. müddetle $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda otoklavdan çıkarılan tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Alt üst edilerek karıştırıldı. Her tüpe 2'şer ml % 40'lık TCA ilave edildi. Vorteksde iyice karıştırıldı. 1500 x g'de 10 dak. santrifüj edildi. Tamamiyle berrak süzüntü elde etmek için süzgeç kağıdından süzülerek 443 nm'de köre karşı absorbanları okunarak kaydedildi.

Numune, kör ve standart tüplerinden 3'er ml alınarak üzerlerine 1'er ml 2-tiyobarbitürik asit çözeltisinden ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan sonra 37°C 'lik su banyosunda 30 dak. süreyle inkübasyona tabi tutuldu. 30 dak. sonra tüplerin oda sıcaklığına gelmesi için 15 dak. beklendi. 443 nm de köre karşı tekrar absorbanları okundu. 37°C 'lik inkübasyondan önceki ve sonraki absorbanlar arasındaki farklar tespit edildi.

Çalışma standartlarının konsantrasyonları ve onlara karşılık okunan absorban değerleri arasında grafik çizilerek standart eğrisi elde edildi (Şekil 18). Standart eğrisinden numunelere ait farklara karşılık gelen standart konsantrasyonları µmol/lt cinsinden tespit edildi. Sonuçlar fruktoz indeksi ve % Hemoglobin A_{1c} olarak hesaplandı. Hemolizat % 1

gr hemoglobin (10 gr Hb/lt) içerdüğinden grafikten bulunan değerler 10'a bölünerek 1 gr hemoglobin için μmol fruktoz değerleri elde edildi.

$$F_i(\text{fruktoz indeksi}) = \frac{\mu\text{mol Fruktoz}}{1 \text{ gr Hb}}$$

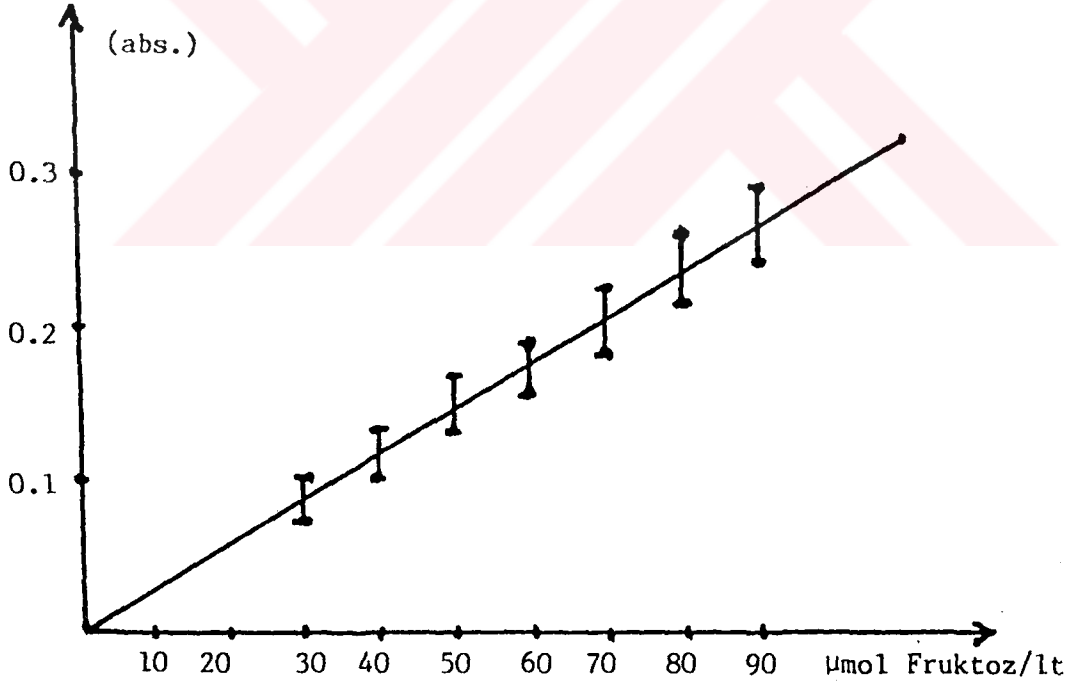
$$\% \text{HbA}_{1c} = \frac{32.000 \times 100}{10^6} \times F_i$$

32.000: Hemoglobinin $\alpha\beta$ dimerlerinin molekül ağırlığı

F_i : Fruktoz indeksi

100 : Yüzdeye çevirme faktörü

10^6 : Mol'ü mikro mole çevirme faktörü.



ŞEKİL 18- Fruktoz standart eğrisi

SIÇAN KUYRUK TENDON KOLLAGENİN ELDE EDİLMESİ(40)

Kullanılan Çözeltiler

1- Sodyum klorür çözeltisi (% 1 gr): 1 gr Sodyum klorür bir miktar distile suda çözülüp hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2- Asetik asit çözeltisi (0,5 N): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 28,6 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3- Sodyum klorür çözeltisi (% 30 gr): 30 gr sodyum klorür bir miktar 0,5 N asetik asit çözeltisi içersinde çözümlenerek hacmi aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlandı.

4- Sodyum klorür çözeltisi (% 5 gr): 5 gr sodyum klorür bir miktar 0,5 N asetik asit içinde çözülerek aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlandı.

5- Sekonder sodyum fosfat çözeltisi ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 M): 3,56 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözülüp hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

6- Asetik asit çözeltisi (0,1 N): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 5,7 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Sıçan öldürüldükten sonra kesilen kuyruk, soğuk distile su ile yıkandı (iyi kapatılmış plastik kapta dondurularak saklanabilir, kullanılacağı zaman buzlu su içinde yumuşatılmalıdır). Bütün işlemler 0-5°C'de ve önceden soğutulmuş malzeme, alet ve çözelti kullanılarak yapıldı.

Kuyruk ucunun etrafındaki deri ve kuyruk ucu, uç kısımdan az miktarda kesildi. Tendonlar ince uçlu pens ile çekilerek serbestleştirildi. Makasla kesilerek % 1'lik NaCl çözeltisi içine konuldu. Uç kısım kesilerek atıldı. Her seferinde kuyruk etrafındaki deri birkaç milimetre kesilerek atıldı. Tendonlar pensle çekilerek % 1'lik NaCl çözeltisi

içine konuldu. Bu işleme kuyruk sonuna kadar yani tüm tendonlar alınıncaya kadar devam edildi. Tendonlar birkaç kere %'lik NaCl ile yıkandı. Kaslara yapışmış veya herhangi bir nedenle kirlenmiş tendonlar atıldı.

Tendonlar, çok çabuk süzgeç kağıdı arasında kurutularak nemli olarak tartıldı. 0,5 N asetik asit içine konuldu. Çok viskoz olmaması için çözeltinin konsantrasyonu yaklaşık 1 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. Devamlı karıştırılarak bir gece ekstraksiyona devam edildi. Ekstrat birkaç tabaka tülbentten süzüldü. Süzüntü 30.000 x g'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Süpernatant alınarak, hacminin beşte biri kadar % 30'luk NaCl (0,5 N asetik asit ile hazırlanmış) çözeltisinden yavaş yavaş ilave edilerek ve devamlı karıştırılarak, 1-2 saat içinde kollagen çöktürüldü. Çöktürme işlemi tamamlandıktan sonra 1/2-1 saat bekletildi. 7800 x g'de 30 dak. santrifüj edildi. Çökelti bir defa % 5'lik NaCl (0,5 N asetik asit ile hazırlanmış) çözeltisi ile yıkandı.

Yıkanmış çökelti iki kısım 0,5 N asetik asit içinde süspanse edilerek, bir gece 0,5 N asetik asite karşı diyaliz edildi. Diyaliz tamamlandıktan sonra 30.000xg'de 1 saat santrifüj edildi. Çökelti atıldı. Süpernatant iki gün 0,02 M Na_2HPO_4 çözeltisine karşı diyaliz edildi. Na_2HPO_4 çözeltisi birkaç kere değiştirildi. 7800 x g'de 30 dak. santrifüj edildi. Çökelti 0,02 M Na_2HPO_4 ile bir defa yıkanarak iki kısım 0,5 N asetik asit içinde süspanse edildi. 1 gece 0,5 N asetik aside karşı diyaliz edildi. Çözelti 30.000 x g'de iki saat santrifüj edildi. Çökelti atıldı. Süpernatant alınarak 0,1 N asetik asite karşı iki gün diyaliz edildi. Diyaliz çözeltisi üç kere değiştirildi.

Bu şekilde saflaştırılan kollagen liyofilize edilerek, buzdolabında iyi kapatılmış kaplarda saklandı.

SIÇAN DIŞETİ BAĞ DOKUSU KOLLAGENİNİN ELDE EDİLMESİ(158,159)

Kullanılan Çözeltiler:

1- Asetik asit çözeltisi (0,5 N): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 28,6 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2- Triklorasetik asit (TCA, % 16 gr'luk): % 100 gr'luk TCA çözeltisinden 16 ml alınıp distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

3- Triklorasetik asit (TCA, % 8 gr'luk): % 100 gr'luk TCA çözeltisinden 8 ml alınıp hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4- Eter: Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.

5- Asetik asit çözeltisi (0,1 N): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 5,7 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Bütün işlemler 0-5°C de yapıldı. Sıçanlar öldürüldükten hemen sonra üst ve alt kesicilerin vestibül ve oral yüzlerindeki dişeti yapılan insizyonla mukogingival bileşime kadar periost'un üzerinden çıkarıldı. Doku iyice parçalandı, kıyıldı. Konsantrasyonu yaklaşık 1,5 mg/3 ml olacak şekilde 0,5 N'lik asetik asit çözeltisi içine alındı. 30 dak. bekletildi.

Cam homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizat alındı. Homojenizatör az miktarda 0,5 N asetik asit çözeltisi ile yıkandı. Homojenizat ve yıkama çözeltisi birleştirildi. Eşit hacimde % 16'luk TCA ilave edildi. 1 saat devamlı karıştırılarak süspanse edildi. Süspanسیون 13200 x g'de santrifüj edildi. Çökelti ve süpernatant ayrıldı. Çökelti, TCA'de çözünmeyen dişeti kısmını, süpernatant ise TCA'de çözünen dişeti kısmını ihtiva etmekteydi. Çökelti bir miktar % 8'lik TCA ile karıştırılarak tekrar santrifüj edildi. Süpernatant ilk sü-

pernatant ile birleştirildi. Süpernatant ve çökeltideki TCA, iki kısım eterle ekstre edilerek uzaklaştırıldı. Eterle ekstraksiyondan sonra süpernatant ve çökelti 0,1 N'lik asetik asit ile, asetik asit çözeltisi birkaç kez değiştirilerek diyaliz edildi. Her iki fraksiyon ayrı ayrı liyofilize edilerek buzdolabında saklandı. TCA'da çözünebilen kısım çok az elde edildiğinden diğer denemelerde kullanılmadı.

HİDROKSİPROLİN TAYİNİ İÇİN HİDROLİZATLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan Çözeltiler

1- Hidroklorik asit çözeltisi (6 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37'lik HCl'den 49,7 ml alınıp hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Liyofilize edilmiş sıçan kuyruk tendon kollagenlerinden ve dişeti kollagenlerinden 2-9 mg'lık tartımlar alınarak cam kapaklı hidroliz tüplerine konuldu. Üzerlerine 1'er ml 6 N'lik hidroklorik asit çözeltisinden ilave edildi. Kapakları sıkıca kapatılarak 100°C'de 24 saat hidroliz edildi(65,105). 24 saat sonunda tüpler alınarak oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. Distile su ilave edildi. Karıştırıldı, Hidrolizatlar tartımlarına göre 25, 50, 100 ml'lik balonjölere aktarıldı. Hidroliz tüpleri distile su ile birkaç kere yıkanarak, yıkama çözeltileri diğerlerinin üzerine ilave edildi. Hacimleri 25, 50 veya 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Daha sonra sodyum hidroksitle nötralleştirilen(184) hidrolizatlar hidroksiprolin tayininde kullanıldı.

HİDROKSİPROLİN TAYİNİ(133)

Kullanılan Çözeltiler:

1- Bakır sülfat çözeltisi (0,01 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$): 0,625 gr bakır sülfat bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

2- Sodyum hidroksit çözeltisi (2,5 N): 25 gr NaOH bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

3- Hidrojenperoksit çözeltisi (% 6'lık): Yoğunluğu 1,13 gr/ml olan % 35'lik hidrojenperoksit çözeltisinden 38 ml alınıp 250 ml'ye tamamlandı.

4- Sülfat asidi (3 N): Yoğunluğu 1,84 gr/ml olan % 95-98'lik sülfat asidinden 20,4 ml alınıp hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

5- p-Dimetilaminobenzaldehit (% 5 gr): 12,5 gr p-dimetilaminobenzaldehit bir miktar n-propanolde çözülerek hacmi aynı çözelti ile 250 ml'ye tamamlandı.

6- n-Propanol: Orjinal şişesinden alınarak kullanıldı.

7- Hidroksiprolin stok standart çözeltisi (% 500 mgr): 500 mgr hidroksiprolin bir miktar 0,001 N HCl asidi içinde çözlüp, hacmi aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlandı.

8- Hidroksiprolin çalışma standardı (% 2,5 mg): Stok standarttan 0,5 ml alınıp, 0,001 N HCl(184) ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti 1 ml'sinde 25 µgr hidroksiprolin ihtiva etmekteydi. Deneme sırasında bu çözelti de 1 ml'sinde 25, 20, 15, 10, 5'er µgr'lık hidroksiprolin ihtiva edecek şekilde 0,001 N HCl ile seyreltildi.

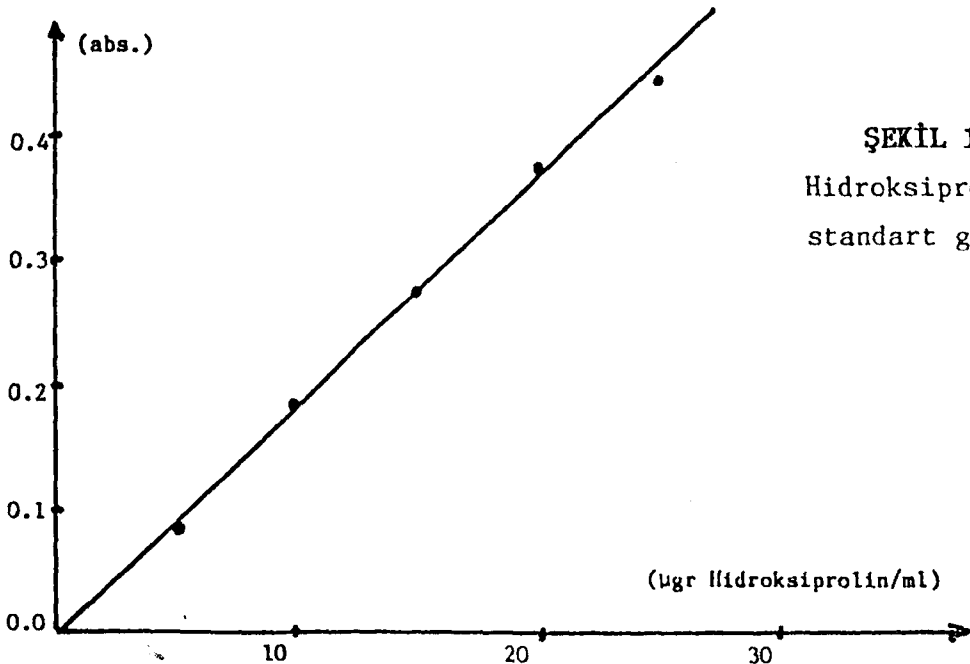
9- Hidroklorik asit çözeltisi (0,001 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37'lik HCl çözeltisinden hazırlanan 1 N'lik HCl çözeltisinden 1 ml alınarak hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Numune, kör ve standart tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı. Numuneler çift çalışıldı.

Reaktifler	T Ü P L E R		
	Numune	Kör	Standart
Hidrolizat	1 ml	-	-
Distile su	-	1 ml	-
Standart çözelti	-	-	1 ml
Bakır sülfat	1 ml	1 ml	1 ml
Sodyum hidroksit	1 ml	1 ml	1 ml
Hidrojen peroksit	1 ml	1 ml	1 ml

Bütün tüpler ara sıra olmak üzere 5 dak. karıştırıldı. 80°C'lik su banyosunda şiddetli karıştırarak 5 dak. tutuldu. Böylece fazla hidrojen peroksit uçuruldu. Tüpler buzlu su içinde soğutuldu. Buzlu su içindeyken herbirine 4 ml 3N H₂SO₄ çözeltisinden ilave edildi. Karıştırıldı. 2'şer ml % 5'lik p-dimetilaminobenzaldehit çözeltisinden konularak tekrar karıştırıldı. 70°C'lik su banyosunda 16 dak. tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra 540 nm'de köre karşı absorpsiyonları okundu ve kaydedildi.

Standart absorpsiyonları ve standart hidroksiprolin miktarları (25, 20, 15, 10, 5 µgr/ml) arasında grafik çizilerek standart eğrisi elde edildi (Şekil 19). Numune absorpsiyonlarına karşılık gelen hidroksiprolin miktarları (µgr hidroksiprolin/1 ml hidrolizat olarak) bu grafikten bulundu.



ŞEKİL 19
Hidroksiprolin
standart grafisi

HİDROKSİPROLİN TAYİNİ (Hypronosticon kiti ile)

Kullanılan Çözeltiler

1- Hidroklorik asit çözeltisi (2 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37'lik HCl çözeltisinden 16,6 ml alınarak distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2- İsoopropanol: Orjinal şişesinden alınarak kullanıldı.

3- Perklorik asit (% 60'luk): Orjinal şişesinden alınarak kullanıldı.

4- Hidroksiprolin standart çözeltisi: Hypronosticon kitinin 50 µgr/ml'lik hidroksirolin standart çözeltisi kullanıldı.

5- Renk ayıracı: p-dimetilaminobenzaldehit ihtiva eden hypronosticon kitinin renk ayıracından 4 gr tartılarak (1 numune için) üzerine 6 ml perklorik asit ilave edildi. Hacmi isopropanolle 55 ml'ye tamamlandı (bu çözelti oda sıcaklığında iki saat dayanıklıdır).

6- Oksitleyici Çözelti: 1 numune için, hypronosticon kitinin oksitleyici maddesinden (kloramin T) 55 mgr tartıldı. 4 ml hypronosticon kitinin tompon çözeltisinde çözüldü (bu çözelti oda sıcaklığında 15 dak. dayanıklıdır).

Deneyin Yapılışı: Numune, kör ve standart tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı. Numune ve standartlar çift çalışıldı.

Reaktifler	T Ü P L E R		
	Numune	Kör	Standart
Hidrolizat	0,5 ml	-	-
Distile su	-	0,5 ml	-
Hidroksiprolin standartı	-	-	0,5 ml
2 N HCl	1 damla	1 damla	1 damla
İsopropanol	1 ml	1 ml	1 ml
Oksitleyici çözelti	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Bütün tüpler karıştırıldıktan sonra oksidasyon için en az 4 dak. oda sıcaklığında bekletildi. Herbirine 10'ar ml renk ayırıcından ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda 25 dak. tutuldu. Musluk suyunda soğutulularak oda sıcaklığında 30 dak. bekletildi. 560 nm'de köre karşı absorbanları okunarak kaydedildi.

Hesaplama:

$$1- \text{Hidrolizattaki \% mg Hidroksiprolin} = \frac{\text{Numune absorbanı}}{\text{Standart absorbanı}} \times 5$$

5: Hidroksiprolin standart çözeltisinin yüzde konsantrasyonu (mg)

2- Yukarıdaki gibi yüzdesi hesaplandıktan sonra 1 ml, hidrolizattaki hidroksiprolin miktarı (μgr) bulunur.

KOLLAGENİN NONENZİMATİK GLİKOZİLASYON DEĞERİNİN TAYİNİ

Kullanılan Çözeltiler: Hemoglobin A_{1c} tayininde kullanılan çözeltilerin aynısıdır.

Deneyin Yapılışı: Hemoglobin A_{1c} tayininde kullandığımız Tiyobarbitürik Asit metodu kullanıldı.

Liyofilize edilmiş sıçan kuyruk tendon kollagenleri ve dişeti kollagenleri, konsantrasyonları 4-6 mg/ml olacak şekilde tartılarak distile su(160) içinde süspanse edildi. Bir gece 4°C'de bekletildi. Bu süspanسیونlardan 2'şer ml alınarak cam kapaklı hidroliz tüplerine konuldu. Üzerlerine 2'şer ml 0,5 M'lık oksalik asit çözeltisinden ilave edilerek, hemoglobin A_{1c} tayininde yapılan aynı işlemlere tabi tutuldu.

Önceki ve sonraki absorbanslar arasındaki farklar hesaplanarak kaydedildi. Fruktoz standart grafiğinden (Şekil 18) farklılık karşılık gelen µmol Fruktoz/lt değerleri bulunarak, kollagenlerin glikozilasyon değerleri önce nmol Fruktoz/1 mg liyofilizat olarak, liyofilizattaki yüzde hidroksiprolin ve yüzde kollagen miktarı bulunduğundan sonra da nmol Fruktoz/1 mg kollagen cinsinden aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$1- E = G \cdot \frac{0,002}{L} \cdot 10^3$$

E = nmol Fruktoz/1 mg liyofilizat cinsinden liyofilizatın nonenzimatik glikolizasyon değeri

G = Absorbanslara karşılık gelen, grafikten bulunan değer (µmol Fruktoz/1 lt)

10³ = µmol'ü nmol'e çevirme katsayısı

L = 2 mldeki liyofilizat miktarı (mg)

0,002= Metoda ait katsayı

$$2- C = \frac{V \cdot B}{A} \cdot 0,1$$

C = liyofilizattaki hidroksiprolin miktarı (% mg)

V = Hidrolizatın seyreltildiği hacim (ml)

B = 1 ml hidrolizattaki hidroksiprolin miktarı (µgr)

A = Hidroliz edilen liyofilizat miktarı (mg)

0,1= µgr'm mg'a çevirme katsayısı

3- Kollagendeki hidroksiprolin miktarı % 13,4 olarak kabul edildiğinden(128,132), 1 mg hidroksiprolin 7,46 mg kollagende bulunur. Buna göre;

$$D = C \times 7,46$$

D = liyofilizattaki kollagen miktarı (% mg)

C = liyofilizattaki hidroksiprolin miktarı (% mg)

$$4- F = \frac{E}{D \cdot 10^{-2}}$$

F = nmol Fruktöz/1 mg Kollagen cinsinden kollagenin nonenzimatik glikozilasyon değeri

E = nmol Fruktöz/1 mg liyofilizat cinsinden liyofilizatın nonenzimatik glikolizasyon değeri

SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Weber-Osborn metodu uygulandı(179). Kollagenin molekül ağırlığı yaklaşık 300.000 civarında olduğundan akrilamid çözeltilisinin konsantrasyonu % 10 yerine % 5 olarak değiştirildi(10).

Kullanılan Çözeltiler:

1- A Çözeltisi (Jel tamponu, 0,2 M): 25,6 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 7,8 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ biraz distile suda çözülüp hacmi 980 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman 20 ml % 10 gr'lık SDS çözeltisinden ilave edildi.

2- Sodyum dodesil benzen sülfonat (% 10 gr, SDS): 10 gram SDS biraz distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

3- B çözeltisi (Akrilamid çözeltisi, % 5 gr): 10,77 gr akrilamid ve 0,33 gr bis-akrilamid bir miktar distile su içinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

4- C çözeltisi (Amonyum persülfat çözeltisi, % 1,5 gr): Kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanır. 10 jel tübü için 30 mgr amonyumpersülfat tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi 2 ml'ye tamamlandı.

5, D çözeltisi (elektroforez tamponu): A çözeltisi 1/1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

6- E çözeltisi (Boyama çözeltisi): 2,5 gr Commassie Brillant Blau 454 ml distile su içinde çözüldü. Üzerine 454 ml metanol ve 92 ml glacial asetik asit ilave edildi. İyice karıştırıldı.

7- F çözeltisi (Boya çıkarma çözeltisi): 75 ml glacial asetik asit, 50 ml metanol ve 875 ml distile su birbiriyle karıştırılarak hazırlandı.

8- Asetik asit çözeltisi (% 7,5): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 75 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

9- Brom fenol blue (% 0,05 gr BFB): 0,05 gr brom fenol blue bir miktar distile suda çözülüp hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

10- β -Merkaptoetanol çözeltisi (MET): Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.

11- N, N, N', N' tetra metilendiamin (TEMED): Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.

12- Gliserin: Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.

13- Gliserin çözeltisi (% 50): Orjinal gliserin çözeltisinden 50 ml alınıp hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

1- Jel Tüplerinin Hazırlanması:

Boyu 9 cm, iç çapı 0,6 cm olan kuru ve temiz jel tüplerinin alt ucu parafilmle kapatıldı. Tüplerin altından 7,5 cm'lik yükseklikler cam kalemiyle işaretlendi. Tüpler dik olarak tüp taşıyıcıya yerleştirildi.

2- Ayırma Jelinin Hazırlanması:

Ayırma jeli 10 tüp için 30 ml olarak aşağıdaki gibi hazırlandı.

Buz içine oturtulmuş cam kap içine:

14,7 ml SDS konulmamış A çözeltisinden

13,5 ml B çözeltisinden

1,5 ml C çözeltisinden

konularak, devamlı karıştırmak süreci ile vakum tulumbası yardımıyla yaklaşık 10 dak. havası alındı. Cam kap buz içindeyken;

45 µl TEMED

0,3 ml % 10'luk SDS çözeltisinden ilave edilerek karıştırıldı. Ucuna ince teflon boru geçirilmiş bir enjektör ile, tüp taşıyıcıda dik olarak durmakta olan jel tüplerine, yavaşça 7,5 cm yüksekliğinde döküldü. Herbirinin üzerine 45 µl distile su yayıldı. Polimerleşmesi beklendi. Ayırma jeli ortamın sıcaklığına göre 10-20 dak.'da polimerize olur. Jelin polimerize olduğu, jel ile distile su arasında oluşan çizgiden anlaşılır.

3- Jele uygulanacak numune ve standart çözeltilerinin hazırlanması:

a) Numunelerin hazırlanması: Liyofilize kollagenler konsantrasyonu 4 mg/ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Deney ve kontrol grubu sıçanlarının kuyruk ve dişeti kollagenleri için birer tüp işaretlendi. Her tübe;

<u>H₂O</u>	<u>% 10 SDS</u>	<u>MET</u>	<u>Numune (4mg Kollagen/ml)</u>	<u>A Çözeltisi</u>
320 µl	50 µl	10 µl	100 µl	20 µl

konularak 90°C'de 15 dak. denatüre edildi. Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra her tübe,

<u>% 0.05 BFB</u>	<u>Gliserin</u>	<u>MET</u>	<u>D Çözeltisi</u>
100 µl	200 µl	50 µl	500 µl

ilave edilerek karıştırıldı. Jel başına bu karışımdan 100 µl uygulandı.

b- Standart çözeltinin hazırlanması: Sigmanın Hemocya-in cross-linked standardı kullanıldı. 2.5 mg'lık standart 0,625 ml distile suda çözüldü. Standart molekül ağırlığı 70.000 olan monomer, 140.000 olan dimer, 210.000 olan trimer ve 280.000 olan tetramer içermekteydi. Standart (St) olarak işaretlenmiş bir tübe;

<u>H₂O</u>	<u>% 10 SDS</u>	<u>MET</u>	<u>St</u>	<u>A Çözeltisi</u>
320 µl	50 µl	10 µl	100 µl	20 µl

konularak nümune tüpleri ile birlikte 90°C'de 15 dak. denatüre edildikten sonra,

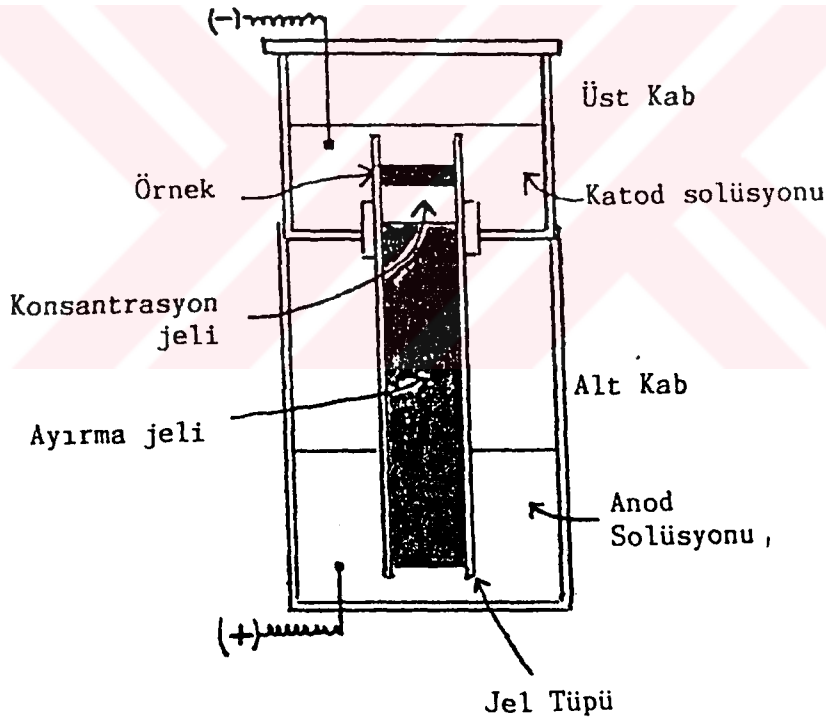
<u>H₂O</u>	<u>Gliserin</u>	<u>MET</u>	<u>D Çözeltisi</u>
100 µl	200 µl	50 µl	500 µl

ilave edildi ve karıştırıldı. Jel başına bu karışımdan 100 µl uygulandı.

4- Elektroforez İşlemi: Elektroforez aletinin üst kabına (katod bölgesi) jel tüpleri dik olarak yerleştirildi. Tüpleri lastik halkalara kolayca yerleştirebilmek için, lastik halkaların içine çok ince tabaka halinde sabun sürüldü. Jel tübünün alt ucundaki parafilm tabakası çıkarıldı. Jellerin üst kısmındaki su, süzgeç kağıdı ile kurulandı. D çözeltisi ile iki kere yıkandı.

Alt kab (anod bölgesi) D çözeltisi ile dolduruldu. Jel tüplerinin bulunduğu üst kab, alt kabın üstüne yerleştirildi. Jel tüplerinin alt kabta bulunan uçlarında hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Jellerin üzerine, tüp doluncaya kadar D çözeltisinden konuldu. Önceden hazırlanmış numune ve standart çözeltilerinden, bir mikro pipet yardımıyla tüp başına 100'er µl yavaşça jellerin üzerine uygulandı. Daha sonra D çözeltisi bir huni yardımıyla üst kaba yavaşça dolduruldu.

Doğru akım güç kaynağının pozitif ucu alt kaba, negatif ucu ise üst kaba bağlandı (Şekil 20). Jel başına 8 mA düşecek şekilde akım verildi. Nüme çözeltisi jelin bitimine



ŞEKİL 20- Elektroforez aletinin ve jeltübünün şematik görünüşü

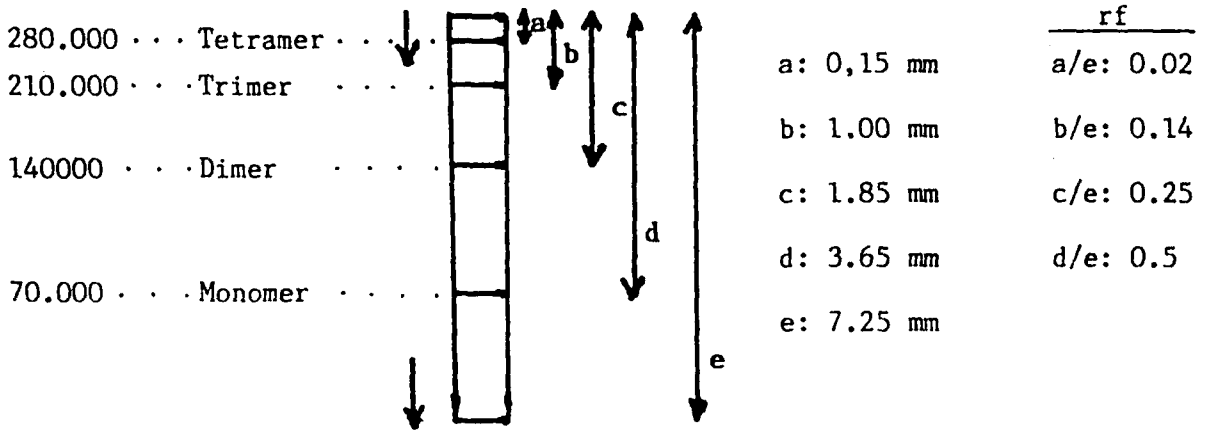
1 cm yaklaştığında akım kesildi. Tüpler üst kaptan çıkarıldı. % 50'lik gliserin çekilmiş bir enjektörle jel tübü ile jel arasında gliserin (% 50) enjekte edildi. Bu işlem jel tübünün hem alt hem de üst ucuna yapıldı. Daha sonra jel, bir lastik

pompa ile yavaşça ittirilerek çıkarıldı. Jel üzerinde çözeltinin bulunduğu yer iğne ile delinerek işaretlendi.

Delinerek işaretlenen jeller deney tüplerine konuldu. Deney tüplerine jelleri örtecek yüksekliğe kadar boyama çözeltisinden ilave edildi. 30-60 dak. bekletildi. Boyama işleminin bitiminden sonra, jeller boya çıkarma aletinin plakları arasına yerleştirildi. Alete boya çıkarma çözeltisinden konuldu.

Boya çıkarma işlemi, alet 24 voltta çalıştırılarak iki saatte tamamlandı. Boya çıkarma işlemi tamamlanan jeller % 7,5'lükasetik asit çözeltisi konulmuş kapaklı tüplerde saklandı.

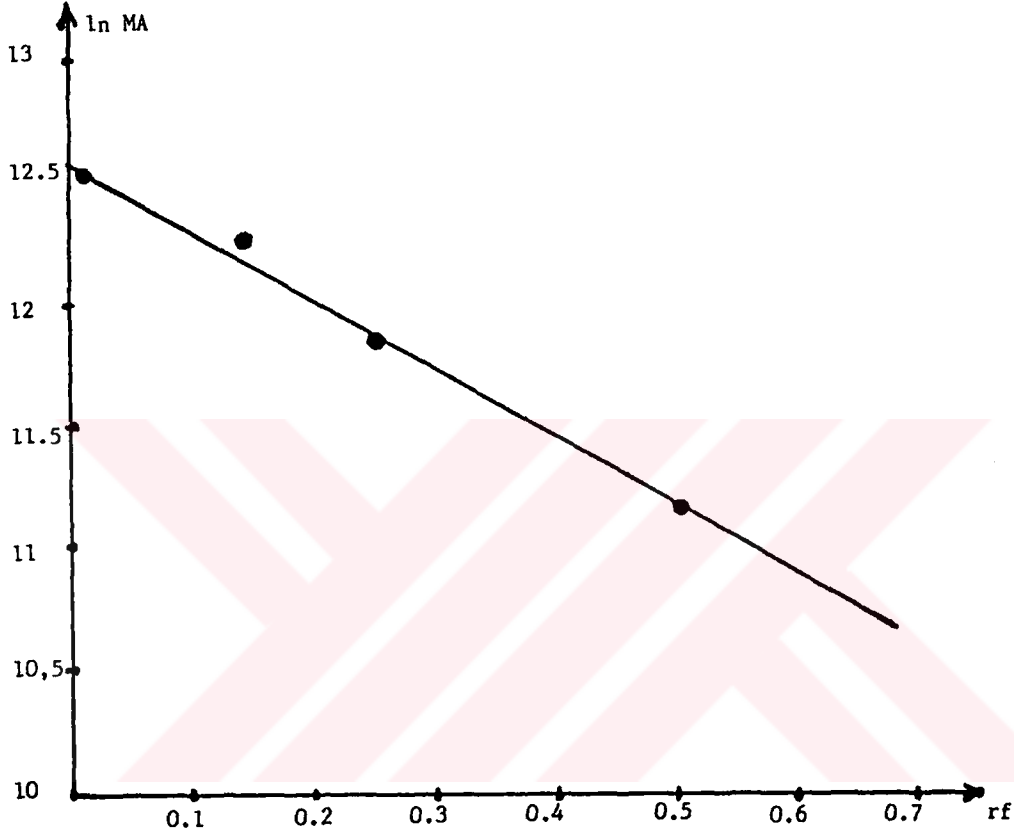
Hemocyanin standart proteine ait jelde, elektroforez işlemi sonunda 4 band elde edildi. Bu bandların orijine göre uzaklıkları tesbit edildi. Bu uzaklıklarında bitiş noktasına olan oranları hesaplanarak rf değerleri bulundu (Şekil 21).



ŞEKİL 21- Hemocyanin standart proteinine ait rf değerlerinin hesaplanması.

Hesaplanan rf değerleri absise ve bandlara karşılık

gelen molekül ağırlıklarının logaritması da ordinata konarak hemocyanin standart proteinine ait molekül ağırlığı grafiği elde edildi (Şekil 22).



ŞEKİL 22- Molekül ağırlığı (MA) grafiği

GLİKOPROTEİN BOYAMASI(10)

Kullanılan Çözeltiler:

1- Triklorasetik asit çözeltisi (TCA, % 12,5): % 100'lük TCA çözeltisinden 31,25 ml alınıp, hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

2- Asetik asit çözeltisi (% 3): Yoğunluğu 1.050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 30 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3- Periyodik asit (% 1): 2,5 gr periyodik asit % 3'lük asetik asit içinde çözülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

4- Sodyummetabisülfid çözeltisi (% 0,5): 5 gr sodyummetabisülfid bir miktar distile su içinde çözülerek hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

5- Asetik asit çözeltisi (% 5): Yoğunluğu 1,050 gr/ml olan % 99-100'lük asetik asitten 50 ml alınıp hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

6- Klorür asidi (2 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37 lik klorür asidinden 16,6 ml alınıp distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

7- Klorür asidi (1 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37 lik klorür asidinden 8,3 ml alınıp distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

8- Schiff Boyası: 2 gram bazik fuksin 400 ml kaynar suda çözülerek, soğutuldu. Süzüldü. Üzerine 10 ml 2 N HCl çözeltisi ile 4 gram sodyummetabisülfid ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 1 gece karanlıkta bekletildi. 1 gram aktif karbon konularak karıştırıldı ve süzüldü. Üzerindeki süzgeç kağıdının pembe rengi açılıncaya kadar 1 N HCl ilave edildi. Çözelti renksiz olmalıdır. Pembe olduğu takdirde bozulmuş demektir.

Deneyin Yapılışı: Jellerin hazırlanması ve elektroforez işlemi, boyama safhasına gelinceye kadar SDS-poliakrilamid jel elektroforez metoduna göre yapıldı.

% 50'lik gliserin ile çıkarılıp işaretlenen jeller 25-30 ml % 12,5'lük TCA içinde 30 dak. bekletildi. 30 dak. sonunda hemen distile su ile çalkalanarak % 1'lik periyodik asit içinde 50 dak. tutuldu. Distile su ile çok iyi çalkalanarak yıkanan jeller suyu birkaç kez değiştirilerek bir gece distile su içinde bekletildi. Daha sonra schiff boyası (fuksin sülfid) içinde 50 dak. tutuldu. Jel başına 25-30 ml olmak üzere % 0,5'lik sodyummetabisülfid çözeltisi ile herbiri

10'ar dak.'dan üç kere yıkandı (toplam 30 dak.). Boya tamamıyla çıkıncaya kadar bir gece distile su içinde bekletildi. Boya çıkarma işlemi tamamlanan jeller % 5'lik asetik asit içinde, kapalı tüplerde saklandı.

DAVIS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ(20,46)

Proteinleri denatüre etmeden inceleyen bir methoddur.

Kullanılan Çözeltiler:

1- DA çözeltisi: 30 gr akrilamid ve 0,9 gr bis-akrilamid bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2- DB çözeltisi: 18,15 gram tris bir miktar distile suda çözüldü. Üzerine 24 ml 1 N HCl ilave edilerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3- DC çözeltisi: 0,36 gr Amonyumpersülfat bir miktar distile suda çözümlü hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Taze hazırlanır).

4- DD çözeltisi: 5 gr Akrilamid ve 0,9 gr bis-akrilamid bir miktar distile su içinde çözümlü hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5- DE çözeltisi: 2,85 gr Tris bir miktar distile su içinde çözüldü. Üzerine 1 N H_3PO_4 ilave edilerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

6- DF çözeltisi: 2 mg Riboflavin ve 40 gr sucrose bir miktar distile suda çözümlü 100 ml'ye tamamlanır. Fazla miktarda madde harcamamak için şu şekilde hazırlandı: 10 mg Riboflavin 500 ml distile su içinde çözüldü. 2 gr sucrose ise bu çözelti içinde çözümlü hacmi 5 ml'ye tamamlandı. DF çözeltisi de taze hazırlanır.

7- Marker çözeltisi: 2,85 gr Tris, 20 gr sucrose, 2 gr bromfenolblue bir miktar distile su içinde çözüldü. Üzeri-

ne 12,8 ml 1 N H_3PO_4 çözeltisinden ilave edilerek hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8- Anod çözeltisi (pH-8,1): 12,1 gram Tris bir miktar distile su içinde çözülüp, üzerine 50 ml 1 N HCl ilave edilerek, hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

9- Katod çözeltisi (pH-8,7): 6,32 gr Tris ve 3,94 gr glisin bir miktar distile su içinde çözülüp hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

10- N, N, N', N' Tetrametilentetramin (TEMED): Orjinal şişesinden alınarak kullanıldı.

11- Klorür asidi (1 N): Yoğunluğu 1,19 gr/ml olan % 37'lik klorür asidi çözeltisinden 8,3 ml alınıp hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

12- Fosforik asid (1 N H_3PO_4): Yoğunluğu 1,71 gr/ml olan % 85'lik fosforik asit çözeltisinden 2,25 ml alınıp hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Gliserin, boyama ve boya çıkarma çözeltileri Weber-Osborn metodundaki gibidir.

Deneyin Yapılışı:

1- Jel tüplerinin hazırlanması: Boyu 9 cm, iç çapı 0,6 cm olan kuru ve temiz cam jel tüplerinin alt ucu parafilmle kapatıldı. Tüplerin altından 6 ve 7 cm'lik yükseklikler cam kalemiyle işaretlendi. Tüpler dik olarak tüp taşıyıcıya yerleştirildi.

2- Ayırma jelinin hazırlanması: 10 jel tüpü için 20 ml olarak hazırlandı. Buz içine oturtulmuş cam kap içine;

5 ml DA çözeltisinden (1 kısım)

5 ml DB çözeltisinden (1 kısım)

10 ml DC çözeltisinden (2 kısım) konularak karıştırıldı.

Buz içindeyken ve devamlı karıştırılarak vakum pompası yardımıyla 10 dak. süreyle havası alındı. 15 µl TEMED konularak tekrar karıştırıldı. Ucuna ince teflon boru geçirilmiş bir enjektör ile, tüp taşıyıcıda dik olarak durmakta olan jel tüplerine yavaşça döküldü. Bütün tüplerin üzerine 45 µl distile su ilave edildi. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra konsantrasyon jeli aşağıdaki gibi hazırlanıp ayırma jeli üzerine döküldü.

3- Konsantrasyon jelinin hazırlanması: 10 jel tüpü için 4 ml olarak hazırlandı. Buz içine oturtulmuş cam kap içine;

2 ml DD çözeltilisinden (2 kısım)
1 ml DE çözeltilisinden (1 kısım)
1 ml DF çözeltilisinden (1 kısım)

konularak yukarıdaki gibi havası alındı. Buz içindeyken 1 µl TEMED ilave edilerek karıştırıldı. Jel enjektörü yardımıyla ayırma jeli üzerine (ayırma jelinin üzerindeki su süzgeç kağıdı ile kurutulmalıdır) 1 cm yüksekliğinde döküldü. Konsantrasyon jeli üzerine 45 µl distile su yayıldı. Konsantrasyon jelinin kısa sürede polimerleşmesi için tüpler, UV lambasının tam altına yerleştirildi. Polimerizasyonun tamamlandığı, jel ile su arasındaki ince çizgiden anlaşılır.

4- Jele uygulanacak numunelerin hazırlanması: 4 mg/ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanan liyofilize kollagenlerden 50 µl, marker çözeltilisi ile karıştırıldı.

<u>Marker</u>	<u>Numune (4 mg kollagen/ml)</u>
50 µl	50 µl

Her sıçanın dişeti ve kuyruk kollagenleri için ayrı ayrı deney tüpleri işaretlenerek, bu karışımlar yukarıdaki gibi ha-

zırlandı. Jel başına bu karışımlardan 50 µl uygulandı.

5- Elektroforez işlemi: Weber-Osborn metodundaki gibi jel tüpleri üst kaba dik olarak, konsantrasyon jeli üstte kalacak şekilde, yerleştirildi. Jellerin üst kısmındaki su, süzgeç kağıdı ile kurulandı. Jel tüplerinin alt ucundaki parafilm çıkarıldı.

Alt kaba anod çözeltisi dolduruldu. Üst kab, alt kabın yani anod kabının üzerine yerleştirildi. Jel tüplerinin alt kabda bulunan uçlarında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edildi. Jellerin üzerine katod çözeltisinden konuldu. Hazırlanan numune karışımlarından bir mikro pipet yardımıyla jellerin üzerine 50 µl uygulandı. Daha sonra üst kaba bir huni ile katod çözeltisi yavaş yavaş dolduruldu.

Alt kab, doğru akım güç kaynağının pozitif ucuna, üst kab ise negatif ucuna bağlandı (Şekil 20). Başlangıçta numune çözeltisi konsantrasyon jelini geçene kadar jel başına 2 mA düşecek şekilde akım verildi. Nümune çözeltisi konsantrasyon jelini geçtikten sonra jel başına 4 mA düşecek şekilde akım arttırıldı. Nümune çözeltisi jelin bitimine 1 cm yaklaştığında akım kesildi.

Jelleri çıkarma, boyama ve boya çıkarma işlemleri Weber-Osborn SDS poliakrilamid jel elektroforez metodunda ki gibi yapıldı.

TROMBOSİT AGREGASYONU(22,105)

Kullanılan Çözeltiler:

1- Sodyum sitrat çözeltisi (% 3.8 gr): 3,8 gram sodyum sitrat bir miktar distile su içinde çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

2- PRP (Trombositten zengin plazma): Normal ve sağlıklı kişiden % 3,8'lik sodyum sitrat üzerine (1 hacim sodyum sitrat, 9 hacim kan) kan alınarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında 20 dak. bekletildi. 1500 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Bu işlem birkaç kez tekrar edilerek elde edilen PRP'ler biriktirildi.

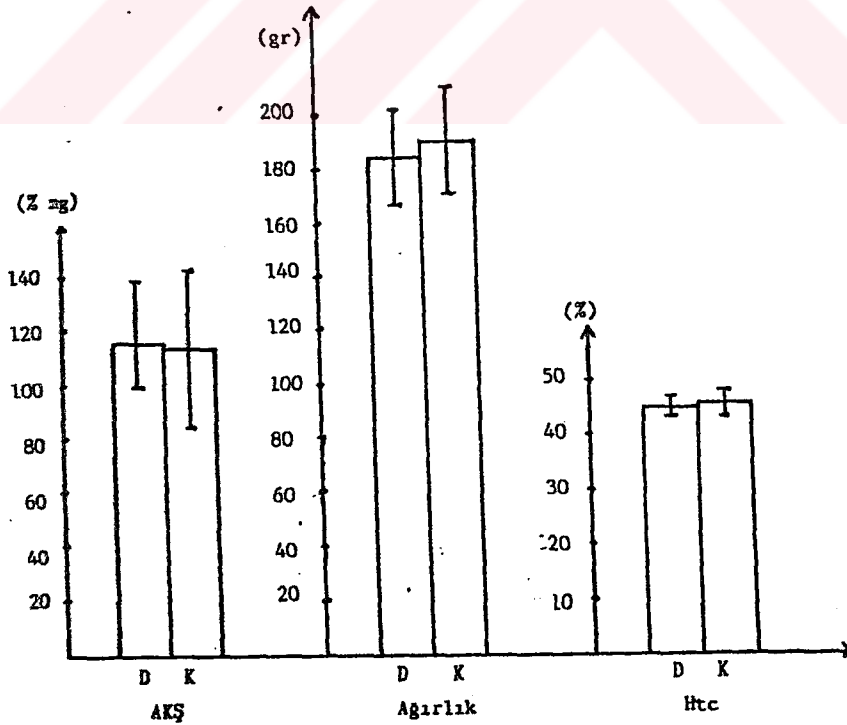
3- PPP (Trombositten fakir plazma): PRP elde edildikten sonra kalan kan 3000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilerek PPP alındı.

4- Agregasyon yapıcı madde olarak kollagenlerin hazırlanması: Bir gün önceden liyofilize kollagenler 1 mg/ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Dişeti çözünmediğinden cam homojenizatörle homojenize edilerek hazırlandı. Deney sırasında 1 mg/ml olan kollagen çözeltileri, 50 µl'sinde 6-10 µg kollagen ihtiva edecek şekilde distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

Deneyin Yapılışı: Agregometrenin sıcaklığı 37°C olduktan sonra, agregometre tüplerine 0,45 ml PRP ve 0,5 ml PPP konularak, agregometrenin % 0 ve % 100'lük ışık geçirgenliği ayarı yapıldı. 0,45 ml PRP alınarak sıcaklığının 37°C'ye gelmesi beklendi. Devamlı karıştırılırken üzerine 50 µl kollagen çözeltisinden ilave edildi. Işık geçirgenliğinin artışı izlendi ve agregometrenin yazıcısı ile kaydedildi. Işık geçişi daha fazla yükselmeyinceye kadar kayıt sürdürüldü.

BULGULAR

1- Çalışmamızda kullanılan 48 sıçanın rastgele 24 tanesi diyabet ve diğer 24 tanesi de kontrol grubu olarak ayrılmıştı. Diyabet grubuna streptozotocin verilmeden önce, yani başlangıçta; iki gruba ait açlık kan şekeri, ağırlık ve hematokrit değerleri Şekil 23'de gösterilmiştir. Bu iki grup arasında, belirtilen parametreler açısından yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunmamıştır. p değerlerinden bulunan farkın anlamsız olduğu görülmektedir (Tablo 4).



ŞEKİL 23- Başlangıçta, STZ verilmeden önce diyabet (D) ve kontrol (K) gruplarının açlık kan şekeri (AKŞ), ağırlık ve hematokrit (Htc) değerleri

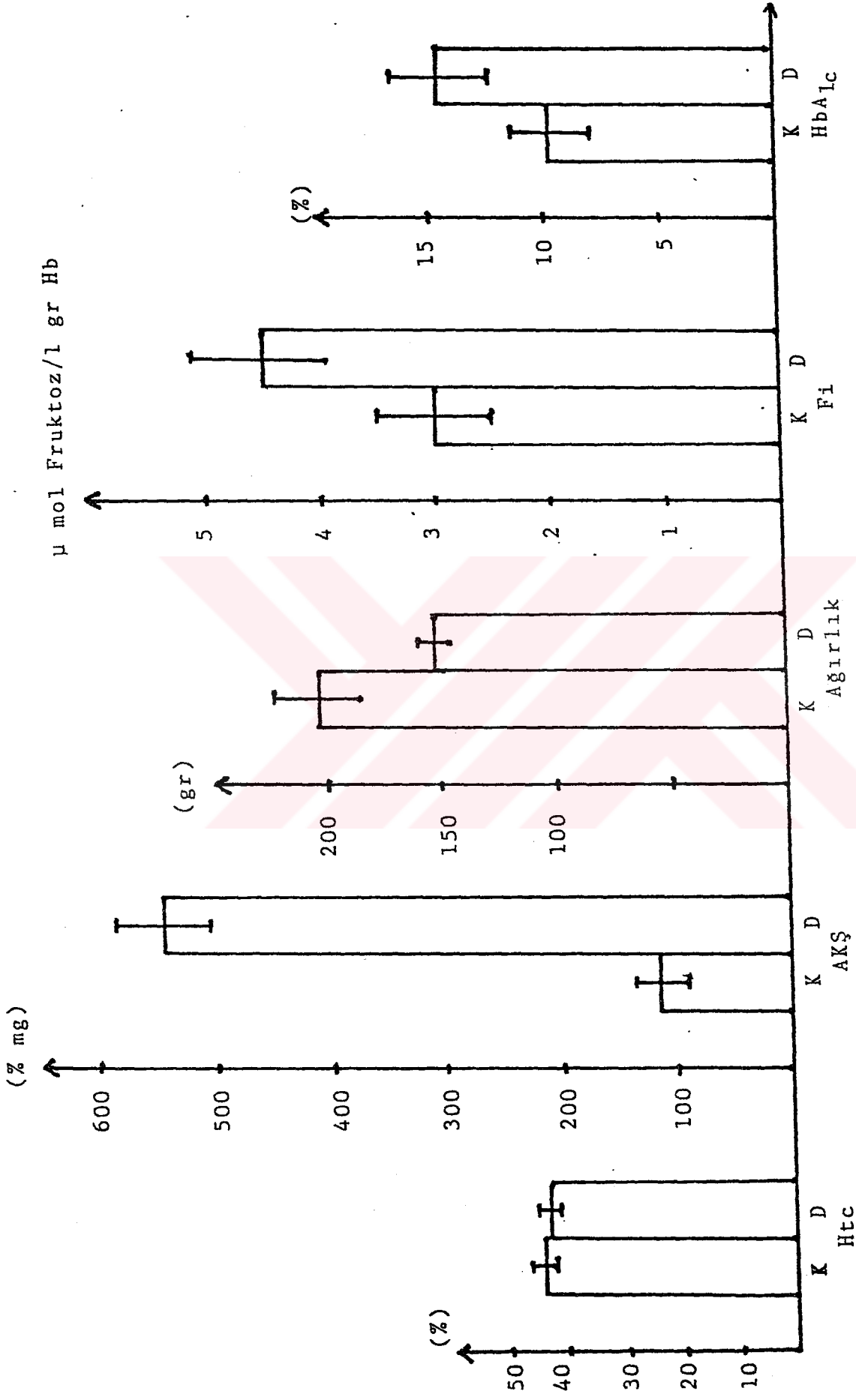
TABLO 4- Başlangıçta, diyabetik deney ve kontrol grupları arasında, açlık kan şekeri, ağırlık ve hematokrit değerleri açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet ve Kontrol Grupları	p
Açlık kan şekeri	0,5789
Ağırlık	0,2095
Hematokrit	0,4050

2- STZ verilmesinden onyedinci gün sonra, yani deney sonunda, diyabet ve kontrol gruplarına ait açlık kan şekeri, ağırlık, hematokrit, fruktoz indeksi (Fi) ve hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) değerleri Şekil 24'de gösterilmiştir. Diyabet ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırma, diyabetik hayvanların açlık kan şekeri, fruktoz indeksleri ve HbA_{1c} değerlerinde kontrol grubuna oranla çok anlamlı bir artış olduğunu, ağırlıklarında kontrol grubuna oranla çok anlamlı bir azalma olduğunu, diyabet ve kontrol gruplarının hematokrit değerleri arasında ise anlamlı bir farkın olmadığını göstermiştir (Tablo 5).

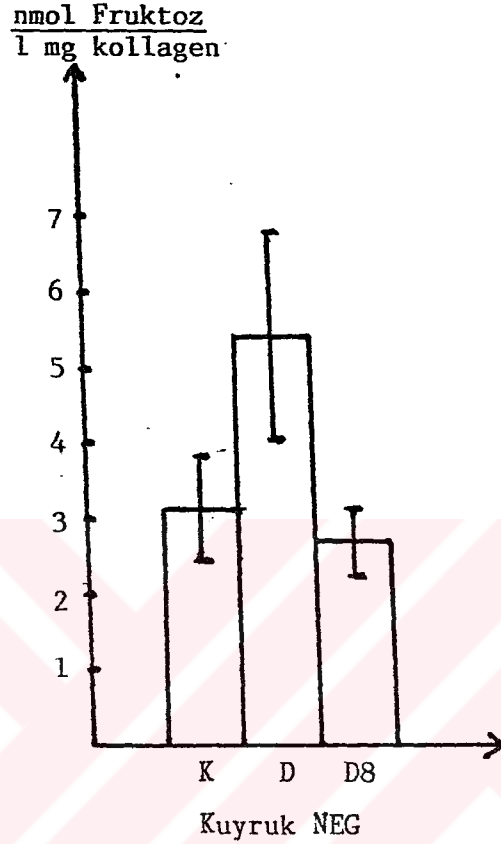
TABLO 5- Deney sonunda, diyabet ve kontrol grupları arasında, açlık kan şekeri, ağırlık, hematokrit, fruktoz indeksi ve hemoglobin A_{1c} değerleri açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet ve Kontrol Grupları	p
Açlık kan şekeri	0,0001
Ağırlık	0,0001
Hematokrit	0,1752
Fruktoz indeksi	0,0001
Hemoglobin A _{1c}	0,0001



ŞEKİL 24- Deneysel diyet ve kontrol gruplarının Hematokrit (Htc), Açlık Kan Şekerleri (AKŞ), Ağırlık, Fruktoz indeksi (Fi) ve Hemogloblin A_{1c} (HbA_{1c}) değerleri

3- Diyabet ve kontrol gruplarının kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri Şekil 25'de gösterilmiştir.



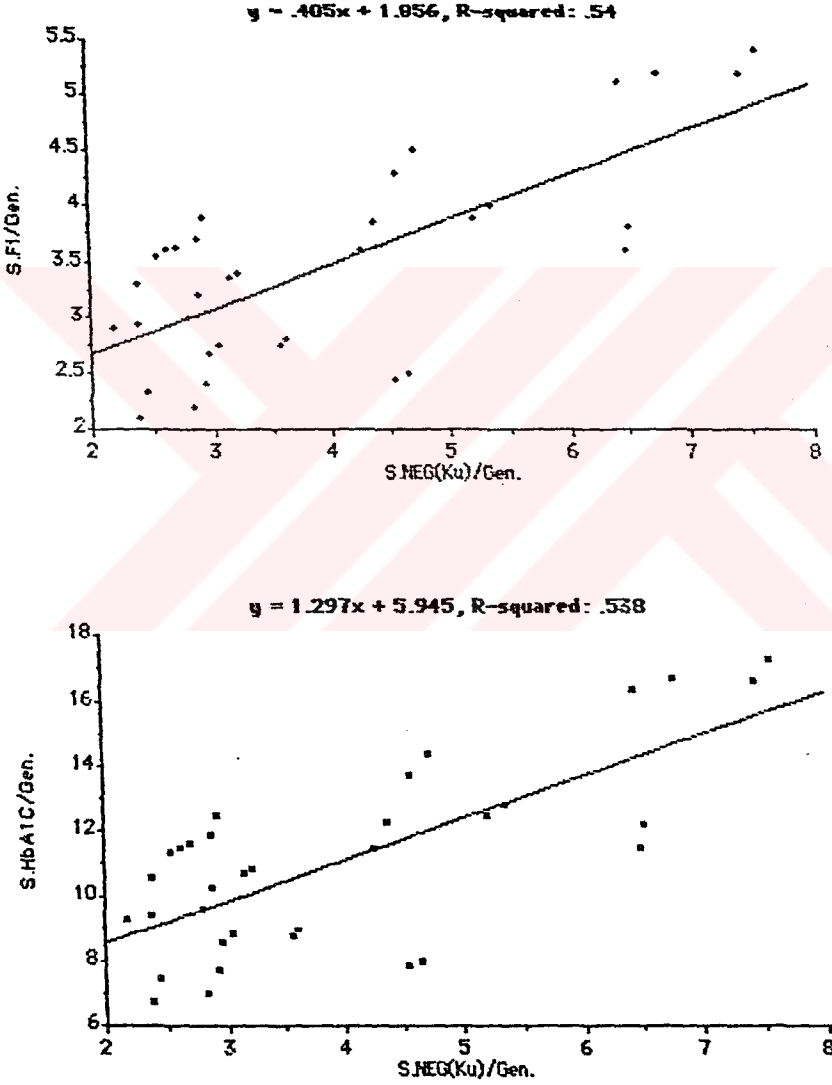
ŞEKİL 25- Kontrol (K), diyabet (D) ve 8 günlük diyabet (D8) gruplarının kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon (NEG) değerleri

İki grup, nonenzimatik glikozilasyon açısından karşılaştırıldığında, diyabet grubunda kontrol grubuna oranla çok anlamlı bir artış bulunmuştur (Tablo 6).

TABLO 6- Diyabet ve kontrol grupları arasında kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerleri açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet ve Kontrol Grupları	p
Kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu	0,0001

4- Diyabet ve kontrol grupları arasında fruktoz indeksi, hemoglobin A_{1c} ve kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri açısından bir ilişkisi olup olmadığı incelendi. Regresyon grafiği (Şekil 26) ve hesaplanan korrelasyon katsayısı (r) (Tablo 7), bu iki parametre arasında zayıf pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.

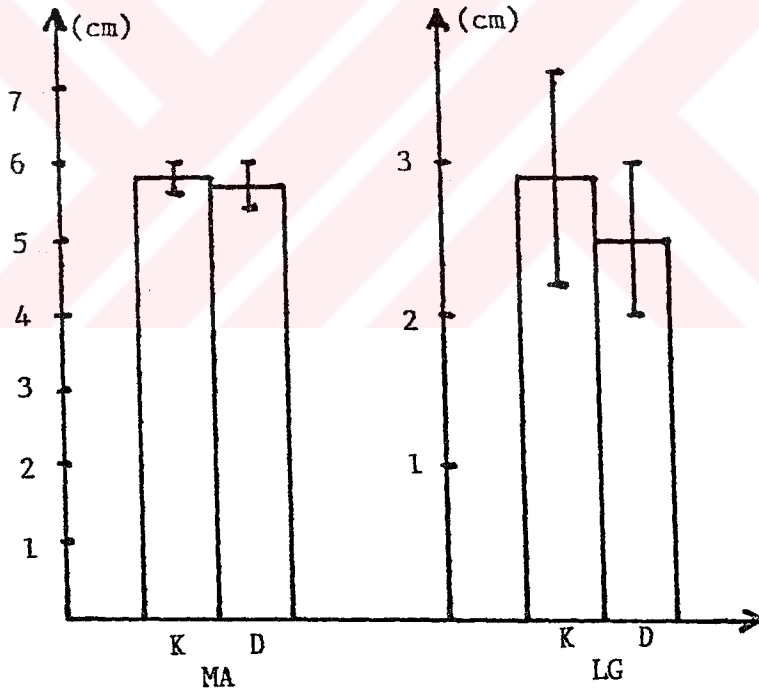


ŞEKİL 26-- Kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerleri ile fruktoz indeksi (a) ve hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) (b) arasındaki regresyon grafiği (S: Deney sonunda, Gen: Genel, NEG: Nonenzimatik glikozilasyon, Ku: Kuyruk)

TABLO 7- Kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilyasyonu (NEG) ile fruktoz indeksi (Fi) ve hemogloblin A_{1c} (HbA_{1c}) arasındaki korrelasyon

	r
Kuyruk NEG - Fi	0,735
Kuyruk NEG - HbA _{1c}	0,734

5- Diyabet ve kontrol gruplarının kuyruk tendon kollagenleri ile oluşturulan trombosit agregasyon eğrilerinin maksimum amplitüd ve lag periyodu değerleri Şekil 27'de gösterilmiştir.



ŞEKİL 27- Kontrol (K) ve diyabet (D) gruplarının kuyruk tendon kollagenleri ile oluşturulan trombosit agregasyon eğrilerinin maksimum amplitüd (MA) ve lag periyodu (LG) değerleri

Diyabet ve kontrol gruplarının kuyruk tendon kollagenlerinin trombosit agregasyon eğrileri karşılaştırıldığında,

agregasyon eğrilerinin maksimum amplitüdleri arasındaki farkın anlamlı olmadığı, fakat lag periyodları arasındaki farkın az anlamlı olduğu bulunmuştur. Diyabetlilerde lag periyod kontrol grubuna oranla daha kısa bulunmuştur (Tablo 8).

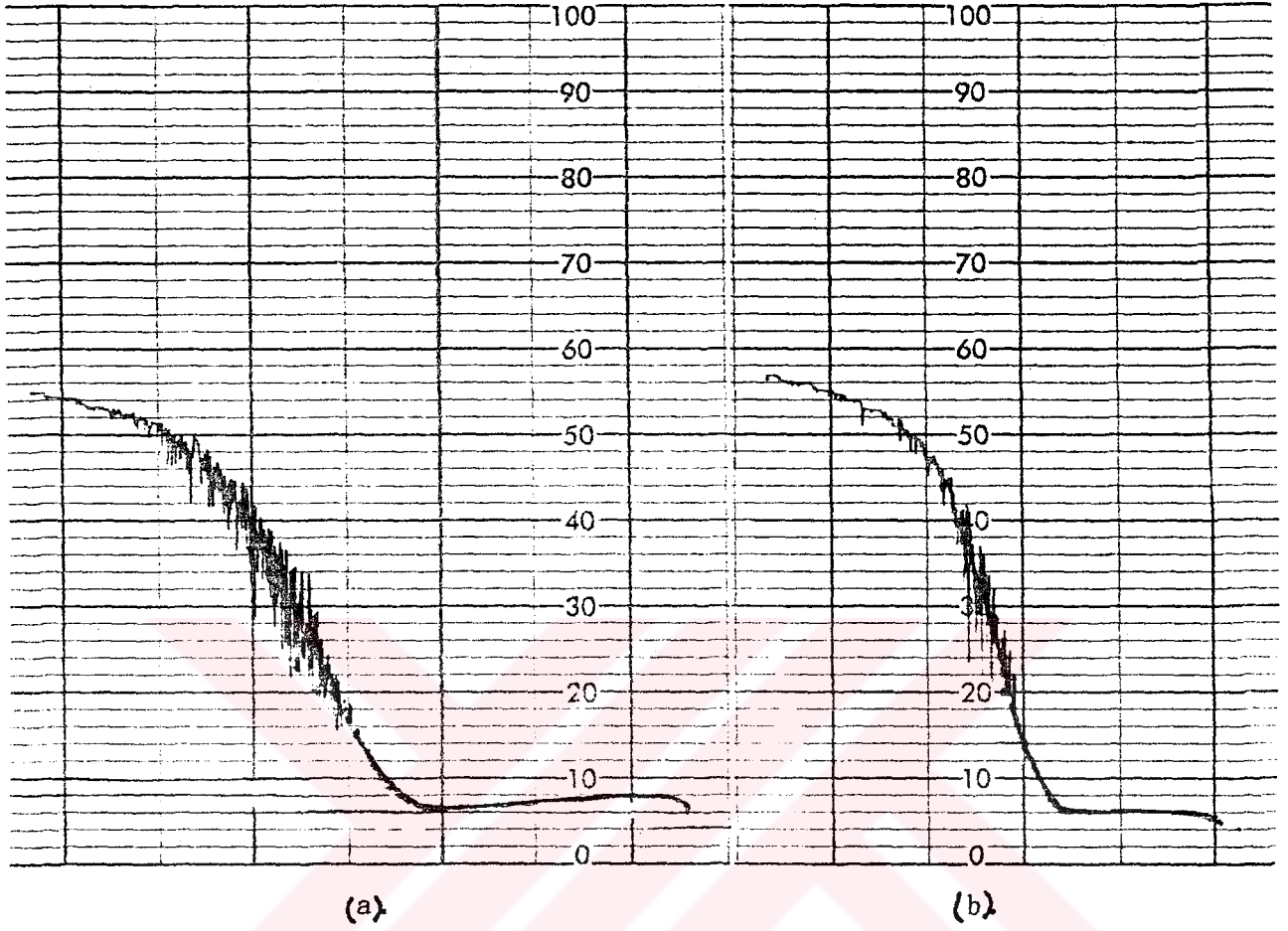
TABLO 8- Diyabet ve kontrol grupları arasında kuyruk tendon kollajeninin trombosit agregasyon eğrilerinin maksimum amplitüdü ve lag periyodu açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet ve Kontrol Grupları	p
Maksimum Amplitüd	0,1727
Lag Periyodu	0,0925

Diyabet ve kontrol gruplarından elde edilen kollajenle oluşturulan trombosit eğrileri Şekil 28a ve 28b'de gösterilmiştir.



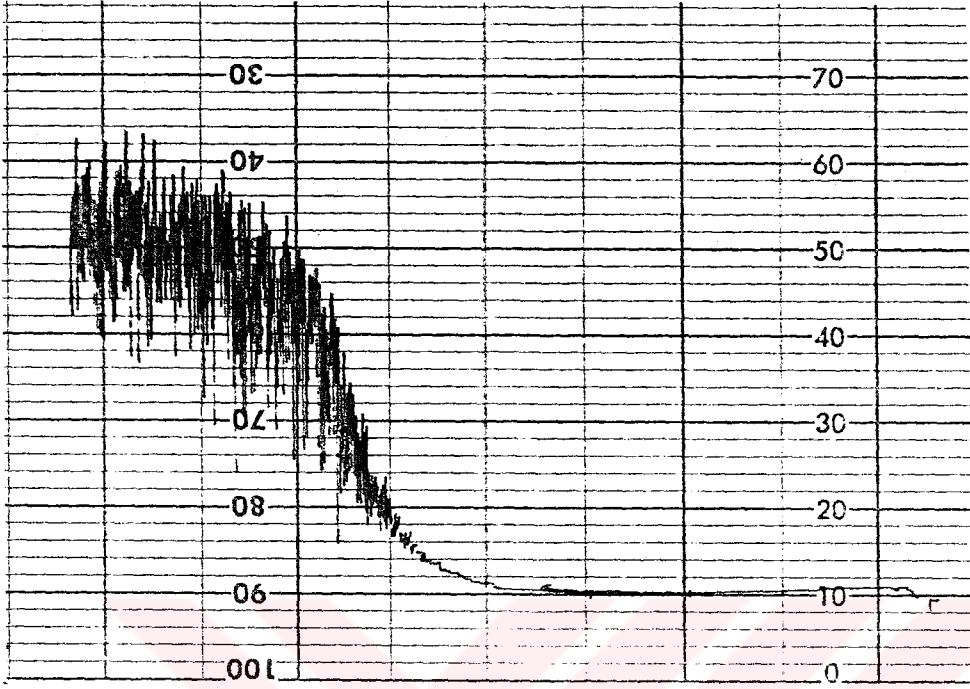
ŞEKİL 28- a) Kontrol, b) Diyabet grubunda kuyruk kollajenleri ile oluşturulan trombosit agregasyon eğrilerinin toplu halde gösterilmesi



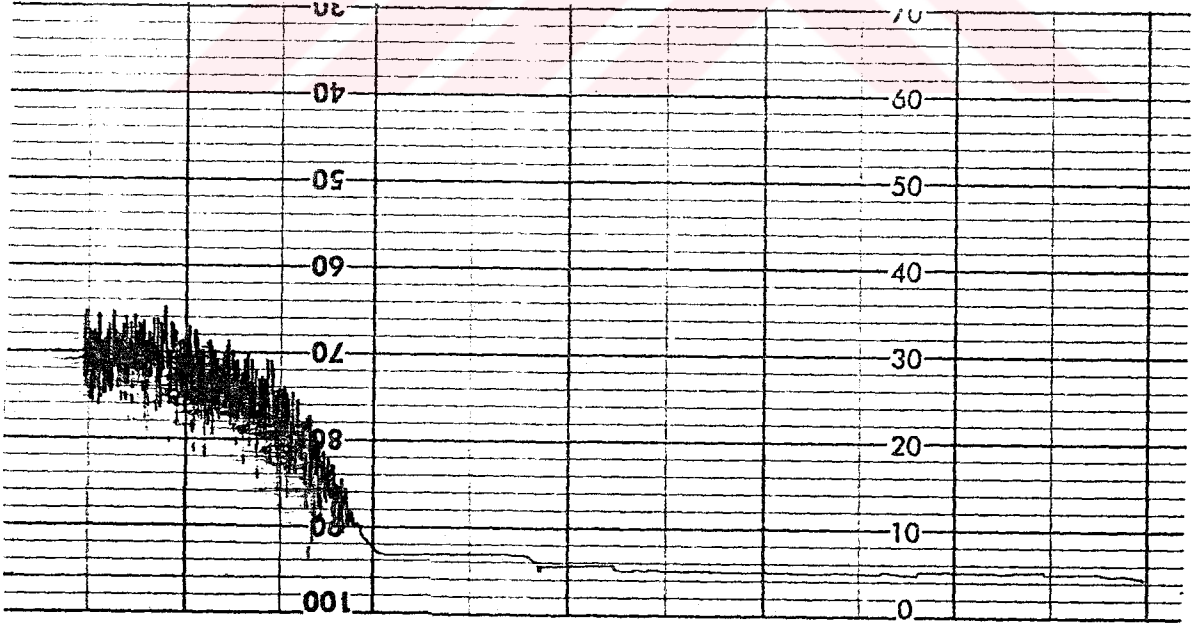
ŞEKİL 29- a) Kontrol, b) Diyabet grubunda, kuyruk tendon kollageni ile elde edilen trombosit agregasyonlarına birer örnek

Dişeti kollageniyle oluşturulan trombosit agregasyonuna da bakıldı. Ancak dişeti bağ dokusu miktarı çok az olduğundan dişeti kollagen süspansiyonları istenilen konsantrasyonda hazırlanamadı. Dolayısıyla agregasyon eğrileri arasında istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Fakat hem normal, hem de diabetik dişeti kollageni trombosit agregasyonu oluşturdu (Şekil 30).



(a)

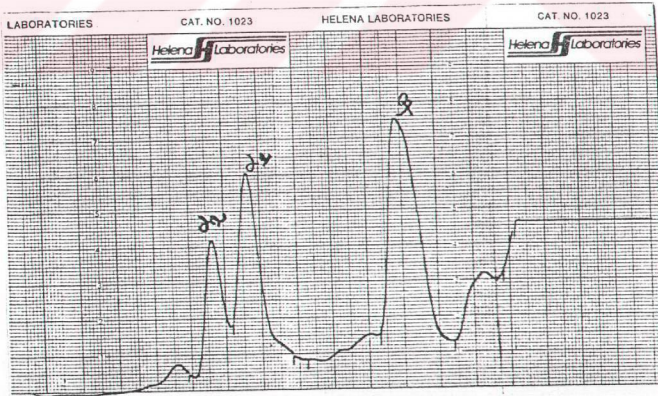
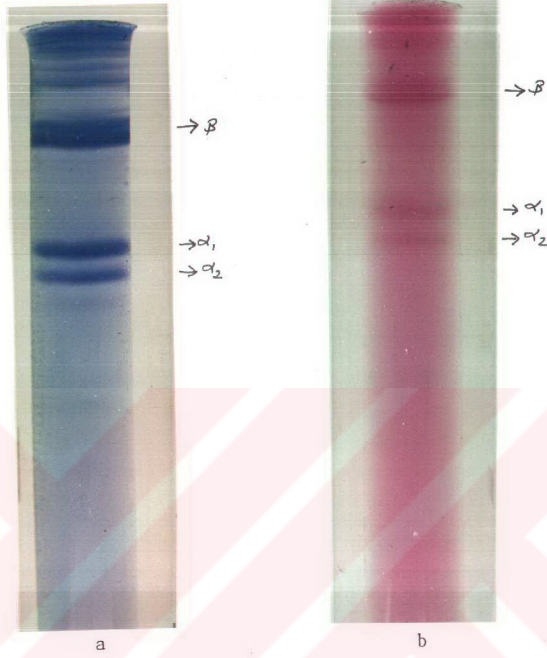


(b)

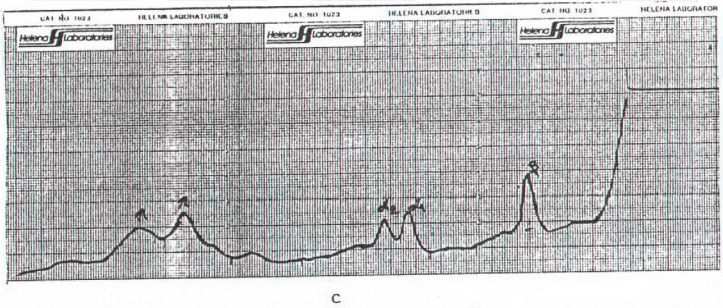
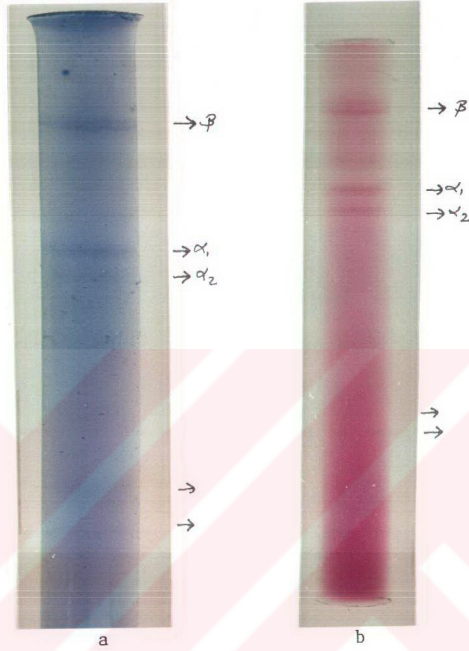
ŞEKİL 30- a) Kontrol, b) Diyabet grubuna ait dişeti kollajeni ile elde edilen trombosit agregasyonu

6- Kuyruk tendon kollagenleri ve dişeti kollagenleri denatüre edilmeden Davis metoduna göre ve denatüre edilerek Weber-Osborn metoduna göre poliakrilamid gel elektroforezine tâbi tutuldu. Weber-Osborn SDS-poliakrilamid gel elektroforezine tâbi tutulan kuyruk ve dişeti kollagenlerine ait elektroforez bantları ve dansitogramları Şekil 31 ve Şekil 32'de görülmektedir. Ayrıca Weber-Osborn poliakrilamid gel elektroforezi uygulandıktan sonra jeller Schiff boyası ile boyanarak kollagenin bir glikoprotein olduğu da gösterilmiştir (Şekil 31, 32). Gerek diyabet, gerekse kontrol grubu dişeti kollagenin elektroforezinde kuyruk kollageninden farklı olarak düşük molekül ağırlıklı iki band tesbit edilmiştir. Kollagenin, α_2 ve α_1 bantları Hemocyanin standart protein bantları (Şekil 33) ile karşılaştırılarak molekül ağırlıkları tayin edilmiştir. α_2 'nin molekül ağırlığı yaklaşık 97.380 ve α_1 'in molekül ağırlığı ise yaklaşık 102.000 civarında bulunmuştur.

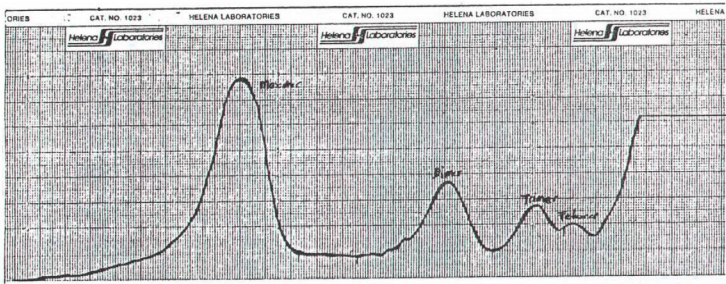
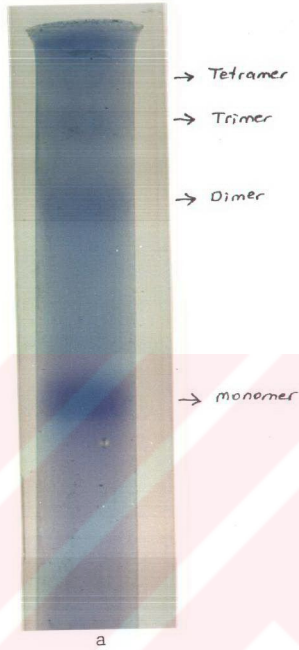
Elektroforez çalışmaları sonunda elde edilen diyabet ve kontrol grubuna ait kuyruk tendon kollagenlerinin α_2 , α_1 ve β bantlarının değerleri Şekil 34'de gösterilmiştir. İki grup karşılaştırıldığında α_2 bantları arasındaki farkın anlamsız, α_1 bantları arasındaki farkın az anlamlı, yani diyabet grubuna ait α_1 bantlarında kontrol grubuna oranla biraz azalma olduğu ve β bantları arasındaki farkın anlamsız olduğu bulunmuştur (Tablo 9).



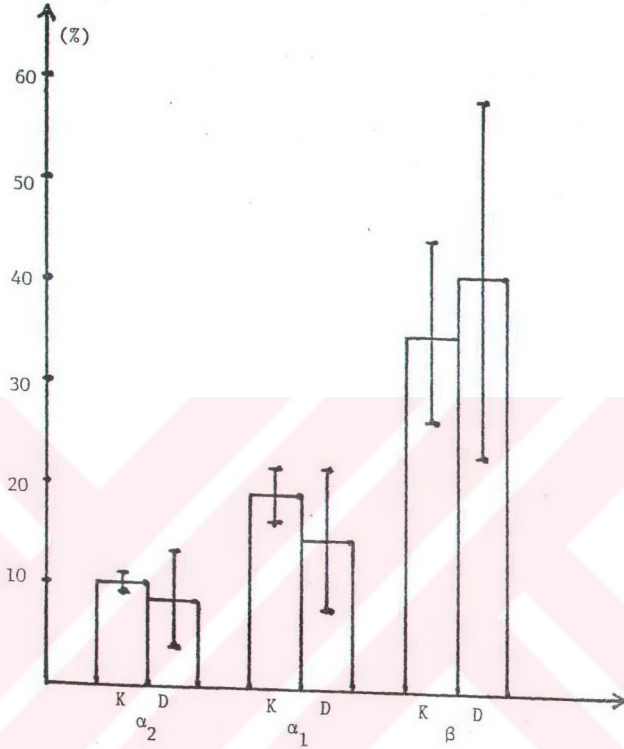
ŞEKİL 31- Kuyruk tendon kollageninin SDS-poliakrilamid gel elektroforezine bir örnek (a) Jelin Commasi brillant blau ile boyanması, (b) Jelin glikoprotein boyası ile boyanması, c) Jelin dansitogramı



ŞEKİL 32- Dişeti kollajenininin SDS-poliakrilamid jel elektroforezine bir örnek a) Jelin Commassi brillant blau ile boyanması, b) Jelin glikoprotein boyası ile boyanması, c) Jelin dansitogramı



ŞEKİL 33- a) Hemocyanin standart proteinine ait SDS-poliakrilamid jel elektroforezi, b) Jelin dansitogramı

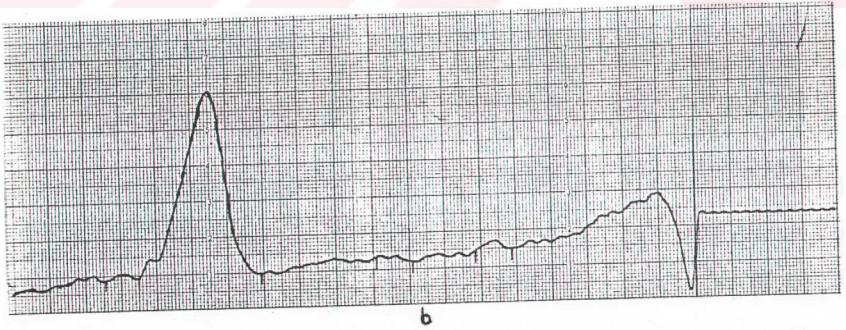


ŞEKİL 34- Kontrol ve diyabet gruplarının SDS-poliakrilamid jel elektroforez bantlarının (α_2 , α_1 , β) değerleri

TABLO 9- Diyabet ve kontrol grupları arasında α_2 , α_1 ve β bantları açısından olan farkın anlamlılık derecesi

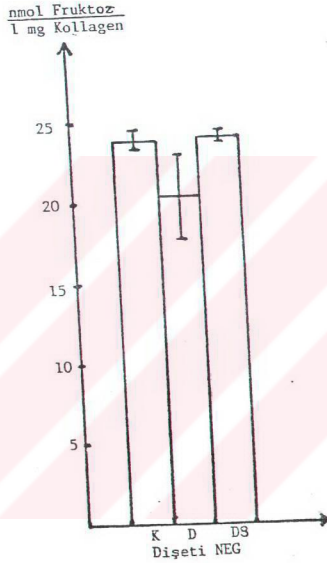
Diyabet ve Kontrol Grupları	p
α_2	0,1668
α_1	0,0582
β	0,1649

Davis poliakrilamid jel elektroforezinde dişeti ve kuyruk kollagenleri için tek bir band elde edildi (Şekil 35).



ŞEKİL 35- a) Dişeti ve Kuyruk kollageninin Davis poliakrilamid jel elektroforezine bir örnek, b) dansitogramda tek bantın görülmesi

7- Diyabet ve kontrol gruplarına ait dişeti kollajenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri Şekil 36'da gösterilmiştir. İki grup karşılaştırıldığında ise, diyabetik dişeti kollajenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerlerinde kontrol grubuna oranla çok anlamlı bir azalma bulunmuştur (Tablo 10).



ŞEKİL 36- Kontrol (K), diyabet (D) ve 8 günlük diyabet (D8) gruplarının dişeti kollajeninin nonenzimatik glikozilasyon değerleri

TABLO 10- Diyabet ve kontrol grupları arasında dişeti kollajeninin nonenzimatik glikozilasyon açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet ve Kontrol Grupları	p
Dişeti kollajeninin nonenzimatik glikozilasyonu	0,0001

8- Diyabet grubunun dişeti kollagenleri ile, kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında, dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun, kuyruğa oranla çok fazla olduğu bulunmuştur (Tablo 11).

TABLO 11- Diyabet grubunun dişeti ve kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyonları arasındaki farkın anlamlılık derecesi

Deney Grubunun Dişeti ve Kuyruk Kollageni	p
Nonenzimatik glikozilasyon	0,0001

9- Kontrol grubunun dişeti kollagenleri ile kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında, dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun kuyruğa oranla çok fazla olduğu bulunmuştur (Tablo 12).

TABLO 12- Kontrol grubunun dişeti ve kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyonları arasındaki farkın anlamlılık derecesi

Kontrol Grubunun Dişeti ve Kuyruk Kollageni	p
Nonenzimatik glikozilasyon	0,0001

10- Çalışmamızda STZ verildikten sekiz gün sonra ölen, kanları alınmayan, fakat kuyruk ve dişeti dokuları alınabilen diyabet grubuna ait sekiz sıçanın kuyruk ve dişeti kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerlerini diyabet ve kontrol gruplarınıninki ile, diyabetin etkisinin sekizinci günden onyedinci güne kadar nasıl değiştiğini görmek amacıyla karşılaştırdık.

Sekiz günlük diyabetli ve diyabet grubuna ait kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında aradaki farkın çok anlamlı olduğu bulunmuştur. Diyabet grubuna ait kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerleri 8 günlük diyabetlilere oranla çok fazladır (Tablo 13) (şekil 25).

TABLO 13- Diyabet grubu ve 8 günlük diyabetliler arasında kuyruk kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu (NEG) açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet Grubu 8 Günlük Diyabet	p
Kuyruk Kollageninin NEG'si	0,0033

11- 8 günlük diyabetli ve kontrol grubuna ait kuyruk tendon kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamsız olduğu görülmüştür (Tablo 14) (şekil 25).

TABLO 14- Kontrol grubu ve 8 günlük diyabetliler arasında kuyruk kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu (NEG) açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Kontrol Grubu 8 Günlük Diyabet	p
Kuyruk Kollageninin NEG'si	0,2115

12- 8 günlük diyabetli ve diyabet grubuna ait dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur. Diyabet grubuna ait dişeti kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri 8 günlük diyabetlilere oranla düşüktü (Tablo 15) (şekil 36).

TABLO 15- Diyabet grubu ve 8 günlük diyabetliler arasında dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu (NEG) açısından olan farkın anlamlılık derecesi

Diyabet Grubu 8 Günlük Diyabet	P
Dişeti Kollageninin NEG'si	0,0197

13- 8 günlük diyabetli ve kontrol grubuna ait dişeti kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna ait dişeti kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon değerleri 8 günlük diyabetlilere oranla oldukça düşük bulunmuştur (Tablo 16) (Şekil 36).

TABLO 16- Kontrol grubu ve 8 günlük diyabetlilere ait dişeti kollagenlerinin nonenzimatik glikozilasyon (NEG) değerleri arasındaki farkın anlamlılık derecesi

Kontrol Grubu 8 Günlük Diyabet	P
Dişeti Kollageninin NEG'si	0,0003

Diyabetik ve kontrol gruplarına ait tüm deney sonuçları Tablo 17, 18, 19, 20'de yer almaktadır.

Çalışmamızın istatistikî değerlendirilmesi M.Ü. Bilgisayar Eğitim Müdürlüğünde, Statview 512+ paket program kullanılarak Apple Macintosh aleti ile yapılmıştır. "t" testi uygulanmıştır (Bkz. Ek 1, s. 165).

TABLE 17 - KONTROL GRUP

Sığın No	Başlangıç			8 Gün Son.			Deney Sonunda				Hidroliiz Edilen Liyoflizat (mg) (A)	Seyreltilmiş Hacim (ml) (V)	1 ml Hidrolizatteki Hidroksil Prolin gr (B)	Liyoflizatta % mg Hidroksil Prolin (C)	Liyoflizatta % mg Kollajen (D)	nmolF 1 mg Liyoflizat (E)	nmolF 1 mg Kollajen (F)
	Ağırlık (gr)	Htc (%)	AKŞ % mg	Htc	AKŞ	Ağırlık	Htc	AKŞ	F1	HbA _{1c}							
25	182	46	83	47	82	202	44	88	2.40	7.70	3.3	25	14.92	11.30	84.30	2.46	2.82
26	189	45	81	46	95	195	43	91	2.20	7.04	3.5	25	15.71	11.22	83.70	2.37	2.83
27	175	52	135	51	140	204	48	145	3.55	11.40	4.0	25	18.44	12.15	90.64	2.29	2.53
28	180	50	130	48	138	200	45	138	3.30	10.60	4.0	25	18.52	12.20	91.01	2.17	2.38
29	207	44	142	50	139	214	42	140	3.20	10.24	3.5	25	15.50	11.10	82.81	2.36	2.87
30	200	44	140	48	135	220	45	143	3.00	9.60	4.3	25	18.36	11.26	84.00	2.35	2.80
31	203	46	103	45	96	208	46	98	2.74	8.80	5.1	50	11.00	10.78	80.42	2.44	3.03
32	188	44	99	43	95	200	45	100	2.87	8.54	5.5	50	12.14	11.04	82.35	2.43	2.95
33	177	46	136	48	141	184	43	140	2.32	7.42	6.5	50	12.04	9.26	68.08	1.88	2.43
34	170	45	133	47	140	192	46	138	2.10	6.72	5.8	50	11.37	8.80	73.11	1.73	2.37
35	182	43	110	47	123	214	45	118	2.93	9.40	5.2	50	12.22	11.75	87.66	2.09	2.38
36	182	44	98	47	125	211	45	110	2.80	9.28	6.0	50	13.58	11.32	84.44	1.84	2.18
37	180	43	130	44	132	189	48	125	3.60	11.51	3.3	25	15.82	12.06	89.87	2.36	2.82
38	184	43	125	44	130	202	47	138	3.63	11.62	4.0	25	18.41	12.13	80.52	2.44	2.70
39	170	44	123	44	117	182	46	125	3.90	12.50	5.7	50	12.81	11.24	83.85	2.45	2.82
40	175	45	120	45	115	186	47	123	3.71	11.87	5.5	50	12.21	11.10	84.61	2.38	2.87
41	237	46	135	43	120	246	46	140	3.35	10.72	3.8	25	17.82	11.79	87.95	2.76	3.14
42	220	45	130	41	115	241	43	135	3.40	10.88	3.0	25	13.82	11.60	86.50	2.77	3.20
43	157	42	89	47	102	171	45	96	2.74	8.77	7.8	100	8.33	10.68	78.67	2.83	3.55
44	155	42	90	47	108	179	46	100	2.80	8.96	9.1	100	9.81	10.78	80.42	2.90	3.61
45	222	46	133	50	126	235	47	130	2.44	7.81	3.4	25	18.19	13.38	99.81	4.52	4.53
46	220	46	130	48	123	230	47	129	2.50	8.00	3.5	25	18.35	13.11	97.80	4.55	4.65
47	170	49	122	46	128	200	44	130	3.85	12.32	2.9	25	15.50	13.36	99.66	4.36	4.37
48	175	48	120	46	125	197	45	130	3.60	11.52	3.5	25	18.34	13.10	97.73	4.15	4.25
											A	V	B	C=(A.B.C.10 ³)	7.46x4	E	F=E/(0.10 ³)

TABLE 18- DİYABETİK GRUPLU

Sıra No	Başlangıç			8 Ekin Sonu			Densiyonlarında					Hidroliiz Edilen Liyoifilizat (mg) (A)	Seyreltilmiş Hacim (ml) (V)	1 ml Hidroliiz zattaki Hidroksi Prolin gr (B)	Liyoifilizatın % mg Hidroksi Prolin (C)	Liyoifilizatın % mg Kollagen (O)	nmol/Liyoifilizat (E)	nmol/Liyoifilizat (F)
	Ağırlık (gr)	Htc (%)	AKS % mg	Htc	AKS	Ağırlık	Htc	AKS	Fi	HbA _{1c}								
1	175	48	81	42	567	127	-	-	-	-	6.8	100	7.88	8.85	66.02	2.78	4.21	
2	172	48	80	42	560	125	-	-	-	-	7.0	100	6.58	9.40	70.12	2.90	4.14	
3	180	42	81	41	566	117	-	-	-	-	7.6	100	8.54	11.24	83.85	2.48	2.98	
4	195	43	83	42	570	120	-	-	-	-	8.1	100	8.91	11.00	82.06	2.87	3.50	
5	170	44	106	45	571	155	41	588	4.5	16.40	3.2	25	15.10	11.80	88.03	4.15	4.73	
6	170	45	103	44	547	150	42	580	4.3	13.76	4.0	25	18.40	11.50	85.79	3.91	4.56	
7	180	46	118	44	520	115	-	-	-	-	5.3	50	12.31	11.61	86.61	4.55	5.25	
8	183	46	120	44	539	120	-	-	-	-	6.2	50	14.21	11.46	85.50	4.30	5.03	
9	170	44	103	41	566	157	43	588	5.4	17.28	4.4	25	15.0	8.81	85.72	4.87	7.58	
10	175	43	105	42	531	159	42	583	5.2	16.64	3.5	25	13.38	9.56	71.30	5.30	7.43	
11	152	49	128	45	441	145	47	488	3.6	11.52	2.7	25	11.51	10.66	78.52	5.15	6.48	
12	155	48	125	44	460	147	46	502	3.81	12.20	4.3	25	18.59	10.81	80.84	5.25	6.51	
13	195	44	133	48	500	142	39	512	4.0	12.80	2.6	25	11.11	10.68	78.67	4.26	5.35	
14	190	43	130	46	481	146	40	510	3.8	12.48	2.5	25	10.59	10.58	78.03	4.12	5.21	
15	176	45	102	-	-	-	-	-	-	-	2.6	25	13.84	13.40	100.00	2.46	2.46	
16	174	45	100	-	-	-	-	-	-	-	3.0	25	15.77	13.14	96.05	2.66	2.71	
17	222	44	165	43	543	162	45	560	5.2	16.70	2.9	25	14.50	12.50	93.25	6.30	6.76	
18	200	43	160	43	555	160	45	565	5.11	16.35	3.0	25	14.82	12.35	92.15	5.93	6.44	
19	176	44	96	-	-	-	-	-	-	-	2.6	25	11.15	10.72	79.97	1.94	2.43	
20	170	42	85	-	-	-	-	-	-	-	7.0	100	6.92	9.88	73.70	1.60	2.17	
21	217	45	129	-	-	-	-	-	-	-	3.0	25	14.62	12.18	80.86	2.22	2.44	
22	219	45	130	-	-	-	-	-	-	-	5.2	50	12.77	12.28	91.61	2.06	2.25	
23	205	43	148	-	-	-	-	-	-	-	2.5	25	11.92	11.92	88.92	3.11	3.50	
24	200	43	145	-	-	-	-	-	-	-	2.8	25	13.11	11.71	87.36	2.83	3.24	
											A	V	B	C=(V.B.O.1)/A0=7.46x C			E	F=(D.10 ²)

TABLO 19- Diyabet ve Kontrol Grubunun Dişeti Kollagenlerine Ait Sonuçlar

Sıçan No	Hidrolyz Edilen Liyofilizat (mg) A	Seyreltildiği Hacim (ml) V	1 ml Hidrolizattaki Hidroksi Prolin (gr) B	Liyofilizatta % mg Hidroksi Prolin C	Liyofilizatta % mg Kollagen D	nmolF / 1 mg liyofilizat E	nmolF / 1 mg Kollagen F
(25,27,29,31,33,35)	3.1	25	4.76	3.84	28.65	6.87	23.98
(26,28,30,32,34,36)	4.0	25	6.38	3.99	29.76	7.01	23.55
(37,39,41,43,45,47)	4.0	25	5.28	3.30	24.62	6.12	24.86
(38,40,42,44,46,48)	4.5	25	6.62	3.68	27.50	6.41	23.31
(5,13,9,17,11)	2.0	25	3.60	4.50	33.57	5.94	17.69
(6,14,10,18,12)	3.1	25	5.13	4.14	30.88	6.00	19.43
(7,3,1)	2.3	25	2.14	2.33	17.38	3.98	22.90
(8,4,2)	2.5	25	4.23	4.23	31.55	7.72	24.50
(15,19,21,23)	0.9	10	4.76	5.20	39.40	0.43	23.89
(16,20,22,24)	2.2	25	4.19	4.76	35.50	8.48	23.89

KONTROL

DIABET

TABLO 20- Diyabet ve Kontrol Gruplarının Kuyruk Kollagenlerine Ait Trombosit Agregasyonu ve Elektroforez Sonuçları

NO	AGREGASYON		ELEKTROFOREZ		
	LAG PERİYODU (cm)	MAXIMUM AMPLİTÜDÜ (cm)	α_2 %	α_1 %	β %
1	3.1	5.5	2.0	6.4	65.0
3	2.2	5.5	2.2	6.8	68.0
5	3.2	5.2	16.7	26.6	22.1
7	2.6	5.8	10.0	15.0	26.5
9	1.6	5.5	12.2	18.8	27.1
11	2.8	6.0	5.9	9.1	44.0
13	2.1	5.9	8.3	16.9	34.6
17	2.5	6.2	9.9	17.5	38.7
25	3.6	5.6	8.2	18.2	21.9
27	3.3	5.7	9.9	19.2	39.1
29	2.4	6.0	11.4	20.5	30.5
31	3.4	5.8	12.2	25.3	32.4
33	3.0	5.9	9.3	19.7	35.9
35	3.7	5.8	10.4	18.3	31.0
37	2.0	5.9	9.4	16.1	30.3
39	2.0	5.9	9.5	16.1	46.7
41	2.3	6.0	9.0	15.6	30.3
43	2.5	6.0	11.8	19.9	35.7
45	4.0	5.2	8.4	17.1	34.6
47	4.0	5.5	9.9	19.5	57.7

TARTIŞMA

Bulgularını sunduğumuz bu çalışmada amacımız diyabetik dokulardaki kollagenin yapısına bir açıklık getirmektir. Bu nedenle sıçanların dişeti bağ dokusu ve kuyruk tendon kollagenlerini izole ederek nonenzimatik glikozilasyonlarını inceledik. Çünkü, genel bilgiler bölümünde belirttiğimiz gibi; diyabette çeşitli proteinlerin nonenzimatik glikozilasyon değerlerinin artması, bu proteinlerin fonksiyonlarını da değiştirebilmektedir(18,29,30,87,105,107,112,121,124,182,191).

Kollagenin nonenzimatik glikozilasyon değerlerini bulmak amacıyla diyabetik ve kontrol grubu olarak rastgele seçtiğimiz sıçanların açlık kan şekeri, hematokrit değerleri ve ağırlıkları arasında fark yoktu (Şekil 23) (Tablo 4). 80 mg/kg dozda STZ verilmeden önce, başlangıçta % 115,25±24,64 mg olan kan şekeri değeri STZ verildikten 17 gün sonra 547,60±% 39,91 mg olmuştur. Hematokrit değerleri yaklaşık olarak aynı kalırken, ağırlıkları 184,62±18,9 gr'dan 152±7,15 gr'a düşmüştür. Bunlar bize STZ'nin kalıcı diyabet oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca STZ verilmesinden sekiz gün sonra da kalıcı diyabet olduğu Tablo 18'de görülmektedir. Kontrol grubunun fruktoz indeksi 3.03±0.55 µmol F/1 gr Hb (HbA_{1c} % 9.71±1.76) iken, diyabetlilerin fruktoz indeksi 4.50±0.67 µmol F/1 gr Hb (HbA_{1c} % 14.41±2.16)'ye yükselmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu değer bize kandaki hemoglobinin nonenzimatik reaksiyonla glikozillendiğini gösterir. Bilindiği gibi günümüzde glikozillenmiş hemoglobin tayinleri

glisemi kontrolünde kullanılmaktadır. Bu değerler 6-8 haftalık ortalama kan glikozu değerini yansıtır. Eritrositlerin yaşam süresinin 120 gün olduğu göz önüne alındığında, çalışmamızda 17 günlük diyabetli hayvanlarda hemoglobinin nonenzimatik glikozilasyonundaki artışın saptanması, kalıcı diyabet oluşmasının başka türlü ifadesidir. Yapılan diğer bir çalışmada 17 günlük değil de daha uzun süreli hiperglisemi oluşturulan olgularda glikozillenmiş hemoglobin değerlerine bakılmış ve yüksek bulunmuştur(191). Kısa süreli diyabetteki bu değerlerin kontrol grubu değerlerinden farklı oluşu hemoglobin glikozilasyonunun, diyabetin başlangıcından itibaren oldukça duyarlı olduğunu düşündürür.

Çalışmamızda hemoglobinin nonenzimatik glikozilasyonuna paralel olarak kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun da arttığı gözlenmiştir (Şekil 26). Bu bulgu, diyabetle bir taraftan kan glikozu ile direkt temasta olan kan proteinlerinin olduğu kadar doku proteinlerinin de nonenzimatik reaksiyonla glikozillendiğini göstermektedir. Kontrol grubunun kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değeri 3.08 ± 0.71 nmol Fruktoz/1 mg Kollagen iken, 17 günlük diyabet sonunda 5.38 ± 1.37 nmol Fruktoz/1 mg Kollagen'e yükselmiştir. İstatistiksel olarak bu değerler çok anlamlı bulunmuştur ($p=0.0001$). Bu da kısa süreli kalıcı ve kontrolsüz diyabetin, doku proteinlerinde de önemli değişikliklere sebep olabileceğini kanıtlar.

Le pape ve arkadaşları 1981'de yaptıkları çalışmada erkek sıçanları (Sprague-Bawley) 65 mg/kg'lık STZ vererek diyabet yaptıktan 6 ay sonra öldürerek kuyruk tendon kollagenlerini izole etmişlerdir. TBA metodunu kullanarak nonenzimatik glikozilasyonunu incelediklerinde, normal sıçanların kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerini 1.1 ± 0.2 nmol HMF/1 mg Kollagen ve diyabetik sıçanlar için 2.6 ± 0.3 nmol HMF/1 mg Kollagen olarak bulmuşlardır. Normal kuyruk tendon kollagenini de glikozla inkübe ederek in vitro

nonenzimatik glikozilasyonunu incelediklerinde ise; 2 günlük inkübasyondan sonra 2.75, 8 günlük inkübasyondan sonra 9.45 nmol HMF/1 mg Kollagen değerlerini elde etmişlerdir(107).

1983'de Le pape ve arkadaşları aynı şekilde diyabet oluşturulan erkek sıçanları bu kez 4 ay sonra öldürerek kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunu TBA metodu ile incelemişlerdir. Normal sıçanların nonenzimatik glikozilasyonunu 2.3 nmol HMF/1 mg kollagen, diyabetiklerin, 7.6 nmol HMF ve glikozla inkübe ederek in vitro glikozilasyonunu 9.0 nmol HMF olarak bulmuşlardır(105).

1985'de Lyons ve Kennedy diyabetik olmayan kişilerin derisinden çözünmeyen kollageni izole ederek TBA metodu ile nonenzimatik glikozilasyonunu incelemişler, nonenzimatik glikozilasyon değerini 13.1 ± 1.0 nmol Fruktoz/10 mg Kollagen bulmuşlardır. Glikozla inkübe ederek in vitro glikozillediklerinde ise bu değer $45,2 \pm 5.5$ nmol Fruktoz/10 mg Kollagen'e yükseldiğini izlemişlerdir(113).

Lyons ve Kennedy aynı sene yaptıkları diğer bir çalışmada ise diyabetsiz ve diyabetli kişilerin önkol biyopsisinden elde edilen kollagenin nonenzimatik glikozilasyonunu TBA metodu ile inceleyerek normal kişiler için 15.3 ± 1.3 nmol Fruktoz/10 mg protein, diyabetli kişiler için ise 16.5 ± 1.3 nmol/10 mg protein olarak bulmuşlardır(114).

1986'da Masu ve arkadaşları normal ve diyabetik sıçanlardan elde ettikleri submandibular glanddaki çözünmeyen kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunu TBA metodu ile ölçmüşler, normal sıçanlar için 0.9 ± 0.07 nmol HMF/mg Kollagen ve diyabetli sıçanlar için 1.28 ± 0.19 nmol HMF/mg Kollagen olarak bulmuşlardır(118).

Bu bulgulardan da anlaşılacağı gibi çeşitli dokulardan elde edilen kollagen farklı şekilde oluşturulan diyabet mo-

dellerinde normale oranla daha fazla miktarda nonenzimatik olarak glikozillenmektedir. Bulgularımız da bunları teyid etmektedir.

Kollagenin nonenzimatik glikozilasyonunda kullanılan Tiyobarbitürik asit metodunda, protein zayıf bir asit olan oksalik asitle hidroliz edilerek, kararlı ketoamin bileşiği (1-amino-2-keto fruktoz), hidroksimetil furfural aldehyde dönüştürülür. Bu da 2-tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak renkli bir bileşik elde edilir. Oluşan rengin absorban-sı standart çözeltinin verdiği rengin absorban-sı ile karşılaştırılır(55,84,146). Standart olarak 5-hidroksimetilfurfural veya Fruktoz kullanılabilir(71,139,146). Biz çalışmamızda standart olarak Fruktoz'u kullandık.

Nonenzimatik glikozilasyon değerini 1 mg kollagen başına nmol fruktoz cinsinden ifade edebilmek için hazırladığımız liyofilizatları hidroliz ederek, nötralleştirdik. Nötralleştirilmiş hidrolizatlarda hidroksiprolin tayini yaptık. Hidroksiprolin tayini için Neuman ve Logan geliştirdikleri kolo-rimetrik metod ile Organon firmasının idrarda hidroksiprolin tayini için hazırlanmış olan hypronosticon kitini kullandık. Neuman ve Logan(133)'ın metodunda hidroksiprolin, hidrojenperoksitle, hypronosticon kitinde ise kloramin-T ile pirrol türevlerine yükseltgenir. Daha sonra her iki metodda da Erlich ayıracı (P,dimetilaminobenzaldehit) ile renklendirilir. Hypronosticon metodunun baş tarafı yapılmadı çünkü idrardaki hidroksiprolin reçineyle adsorbe edilerek ve daha sonra da hidroliz edilerek reçineden geri kazanılıyordu. Halbuki kullandığımız hidrolizatta hidroksiprolinin ortamdan uzaklaştırılması gerekmiyordu. Hypronoticon kiti Weossner metodunun(184) idrar için modifiye edilmiş şekliydi. İki metodda da benzer sonuçlar elde ettik. Fakat Neuman ve Logan metoduna göre bulduğumuz sonuçlar biraz daha düşüktür. Bu metodda reaksiyon şartlarının çok iyi ayarlanması gerekiyordu. Biz hypronosticon kiti ile elde ettiğimiz sonuçları dikkate al-

dık ve hesaplamalarımıza göre yaptık. Kollajendeki hidroksi-prolin miktarını % 13.4 kabul ederek(132) liyofilizattaki kollagen miktarını hesapladık. Bütün sonuçlar Tablo 17, 18'de toplu halde gösterilmiştir.

Çalışmamızda literatürde ilk olarak diyabetik dişeti bağ dokusu kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunu inceledik. Bulgularımıza göre 17 günlük diyabetlilerde dişeti bağ dokusu kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. kontrol grubunun dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu 23.92 ± 0.60 nmol Fruktoz/1 mg kollagen, diyabetlilerde 20.48 ± 2.71 nmol Fruktoz/1 mg kollagen'dir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır (p 0.001). Buna karşın sekiz günlük diyabette kontrole göre, dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kontrol grubunun nonenzimatik glikozilasyon değerleri 23.92 ± 0.60 iken, sekiz günlük diyabette 24.19 ± 0.32 'dir. Bu değerler de istatistiksel olarak anlamlıdır (p 0.003). Bu bulgulardan, diyabetin başlangıcında nonenzimatik glikozilasyonun arttığı, fakat kısa süre içinde, diyabet süresi arttıkça nonenzimatik glikozilasyonun azaldığı anlaşılmaktadır. Oysaki kuyruk kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu göz önüne alındığında 8 günlük diyabetik kuyruk kollagenlerinde, kontrol grubu kuyruk kollagenlerine oranla bir artış saptanmamıştır (Şekil 25).

Ramamurthy ve arkadaşları diyabette dişeti kollajenaz aktivitesinin normale göre arttığını göstermişlerdir(66,143,144). Ayrıca diyabette yeni sentezlenen kollagenin çabuk bozunduğu(159) Schneir ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Yine literatürden bilindiği gibi dişeti kollageninin turnoverı diğer dokulara oranla hızlıdır(66,99,162). Bulgularımızda saptadığımız bu azalmanın sebebi; diyabette kollajenaz aktivitesinin artmasına, dolayısıyla periodontal yıkımın da artarak nonenzimatik glikozilasyon değerlerinde yanıtıcı bir düşüşün görülmesine neden olabilir. Diyabette yeni sentezlenen kollagenin yıkımın artmasına ve çözünür olmayan kollagen fraksiyonunda da zamanla bir azalmaya sebep olduğu düşü-

nülebilir. Daha uzun süreli diyabet oluşturularak bu deney yapıldığında, nonenzimatik glikozilasyon değerlerindeki değişimin hangi yönde gelişeceği incelenebilir. Kontrolsuz diyabette kollagenaz aktivitesinin nasıl değişim gösterdiği henüz tam olarak açıklanmamış bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Dişeti ve kuyruk kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunu karşılaştırdığımızda, gerek diyabet ve gerekse kontrol grubunda dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonunun, kuyruk kollagenine nispetle çok daha fazla olduğu görülmüştür. Diyabet grubunda; dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu 20.48 ± 2.71 iken kuyruk kollageninki 5.38 ± 1.37 olup, kontrol grubunda; dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu 23.92 ± 0.60 iken kuyruk kollageninki ise 3.08 ± 0.71 'dir. Bu da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$). Bu farkın sebebi, dişeti kollageninin ağız ortamı gibi sürekli karbonhidratlı besinlerle temas halinde olmasından ileri geldiği düşünülebilir.

Gerek kontrol grubundan gerekse diyabetli olgulardan saflaştırdığımız kuyruk kollagenini elektroforetik olarak incelediğimizde, tip I kollagene ait $\alpha_2\alpha_1$ ve β bantlarını elde ettik. Diyabetik ve kontrol grubu dişeti kollageninde, kuyruk kollageninden farklı olarak daha düşük molekül ağırlığına tekabül eden iki band mevcuttu (Şekil 32). Bu düşük molekül ağırlıklı iki band, kollagenaz enziminin etkisi ile α_1 ve α_2 zincirlerinden koparılmış kısımları düşündürebilir. Çünkü gine domuzu ile yapılan çalışmada, deri kollageni izole edilerek SDS gel elektroforezi uygulanmış, daha sonra bu kollagene insan romatid sinoviyal kollagenazı etki ettirilerek SDS gel elektroforezi incelendiğinde, kollagenazın etki ettirilmediği kollagenen farklı olarak, daha düşük molekül ağırlığına tekabül eden iki band olduğu görülmüştür(134). Diyabet ve kontrol grubu dişeti kollagenlerinde bulduğumuz bu iki bant, dişetinde kollagenazın etkisini gösterebilir.

Diyabetik ve kontrol grubu arasında, tip I kollagenine ait α_2 , α_1 ve β bantlarının pozisyonları ve yoğunluğu açısından bir fark tespit edemedik. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda diyabetlilerde β bantının arttığı gözlenmiştir(65, 105,118,193). Bu da, diyabette artan nonenzimatik glikozilasyondan dolayı kollagendeki çapraz bağlanmaların artmasına atfedilmektedir. Biz sekiz günlük diyabetliler ile onyedü günlük diyabetlileri elektroforetik yönden incelediğimizde de, bu bantlar arasında farklılık görmedik. Literatürdeki çalışmalarda yapılan elektroforetik incelemeler deneysel diyabetin farklı zamanlarındadır. Biz, STZ ile 21 günlük diyabet yapılanı(65) kendimize en yakın kontrol olarak, kabul edip mukayese yaptık. Bu farklılık sıçanların türüne, yaşına bağlı olabilir. Bu farkın verilen STZ dozuna bağlanmasını düşünmeyiz. Çünkü, karşılaştırdığımız çalışmada kullanılan STZ dozu bizimkinden daha düşüktü.

Diyabetik dişetinde, kollagenin nonenzimatik glikozilasyonunun kontrola oranla azalması, dişetindeki kollagen molekülünün çapraz bağlanmalarının bozulduğunu düşündürür. Literatür bilgilerine göre nonenzimatik glikozilasyon kollagenin çapraz bağlanmasını arttırmaktadır(74,87,146,182,193). Bulgularımıza göre dişetindeki glikozilasyonun azalması çapraz bağlanmalarda da bir azalma olduğunu düşündürür. Bilindiği gibi lizil oksidaz enzimi çapraz bağların oluşumunu sağlamaktadır. Bulgularımıza göre nonenzimatik glikozilasyonun dişetinde azalması çapraz bağlanmaların azaldığını, paralel olarak lizil oksidaz enziminin aktivitesinde veya miktarında bir azalma olduğunu düşündürebilir. Literatürde ise STZ ile diyabet yapılmış sıçanların akciğerlerinde bu enzimin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir(115). Le pape ve arkadaşları da diyabetik sıçan kuyruk kollageninde lizil oksidaza bağlı çapraz bağların artmadığını ileri sürmüşlerdir(107). Lizil oksidaz bir protein olduğuna göre bu proteinin sentezi insüline bağımlı olabilir. İnsülin eksikliğine paralel olarak lizil oksidazın miktarı azalabilir ve çapraz bağlanmadaki rolü-

ne etkisi olabilir. Fakat bu durumda kollagenaz aktivitesinin artması bir çelişki olarak karşımıza çıkar. Çünkü kollagenaz aktivitesinin diyabette arttığı gösterilmiştir. Bu takdirde insülinin bu iki protein sentezine etkisinin farklı yönde olduğu düşünülebilir. Literatürde bu konuda çeşitli görüşler vardır. Örneğin; diyabette ağız kuruluğu bilinen bir olaydır. Sebebi ise insülin azlığından dolayı tükürük bezlerinde bazı enzimatik proteinlerin sentezinin inhibe edildiğidir(6,7,108, 186).

Ayrıca insülinin kollagen yapımında etkili olduğu da ileri sürülmektedir. Canalis ve arkadaşları kemikte kollagen sentezinin insülin tarafından stimüle edildiğini ve kollagen sentezi için ortamda insülin bulunmasının gerektiğini in vitro olarak göstermişlerdir(39). Kontrolsuz diyabette, insülin yetersizliğinden dolayı, turnover'ı hızlı genç dokularda kollagen sentezinin azalması, buna karşın yıkımın artması dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerlerindeki azalmayı açıklayabilir.

Bilindiğine göre dişetinde kollagen tip I'den başka tip III ve tip IV'de vardır. Kollagen tip I miktarı tip III ve tip IV'e oranla daha fazladır(43,44). Yine bilindiği gibi tip IV'ün hidrosilizin miktarı tip I ve tip III'den çok daha fazladır(86,134,181). Tip I ve tip III'ün hidrosilizin miktarları ise birbirine yakındır. Dişeti kollageninin hidrosilizin miktarının fazla olması nonenzimatik glikozilasyonla bloke edilmiş hidrosilizin kalıntılarının daha fazla olabileceğini ve dolayısıyla nonenzimatik glikozilasyon değerinin de diğer dokulara oranla örneğin kuyruk kollagenine oranla daha fazla olacağını düşündürür. Biz de bu çalışmamızda gerek diyabet ve gerekse kontrol grubunda, dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyon değerlerinin kuyruk kollagenine nispetle çok daha yüksek olduğunu gördük. Literatürde, bulgularımıza ve yukarıdaki düşünüş tarzına uyan çalışmalar mevcuttur. Çoğunlukla kollagen tip I ve tip III'den oluşmuş aorta-

nın nonenzimatik glikozilasyonu kontrol grubu için 14.37 2.46 nmol HMF/1 mg Kollagen, diyabet grubu için 25.16 4.17 nmol HMF/1 mg Kollagen olarak bulunurken(152), kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu ise kontrol grubu için 1.1 ± 0.2 nmol HMF/1 mg kollagen ve diyabet grubu için 2.6 ± 0.3 nmol HMF/1 mg kollagen olarak aortadan çok daha düşük olan değerler bulunmuştur(107). Elektroforez çalışmalarımızda dişetinde kollagen tip I'e ait bantlar elde ettik. Yalnız bazı dansitogramlarda kollagen tip III'e rastlanmıştır. Bunun sebebi, kollagen tip III'ün tip I'e göre daha güç çözünür ve miktarca az olması olabilir. Kuyruk kollageninde ise böyle bantlar gözlenmemiştir. Tip IV'e ait bandı göremedik. Literatürde, dişetindeki kollagen tip IV'ün varlığı elektron mikroskopu ile incelemelerde farkedilmiştir(43).

Diyabetin, ağızda ağız kuruluşundan başka diğer belirtileri; periodontitis, kronik gingivitis, diş sallanmaları, kolay kanayan dişeti, kalın ve büyük dil vs sayılabilir(155).

Diyabetik hastaların enfeksiyonlara karşı meyilli oldukları ve böyle hastalarda sık sık çıbanların meydana geldiği ve iyileşmenin sağlıklı kişilere nazaran çok yavaş olduğu iyice anlaşılmıştır. Diyabetli hastalarda özellikle dişetlerini ilgilendiren periyodontal abselerin çok sık teşekkül ettiği ve periyodonsiyumda harabiyetin çabuk geliştiği görülür. Bazı araştırmacılara göre Diyabetes-Mellitus; dişetlerine, periyodontal aralığa veya semente değil de çene kemikleri dahil bütün kemiklerde osteoporetik değişiklikler meydana getirmektedir(155).

Bu bilgilere göre, diyabetli hastalarda enfeksiyonlardan sonra görülen yavaş iyileşme, insülin eksikliği dolayısıyla kollagen dahil çeşitli proteinlerin azlığına bağlı olduğu gibi, glikozillenme dolayısıyla farklı yapıda kollagenin meydana gelişine de bağlı olabilir. Burada, insülinin protein metabolizmasına etkisi dolayısıyla daha az kollagen

oluşabilir, diğer taraftan karbonhidrat metabolizmasına etkisi dolayısıyla farklı yapıda kollagen oluşabilir. Kanamanın nedeni ise kollagen molekülünün, hem nonenzimatik glikozilasyondan dolayı bozulması, hem de yine nonenzimatik glikozilasyon nedeni ile bozuk bir bağ dokusu teşekül etmesi olabilir. Bağ dokusunun bozuk olması ile anlatmak istediğimiz, bağ dokusu kollageninin çapraz bağlarının azalması, dolayısıyla gevşemesidir. Bu da sızıntı şeklinde kanamaların sebebi olabilir.

Diyabette, trombositler sayıları yönünden normal olduğuna göre, uzun süreli kontrolsüz diyabette bağ dokusu bozulacağından, trombositlerde bağ dokusundaki görevini tam yapamazlar. Bunlar hem periyodontal hastalıkların hem de kanamanın sebebi olarak düşünülebilir.

Literatüre göre diyabet, erken yaşlanmaya sebep olur. Diyabetli kollagende görülen değişimler, yaşlılıkta kollagende görülen değişimlere de benzetilmektedir(65,74,107,192). Diyabette bazal membranda kollagen sentezi artar. Bazal membranların yapısını kollagen tip IV ve tip V meydana getirdiğine göre bunlarında sentezinin arttığı bildirilmektedir(77, 168). Kollagen metabolizmasının bozukluğuna bağlı olarak hemostatik sistemde de bozukluklar görülür. Genel bilgiler bölümünde söz edildiği gibi trombositlerin hipo ve hiperagregasyon durumlarında diğer agreganlara göre, kollagenle yapılan agregasyon testinin daha gerçeğe yakın değerleri yansıtaacağı düşünülür(22) ve kliniklerde test materyali olarak kullanılır.

Trombosit kollagen ilişkisi henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu konu ile ilgili çeşitli çalışmalar trombosit membranındaki reseptörlerin önemi üzerinde durdukları gibi(52), FVIII/vWF molekülünün de subendotel-kollagen-trombosit köprüsü olarak rol oynayabileceği ve dolayısıyla primer hemostazı başlatabileceği ileri sürülmektedir(90).

Bizim diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarının kuyruk ve dişetlerinden elde ettiğimiz kollajenle normal insan trombositlerinin verdiği agregasyon eğrilerini değerlendirmekten amacımız, diyabetle nonenzimatik glikozilasyonu artmış kollajenin trombosit agregasyonunda nasıl davranacağını izlemektir. Diyabetik kuyruk kollajeni ile yapılan trombosit agregasyonunda normalden farklı olarak sadece lag periyodda çok anlamlı olmayan bir kısalma saptanmıştır. Maksimum amplitüde ise kontrole göre hiçbir fark gözlenmemiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmada, yine STZ ile diyabet oluşturulmuş fakat diyabet süresi bizimkinden daha uzun tutulmuştur(105). Bu çalışmada diyabetlilerde lag periyodda anlamlı bir kısalma görüldüğü gibi maksimum amplitüd de anlamlı olarak artmıştır. Şu halde kontrolsüz diyabet süresi uzadıkça kollajen molekülünün trombositlere davranışı farklı olmaktadır. Bizim çalıştığımız kollajen tipi, tip I'dir. Bilgilerimize göre; kollajen tip III'ün tip I'den, kollajen tip III ve tip I'in ise, tip II'den daha fazla agregasyon yaptırıcı etkisi vardır. Ayrıca tip I kollajende karboksi terminalin sekresyon ve agregasyon için en aktif bölge olduğu, amino terminal ucunun, karboksi ucundan daha az aktif olduğu gösterilmiştir(60). Yukarıda sözünü ettiğimiz trombosit agregasyonları da kuyruktan elde edilen tip I kollajenle yapılmıştır. Ayrıca plasentadan elde edilen kollajenle trombosit agregasyonu yapılmış ve kuyruk kollajenine benzer sonuçlar elde edilmiştir(106).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda trombosit agregasyonu, dişetinden elde edilen kollajenle yapılmamıştır. Bizim, literatürde ilk defa gösterdiğimiz, dişeti kollajeninin trombosit agregasyonu, kuyruk kollajeni agregasyonu arasında bir fark yoktur. Kollajen agregasyonunda lag periyod denilen kısım, kollajen fibrillerinin oluşması için gereken zamandır. Gerek diyabetli kollajenin gerekse kontrol grubu kollajeninin lag periyodu, denatüre etmeden ısıtma (37°C'de) ve bekletme gibi çeşitli işlemlerle kısaltılabilir. Bizim 17 günlük deneysel diyabette ve diğer araştırmacıların daha uzun süreli

diyabette gösterdikleri lag periyoddaki kısıalma, kontrolle aynı şartlarda yapıldığından, aradaki fark diyabette değerlendirilecek niteliktedir. Çünkü bu gözlem diyabetteki kollagen molekülünde bir değişim olduğunu gösterebilir. Kollagenle yapılan in vitro agregasyon deneyleri, in vivo olarak da hemostatik sistemde son derece önemli olan yabancı yüzeyle ilişkiyi yansıtır. Çünkü hemostatik sistemin başlaması kollagen fibrillerine veya daha üst yüzeydeki subendotel dokuya temasla olur.

Kollagenle yapılan agregasyonda veya in vivo durumda, kollagen aktivitesinin bu fibrillerin yapısal parametrelerine nasıl bağlı olduğu bilinmemektedir(94).

Muggli, trombosit agregasyonu için kollagenin doğal düzenlenmesinin gerekli olmadığını belirtirken(128), Kronick ve Jimenez, trombositlerin maksimum adezyonu ve agregasyonu için sedimentasyon kat sayısı 10^5 S olan optimum polimerizasyon durumunun gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir(94).

Bulgularımıza göre diyabetlilerde lag periyodun azalması kollagen fibrillerinin daha çabuk oluştuğunu düşündürür. Nitekim uzun süreli diyabet oluşturulan benzer çalışmada, fibrillerin çabuk oluşmasına bağlı olarak kollagenle elde edilen trombosit agregasyon eğrisinde maksimum amplitüd de yükselmiştir. Bu durum kollagenin diyabette trombosit agregasyonu yönünden normale göre daha aktif bir davranış gösterdiği izlenimini düşündürür. Burada, trombositler normal, fakat kollagenin trombosit agregasyonu oluşturma potansiyeli artmıştır. Literatürde bu olayın nedeni nonenzimatik glikolizasyonun artmasına bağlanmaktadır. Olay in vivo düşünüldüğünde, bu durum hemostatik sistemde trombus oluşumuna neden olabilecek bir gözlemdir. Diğer taraftan daha önce de sözünü ettiğimiz gibi diyabetli kişilerde kanamaya meyil vardır. Fakat trombusa meyil, dışetinde görülen kanamayla çelişki yaratmaktadır. Kuyruk kollageninden elde ettiğimiz bulgulara ve literatür

bulgularına göre dişeti, trombosit agregasyonu açısından kanamaya meyilli olmamalıdır. Ancak dişetin nonenzimatik glikozilasyonunda kuyrukla ters orantılı gelişen bir durum, yani nonenzimatik glikozilasyonun azalması bu çelişkiye açıklık getirmektedir.

Literatürden bilindiği gibi ve genel bilgiler bölümünde geniş olarak yazıldığı gibi diyabetlilerde çeşitli yönlerde ateroskleroza meyil vardır(1,3,156,169,174). Kollagen, insan fibroz aterosklerotik plağının % 30'unu oluşturur. Kollagenin arter intimasında birikmesi, kroner ve serebral arter hastalıkların irreversible karakterli olmasına neden olur. Diyabetik kişilerin fibroz ateroskleroz plakları incelenmiş kollagen tip I ve tip III'ü ihtiva ettikleri ve bunların miktarlarının normal arterlerdekinden farklı olduğu da gösterilmiştir(120). Kollagenle agregasyonun normale göre diyabetlilerde aktif olması in vitro şartlarda trombositlerin hiperaktivitesine neden olur. Ancak in vivo şartlarda durumun ne olacağı henüz açık bir konudur. Biz bu çalışmada dişetinden elde edilen kollagenin trombositlerle yapmış olduğu agregasyonu kuyruk kollageni kadar detaylı incelemedik. Sadece buradan elde edilen kollagenin de normal agregasyon verip veremeyeceğine, ilave olarak bakmak istedik.

Kanaatimizce; dişeti kollageni ile ilgili olarak literatürde ilk kez gösterdiğimiz bulgularımızdan yararlanılarak, yapılacak yeni araştırmalar, henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olan diyabet komplikasyonlarının nedenine bir çözüm getirebilir.

Ö Z E T

Bu çalışmada toplam 48 sıçandan 24 tanesine 80 mg/kg'lık STZ verilerek diyabet oluşturuldu. Diğer 24 tanesi ise kontrol grubu olarak muhafaza edildi. STZ enjeksiyondan 8 gün ve 17 gün sonra sıçanların kanları, kuyruk ve dişeti dokuları alındı. 8 gün sonrakilerden kan alınamadı. Dişeti bağ dokusu kollageni ve kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu, glikozillenmiş hemoglobin ve kan parametreleri kontrol grubu ile mukayeseli olarak değerlendirildi.

STZ verilmesinden önce kan şekeri % 115.25±26.64 mg, hematokrit % 44.70±2.05, ağırlıkları 184.62±18.9 gr iken 17 gün sonra sırası ile % 547.60±39.91 mg, % 43±2.66 ve 152.3±7.15 gr olarak bulundu (Şekil 23,24).

Kontrol grubunun fruktoz indeksi 3.03±0.55 µmol F/1 gr Hb (HbA_{1c} % 9.71±1.76) iken diyabet grubununki 4.50±0.67 µmol F/1 gr Hb (HbA_{1c} % 14.41±2.16)'ya yükselmiştir (Şekil 24).

Kontrol grubuna ait kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu 3.08±0.71 nmol F/1 mg Kollagen iken diyabetlilerde 5.38±1.37 nmol F/1 mg Kollagen'e yükselmiştir. 8 günlük diyabetlilerde ise 2.65±0.47 nmol F/1 mg Kollagen'dir (Şekil 25).

Kuyruk tendon kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu ile hemoglobinin nonenzimatik glikozilasyonunun korrelasyonlu

olup olmadığına bakılmış ve aralarında zayıf bir korrelasyon bulunmuştur ($r=0.735$).

Kontrol grubuna ait dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu 23.92 ± 0.60 nmol F/1 mg Kollagen iken diyabetlilerde bu değer 20.48 ± 2.71 nmol F/1 mg Kollagen'e düşmüştür. 8 günlük diyabetlilerde ise 24.19 ± 0.32 nmol F/1 mg Kollagen'dir (Şekil 36).

Kontrol ve diyabet gruplarından elde edilen kollagen ile trombosit agregasyonu oluşturuldu. Kuyruk tendon kollageni ile elde edilen agregasyon eğrilerinin lag periyodu ve maksimum amplitüdü ölçüldü. Kontrol grubunun lag periyodu 2.92 ± 0.53 cm ve maksimum amplitüdü 5.77 ± 0.24 cm iken diyabetlilerde sırası ile 2.51 ± 0.53 cm ve 5.7 ± 0.33 cm olarak bulunmuştur (Şekil 27).

Kuyruk ve dişeti kollageninin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde tip I kollagene ait α_2 , α_1 ve β bantları elde edilmiş, dişetinde kuyruktan farklı olarak daha düşük molekül ağırlıklığına tekabül iki bant daha görülmüştür (Şekil 31,32). α_1 ve α_2 zincirlerinin molekül ağırlıkları sırası ile yaklaşık 102.000 ve 97.380 civarında hesaplanmıştır. Diyabetik ve kontrol grubu arasında α_2 , α_1 β bantlarının yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca glikoprotein boyası ile boyanan jellerde her iki grup arasında fark izlenmemiştir.

Sonuç olarak 17 gün gibi kısa sürede oluşturulan kontrolsüz diyabet de farklı dokuları farklı şekilde etkileyerek kollagen yapısında değişikliklere sebep olmaktadır. Hemoglobin ve kuyruk kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu artarken, dişeti kollageninin nonenzimatik glikozilasyonu azalmıştır.

S U M M A R Y

In this study, twenty-four female wistar Albino rats were made diabetic by one intraperitoneal injection of 80 mg/kg STZ. The other twenty-four rats were used as a non-diabetic control group. Eight and seventeen days after STZ injection, samples of cardiac blood were taken, gingival samples and tails were excised. Blood samples could not be taken from those rats which were killed eight days after STZ injection. Collagen was extracted from rat tail tendons and connective tissue of the gingiva. Nonenzymatic glycosylation of collagen and glycosylated hemoglobin were measured using the TBA method. The nonenzymatic glycosylated collagen, glycosylated hemoglobin and the blood parameters were compared with the results obtained from the control group.

Prior to induction of diabetes, the blood glucose, the hematocrite and the weight of the rats were $115.25 \pm 24.64\%$ mg, $44.70 \pm 2.05\%$ and 184.62 ± 18.9 gr respectively. At the end of seventeen days, they were found as $547.6 \pm 39.91\%$ mg, $43 \pm 2.66\%$ and 152.3 ± 7.15 gr (Figure 23,24).

While the fructose index in the control group was 3.03 ± 0.55 μmol Fructose/1 gr Hemoglobin (HbA_{1c} , $9.71 \pm 1.76\%$), it was observed to increase to a level of 4.50 ± 0.67 μmol Fructose/1 gr Hemoglobin (HbA_{1c} , $14.41 \pm 2.16\%$) in the diabetics (Figure 24).

The nonenzymatic glycosylation of rat tail tendon collagen was 3.08 ± 0.71 nmol Fructose/1 mg Collagen in the control group and 5.38 ± 1.38 nmol Fructose/1 mg Collagen in the diabetics. In eight days diabetics it was found to be 2.65 ± 0.47 nmol Fructose/1 mg Collagen (Figure 25).

The nonenzymatic glycosylation of collagen was weakly correlated with glycosylated hemoglobin (r 0.735).

While the nonenzymatic glycosylation of collagen from rat gingiva was 23.92 ± 0.60 nmol Fructose/1 mg Collagen, it was observed to drop to a level 20.48 ± 2.71 nmol Fructose/1 mg Collagen. In eight days diabetics it was found to be 24.19 ± 0.32 nmol Fructose/ 1 mg Collagen (Figure 36).

The platelet aggregation was induced by collagen obtained from control and diabetic rats. The lag periods and the maximum amplitudes of the aggregation curve obtained with tail tendon collagen were measured. The lag period in the control group was 2.92 ± 0.53 cm and the maximum amplitude was 5.77 ± 0.24 cm. These were 2.51 ± 0.53 cm and 5.7 ± 0.33 cm respectively for the diabetics (Figure 27).

In the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of rat tail tendon and gingiva collagen, α_2 , α_1 and β bands belonged to type I collagen. It can be seen in Fig. 31,32. The position of α_2 , α_1 and, β bands were identical in control and diabetic animals. We found two more bands with low molecular weight for gingiva collagen compared with tendon collagen (Figure 31,32). Molecular weights of α_2 and α_1 chains were calculated to be about 97.380 and 102.000 respectively. Control and diabetic gels stained with glycoprotein stain showed no differences also. No significant differences were found between the density of α_1 , α_2 , β bands of the control group and the diabetics.

As a conclusion, we can say that uncontrolled diabetes induced for such short periods as seventeen days, while affecting different tissues differently, can cause changes in collagen structure. We found an increase of nonenzymatic glycosylation of hemoglobin and tendon collagen, while the nonenzymatic glycosylation of gingival collagen was observed to decrease.

K A Y N A K L A R

- 1- Akman,N.: Diyabetes Mellitus'da Koagülasyon, Diyabet Yıllığı, 1:20-35, (1983).
- 2- Aktaş,T.: STZ'nin Sıçanlarda Endokrin Pankreas Hücreleri Üzerindeki Akut Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopu Düzeyinde İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul, (1985).
- 3- Aktuğlu,G.: Diyabetes Mellitusda Antitrombinler ve Fibrinolitik Sistem, Diyabet Yıllığı, 1:36-44, (1983).
- 4- Alexander,D.P., Britton,H.G., Cohen,N.M., Mashiter,K., Nixon,D.A., Smith,F.G.: Streptozotocin Induced Diabetes in The Newborn Lamb. Biol. Neonate, 17:381-393, (1971).
- 5- Allen,D.W., Schroeder,W.A. and Balog,J.: Observations on The Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin, J. Am. Chem. Soc., 80:1628-1634, (1958).
- 6- Anderson,L.C. ve Johnson,D.A.: Effect of Alloxan Diabetes on Rat Paratoid Glands and Saliva, Comp. Biochem. Phy. 708, 725, (1981).
- 7- Anderson,L.C. ve Shapiro,B.L.: The Effect of Alloxan Diabetes and Insulin on Protein Synthesis in The Rat Submandibular Gland, Horm. Metab. Res. 12, 47-51, (1980).

- 8- Andreassen, T.T., Hansen, K.S. and Oxlund, H.: Biomechanical Changes in Connective Tissues Induced by Experimental Diabetes, *Acta Endocrinologia*, 98:432-436, (1981).
- 9- Andreassen, T.T. and Oxlund, H.: Thermal Stability of Collagen in Relation to Non-enzymatic Glycosylation and Browning In vitro, *Diabetologia*, 28:687-691, (1985).
- 10- Andrews, A.T.: Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, Clarendon Press, Oxford, 31-33, 89, (1981).
- 11- Arison, R.N., Ciaccia, E.I., Glitzer, M.S., Cassaro, J.A., Prus, M.P., Rahway, B.S.: Light and Electron Microscopy of Lesions in Rats Rendered Diabetes with Streptozotocin, *Diabetes*, 16:51-56, (1967).
- 12- Arison, R.N. and Feudale, E.L.: Induction of Renal Tumour by Streptozotocin in Rats, *Nature*, 214:1254-1255, (1967).
- 13- Arnould, Y., Doms, H.A. and Bastenie, P.A.: Treatment of Unsilinoma with Streptozotocin. *Lancet* I:1210-1211, (1969).
- 14- Baban, N.: Protein Biyokimyası, 201, (1980).
- 15- Bailey, A.J., Peach, C.M. and Fowler, L.J.: Chemistry of the the Collagen Cross-Links Isolation and Characterization of Two Intermediate Intermolecular Crosslinks in Collagen, *Biol. J.*, 117:819-831, (1970).
- 16- Bakan, E. and Bakan, N.: Glycosylation of Nail in Diabetics: Possible Marker of Longterm Hyperglycemia, *Clinica Chimica Acta*, 147:1-5, (1985).

- 17- Bakan,N.: Erzurum ve Çevresindeki Sağlam Şahıslarda Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA_{1c}) değerleri, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Biyokimya Bölümü, Erzurum, (1984).
- 18- Bassiouny,A.R., Rosenberg,H. and McDonald,T.L.: Glucosylated Collagen is Antigenic, Diabetes, 32:1182-1184, (1983).
- 19- Bauer,J.D., Ackermann,P.G. and Toro,G.: Bray's Clinical Laboratory Methods, 7.Baskı, 99, (1968).
- 20- Bayraktar,E.: BALB/C Farelerinin Kan Serum Proteinleri Üzerinde UV-C Işınlarının Etkilerinin Poliakrilamid Gel Elektroforezi Yöntemiyle İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul, 26-31, (1986).
- 21- Belting,C.M., Hiniker,J.J. and Dummett,C.D.: Influence of Diabetes on Severity of Periodontal Disease, J. Periodont. 35:476-481, (1964).
- 22- Berkarda,B., Eyüpoğlu,H.: Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri, İstanbul, 288, (1983).
- 23- Berkarda,B., Müftüoğlu,A.Ü. ve Ulutin,O.: Kan Hastalıkları, İstanbul, 189-190, (1983).
- 24- Bohinski,R.C.: Modern Concepts in Biochemistry, Third Edition, 139, (1975).
- 25- Bookchin,R.M. and Gallop,P.M.: Structure of Hemoglobin A_{1c}, Nature of the N-terminal Beta Chain Blocking Group, Biochem. Biophys. Res. Comm., 32:86-93, (1968).
- 26- Borng,G.V.R. and Cross,M.J.: The Aggregation of Blood Platelets, J. Physiol., 163:178-195, (1963).

- 27- Bosmann,H. and Eylar,E.H.: Glycoprotein Biosynthesis: The Biosynthesis of The Hydroxy-Lysine-Galactose Linkage in Collagen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33:340,346, (1968).
- 28- Brosky,G. and Logothetopoulos,J.: Streptozotocin Diabetes in The Mouse and Guinea Pig. *Diabetes*, 18:606-611, (1969).
- 29- Brownlee,M., Pongor,S., and Cerami,A.: Covalent Attachment of Soluble Proteins by Nonenzymatically Glycosylated Collagen, *J. Exp. Med.* 158:1739-1744, (1983).
- 30- Brownlee,M., Vlassara,H. and Cerami,A.: Nonenzymatic Glycosylation and Pathogenesis of Diabetic Complications, *Ann. Intern. Med.*, 101:527-537, (1984).
- 31- Brownlee,M., Vlassara,H. and Cerami,A.: Nonenzymatic Products on Collagen Covalently Trap low-Density Lipoprotein, *Diabetes*, 34:938-941, (1985).
- 32- Bunn,H.F., Gabbay,K.H. and Gallop,P.M.: The Glycosylation of Hemoglobin: Revelance to Diabetes Mellitus, *Science*, 200:21-27, (1978).
- 33- Bunn,H.F., Haney,D.N., Gabbay,K.H. and Gallop,P.M.: Further Identification of The Nature and Linkage of the Carbohydrate in Hemoglobin A_{1c}, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 67:103-109, (1975).
- 34- Büyükdevrim,S.A.: Şekerli Diyabet Multihormonal Bir Denge kusurudur, *Diyabet Yıllığı*, 3, 11, (1983).
- 35- Caen,J., Castaldi,P.A., Leclerc,J.C., Inceman,S., Lorriev, M.J. and Bernard,J.: Congenital Bleeding Disorders with long Bleeding time and Normal Count, *Am. J. Med.*, 41:4, (1966).

- 36- Caen, J.: Glanzman Thrombosthenia, Clinics Haemat, 1:393, (1972).
- 37- Caen, J.P., Vainer, M., Sultan, Y. and Lukasiewicz, M.: Constitutional and Acquired Abnormalities of Platelets Aggregation, Ser. Haemat. 3:83, (1970).
- 38- Campbell, I.L., Hellquist, N.B., Taylor, K.W.: Insulin Biosynthesis and Its Regulation, Clin. Science. 62:449-455, (1982).
- 39- Canalis, E.M., Dietrich, J.W., Maina, D.M. and Raisz, L.G.: Hormonal Control of Bone Collagen Synthesis In Vitro Effect of Insulin and Glucagon, Endocrinology, 100:668, (1977).
- 40- Chandrakasan, G., Torchia, D.A. and Piez, K.A.: Preparation of Intact Monomeric Collagen from Rat Tail Tendon and Skin and The Structure of The Nonhelical Ends in Solution, The Journal of Biological Chemistry, 251:6062-6067, (1976).
- 41- Chandramouli, V. and Carter, J.R.: Cell Membrane Changes in Chronically Diabetic Rats, Diabetes, 24, 257, (1975).
- 42- Chang, A.Y.: On The Mechanism for The Depression of Liver NAD by Streptozotocin. Biochem. Biophysiol. Acta, 261: 77-84, (1972).
- 43- Chavrier, C., Couble, M.L., Magloire, H. and Grimaud, J.A.: Connective Tissue Organization of Healthy Human Gingiva, Ultrastructural Localization of Collagens type I-III-IV., Journal of Periodontal Research, 19:221-229, (1984).
- 44- Chavrier, C., Couble, M.L., Maglorie, H. and Grimaud, J.A.: Immunohistochemical localization of type I, III and IV Collagen in Healthy Human Gingiva, J. Biol. Buccale, 9(3):271-7, (1981).

- 45- Conner,S., Irarpoir,B. and Millis,J.: Alteration in Parotid Salivary Flow in Diabetes-Mellitus, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 30:55-59, (1970).
- 46- Davis,B.J.: Disc Electrophoresis, II Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N.Y.Acad. Sci. 121; 404-427, (1964).
- 47- Davis,P.F. and Stehbens,W.E., comparison of Nonenzymatic Glycosylation of Arterial and Venos Collagen S., Biochem. Med. 32:15-21, (1984).
- 48- Devrim,S.A., Altuğ,T., Erseven,G., Güzel,D.: Multipl ve Subdiabetojenik Streptozotocin Dozları ile Sıçanlarda Geliştirilen Diyabet Modelinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi. Tıp fak. Mecm., 45:13-20, (1982).
- 49- Emekli,N.B.: Galactose Transport and Glyprotein Changes in the Platelets of Atherosclerosis, International Istanbul Symposia on Haematology, İstanbul, 89-101, (1981).
- 50- Emekli,N.B.: ¹⁴Galaktozun İçeri Alınışı ve Proteinlere İnkorporasyonunun Normal ve Aterosklerozlu Olguların Trombositlerinde İncelenmesi ve Trombosit Proteinlerinin PAGE ile Ayrılması, TÜBİTAK Araştırma Grubu Kongre Kitabı yayını, Ankara, 611-622, (1980).
- 51- Emekli,N.B. ve Ulutin,O.N.: The Effect of Cyclooxygenase Inhibitors on The Glycoprotein Synthesis, International Istanbul Symposium Kitabı, İstanbul, 89, (1982).
- 52- Emekli,N.: Normal ve Aterosklerozlu Olgularda Trombosit glikoproteinlerinin İncelenmesi, Doçentlik Tezi, İstanbul, (1981).

- 53- Evans, J.J., Gerritsen, G.C., Mann, K.M. and Owen, S.P.: Antitumor and Hyperglycemic Activity of Streptozotocin. (NSC-37917) and Its Cofactor U-15774. *Cancer Chemother. Rep.*, 48:1-6, (1965).
- 54- Evensen, S.A. and Jeremia, M.: Platelets and The Triggering Mechanism of Intravascular Coagulation, *Brit. J. Haemat.*, 19:33, (1970).
- 55- Flückiger, R., Gallop, P.M.: Measurement of Nonenzymatic Protein glycosylation, *Methods in Enzymology*, 106:77-87, (1984).
- 56- Flückiger, R. and Winterhalter, K.H.: In vitro Synthesis of HbA_{1c}, *Febs letter*, 71:356-360, (1976).
- 57- Fullmer, H.M., Taylor, R.E. and Guthrie, R.W.: Human Gingival Collagenase: Purification, Molekuler Weight, and Inhibitor Studies, *J. Dent. Res.*, 51:349, (1972).
- 58- Ganda, O.P., Rossini, A.A. and Like, A.A.: Studies on The Streptozotocin Diabetes, *Diabetes*, 25:595-603, (1976).
- 59- Gans, J.H. and Cater, M.R.: Hypercholesterolemia of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Dogs. *Life Science*, 10, Part II:301-308, (1971).
- 60- Gastpar, H., Kühn, K. and Marx, R.: Collagen-Platelet Interaction, *Proceedings of The First Munich Symposium on Biology of Connective Tissue*, Munich, July 19-20, (1976).
- 61- Gerritsen, G.C. and Dulin, W.E.: Characterization of Diabetes in The Chinese Hamster. *Diabetologia*, 3:74-84, (1967).

- 62- Golden,P., Baird,L., Malaisse,W.J., Malaisse-Lagae,F. and Walker,M.M.: Effect of Streptozotocin on Glucose-Induced Insulin Secretion by Isolated Islets of Langerhans, diabetes, 20:513-518, (1971).
- 63- Goldstein,D.E., Peth,S.B., England,J.D., Hess,R.L. and Costa,J.D.: Effects of Acute Changes in Blood Glucose on HbA_{1c}, Diabetes, 29:623-628, (1980).
- 64- Golub,L.M., Garant,P.R. and Ramamurthy,N.S.: Inflammatory Changes in Gingival collagen in the Alloxan-diabetic Rat, J. Periodontal Res. 12:402-418, (1977).
- 65- Golub,L.M., Greenwald,R., Zebrowski,E.J. and Ramamurthy, N.S.: The Effect of Experimental Diabetes on The Molecular Characteristics of Soluble Rat-Tail Tendon Collagen, Biochimica et Biophysica Acta, 534:73-81, (1978).
- 66- Golub,L.M., Lee,H.M., Lehrer,G., Nemiroff,A., McNamara, T.F., Kaplan,R. and Ramamurth,N.S.: Monocycline Reduces Gingival Collegenolytic Activity During Diabetes, Journal of Periodontal Research, 18:516-526, (1983).
- 67- Golub,L.M., Wolff,M., Lee,H.M., McNamara,T.F., Ramamurthy, N.S., Zambon,J. and Ciancio,S.: Further Evidence that Tetracyclines Inhibit Collagenase Activity in Human Crivicular Fluid and from other Mamalian Sources, Journal of Periodontal Research, 20:12-23, (1985).
- 68- Goodman,A. and Gilman,A.: The Pharmacological Basis of Therapeutic, MacMillan Publishing Co. Inc., s.1503, (1975).
- 69- Gottfried,S.: The Effect of Aspirin and Related Compounds on Blood Coagulation, Periodontal Disease (Schluger,S., Yuodelis,R.A. and Capase,R.), 466-468, (1978).

- 70- Grant,D.A., Stern,I.B. and Listgarten,M.A., Periodontics, sixth edition, The C.V. Mosby Company, 41-49, (1988).
- 71- Grigorov,V., Atanassov,N. and Chichovska,M.: A Study of a Colorimetric method for The Quantitative Determination of Glycosylated Hemoglobin in Humans, Folia Medica, 4:46-50, (1984).
- 72- Guitton,J.D., Lepape,A. and Muh.,J.P.: Influence of In vitro Nonenzymatic Glycosylation on The Physicochemical Parameters of Type I Collagen, Coll. Relat. Res. 4:253-264, (1984).
- 73- Haerem,J.W.: Sudden Coronary Death: The Occurance of Platelets Aggregates in The Epicardial Arteries of Man, Atherosclerosis, 14:417, (1971).
- 74- Hamlin,C.R. and Kohn,R.R.: Evidence for Progressive, Age-Related Structural Changes in Post-Mature Human Collagen, Biochimica et Biophysica Acta, 236:458-467, (1971).
- 75- Handle,E.J., Rostron,G.M., Clark,S.A. and Gatt,J.A.: Serum Fructosamin and Glycated Hemoglobin Measurments in Diabetic Control, Archives of Disease in Child Hood, 61: 113-117, (1986).
- 76- Harper,H.A.: Fizyolojik Kimyaya Bakış, Çevirenler: Prof.Dr.N.K.Menteş, Doç.Dr.G.Menteş, Ege Üniversitesi, 679-685, (1976).
- 77- Hasslacher,C., Reichenbacker,R., Gechter,F. and Timpl,R.: Glomerular Basement Membrane Synthesis and Serum Concentration of Type IV Collagen in Streptozotocin-Diabetic Rats, Diabetologia, 26:150-154, (1984).

- 78- Hessler, E.J. and Jahnke, H.K.: Improved Synthesis of Streptozotocin. *J. Org. Chem.*, 35:245-246, (1970).
- 79- Ho, C.K., Haskim, S.A.: Pyridine Nucleotide Depletion in Pancreatic Islets Associated with Streptozotocin Induced diabetes, *Diabetes*, 21:789-793, (1972).
- 80- Hoftiezer, V. and Carpenter, A.M.: Comparison of Streptozotocin and Alloxan Induced Diabetes in The Rat, *Diabetologia*, 9:178-184, (1973).
- 81- Holmquist, W.R. and Schroeder, W.A.: A New N-terminal Blocking Group Involving a Schiff-base in Hemoglobin A_{1c}, *Biochemistry*, 5:2489-2503, (1966).
- 82- Howard, C.F.: Streptozotocin-Induced diabetes Mellitus by direct Pancreatic Infusion in *Macaca nemestrina*. *Diabetes*, 21:138-142, (1972).
- 83- Jenkins, G.N.: *The Physiology and Biochemistry of The Mouth*, fourth edition, 86-99, (1977).
- 84- Jovanovic, L. and Peterson, C.M.: The Clinical Utility of Glycosylated Hemoglobin, *The American Journal of Medicine*, 70:331-336, (1981).
- 85- Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W. and Renold, A.E.: Diabetogenic Action of Streptozotocin. Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, 48:2129-2139, (1969).
- 86- Junquerira, I.C., Carneiro, J. and Contopoulos, A.: *Basic Histology*, fifth edition, 89-119, (1986).

- 87- Kennedy,L. and Baynes,J.W.: Non-Enzymatic Glycosylation and The Chronic Complications of Diabetes: an Overview, *Diabetologia*, 26:93-98, (1984).
- 88- Kenndy,L., Mehl,T.D., Elder,E., Varghese,M.W. and Merimee, T.J.: Nonenzymatic Glycosylation of Serum and Plasma Proteins, *Diabetes*, 31:52-56, (1982).
- 89- Kent,M.J., Light,N.D. and Bailer,A.J.: Evidence for Glucose Mediated Covalent Cross-linking of Collagen After Glycosylation In vitro, *Biochem. Jour.*, 225:745-752, (1985).
- 90- Kessler,M.C., Floyd,C.M., Rick,M.E., Krizek,M.D., Lee, S.L. and Grainick,H.R.: Collagen Factor VIII/von Willerbrand Factor Protein Interaction, *Blood*, 63:1291-1298, (1984).
- 91- Kinoshita,M., Kosaka,H., Ikeo,T., Shioji,I., Kamada,A. and Sakaki,T.: Glycosaminoglycan Changes in Submandibular Glands of Experimental Diabetic Rats., *J.Osaka Dental Uni.*, 20:55-71, (1986).
- 92- Koenig,R.J., Blobstein,S.H. and Cerami,A.: Structure of Carbonhydrate of Hemoglobin A_{1c}, *The Journal of Biochemistry*, 252:2992-2997, (1977).
- 93- Kohn,R.R. and Schnieder,S.L.: Glycosylation of Human Collagen, diabetes, 31:47-51, (1982).
- 94- Kronick,P. and Jimenez,S.A.: The Size of Collagen Fibrils That Stimulate Platelet Aggregation in Human Plasma, *Biochem. J.*, 186:5-12, (1980).
- 95- Kumar,A., Sharma,K. and Pattabiraman,T.N.: Nature of Nonenzymatically Bound Hexose in Hemoglobin, Albumin and Crystallin, *Biochemical Medicine*, 34:112-119, (1985).

- 96- Kushner,B., Lazar,M., Farman,M., Lieberman,T.W. and Leopold,I.H.: Resistance of Rabbits and Guinea Pigs to The Diabetogenic Effect of Streptozotocin. Diabetes, 18:542-544, (1969).
- 97- Langslow,D.R., Butter,E.J., Halen,C.N. and Pearson,A.W.: The Response of Plasma Insulin, Glucose and Non-Esterified Fatty Acids to Various Hormones, Nutrients and Drugs in Domestic fowl, J. Endocrinol., 46: 243-260, (1970).
- 98- Lapolla,A., Valerio,T.P.A. and Fedele,D.: Glycosylated Serum Proteins in Diabetic Patients and Their Relation to Metabolic Parameters, Diabete and Metabolisme, 11:238-242, (1985).
- 99- Lavelle,C.L.B.: Applied Physiology of The Mouth, 1-32, (1975).
- 100- Lazarus,S.S. and Shapiro,S.H.: Serial Morphologic Changes in Rabbit Pancreatic Islet Cells After Streptozotocin. Lab. Invest., 27:174-183, (1972).
- 101- Lazarus,S.S. and Shapiro,S.M.: Influence of Nicotinamid and Pyridine Nucleotides on STZ and Alloxan Induced Pancreatic 3 Cell Cytotoxicity. Diabetes 22, 499, (1973).
- 102- Lazar,M., Golden,P., Farman,M. and Lieberman,T.W.: Resistance of The Rabbit to Streptozotocin, Lancet, 2:919, (1968).
- 103- Legrand,C. and Nurden,A.T.: Studies on Platelets of Patients with Inherited Platelet Disorders Suggest That Collagen-Induced Fibrinogen Binding to Membrane Receptors Requires Secreted ADP but no Released α -Granule Proteins, Thrombosis and Haemostasis, 54:603-606, (1985).

- 104- LePape,A., Guitton,J.D. and Muh,J.P.: Distribution of Non-enzymatically Bound Glucose in In vivo and In vitro Glycosylated type I Collagen Molecules, Febs Letter, 170:23-27, (1984).
- 105- LePape,A., Guitton,J.D., Gutman,N., Legrand,Y., Fauvel, F. and Muh,J.P.: Nonenzymatic Glycosylation of Collagen in Diabetes: Incidence on Increased Normal Platelet Aggregation, Haemostasis, 13:36-41, (1983).
- 106- LePape,A., Gutman,N., Guitton,J.D., Legrand,Y. and Muh, J.P.: Nonenzymatic Glycosylation Increases Platelet Aggregating Potency of Collagen from Placenta of Diabetic Human Beings, Biochem. and Biophysic. Res. Com., 111: 602-610, (1983).
- 107- LePape,A., Muh,J.P. and Bailey,A.J.: Characterization of N-Glycosylated type I Collagen in Streptozotocin-Induced Diabetes, Biochem. J., 197:405-412, (1981).
- 108- Leslie,S.C., Harriet,E.P., Constance,C. and Rusetto,S.B.: Ultrastructural Studies of The Rat Submandibular Gland in Streptozotocin Induced diabetes Mellitus, Virchows Arch. A. Path. and histol. 382, 301, (1979).
- 109- Lewis,C. and Barbiers,A.R.: Streptozotocin, A New Antibiotic. In vitro and In vivo Evaluation, Antibiotics Annual., Antibiotica New York, 247-254, (1960).
- 110- li,W.Y., Khatami,M., Robertson,G.A., Shen,S. and Rockey, J.H.: Nonenzymatic Glycosylation of Bovine Retinal Microvessel Basement Membranes. In vitro, Kinetic Analysis and Inhibition by Aspirin, Invest. Ophthal. Vis. Sci., 25:884-92, (1984).

- 111- Li,W.Y., Shen,S.Y., Robertson,G.A., Khatami,M. and Rockey,J.H.: Increased Solubility of Newly Synthesized Collagen in Retinal Capillary Pericyte Cultures by Non-enzymatic Glycosylation, *Ophthalmic Res.*, 16:315-321, (1984).
- 112- Lütjens,A., Tevelde,a.A., Veen,E.A. and Meer,J.V.: Glycosylation of Human Fibrinogen In vivo, *Diabetologia*, 88:87-89, (1985).
- 113- Lyons,T.J. and Kennedy,L.: Effect of In vitro Nonenzymatic Glycosylation of Human Skin Collagen on Susceptibility to Collagenase Digestion, *Eur. J. Clin. Invest.*, 15:128-131, (1985).
- 114- Lyons,T.J. and Kennedy,L.: Nonenzymatic Glycosylation of Skin Collagen in Patients with Type I (Insulin-Dependent). Diabetes Mellitus and limited Joint Mobility, *Diabetologia*, 28:2-5, (1985).
- 115- Madia,A.M., Rozovski,S.J. and Kagan,H.M.: Changes in Lung Lysyl Oxidase Activity in Streptozotocin-Diabetes and in Starvation, *Biochim. Biophys. Acta*, 585:481-487, (1979).
- 116- Maldonato,A., Renold,A.E., Sharp,G.W.G. and Cerasi,E.: Glucose-Induced Proinsulin Biosynthesis. Role of Islet cAMP. *Diabetes*, 26:538-545, (1977).
- 117- Mansford,K.R.L. and Opie,L.: Comparison of Metabolic Abnormalities in Diabetes Mellitus Induced by Streptozotocin or Alloxan. *Lancet*, I.670-671, (1968).
- 118- Masu,N., Funato,N., Yamauchi,K., Shioji,I., Fujita,A. and Sakaki,T.: Biochemical Aspects of Collagen in Submandibular Glands of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *J.Osaka Dental Uni.*, 20:72-90, (1986).

- 119- Means,G.E. and Chang,M.K.: Nonenzymatic Glycosylation of Proteins, Structure and Function Changes, Diabetes, 31:1-4, (1982).
- 120- McCullagh,K.A., Balian,G.: Collagen Characterisation and Cell Transformation in Human Atherosclerosis, Nature, 258:73-75, (1975).
- 121- McFarland,K.F., Catalano,E.W., Day,J.F., Thorpe,S.R. and Baynes,J.W.: Nonenzymatic Glucosylation of Serum Proteins in Diabetes-Mellitus, Diabetes, 28:1011-1014, (1979).
- 122- McGilvery,R.W.: Biochemistry, A Functional Approach, second edition, 154-162, (1979).
- 123- McMullen,J.A., Legg,M., Gottengen,R. and Camarini Davalos, R.: Microangiopathy within The Gingival Tissues of Diabetic Subjects with Special Reference to the Pre-diabetic State, Periodontics, 5:61-69, (1967).
- 124- Monnier,V.M. and Cerami,A.: Nonenzymatic Glycosylation and Browning in Diabetes and Aging, Studies on Lens Proteins, Diabetes, 31:57-63, (1982).
- 125- Montgomery,R., Dryer,R.L., Conway,T.W. and Spector,A.A.: Biochemistry, Second Edition, 68-72, (1977).
- 126- Morin,R.J., Cher,A.F.T., Narayan,A.S.: Platelet Adhesion to Collagen in Normal and Von Willebrand's Disease Subjects, Throm. Res., 17:719-728, (1980).
- 127- Mortensen,H.B.: Glycated Hemoglobin, Danish Medical Bulletin, 32:309-328, 1985.

- 128- Muggli,R.: Collagen Induced Platelet Aggregation: Native Collagen Quaternary Structure is not An Essential Structural Requirement, *Thrombosis Research*, 13:829-843, (1978).
- 129- Murray-Lyon,I.M., Eddieston,A., Williams,R., Brown,M., Hogbin,B.M., Benheot,A., Edwards,J.C. and Taylor,K.W.: Treatments of a Multiple-Hormone Producing Malignant Islet Cell Tumor with Streptozotocin. *Lancett* II:895, (1968).
- 130- Murray,L.M.: Treatment of Multiple Hormone Producing Malignant Islet Cell Tumor with Streptozotocin, *Lancet*, 2, 895, (1968).
- 131- Nelson,D.M., Barrows,H.J., Clapp,D.H., Nabi,J.O. and Whitehurst,R.M.: Glycosylated Serum Protein Levels in Diabetic and Nondiabetic Pregnant Patients: An Indicator of Short Term Glycemic Control in diabetic Patient, *Am. J. Obstet. Gynecol*, 151:1042-1047, (1985).
- 132- Neuman,R.E. and Logan,M.A.: The Determination of Collagen and Elastin in tissues, *J. Biol. Chem.*, 186:549-556, (1950).
- 133- Neuman,R.E. and Logan,M.A.: The Determination of Hydroxyproline, *J. Biol. Chem.*, 184:299-306, (1950).
- 134- Neurath,H. and Hill,R.L.: *The Proteins*, Academic Press, New York, 4:411-632, (1979).
- 135- Orłowski,W.A.: Metabolism of Gingival collagen in a Rat, *J. Dent. Res.*, 57:329-333, (1978).

- 136- Öcal,T., Altuğ,T., Erseven,G., Büyükdevrim,S.: Farklı Dozlarda STZ Uygulanmasının Pankreas Adacıklarında Ortaya Çıkardığı Histolojik Değişiklikler, Diyabet Yıllığı 2, 101, (1982).
- 137- Öcal,T., Altuğ,T., Erseven,G., Devrim,A.S.: Farklı Dozlarda Streptozotocin Uygulamasının Pankreas Adacıklarında Ortaya Çıkardığı Histolojik Değişiklikler, Diyabet Yıllığı, 2:101-111, (1984).
- 138- Ögün,S., Polat,C. ve Yurtman,İ.Y.: Glikoz, Yaşlanma ve Gençlik Aşısı, Bilim ve Teknik Dergisi, 20, 239:18-20, (1987).
- 139- Parker,K.M., England,J.D., DaCosta,J., Hessel,R.L. and Goldstein,D.E.: Improved Colorimetric Assay for Glycosylated Hemoglobin, Clin. Chem., 27:669-672, (1981).
- 140- Pasternak,C.A.: İnsan Biyokimyasına Giriş, Çeviriyi yapan: Ciliv,G., Emerk,K. ve Karan,A., H.Ü. Yayınları, 296-297, (1978).
- 141- Perret,B.A., Furlan,M., Jenö,P. and Beck,E.A.: Von Willebrand Factor-Dependent Agglutination of Washed Fixed human Platelets by Insoluble Collagen Isolated from Bovine Aorta, 107:244-252, (1986).
- 142- Rakieten,N., Rakieten,M.L., Nadkorni,V.: Studies on The Diabetogenic Action of Streptozotocin (NSC 37917). Cancer Chemother. Rep., 29:91-98, (1963).
- 143- Ramamurthy,N.S. and Golub,L.M.: diabetes Increases Collagenase Activity in Extracts of Rat Gingiva and Skin, Journal of Periodontal Research, 18:31-39, (1983).

- 144- Ramamurthy,N.S., Zebrowski,E.J. and Golub,L.M.: Insulin Reversal of Alloxan Diabetes Induced Changes in Gingival Collagen Metabolism of the Rat, *Journal of Periodontal Research*, 9:199-206, (1974).
- 145- Ramamurthy,N.S., Zevrowski,E.J. and Golub,L.: The Effect of Alloxan Diabetes on Gingival collagen Metabolism in Rats., *Archs. Oral Biol.*, 17:1551-1560, (1972).
- 146- Rendell,M., Kao,G., Mecherikunnel,P., Petersen,B., Duhaney,R., Nierenberg,J., Rasbold,K., Klenk,D. and Smith,P.K.: Aminophenylboronic Acid Affinity Chromatography and Tiobarbituric Acid Colorimetry Compared for Measuring Glycated Albumin, *Clinical Chemistry*, 31:229-234, (1985).
- 147- Rerup,C.C., Tarding,F.: Streptozotocin and Alloxan-Diabetes In Mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 7:89-96, (1969).
- 148- Ristelli,J., Rohde,H. and Timpl,R.: Sensitive Radioimmuno Assays for 7S Collagen and Laminin: Application to Serum and Tissue, *Studies of Basement Membranes, Analytical Biochemistry*, 113:372-378, (1981).
- 149- Ristelli,J., Wick,G. and Timpl,R.: Immunological Characterization of The 7S Domain of Type IV Collagens, *Coll. Res.* 5:419-432, (1981).
- 150- Robertson,P.B. and Simpson,J.: Collagenase: Current Concepts and Relevance to Periodantal Disease, *J. Periodontol.*, 29-33, (1976).
- 151- Robins,S.P. and Bailey,A.J.: Age-related Changes in Collagen: The Identification of Reducible Lysine-Carbohydrate Condensation Products, *Brochem. Biophys. Res. Comm*, 48:76-84, (1972).

- 152- Rosenberg,H. and Modrak,J.B.: Glycosylated Collagen, Biochem. and Biophys. Research Comm., 91:498-501, (1979).
- 153- Sakai,T. and Gross,J.: Some Properties of Products of Reaction of Tadpole Collagenase with Collagen, Biochemistry, 6:518-528, (1964).
- 154- Saltmarch,M. and Labuza,T.P.: Nonenzymatic Browning via The Millard Reactions in Foods, Diabetes, 31:29-36, (1982).
- 155- Sandallı,P.: Periodontoloji, İ.Ü. Dişhekimliği Fak. Erler Mat., 8-24, (1981).
- 156- Santen,R.J., Willis,P.W. and Fajans,S.S.: Atherosclerosis in Diabetes Mellitus, Correlations with Serum Lipid levels, Adiposity and Serum Insulin level, Arch. Intern. Med., 130:833-843, (1972).
- 157- Schneir,M.L., Bowersox,J., Ramamurthy,N.S., Yavelow,J., Murray,J., Folz,E.E. and Golub,L.: Response of Rat Connective Tissues to Streptozotocin-diabetes, Tissue Spesifik Effects on Collagen Metabolism, Biochimica et Biophysica Acta, 583:95-102, (1979).
- 158- Schneir,M.L., Ramamurthy,N.S. and Golub,L.: Skin Collagen Metabolism in The Streptozotocin Induced diabetic Rat, Enhanced Catabolism of Collagen formed Both Before and During The Diabetic State, Diabetes, 31:426-431, (1982).
- 159- Schneir,M.L., Ramamurthy,N.S. and Golub,L.M.: Extensive Degradation of Recently Synthesized Collagen in Gingival of Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, J. Dent. Res., 63:23-27, (1984).

- 160- Schnider, S.L. and Kohn, R.R.: Glucosylation of Human Collagen in Aging and Diabetes-Mellitus, *J. Clin. Invest.*, 66:1179-1181, (1980).
- 161- Shadle, P.J. and Barondes, S.H.: Adhesion of Human Platelets to Immobilized Trimeric Collagen, *J. Cell. Biol.*, 95:361-365, (1982).
- 162- Slavkin, H.C. and Bavetta, L.A.: *Developmental Aspects of Oral Biology*, Academic Press, New York, 275-308, (1972).
- 163- Sodek, J.: A Comparison of Collagen and Non-Collagenous Protein Metabolism in Rat Molar and Incisor Periodontal Ligaments, *Archs. Oral Biol.*, 23: 977-982, (1978).
- 164- Sodek, J.: A Comparison of the Rates of Synthesis and Turnover of Collagen and Noncollagen Proteins in Adult Rat Periodontal Tissues and Skin Using a Microassay, *Archs. Oral Biol.* 22:655-675, (1977).
- 165- Sokolski, W.T., Vavra, J.J. and Hanka, L.J.: assay Methods and Antibacterial Studies on Streptozotocin, *Antibiotics Annual.*, Antibiota New York, pp.241-247, (1960).
- 166- Sosenko, J.M., Flückiger, R., Platt, O.S. and Gabbay, K.H.: Glycosylation of Variant Hemoglobins in Normal and Diabetic Subjects, *Diabetes Care*, 3:590-593, (1980).
- 167- Stegemann, H.: Mikro Bestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T and P-Dimetilaminobenzaldehyd, *Physiol. Chem.*, 311:41-45, (1958).
- 168- Sternberg, M., Forterre, C. and Peyroux, J.: Connective Tissue in Diabetes Mellitus: Biochemical Alterations of The Intercellular Matrix with Special Reference to Proteoglycans, Collagens and Basement Membrans, *Diabetes and Metabolisme*, 11:27-50, (1985).

- 169- Stout,R.W.: Diabetes and Atherosclerosis - The Role of Insulin; *diabetologia*, 16:141-150, (1979).
- 170- Timpl,R., Wiedemann,H., Delden,V.V., Furthmayr,H. and Kühn,K.: A Network Model for the Organization of Type IV Collagen Molecules in Basement Membranes, *Eur. J. Biochem.* 120:203-211, (1981).
- 171- Trivelli,L.A., Ranney,H.M. and Lai,H.T.: Hemoglobin Components in Patients with Diabetes-Mellitus, *The New England Journal of Medicine*, 284:353-357, (1971).
- 172- Trueb,B., Flückiger,R. and Winterhalter,K.H.: Nonenzymatic Glycosylation of Basement Membrane Collagen in Diabetes Mellitus, *Coll. Relat. Res.*, 4:239-251, (1984).
- 173- Tsunehisa,S., Tsuji,T., Tokama,H. and Osawa,T.: Interaction of Human Platelet Membrane Glycoproteins with Collagen and Lectins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 797: 10-19, (1984).
- 174- Ulutin,O.N.: Diyabetik Aterosklerozda Trombosit Fonksiyon Değişimleri, *Diyabet yıllığı*, 1:14-19, (1983).
- 175- Ulutin,o.N.: *The Platelets, Fundamentals and Clinical Applications*, 232-323, (1976).
- 176- Vlassara,H., Brownee,M. and Cerami,A.: Excessive Non-enzymatic Glycosylation of Pheripheral and Central Nervous System Myelin Components in Diabetic Rats, *Diabetes*, 32:670-674, (1983).
- 177- Vlassara,H., Brownlee,M. and Cerami,A.: Nonenzymatic Glycosylation of Peripheral Nerve Protein in Diabetes Mellitus, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:5190-5192, (1981).

- 178- Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A.: Nonenzymatic Glycosylation: Role in The Pathogenesis of Diabetic Complications, *Clin. Chem.*, 32:37-41, (1986).
- 179- Weber, K. and Osborn, M.: The Reliability of Molecular Weight determinations by Dodecyl-Sulfate Polyacryamide Gel Electrophoresis, *The Jour. Biol. Chem.*, 244:4406-4410, (1969).
- 180- Weiss, L. and Greep, R.O.: *Histology*, Fourth Edition, McGrawhill Book Company, 145-175, (1977).
- 181- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P. and White, A.: *Principles of Biochemistry*, Seventh Edition, 211-224, (1986).
- 182- Wieland, O.H.: Protein Modification by Nonenzymatic Glucosylation: Possible Role in The Development of Diabetic Complications, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 29:125-31, (1983).
- 183- Wilson, G.L., Patton, N.J., McCord, J.M., Mullins, D.W. and Mossman, B.T.: Mechanism of Streptozotocin- and Alloxan Induced Damage in Rat B-cells. *Diabetologia*, 27:587-591, (1984).
- 184- Woessner, J.F.: The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93:440-447, (1961).
- 185- Worth, R., Potler, J.M., Drury, J., Fraser, R.B. and Cullen, D.R.: Glycosylated Hemoglobin in normal Pregnancy: A Longitudinal Study with Two Independent Methods, *Diabetologia*, 28:76-79, (1985).

- 186- Wright,B., Giammara,B.: Morphologic and Enzymatic Alternations in Alloxan Diabetic Mouse Submandibular Glands, J. Dental. Res., 55B, 231B, (1976).
- 187- Yamamoto,H., Uchigata,Y. and Okamoto,H.: DNA Strand Breaks in Pancreatic Islets by In Vivo Administration of Alloxan or Streptozotocin. Biochem. Biophys. Res. Com., 103:1014-1020, (1981).
- 188- Yamamoto,H., Uchigata,Y. and Okamoto,H.: Streptozotocin and Alloxan-Induce DNA Strand Breaks and Poly (ADP-ribose) Synthetase in Pancreatic Islets. Nature, 294: 284-286, (1981).
- 189- Yenson,M.: İnsan Biyokimyası, 5.Baskı, İ.Ü.Tıp Fakültesi, Sermet Matbaası, 359- 374-375, 469, (1984).
- 190- Yue,D.K., McLennan,S. and Turtle,J.R.: Nonenzymatic Glycosylation of Tissue Protein in Diabetes in The Rat, Diabetologia, 24:377-381, (1983).
- 191- Yue,D.K., McLennan,S., Delbridge,L., Handelsman,D.J., Reeve,T. and Turtle,J.R.: The Thermal Stability of Collagen in Diabetic Rats: Correlation with Severity of Diabetes and Nonenzymatic Glycosylation, Diabetologia, 24:282-284, (1983).
- 192- Yue,D.K., McLennan,S., Handelsman,D.J., Delbridge,L., Reeve,T. and Turtle,J.R.: The Effects of Cyclooxygenase and Lipoxigenase Inhibitors on The Collagen Abnormalities of Diabetic Rats, Diabetes, 34:74-78, (1985).
- 193- Yue,D.K., McLennan,S., Handelsman,D.J., Delbridge,L., Reeve,T. and Turtle,J.R.: The Effect of Salicylates on Nonenzymatic Glycosylation and Thermal Stability of Collagen in Diabetic Rats, Diabetes, 33:745-751, (1984).

- 194- Yue,D.K., Morris,R., Mclennan,S. and Turtle,J.R.: Glycosylation of Plasma Protein and It's Relation to Glycosylated Hemoglobin in Diabetes, Diabetes, 29:296-300, (1980).

Paired t-Test X1: DE/REC(Den) Y1: REC(Den)/Kont.

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
23	20.828	111.26	.0001

Note: 10 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: REC(Den)/Dip(17 gln/HR) Y1: REC(Den)/Dip(8 gln/HR)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
9	2.007	4.482	.0038

Note: 28 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: REC(Kem)/Kont. Y1: REC(Kem)/Dip(8 gln/HR)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	26	251	.2118

Note: 28 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: DE/REC(Den)-17 gln/HR Y1: DE/REC(Den)-8 gln/HR

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
9	-3.353	-2.769	.0197

Note: 28 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: DE/REC(Kem) Y1: DE/REC(Dip-8 gln/HR)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	-223	-9.873	.0008

Note: 26 cases deleted with missing values.

X1: Beta/Kont(AL)

DF:	Std. Dev.:	Std. Error:	Y-Mean:	Conf. Int.:	Count:
23	5.172	1.446	14.153	12.341	11
Sum of Squares:	75.94	5.00	Sum of Squares:	7.77777	
31.9	17.7	23.8	456.1	16056.23	22

Note: X1: DE/REC(Den)-17 gln/HR

DF:	Std. Dev.:	Std. Error:	Y-Mean:	Conf. Int.:	Count:
23	1.714	.479	17.566	16.267	16
Sum of Squares:	1.294	.500	Sum of Squares:	8.181729	
17.65	2.12	6.01	327.0	6818.285	110

Note: X1: DE/REC(Kem)

DF:	Std. Dev.:	Std. Error:	Y-Mean:	Conf. Int.:	Count:
23	1.427	.364	12.222	11.222	24
Sum of Squares:	1.000	.500	Sum of Squares:	1.000000	
23.31	24.66	1.95	174.2	17746.112	116

Note: X1: DE/REC(Den)-8 gln/HR

DF:	Std. Dev.:	Std. Error:	Y-Mean:	Conf. Int.:	Count:
23	1.77	.463	18.882	18.000	8
Sum of Squares:	1.120000	.500	Sum of Squares:	8.181729	
21.7	3.2	1.33	21.2	27.773	26

Note: X1: DE/REC(Dip-8 gln/HR)

DF:	Std. Dev.:	Std. Error:	Y-Mean:	Conf. Int.:	Count:
23	1.5	.386	11.26	10.26	5
Sum of Squares:	1.125000	.500	Sum of Squares:	8.181729	
13.77	1.1	.41	1157.6	14888.628	26

F1/NEG/HBA1C H1K1S1

Simple Regression X1: B.REC(Kem)/Den. Y1: B.F1/Den.

DF:	R:	R-squared:	Adj. R-squared:	Std. Error:	F-test:
23	.735	.54	.525	6.15	6.15

No Residual Statistics Computed

DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	14.178	14.178	37.509
RESIDUAL	12.075	3.019	8.0001
TOTAL	26.253		

Simple Regression X1: B.REC(Kem)/Den. Y1: B.F1/Den.

Parameter:	Std. Err.:	Std. Value:	t-value:	Probability:
INTERCEPT	.405	.666	1.6124	.0001
SLOPE				

Beta Coefficient Table

Parameter:	95% Lower:	95% Upper:	90% Lower:	90% Upper:
REGRESSION	3.251	3.681	3.289	3.645
RESIDUAL	.27	.34	.283	.317
TOTAL				

Simple Regression X1: B.REC(Kem)/Den. Y2: B.HBA1C/Den.

DF:	R:	R-squared:	Adj. R-squared:	Std. Error:	F-test:
23	.784	.538	.524	1.872	1.872

No Residual Statistics Computed

DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	149.224	149.224	37.329
RESIDUAL	124.493	3.09	8.0001
TOTAL	269.717		

Simple Regression X1: B.REC(Kem)/Den. Y2: B.HBA1C/Den.

Parameter:	Std. Err.:	Std. Value:	t-value:	Probability:	
INTERCEPT	2.545	2.12	1.34	6.11	.0001
SLOPE					

Beta Coefficient Table

Parameter:	95% Lower:	95% Upper:	90% Lower:	90% Upper:
REGRESSION	11.766	11.574	10.574	11.87
RESIDUAL	.864	1.129	.937	1.656
TOTAL				

Paired t-Test X1: REC(Kem)/Dip Y1: REC(Kem)/Kont.

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
19	2.711	7.412	.0001

Note: 18 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: YAN(Den)-HA/Dip. Y1: YAN(Den)/Kont.

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	-1.129	-1.012	.1727

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: YAN(Den)-B/Dip. Y1: YAN(Den)-B/Kont.

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	-0.112	-1.17	.2975

Note: 26 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: ALFA(Den)/AL Y1: ALFA(Den)/AL

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	-1.438	-1.208	.1448

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: ALFA(Den)/AL Y2: ALFA(Kem)/AL

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	-4.838	-1.791	.0982

Note: 26 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: Beta/Dip(AL) Y1: Beta/Kont(AL)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
7	7.279	1.047	.1649

Note: 26 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: DE/REC(Den) Y1: DE/REC(Den)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
19	-8.438	-4.966	.0001

Note: 18 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: DE/REC(Dip) Y1: REC(Kem)/Dip

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (1-tail):
19	19.108	19.744	.0001

Note: 18 cases deleted with missing values.

B.A.G.R.D.G.I.G.Y.F

Paired t-Test X1: AKS(Den) Y1: AKS(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
23	-2.908	-3.68	.0009

Note: 18 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: Agr(Den) Y1: Agr(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
23	-0.876	-1.291	.2079

Note: 18 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: H1C(Dip) Y1: H1C(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
23	-0.629	-2.010	.068

Note: 18 cases deleted with missing values.

Sonunda Dip/Kont grupleri farkli lig

Paired t-Test X1: S.Hic(Dip) Y1: S.Hic(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
9	-1.7	-1.472	.1732

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: B.AKS(Dip) Y1: B.AKS(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
9	425.6	27.592	.0001

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: B.Agr(Dip) Y1: B.Agr(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
9	-49.7	-9.878	.0001

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: B.Hic(Dip) Y1: B.Hic(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
9	1.751	6.579	.0001

Note: 24 cases deleted with missing values.

Paired t-Test X1: B.HBA1C(Dip) Y1: B.HBA1C(Kem)

DF:	Man X - Y:	Paired t-value:	Prob. (2-tail):
9	5.611	6.573	.0001

Note: 24 cases deleted with missing values.

X21: REC(GM)/KONT.

214.344	314 Error	Variances	Conf. Var.	Count
1.337	1.16	2.12	22.199	24
100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
5.12	4.42	0.707	340.474	10

X22: TAB(KO)MA/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X23: TAB(KO)MA/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X24: TAB(KO)LB/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X25: TAB(KO)LB/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X26: TAB(KO)MA/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X27: TAB(KO)MA/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X28: TAB(KO)LB/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X29: TAB(KO)LB/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X11: B. AER(0%)/KONT.

214.344	314 Error	Variances	Conf. Var.	Count
1.337	1.16	2.12	22.199	24
100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
5.12	4.42	0.707	340.474	10

X12: B. AER(0%)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X13: B. AER(0%)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X14: B. AER(0%)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X15: B. AER(0%)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X16: B. AER(0%)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X17: B. AER(0%)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X18: B. AER(0%)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X19: B. AER(0%)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X1: REC(GM)/KONT.

214.344	314 Error	Variances	Conf. Var.	Count
1.337	1.16	2.12	22.199	24
100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
5.12	4.42	0.707	340.474	10

X2: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X3: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X4: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X5: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X6: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X7: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X8: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X9: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X10: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X11: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X12: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X13: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X14: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X15: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X16: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X17: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X18: REC(GM)/DOB.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

X19: REC(GM)/KONT.

100.000	100.000	0.000	Sum Squared	# HISTO.
1.2	1.2	0.0	1.44	24

Ö Z G E Ç M İ Ş

1957 yılında Giresun'da doğdum. Eğitimime Adapazarı Atatürk İlkokulunda başladım. 1968'de İstanbul Fatih İlkokulundan mezun oldum. Aynı sene İstanbul Atatürk Kız Lisesine kayıt oldum. 1974'de Atatürk Kız Lisesini birincilikle bitirdim. Lisans eğitimimi İ.Ü. Kimya Fakültesinde 1978'de tamamladıktan sonra, aynı fakültede Sınai Kimya Kürsüsünde yüksek lisans programına başladım. 1979'da mezun olduktan sonra İ.İ.T.İ.A. Dişhekimliği Yüksek Okulunun Genel Kimya Kürsüsüne asistan olarak girdim. 1983'de M.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Biyokimya biriminde doktora programına kayıt oldum. Halen aynı fakültede araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

T. G.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi