

283827

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

DEKSAMETAZON - 21 - FOSFAT'IN RAT PARYETAL  
KEMİK DOKUSUNDA KOLLAJEN BİYOSENTEZİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

NİLGÜN SÜMER

ANKARA - 1979

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

DEKSAMETAZON-21-FOSFAT'IN RAT PARYETAL  
KEMİK DOKUSUNDA KOLLAJEN BİYOSENTEZİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

NILGÜN SÜMER  
Rehber Öğretim Üyesi  
Doç. Dr. Konçuy Mergen

ANKARA-1979

## I Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ .....	1
ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	12
Araçlar	
Gereçler	
Yöntemler	
Sterilizasyon	
Çözeltilerin Hazırlanması	
Kafa Kemiklerinin Hazırlanması	
İnkübasyon Ortamlarının Hazırlanması	
Reaksiyonun Durdurulması	
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	
Radyoaktivite Ölçümleri	
Protein Tayini	
Protein Hidrolizi ve Hidroksiprolin Tayini	
İstatistiksel Değerlendirme	
BULGULAR .....	20
TARTIŞMA .....	35
ÖZET .....	41
KISALTMALAR .....	42
KAYNAKLAR .....	43

## G İ R İ Ő

Bađ dokusunun ana proteini olan kollajenin en önemli görevi, doku ve organların bütünlüğünü korumak ve dayanıklılık vermektir. Kollajen insan vücudundaki proteinlerin %33'ünü oluşturur. Kollajen molekülünün yapısına giren her otuz amino asitten biri glisindir. Prolin ve hidroksiprolin ise yapıda % 20 oranında bulunurlar. Lizin ve prolin amino asitlerinin hidroksillenmiş şekilleri olan, hidroksilizin ve hidroksiprolin kollajene özgüdürler.

Kollajenin önemli diğer bir özelliği de postribozomal değişikliğe uğrıyan proteinler gurubundan olmasıdır. Prokollajen, kollajene oranla daha fazla amino asit dizisine sahip üç  $\alpha$ -polipeptit zincirinden oluşmuş ve çeşitli proteaz inhibitörleri ile izole edilebilmiştir. İlk sentez ürününün ilave bir amino asit dizisi taşıması kollajenin de diğer bazı salgılanabilen proteinlerde görüldüğü gibi, prokollajen ve \*preprokollajen şekillerinin olduğunu düşündürür (1).

Preprokollajen sentezi kollajen sentezinden sorumlu hücrelerin ribozomlarında, mono (2) veya polisistronik (3,4) olduğu henüz kesinleşmemiş bir mekanizma ile olur. Ribozomlar

---

\* Kollajen konusunda henüz kesin bir terim birliğine varılamamıştır. Bu nedenle John ve Disolletta Fessler'in Annual Reviews of Biochemistry, 1978 (Cilt 47, sayfa 129-62) deki "Biosynthesis of Procollagen" makalesinin nomenklatürü esas alınmıştır.

üzerinde uzayan peptit zincirleri bir yandan özel hidroksilazlar aracılığı ile hidroksillenirken diğer taraftan üçlü helikal yapıyı oluştururlar. Bu hidroksilazlar, peptit zincirlerindeki prolin ve lizinleri belli bir şifre gereğince hidroksilleyen, prolil ve lizil hidroksilaz enzimleridir. Peptit zincirlerindeki prolinlerin hidroksilasyonu, üçlü helikal yapının stabilizasyonu için gereklidir. (5). (Şekil 1)

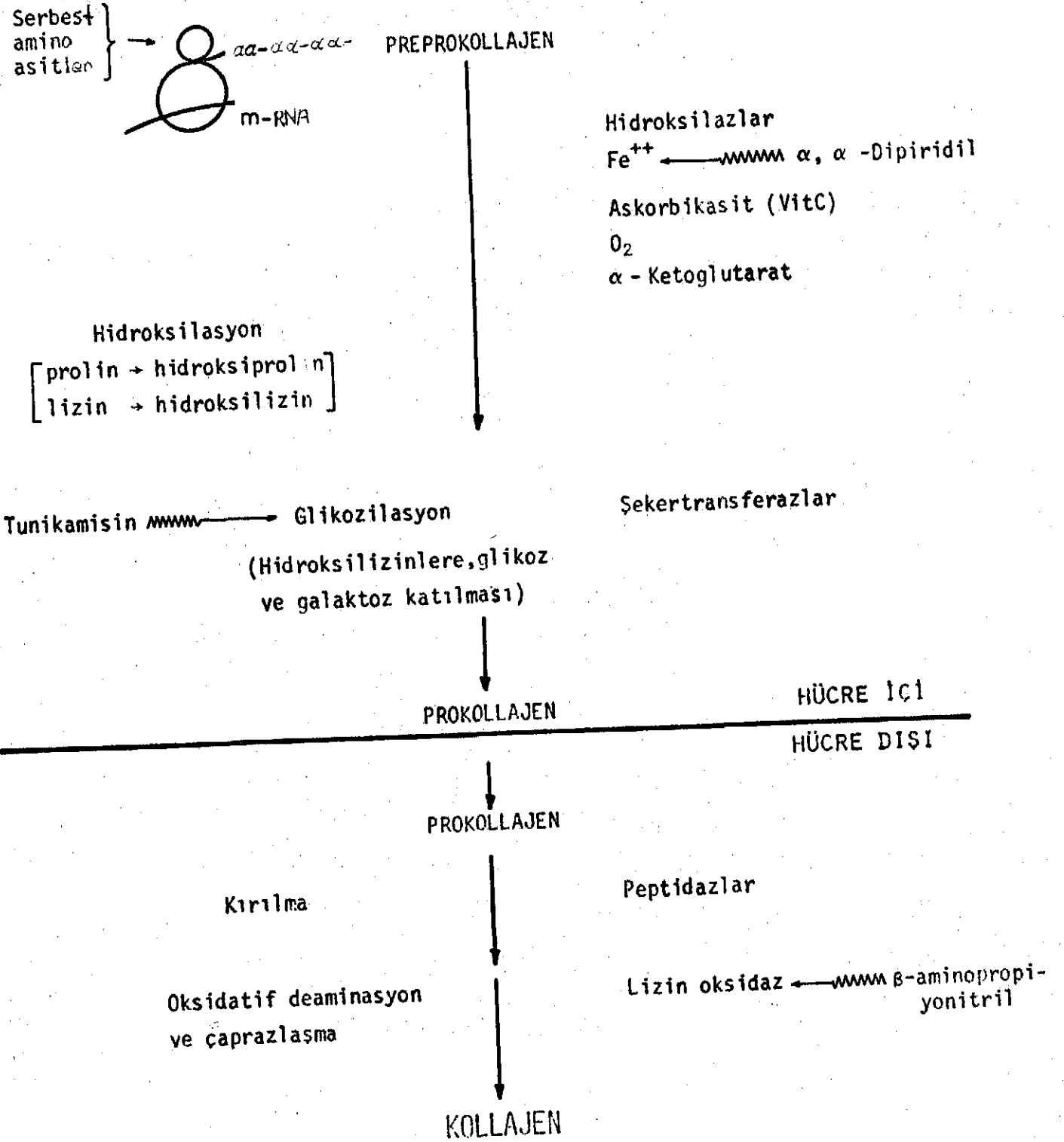
Prolil hidroksilaz (6,7) ve lizil hidroksilaz (8) enzimleri substrat olarak helikal olmayan yapıdaki peptidi kullanırlar. Bu hidroksilazlar çeşitli memeli dokularından ve tavuk embriyosu homojenatından saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir (9-11). Her iki enziminde kofaktör olarak moleküller  $O_2$ ,  $Fe^{++}$ ,  $\alpha$ -ketoglutarat ve askorbik asit (VitC) e gerek duydukları gösterilmiştir. (12).

Kollajen sentezini bu kademedede, demir bağlayıcı bir ajan olan  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dipiridil ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -DP) ile inhibe ederek preprokollajeni ayırmak mümkün olmuş ve yapısı aydınlatılmıştır. (13).

Hidroksillenmemiş ve glikozillenmemiş preprokollajen hücre zarını geçemez. Böylece hücre içinde biriken preprokollajen kendi sentezini muhtemelen negatif feed-back bir mekanizma ile inhibe eder (14).

Hidroksillenen peptit zincirlerindeki bazı hidroksilizinler üzerinden yapıya şeker transferazlar aracılığı ile glikoz ve galaktoz ünitelerinin bağlandığı gösterilmiştir.

## KOLLAJEN BİYOSENTEZİ



Şekil : 1

Kollajen glikoziltransferaz enzimi tavuk embriyosu homojenatından saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir (15). Bu enzim, bazı galaktozilhidroksilizin ünitelerine glikoz molekülünü üridildifosfo-glikozdan taşır, kofaktörü iki değerlikli mangan iyonudur (16).

Hidroksillenen ve glikozillenen prokollajen hücre dışına salınır. Hücre dışında prokollajenler N ve C uçlarından, iki ayrı peptidaz aracılığı ile proteolitik parçalanmaya uğrayarak kollajen molekülünü oluştururlar (1,17).

Kollajen molekülündeki lizin ve hidroksilizinler, bakır taşıyan bir enzim olan lizin oksidaz ile oksidatif deaminasyon tepkimelerine girerler ve oluşan aldehit gurupları aracılığı ile çaprazlaşan kollajen molekülleri kollajen fibrilini oluştururlar (18).

Böylece fizyolojik PH'da çözünmeyen fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından, preprokollajen ve prokollajenden farklı, olgun kollajen meydana gelir.

Preprokollajenden, kollajen fibrillerinin oluşmasına kadar geçen sentez kademeleri, sentezi belli noktalarda inhibe eden çeşitli inhibitörler aracılığı ile ayrıntılarıyla incelenmiştir.

Hidroksilasyon kademesinin iki değerlikli demir iyonu bağlayan  $\alpha, \alpha'$ -DP ile inhibisyonu, çeşitli dokularda ve değişik inhibitör derişimlerinde gösterilmiştir (13,19,20). Bu kademe, L-3,4- dehidroprolin (21) ve cis-4-hidroksi-L-prolin

(22) gibi bazı prolin analogları ile de inhibe edilebilmiştir.

Duskin ve Bornstein, karbohidrat birimlerinin prokol-lajen yapısına katılmasının tunikamisin (Tunicamycine) adlı bir antibiyotik ile bloke olduğunu, ancak hücre dışına salgılanmanın ise inhibe olmadığını göstermişlerdir (17).

Inhibitörler ile yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -aminopropiyo-nitril (BAPN) 'in peptide bağlı lizin ve hidroksilizinlerin oksidatif deaminasyonunu yapan lizin oksidaz enzimini inhibe ederek kollajenin çaprazlaşmasını önlediği ortaya konmuştur (23,24). Aynı kademede inhibisyon yaptığı gösterilen D-peni-sillamin'in ise lizin oksidaz enzimini inhibe etmeyip oluşan aldehit guruplarına bağlanarak çaprazlaşmayı önlediği saptanmış ve bu bulgu deri kollajen miktarının belirgin bir şekilde azaldığının gösterilmesi ile kanıtlanmıştır (25).

Birçok kollajen doku hastalıklarında glukokortikoid-lerin tedavi edici etkisinin gözlenmesi üzerine bu olayın mekanizmasının açıklanabilmesi için invivo ve invitro pek çok deneyler yapılmıştır. Glukokortikoidlerin üzerinde ya-pılan çalışmalar etki mekanizmalarının protein sentezinin inhibisyonuna bağlı antianabolik bir etki ve aynı zamanda lizozom membranının sağlamlştırılması şeklinde antienflama-tuvar bir etki üzerinden olduğu genel kanısına yol açmıştır. Bu konudaki çalışmalar süregelmekte ve çeşitli görüşler orta-ya atılmaktadır.



Blumenkrantz ve Hansen  $^{14}\text{C}$ -prolin içeren ortamda yaptıkları çalışmalarda hidrokortizon'un kollajen sentezini inhibe ettiğini tavuk embriyosu tibialarında  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin miktarının azalması ile göstermişlerdir (26). Betametazon-17-valerat'ın kollajen sentezi üzerine etkisi ise tavuk embriyosu tendon hücrelerinde çalışılmış ve bu bileşiğin  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin sentezini azalttığı saptanmış olup bu bulgular özellikle kollajen sentezinin inhibe olduğunun kanıtı olarak kabul edilmiştir (27).

Cutreneo ve Counts, triamsinalon diasetat'ın yeni doğmuş ratlara birkaç defa enjekte edilmesi ile deride  $^{14}\text{C}$ -prolin'in peptide katılmasının azaldığını ve aynı zamanda prolin hidroksilaz aktivitesindeki inhibisyona bağlı olarak  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin miktarının da azaldığını gözlemişler ve bu bulguların glükokortikoidlerin kollajen sentezi üzerine olan özgül etkisine bağlı olduğunu savunmuşlardır (28).

Uitto ve diğerleri, hidrokortizon asetat, fluosinolon asetonid, fluklorolon asetonid, betametazon-17-valerat ve flupredniliden-21-asetat'ın kollajen sentezi üzerine etkilerini tavuk embriyosu tibialarında incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, kullandıkları glukokortikoidlerin kollajen sentezine etkisini  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin oluşması üzerinden izlemişler ve tüm bileşiklerin, sentezi invivo olarak inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Ancak, betametozon-17-valerat kollajen sentezini invitro şartlarda daha yüksek oranda inhibe etmiştir. Bu çalışmada denenen bütün glukokortikoidlerin, total

protein sentezini de kollajen sentezi ile aynı oranda inhibe etmeleri dikkati çekmiş ve bu bileşiklerin etkilerinin protein sentezi inhibisyonu üzerinden olduğu kanısını uyandırmıştır (29).

Gene Uitto ve diğerleri hidrokortizon asetat ve çeşitli fulorlu glukokortikoidlerin insan derisindeki kollajen sentezi üzerine etkilerini incelemişler ve kullandıkları bütün glukokortikoidlerin kollajen sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği sonucuna varmışlardır (30).

Betametazon disodyum fosfat'ın rat granülasyon dokusunda kollajen sentezini belirgin bir şekilde inhibe ettiği bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiş ancak inhibisyonun mekanizması açıklanamamıştır (31). Daha sonraki bir çalışmada bu inhibisyonun prolil hidrosilaz enzimi üzerinden olmadığı belirtilmiştir (32).

Cruess ve Hong, kortizon'un kollajen sentezi ve aynı zamanda kollajen parçalanması (Kollajenolitik etki) üzerine etkisini rat bacak kemiklerinde incelemişler ve kollajen parçalanmasıyla,  $^{14}\text{C}$ -prolin'in  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin'e dönüşmesinin azalmasıyla kemik kollajen içeriğinin azaldığını gözlemişlerdir (33).

Diğer bir grup araştırmacı tavşanlara iki hafta süre ile sentetik bir glukokortikoid olan prednizon'u 2mg/kg olarak uygulamışlar ve çeşitli parametreleri incelemişlerdir. Prednizon enjeksiyonundan sonra deride protokollajen prolil hidrosilaz aktivitesini, nötral tuz çözeltisinde

çözünebilen hidroksi prolin, total hidroksiprolin, diyaliz olabilen ve olmayan  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin fraksiyonlarını azalmış olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada aorta'nın intima-media bölgesinde yapılan deney sonuçları ise, sadece  $^{14}\text{C}$ -hidroksiprolin sentezinin azaldığını göstermiştir. Bu araştırmacılar prednizon'un kollajen metabolizması üzerinde antianabolik etkisi olduğu görüşünü benimsemişler ve bu etkiyi protein sentezinin genel inhibisyonunun bir parçası olarak değerlendirmişlerdir (34).

Shapira ve Shoshan, gebe deney hayvanlarına kortizon uygulayarak bu ilacın fetustaki kollajen oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Kortizon'un etkisinin kollajen polipeptit zincirlerinin biyosentezi esnasındaki normal hidroksillenme tepkimeleri üzerinde olabileceği sonucuna varmışlardır (35).

Kortikosteroidlerin kollajen biyosentezini inhibe ettiğini gösteren çalışmaların yanısıra, kortikosteroidlerin etkisinin kollajen parçalanmasını arttırdığı veya kollajen sentezini stimüle ettiğini ileri süren yayınlar da vardır.

Cohen ve diğerleri yaptıkları çalışma sonunda hipotez olarak glukokortikoidlerin kollajen yıkımını arttırdığını önermişlerdir (36).

Tavuk embriyo fibroblastlarındaki kollajen sentezi üzerine çeşitli glukokortikoidlerin etkisinin incelendiği bir araştırmada, hidrokortizon süksinat'ın  $10^{-5}\text{M}$  derişimde

kollajen sentezinde hafif bir stimulasyon yaptığı gözlenmiş ancak hidrokortizon bütirat, prednizolon ve betametazon-17-valerat inhibitör etkide bulunmuştur. Bu çalışma sonunda araştırmacılar, hidrokortizon süksinat'ın kollajen sentezi üzerinde pek etkili olmadığını ve sentezi en etkin biçimde inhibe eden bileşiğin, betametazon-17-valerat olduğunu ileri sürmüşlerdir (37).

Harvey, Grahame ve Panayı, insan embriyonik deri ve kas fibroblast kültüründe çalışmışlar ve kortizol ile prednizolon'un, hücre proliferasyonu, DNA sentezi ve kollajen sentezine etkisini incelemişlerdir. Her iki steroid de 0.01-1.0µg/ml derişimde kollajen sentezini ve 0.01µg/ml derişimde DNA sentezini inhibe etmişlerdir. Daha yüksek steroid derişimleri DNA sentezini başkılarken hücre proliferasyonu hızında ancak çok ufak bir inhibisyon sağlamıştır (38).

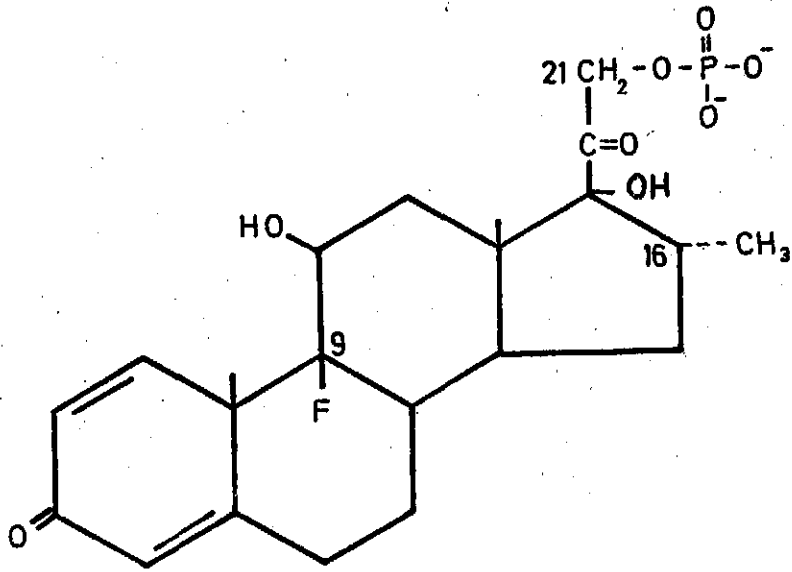
Nakagawa ve diğeri, antienflamatuvar ilaçlardan olan steroidlerin, invitro şartlarda granülasyon dokusunda, kollajen sentezi üzerinde koruyucu etkisine dikkati çekmişlerdir. Bu araştırmacılara göre, invitro çalışmalarda kollajen dışı proteinlerin sentezi çeşitli faktörlerden daha az etkilenirken kollajen biyosentezi genellikle deney şartlarından etkilenmektedir. Steroidler ise invitro deneylerde koruyucu bir etki yaparak gözlenen stimülasyonu sağlamaktadırlar (39). Bu görüşü desteklemeyen bir araştırma da sunulmuş ve insan fibroblast kültüründe kollajen sentezinin

koruyucu etki dışında bir mekanizma ile hidrokortizon sodyum süksinat tarafından stimüle edildiği belirtilmiştir. Ancak bu araştırmacılar stimülasyonun hangi mekanizma ile olduğu konusunda bir görüş getirmemişlerdir (40).

#### AMAC

Antienflamatuvar ilaç olarak geniş bir kullanım alanına sahip glukokortikoidlerin deneysel enflamasyon dokularında protein sentezini inhibe ettiği konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu bileşiklerin pek çoğunun kollajen biyosentezi üzerine etkileri incelenmiş ve yayınların çoğu denenen glukokortikoidlerin kollajen biyosentezini inhibe ettiğini, pek azı invitro şartlarda koruyucu bir etki yarattığını ve rasladığımız bir yayın da hidrokortizon süksinat'ın uyarıcı bir etki yarattığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada kollajen biyosentezi üzerine etkisi araştırılmamış olan bir prednizolon türevi 16 $\alpha$ -metil-9 $\alpha$ -fuloprednizolon-21-fosfat (Deksametazon-21 fosfat) seçilmiş ve bu ilacın 21 günlük rat paryetal kemik dokusunda kollajen biyosentezi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Deksametazon-21-fosfatın açık formülü aşağıda gösterilmiştir. (Şekil.2)



16 α - METİL - 9 α - FLOROPREDNİZOLON - 21 - FOSFAT  
( DEKSAMETAZON - 21 - FOSFAT )

şekil : 2

## ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Araçlar:

Deneylerde inkübatör (Dubnoff metabolic shaking incubator), radyoaktif sayaç (Mark II Liquid scintillation system), spektrofotometre (Zeiss PMQ2), santrifüj (Sorval Superspeed SS-33), kolorimetre (Coleman Junior Spectrophotometer), ve cam teflon homojenizatör kullanıldı.

### Gereçler:

Deneylerde kullanılan L(3,4-<sup>3</sup>H) prolin The Radiochemical Centre Amersham, deksametazon-21-fosfat DEVA, streptomisin ve penisilin Mustafa Nevzat, Sığır serum albumini (BSA) Armour pharmaceutical company, folin reaktifi (Folin and ciocalteu phenol reagent), naftalen ve dioksan BDH  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil ( $\alpha, \alpha'$ -DP), fenilmetilsülfonilfulorid (PMSF),  $\beta$ -aminopropiyonitril fumarat (BAPN), 2,5-fenil oksazol (PPO), ve 1,4-di-2-(5-difeniloksazolil)-benzen (POPOP) sigma Chem. Co, T.C. Minimal Essential Medium Eagle (MEM) DIFCO, p-toluensülfon-kloromid sodyum tuzu (Chloromin-T), p-dimetilaminobenzaldehit MERCK, hidroksiprolin standardı ise Nutritional Biochemical Co. Firmalarından temin edildi. Kullanılan diğer bütün kimyasal bileşikler analitik saflıktadır.

Yeni doğmuş (21 günlük) swiss albino ratlar cinsiyet farkı gözetilmeksizin H.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bölümünden temin edildi.

Yöntemler:

Sterilizasyon:

Deneylerde kullanılan bütün cam malzeme, bistüri, makas ve pensler 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Deneyin yapıldığı bölümün sterilizasyonu ise zefirana temizlenmiş ortamda bek alevi ile temin edildi.

Çözeltilerin hazırlanması:

Steril olarak temin edilen MEM ortamı hücrelerin veya organların minimum şartlarda yaşayabilmeleri için gerekli amino asitleri vitaminleri ve tuzları içermektedir.

Stok  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil çözeltisi alkol içinde  $3 \times 10^{-2}$  M hazırlandı. İnkübasyon ortamına son derişim  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP olacak şekilde ilave edildi (20,41).

Stok  $\beta$ -amino propiyonitril çözeltisi 25mg  $\beta$ -amino-propiyonitril 10 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Bu çözeltiden inkübasyon ortamına ml'de 50  $\mu$ g  $\beta$ -aminopropiyonitril (BAPN) olacak şekilde ilave edildi (42).

Stok fenilmetil sülfonilfulorid çözeltisi, 25 mg fenilmetilsülfonilfulorid 10 ml isoproponol içinde çözülerek taze olarak hazırlandı. Bu çözeltiden inkübasyon ortamına ml'de 50 $\mu$ g fenilmetilsülfonilfulorid (PMSF) olacak şekilde ilave edildi (43).

Deksametazon-21-fosfat çözeltisi, ml'sinde 4mg deksametazon-21-fosfat içeren çözelti, Dekort enjektabl



adı altında hazır olarak sağlandı. Bu çözelti,  $10 \times 10^{-3} \text{M}$  deksametazon-21-fosfat'a tekabül etmektedir. İnkübasyon ortamlarına son derişim  $10^{-3}$  ve  $10^{-6} \text{M}$  deksametazon -21-fosfat olacak şekilde ilave edildi.

Streptomisin penisilin çözeltisi (SP) steril stok çözelti olarak temin edildi. İnkübasyon ortamına ml'de 100IU penisilin ve 100µg streptomisin olacak şekilde ilave edildi. (44).

Sayım çözeltisi, 1000 ml dioksan içinde 7g PPO, 0,3g POPOP ve 100 g naftalen çözülerek hazırlandı. Karanlıkta saklandı (45).

Kloramin-T çözeltisi, asetat sitrat tamponu (PH.6.0) içinde kloramin-T'nin %7 W/V lık çözeltisidir (46).

Erlih çözeltisi, 2g p-dimetil aminobenzaldehit 3ml %60 perklorikasitte çözülüp üzerine 13 ml iso-propanol ilave edilerek taze hazırlandı (46). Karanlıkta saklandı.

Hidroksiprolin stok standart çözeltisi, 5mg siğir serum albümini ve 1.79 mg hidroksiprolin  $10^{-3} \text{M}$  hidroklorikasitte çözülerek hazırlandı, buzlukta saklandı (46). Bu çözeltiden 0,010 ml ve 0.020 ml hidroksiprolin tayinlerinde standart olarak kullanıldı.

#### Kafa Kemiklerinin Hazırlanışı:

Yeni doğmuş (21 günlük) ratların kafaları derhal kesilerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'da donduruldu. Deneylerde kullanılacağı zaman

kafalar, bistüri ve pens yardımı ile yukarıda belirtilen steril şartlarda açılarak paryetal kemikler çıkarılıp hızla doğrandı. Doğranmış kemikler üç defa MEM ile yıkandıktan sonra inkübasyon ortamına konulacak duruma getirildi.

Inkübasyon Ortamlarının Hazırlanması:

Bütün deneyler dört gurup halinde hazırlandı. Bir gurup için gerekli 8 paryetal kemik, bütün paryetaller ayrıldıktan sonra MEM içinde karıştırılıp rasgele seçildi. Dört gurubun ortak yanı 5 ml MEM içinde doğranmış paryetal kemikleri,  $10\mu\text{Ci L-(3,4-}^3\text{H)}$  prolin ve ml'de 100 IU pensilin,  $100\mu\text{g}$  streptomisin içermesidir.

1- Kontrol Gurubu:

Bu gurupda doğranmış paryetal kemikler, içinde  $10\mu\text{Ci L-(3,4-}^3\text{H)}$  prolin ve SP içeren 5 ml MEM'e kondu.

2- İnhibitör İçeren Gurup:

a)  $\alpha,\alpha'$ -dipiridil ile yapılan deneylerde, bu guruba kontrol gurubuna ilave olarak son derişim  $3 \times 10^{-4}\text{M}$  olacak şekilde  $\alpha,\alpha'$  dipiridil stok çözeltisinden ilave edildi (20,41).

b)  $\beta$ -aminopropiyonitril ve Fenilmetilsülfonilfulorid ile yapılan deneylerde, kontrol gurubuna ilave olarak son derişim  $50\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde  $\beta$ -aminopropiyonitril (42) ve fenilmetilsülfonilfulorid (42,43) stok çözeltilerinden ilave edildi.

### 3. İlaç İçeren Gurup:

Bu guruba, kontrol gurubuna ilave olarak son derişim  $10^{-3}$  ve  $10^{-6}$  M olacak şekilde deksametazon-21-fosfat'ın  $10 \times 10^{-3}$  M çözeltilisinden ilave edildi.

### 4. İlaç + İnhibitör İçeren Gurup:

a)  $\alpha, \alpha'$ -Dipiridil ile yapılan deneylerde inhibitörlü guruba ilave olarak son derişim  $10^{-6}$  ve  $10^{-3}$  M olacak şekilde deksametazon-21-fosfat'ın  $10 \times 10^{-3}$  M çözeltilisinden konu.

b)  $\beta$ -aminopropiyonitril ve fenilmetil sülfenil fulorid ile yapılan deneylerde, inhibitörlü guruba ilave olarak son derişim  $10^{-6}$  ve  $10^{-3}$  M olacak şekilde deksametazon-21-fosfat'ın  $10 \times 10^{-3}$  M çözeltilisinden konu.

$\alpha, \alpha'$ -Dipiridil ile yapılan deneylerde, BAPN ve PMSF ile yapılan deneylerden farklı olarak dört guruba da L-(3,4- $^3$ H) prolin,  $37^{\circ}\text{C}$ 'da yarım saat preinkübasyondan sonra konu (20-41).

Bütün deneylerde inkübasyon karışımları hazırlandıktan sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'da 16 saat yavaş hızda çalkalanarak Dubnof metabolik inkübatörde inkübe edildi.

### Reaksiyonun Durdurulması ve Diyaliz:

Inkübasyon süresi sonunda tüpler hızla buz içine konarak reaksiyon durduruldu. (47-49). Kemikler ortamdandan ayrılarak 0,1M asetik asit içinde  $4^{\circ}\text{C}$ 'da 30 dakika homojenize edildi. Homojenat ve ortamlar serbest  $^3$ H-prolin'in ve asetik asit fazlasının uzaklaştırılması için distile suya karşı diyalize

kondu, radyoaktivite kalmayıncaya kadar diyaliz suyu değiştirildi. Bundan sonra homojenat ve ortamların hacımları tesbit edilip, radyoaktivite sayımı ve protein tayinleri için numuneler alındı. BAPN ve PMSF ile yapılan deneylerde ortamlardaki hidroksi prolin tayinleri de bu işlemlerden sonra yapıldı.

#### Amonyum Sülfat Çöktürmesi:

$\alpha, \alpha'$ -Dipiridil ile yapılan deneylerde, dört gurubun da homojenatları 176 mg/ml (%30) katı amonyum sülfat ile 4°C'da bir gece çökmeğe bırakıldı (20,41).

BAPN ve PMSF ile yapılan deneylerde ise dört gurubunda homojenatları 114 mg/ml (%20) katı amonyum sülfat ile 4°C'da bir gece çökmeğe bırakıldı (42). Amonyum sülfat fazlasının uzaklaştırılması için homojenatlar 4°C'da distile suya karşı diyalize kondu. diyaliz suyu dört defa değiştirildikten sonra homojenatlar 4°C da 15000 rpm de 30 dakika santrifüjlendi. Çökelekler 1ml distile suda süspande edildi. Çökelek süspansiyonlarından radyoaktivite sayımı, protein ve hidroksiprolin tayinleri için numuneler alındı.

#### Radyoaktivite Ölçümleri:

Radyoaktif numunelerin 0,2 ml'si 10 ml, sayım solüsyonu içinde Mark II sıvı sayım yapan sayaçta sayıldı. Sayımlar 20 dakika süreyle takip edilip ortalamaları alındıktan sonra sayım/dakika (Count per minute, Cpm) olarak ifade edildi.

Protein Tayini:

Protein tayinleri Folin Ciocalteu metoduna göre yapıldı. (50). Standart protein olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

Protein Hidrolizi ve Hidroksiprolin Tayini:

$\alpha, \alpha'$ -Dipiridil ile yapılan deneylerde dört gurubun da homojenatlarının %30 derişimde amonyum sülfat ile çöken, çökelek süspansiyonlarından alınan numuneler özel tüplere kondu. Üzerine son derişim 6N Hidroklorik asit olacak şekilde asit ilave edildikten sonra tüplerin ağızları vakum altında kapatıldı ve  $120^{\circ}\text{C}$ 'da 6 saat hidroliz edildi (30,48). Hidrolizden sonra numuneler vakum altında kuruluğa kadar uçurulup, distile suda çözüldükten sonra hidroksiprolin tayinleri Bergman ve Loxley'in metoduna göre yapıldı (46).

BAPN ve PMSF ile yapılan deneylerde, dört gurubunda ortamları inkübasyon süresi sonunda ayrılıp, diyaliz edildikten sonra kuruluğa kadar uçuruldu, 1 ml distile suda çözülüp yukarıda belirtilen şekilde hidroliz edilip hidroksiprolin tayinleri yapıldı.

İstatistiksel Değerlendirme:

Deksametazon-21-fosfatın  $10^{-3}$  ve  $10^{-6}$  M dozda ve  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil'in  $3 \times 10^{-4}$  M derişimde kollajen sentezi üzerine etkisinin kontrola göre önemliliği Kruskal-Wallis Varyans Analizi yöntemi ile saptandı (51).

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[ \sum_{i=1}^j \frac{T_j^2}{n_j} \right] - 3(n+1)$$

Kruskal-Wallis formülü

Formülde;

$T_j$  : j. guruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı

(herbir guruptaki değerlerin)

$n_j$  : j. Guruptaki denek sayısı (her bir guruptaki)

$n$  : Toplam denek sayısıdır.

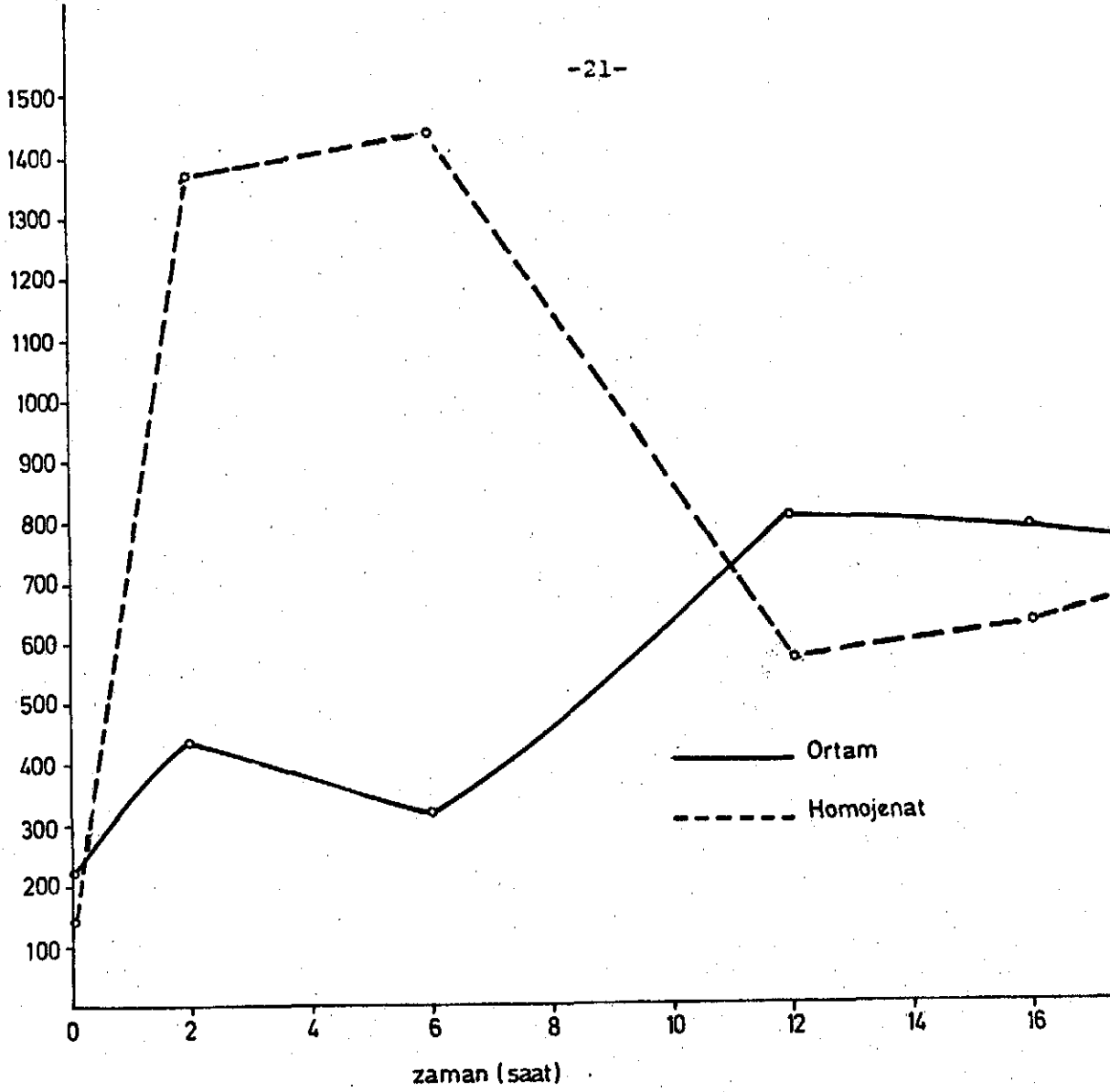
Yanılma olasılığı  $\alpha = 0.05$  seçilmiştir. Hesaplanan KW değeri (gurup sayısı-1) serbestlik derecesinde ve saptanan  $\alpha$  düzeyindeki tablo ki-kare değeri ile karşılaştırılmıştır.

## B U L G U L A R

### Inkübasyon Süresinin Saptanması:

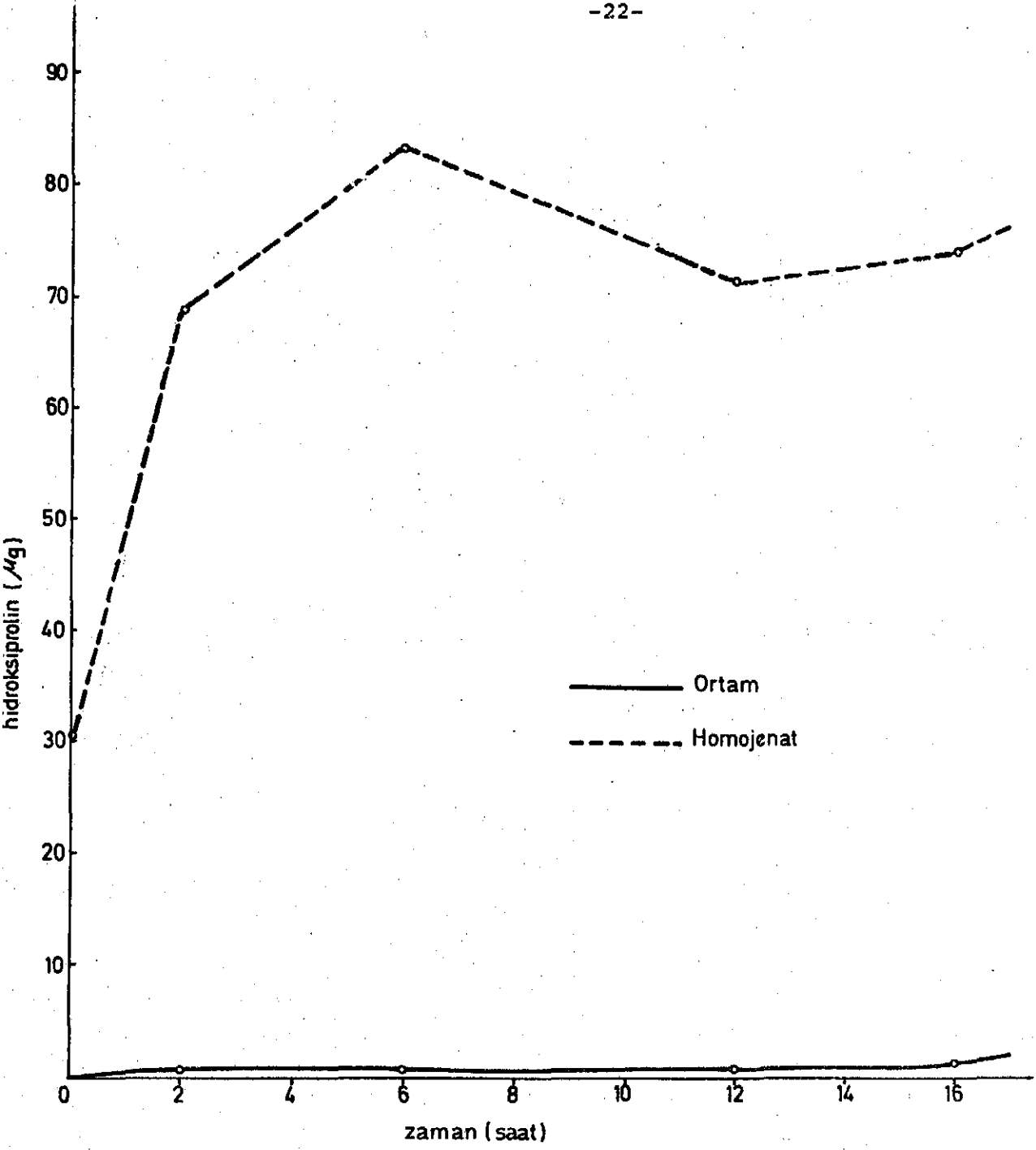
Belli zaman aralıklarında, homojenat ve ortamlardaki radyoaktivite, protein ve hidroksprolin değerlerini saptamak için deney beş gurup halinde yürütüldü. Her gurupta eşit yaş ağırlıkta paryetal kemikler, 10 $\mu$ Ci L-(3,4<sup>3</sup>H) prolin, 100IU pensilin + 100 $\mu$ g streptomisin/ml içeren 5 ml MEM içinde 37°C'da sabit hızla çalkalanarak inkübasyona kondu. Herbir gurupda kemikler inkübasyonun değişik zamanlarında ortamlardan ayrılarak 0,1M asetik asit içinde homojenize edildi. Diyalizden sonra homojenat ve ortamlara son derişim 114mg/ml (%20) olacak şekilde katı amonyum sülfat konularak prokollajen çöktürüldü. Homojenat ve ortamlar tekrar diyaliz edilerek, 15000 rpm'de 4°C'da 30 dakika santrifüjlendi. Çökelekler ayrılıp distile suda süspande edildi. Çökelek süspansiyonlarında yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi radyoaktivite, protein ve hidroksprolin ölçümleri yapıldı.

Bu koşullar altında ortamlardaki (<sup>3</sup>H) radyoaktivite, hidroksprolin ve protein miktarlarının yüksek olduğu 16. saat uygun inkübasyon süresi olarak saptandı. Şekil. 3'de homojenat ve ortamlarda radyoaktivitenin zamana bağlı olarak değişimi, Şekil.4'de homojenat ve ortamlarda hidroksprolin miktarının zamana bağlı olarak değişimi, Şekil.5.'de ise homojenat ve ortamlarda protein miktarının zamana bağlı olarak değişimi görülmektedir.

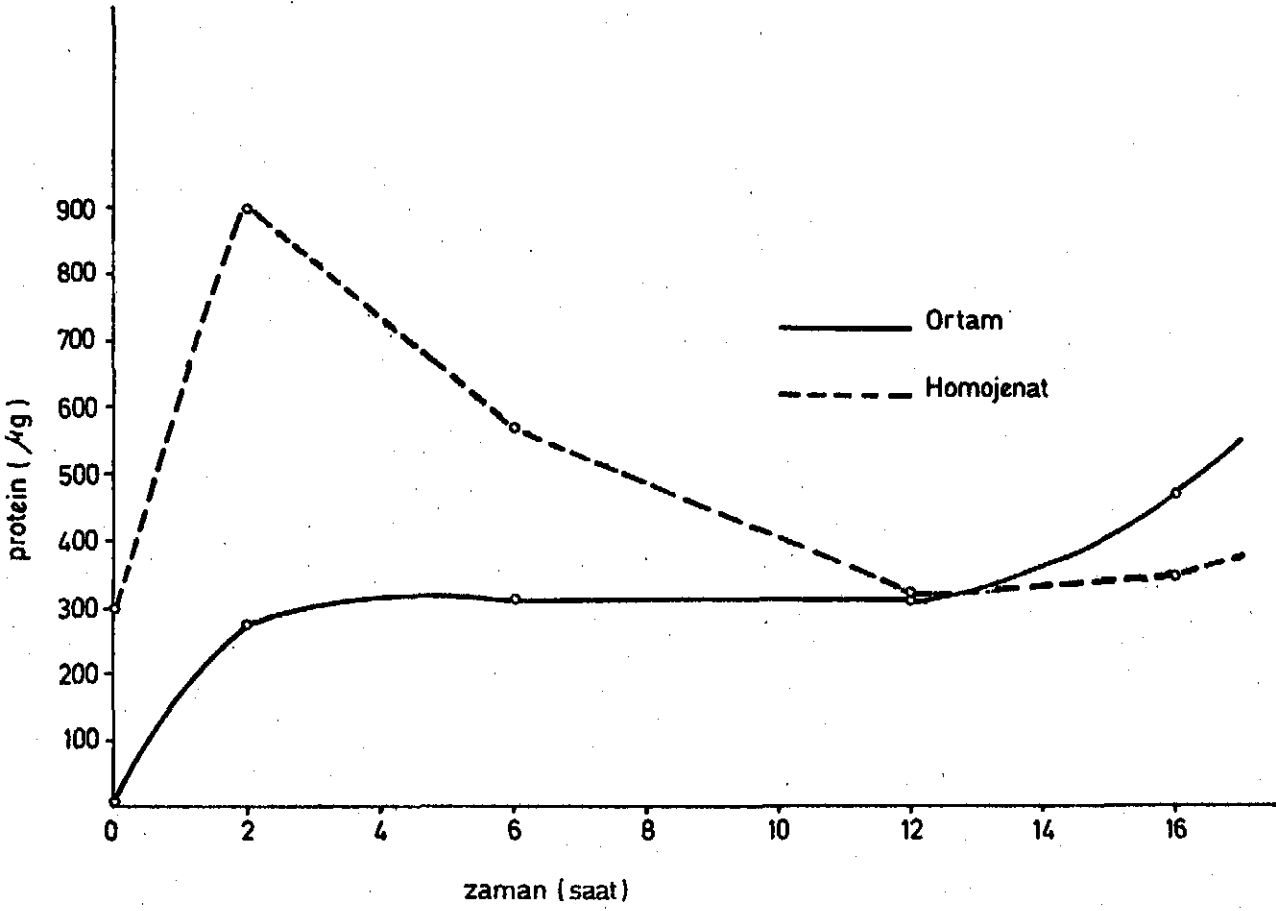


Şekil. 3: İnkübasyon ortamı, 5 ml MEM içinde  $10\mu\text{gCi L-(3,4-}^3\text{H)}$  prolin, SP ve paryetal kemikleri içermektedir. Radyoaktivite değerleri (cpm), homojenat ve ortamlardan %20 amonyum sülfat derişimi ile elde edilen çökelek süspansiyonlarına aittir.





Şekil. 4: İnkübasyon ortamı 5ml MEM içinde  $10\mu\text{Ci}$  L-(3,4- $^3\text{H}$ ) prolin, SP ve paryetal kemikleri içermektedir. Hidroksiprolin değerleri, homojenat ve ortamlardan %20 amonyum sülfat derişimi ile elde edilen çökelek süspansiyonlarının protein hidrolizatlarına aittir.



Şekil.5: Inkübasyon ortamı 5 ml MEM içinde  $10\mu\text{Ci}$  L-(3,4- $^3\text{H}$ ) prolin, SP ve paryetal kemikleri içermektedir. Protein değerleri ( $\mu\text{g}$ ) homojenat ve ortamlardan %20 amonyum sülfat derişimi ile elde edilen çökelek süspanşiyonlarına aittir.

$10^{-3}$  M Deksametazon-21-fosfat ve  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP'in 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki kollajen ve protein sentezi üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerinin karşılaştırılması:

---

Paryetal kemikler  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat,  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP veya her ikisini de içeren ortamlarda  $10 \mu\text{Ci}$  L-(3,4<sup>3</sup>H) prolin ile inkübe edildiğinde, Tablo.1. de görüldüğü gibi  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat ile homojenatların protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu\text{g}$  hidroksiprolin) ile gözlenen kollajen sentezinde kontrola oranla %45 bir inhibisyon vardır.  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP ile bu inhibisyon %44'dür. Her iki değer in önemliliği istatistikî yönden gösterilmiştir. [<sup>3</sup>H] prolin'in peptide katılımı ile gözlenen ve cpm/ $\mu\text{g}$  protein olarak ifade edilen protein sentezinde ise  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat ile kontrola oranla %34 bir inhibisyon vardır.  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP ise protein sentezini %19 inhibe etmiştir.

Tablo.1: 21 Günlük Rat Faryetal Kemiklerindeki Kollajen ve Protein Sentezi Üzerine

$10^{-3}$  M Deksametazon-21-Fosfat ve  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP'in Ayrı Ayrı ve Beraberce Etkileri.

Numune	Deksametazon-21-Fosfat derişimi (M)	Total [ $^3$ H] kollajen cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin	%	Total [ $^3$ H]Protein cpm/ $\mu$ g protein	%
Kontrol	-	64,6	100	2.64	100
Deksametazon-21- fosfat	$10^{-3}$	35.6*	55	1.75	66
$3 \times 10^{-4}$ M $\alpha, \alpha'$ -DP	-	36.4*	56	2.13	81
Deksametazon-21-fosfat + $3 \times 10^{-4}$ M $\alpha, \alpha'$ -DP	$10^{-3}$	35.9	56	1.48	56

Inkübasyon ortamları yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı. Inkübasyon süresi sonunda ortamlardan ayrılan kemikler 0.1M asetik asit içinde homojenize edildi. Diyalizden sonra homojenatlar 176mg/ml (%30) amonyum sülfat ile çöktürüldü. Tekrar diyaliz edilen homojenatlar 15000 rpm'de 4°C'da 30 dakika santrifüjlendi. Çökelek süspansiyonlarında radyoaktivite, protein ve hidroksiprolin ölçümleri yapıldı.

\* Değerlerin kontrola göre önemliliği saptandı.

KW = 8.751 Serbestlik derecesi = 3 p < 0.05

$10^{-6}$  M Deksametazon-21 fosfat ve  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP'in 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki kollajen ve protein sentezi üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerinin karşılaştırılması:

---

Paryetal kemikler  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat,  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP veya her ikisini de içeren ortamlarda  $10 \mu\text{Ci}$  L-(3,4- $^3\text{H}$ ) prolin ile inkübe edildiğinde, Tablo.2. de görüldüğü gibi  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ile homojenatların protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu\text{g}$  hidroksiprolin) ile gözlenen kollajen sentezinde kontrole oranla %48 bir inhibisyon vardır. Bu değer in de önemliliği istatistiki yönden gösterilmiştir. Bu inhibisyon  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP ile %44'dür.

Deksametazon-21- fosfatın bu derişimde ( $^3\text{H}$ ) prolin'in peptide katılımı ile gözlenen ve cpm/ $\mu\text{g}$  protein olarak ifade edilen protein sentezine ise belirgin bir etkisi yoktur.

Tablo.2: 21 Günlük Pat Paryetal Kemiklerindeki Kollajen ve Protein Sentezi Üzerine  $10^{-6}$  M Deksametazon-21-Fosfat ve  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP'in Ayrık Ayrık ve Beraberce Etkileri

Numune	Deksametazon-21-fosfat derişimi (M)	Total ( $^3$ H) Kollajen cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin	%	Total ( $^3$ H) Protein cpm/ $\mu$ g protein	%
Kontrol	-	64.6	100	2.64	100
Deksametazon-21-fosfat	$10^{-6}$	33.4*	52	2.46	93
$3 \times 10^{-4}$ M $\alpha, \alpha'$ -DP	-	36.4*	56	2.13	81
Deksametazon-21-fosfat + $3 \times 10^{-4}$ M $\alpha, \alpha'$ -DP	$10^{-6}$	32.1	50	2.51	95

İnkübasyon ortamları yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı. İnkübasyon süresi sonunda ortamlardan ayrılan kemikler 0.1M asetik asit içinde homojenize edildi. Diyalizden sonra homojenatlar 176mg/ml (%30) amonyum sülfat ile çöktürüldü. Tekrar diyaliz edilen homojenatlar 15000 rpm'de 4°C da 30 dakika santrifüjlendi. Çökelek süspansiyonlarında, radyoaktivite, protein ve hidroksiprolin ölçümleri yapıldı.

\* Değerlerin kontrola göre önemliliği saptandı.

KW = 8.751 Serbestlik derecesi = 3 p < 0.05

$10^{-3}$  M Deksametazon-21-fosfat ve 50 $\mu$ g/ml BAPN+50 $\mu$ g/ml PMSF'nin 21 günlük rat paryetal kemiklerinden ortama salınan prokollajen ve total protein miktarı üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerinin karşılaştırılması:

Paryetal kemikler  $10^{-3}$  M deksametazon-21- fosfat, BAPN+PMSF veya her üçünü de içeren ortamlarda 10 $\mu$ Ci L-(3,4- $^3$ H) prolin ile inkübe edildiğinde Tablo.3'de görüldüğü gibi  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat ile ortamların diyalizle uzaklaşmayan protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin) ile gözlenen prokollajen miktarı kontrola oranla %45 azalmıştır. BAPN ve PMSF'nin ortamdaki, prokollajen miktarına etkileri ise daha düşüktür.

$10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfatın'ın ortamdaki, ( $^3$ H) prolin'in peptide katılımı ile gözlenen ve cpm/ $\mu$ g protein olarak ifade edilen, diyalizle uzaklaşmayan protein miktarına belirgin bir etkisi yoktur.

Tablo.3: 21 günlük Rat Paryetal Kemiklerinden Ortama Salınan Prokollajen ve Total Protein Miktarı Üzerine  $10^{-3}$ M Deksametazon-21-Fosfat ve 50  $\mu$ g/ml BAPN+ 50  $\mu$ g/ml PMSF'nin

Ayrı Ayrı ve Beraberce Etkileri.

Numune	Deksametazon-21-fosfat derişimi (M)	Total ( $^3$ H) Prokollajen cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin %	Total ( $^3$ H) Protein cpm/ $\mu$ g protein %
Kontrol	-	9359	16.34
Deksametazon-21-fosfat	$10^{-3}$	5120	15.92
BAPN + PMSF	-	7474	19.90
Deksametazon-21-fosfat + BAPN + PMSF	$10^{-3}$	8229	23.00

Inkübasyon ortamları yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı. Inkübasyon süresi sonunda kemikler ortamlardan ayrıldı. Ortamlar diyaliz edildi. Radyoaktivite protein ve hidroksiprolin ölçümleri yapıldı.



$10^{-6}$  M Deksametazon-21-fosfat ve  $50\mu\text{g/ml}$  BAPN+ $50\mu\text{g/ml}$  PMSF'nin 21 günlük rat Paryetal kemiklerinden ortama salınan prokollajen ve total protein miktarı üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerinin karşılaştırılması:

---

Paryetal kemikler  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat BAPN + PMSF veya her üçünü de içeren ortamlarda  $10\mu\text{Ci}$  L-(3,4- $^3\text{H}$ ) prolin ile inkübe edildiğinde Tablo 4'de görüldüğü gibi  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ile ortamların diyalizle uzaklaşmayan protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu\text{g}$  hidroksiprolin) ile gözlenen prokollajen miktarı kontrola oranla %41 azalmıştır.  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat'ın inhibitörler ile birlikte prokollajen miktarına etkisi düşüktür.

$10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ortamdaki, ( $^3\text{H}$ ) prolin'in peptide katılımı ile gözlenen ve cpm/ $\mu\text{g}$  protein olarak ifade edilen diyalizle uzaklaşmayan protein miktarını ise kontrola göre % 15 azaltmıştır.

Tablo.4: 21 Günlük Rat Paryetal Kemiklerinden Ortama Salınan Prokollajen ve Total Protein Miktarı Üzerine  $10^{-6}$  M Deksametazon-21-Fosfat ve 50µg/ml BAPN + 50µg/ml PMSF'nin

Ayrı Ayrı ve Beraberce Etkileri

Numune	Deksametazon-21-Fosfat derişimi (M)	Total ( $^3$ H) Prokollajen cpm/µg hidroksiprolin	%	Total ( $^3$ H) Protein cpm/µg protein	%
Kontrol	-	9359	100	16.34	100
Deksametazon-21-fosfat	$10^{-6}$	5564	59	13.84	85
BAPN + PMSF	-	7474	80	19.90	122
Deksametazon-21-fosfat + BAPN + PMSF	$10^{-6}$	8304	89	17.86	109

İnkübasyon ortamları yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı. İnkübasyon süresi sonunda kemikler ortamlardan ayrıldı. Ortamlar diyaliz edildi. Radyoaktifite protein ve hidroksiprolin ölçümleri yapıldı.

Protokollajeni çöktürmek için uygun amonyum sülfat derişiminin saptanması:

BAPN + PMSF ile deksametazon-21-fosfat'ın özellikle prokollajeni içeren protein miktarına etkisinin incelendiği deneylerde, homojenatlarda prokollajeni içeren proteinlerin çöktürülmesi için daha önceden gösterilen 114 mg/ml (%20) amonyum sülfat derişiminin uygunluğu tarafımızdan da saptandı(42). Bu amaçla düzenlenen deneylerde homojenatlarda prokollajeni çöktürmek için %20 amonyum sülfat derişimi kullanıldı.

Tablo.5 de görüldüğü gibi homojenatlarda %20 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen ve özellikle prokollajeni içeren proteinin özgül aktivitesi (cpm/μg protein), %30 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen proteininkine oranla daha yüksektir.

Tablo.5 :

	%20. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		%30 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	Kontrol	50μg/mlBAPN+ 50μg/mlPMSF	Kontrol	50μg/ml BAPN+ 50μg/ml PMSF
Özgül Aktivite cpm/μg protein	2.82	1.77	1.94	1.44

İnkübasyon ortamları yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde hazırlandı. İnkübasyon sonunda ortamdan ayrılan paryetal kemikler 0.1M asetik asit içinde homojenize edildi. Homojenatlar diyaliz edildi. %20 veya %30 amonyum sülfat ile protein çöktürüldü. Tekrar diyaliz edildikten sonra 15000 rpm'de 4°C'da 30 dakika santrifüjlendi. Çökelek süspansiyonlarında, radyoaktivite ve protein ölçümleri yapıldı.

$10^{-6}$ ,  $10^{-3}$  M Deksametazon-21-fosfat'ın ve 50µg/ml BAPN+ 50µg/ml PMSF'nin 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki prokollajeni içeren protein sentezi üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerinin karşılaştırılması:

---

Paryetal kemikler  $10^{-6}$  veya  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat, BAPN + PMSF veya her üçünü de içeren ortamlarda 10µCi L-(3,4- $^3$ H) prolin ile inkübe edildiğinde Tablo.6'da görüldüğü gibi ( $^3$ H) prolin'in peptide katılması ile gözlenen ve cpm/µg protein olarak ifade edilen protein sentezi  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat'ile kontrola oranla değişmemiş ancak  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ile % 21 inhibe olmuştur.

Tablo.6:

Deksametazon-21-fosfatın ve 50µg/ml BAPN+ 50µg/ml PMSF nin 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki prokollajeni içeren protein sentezi üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkileri.

Numune	Deksametazon-21-fosfat derişimi (M)	Total (H <sup>3</sup> )protein cpm/µg protein	%
Kontrol	-	3.15	100
BAPN + PMSF	-	2.31	73
Deksametazon-21-fosfat	10 <sup>-3</sup>	3.31	105
Deksametazon-21-fosfat	10 <sup>-6</sup>	2.49	79
Deksametazon-21-fosfat + BAPN+ PMSF	10 <sup>-3</sup>	2.41	77
Deksametazon-21-fosfat + BAPN + PMSF	10 <sup>-6</sup>	2.97	94

inkübasyon ortamları yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı. Inkübasyon süresi sonunda ortamlardan ayrılan kemikler 0.1M asetik asit içinde homojenize edildi. Diyalizden sonra homojenatlar 114mg/ml (%20) amonyum sülfat ile çöktürüldü. Tekrar diyaliz edileh homojenatlar 15000 rpm'de 4°C'da 30 dakika santrifüjlendi, çökelek süspansiyonlarında radyoaktivite ve protein ölçümleri yapıldı.

## T A R T I Ş M A

Kollajen doku hastalıklarında glukokortikoidlerin tedavi edici etkisinin gözlenmesi üzerine bu olayın mekanizmasının açıklanabilmesi için invivo ve invitro çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Glukokortikoidlerin bir çoğunun kollajen biyosentezi üzerine etkileri incelenmiş ve yayınların büyük bir kısmı, denenen glukokortikoidlerin kollajen biyosentezini inhibe ettiğini (26-35) bazıları ise stimüle ettiğini savunmuşlardır (37,39,40). Glukokortikoidlerin kollajen sentezine etki şekli henüz kesin bir açıklığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada bir prednizolon türevi olan, 16 $\alpha$ -metil 9 $\alpha$ -fuloroprednizolon-21-fosfat (Deksametazon-21-fosfat)'ın iki ayrı dozda 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki kollajen biyosentezi üzerine etkisi önceki araştırmalara nazaran daha farklı bir yöntem ile incelenmiştir. Rat kemik dokusundaki kollajen biyosentezinin en hızlı olduğu devre 21. gündür (52). Ayrıca 21 günlük kemikler, teminindeki kolaylık ve standardizasyon bakımından en uygun olandır. Kollajen biyosentezinin henüz bir platoya ulaşmadığı, hızla arttığı devrede deneylerin sağlıklı bir biçimde yorumlanması bakımından sentezin aynı kısmına ait gündeki dokunun kullanılması, kontrol yönünden çok önemlidir.

Önce L-<sup>3</sup>H-Prolin'in peptide girmesi ve radyoaktif proteinlerin ortama salınması için gerekli süre saptandı. Şek. 3,4 ve 5'de görüldüğü gibi, ortama salınan radyoaktif

proteinin incelenmesi için en uygun inkübasyon süresi 16 saat bulundu. Bu çalışmada homojenatta kalan radyoaktif proteinin ölçüldüğü deneylerde de inkübasyonlar 16 saat süre ile yapılmıştır. Bunlar  $\alpha, \alpha'$ -DP inhibitörü ile yapılan deneyler olup, işaretli preprokollajenin hücre içinde birikmesini gözleyebilmek amacı ile yapılmıştır. Benzer deneyleri 10 saat (30) ve 24 saat (48) inkübasyon sürelerinde yapan araştırmacılar vardır.

Deksametazon-21-fosfat ve  $\alpha, \alpha'$ -DP ile yapılan deneylerde kemik homojenatlarındaki preprokollajeni çöktürmek için kullanılan amonyum sülfat derişimi olan 176 mg/ml (%30) daha önceki çalışmalarda da aynı amaç ile kullanılmıştır (20,41).

PMSF ve BAPN ile yapılan deneylerde ise, PMSF proteolitik aktiviteyi, BAPN çaprazlaşmayı önleyeceği için buradan izole edilecek protein (Prokollajen)'in yapısı bir önceki deneydekinden farklıdır. Çünkü bu yapı hidrosillenmiş prolin ve lizinleri ve bunlara bağlı şeker ünitelerini taşımaktadır. Bu nedenlerle de farklı amonyum sülfat derişiminde çökecektir. Yapılan deneyler sonucu Tablo. 5'de görüldüğü gibi gerekli amonyum sülfat derişimi 114 mg/ml (%20) olarak saptanmıştır. Bu miktar Lichtenstein tarafından da aynı amaçla kullanılan amonyum sülfat derişimidir (42).

Deneylerde kullanılan  $\alpha, \alpha'$ -DP derişimi daha önceki araştırmacıların kullandığı  $3 \times 10^{-4}$  M (20,41) dir. Yaptığımız deneylerle daha yüksek derişimde  $\alpha, \alpha'$ -DP ile daha fazla

bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Bu ön çalışmalardan sonra ilk olarak iki ayrı dozda Deksametazon-21-fosfat ve  $\alpha, \alpha'$ -DP'in rat paryetal kemiklerindeki kollajen ve total protein sentezi üzerine ayrı ayrı ve beraberce etkilerini inceledik.  $10^{-3}$ M deksametazon-21-fosfat'ın, kemik homojenatlarının protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin) ile gözlenen kollajen sentezini kontrola oranla %45,  $10^{-6}$ M deksametazon-21-fosfat'ın ise %48 inhibe ettiğini saptadık.  $3 \times 10^{-4}$ M derişimde  $\alpha, \alpha'$ -DP ile ise bu inhibisyon %44 dür ve bu evvelcede belirtildiği gibi prolii hidroksilaz enziminin inhibisyonuna bağlıdır (26-28). Aynı sistemde  $10^{-3}$ M deksametazon-21-fosfat'ın ( $^3$ H) prolin'in peptide katılması ile gözlenen ve cpm/ $\mu$ g protein olarak ifade edilen total protein sentezini %34 inhibe ettiği,  $10^{-6}$ M deksametazon-21-fosfat'ın ise bu sentezi %7 gibi kontro- la göre önemsiz bir oranda inhibe ettiği gözlenmiştir.  $3 \times 10^{-4}$ M  $\alpha, \alpha'$ -DP'in ise protein sentezini de %19 inhibe etmesi, zaman içinde biriken preprokollajen'in kendi sentezini inhibe etmesinden ileri gelmektedir (14).  $10^{-3}$ M deksametazon-21-fosfat'ın,  $3 \times 10^{-4}$ M derişimde  $\alpha, \alpha'$ -DP ile birlikte kollajen sentezini %44 azaltması, inhibitör ve ilacın birbirinin si- nerjist veya antagonisti olmadığını gösterir.

BAPN ve PMSF ile yapılan deneyler, Deksametazon-21 fosfat'ın iki ayrı dozda ( $^3$ H) prokollajen'in ortama salın- masına bir etkisi olup olmadığını incelemek amacı ile yapılmıştır.



mıştır. Bu gurup çalışmalarda ortamların protein hidrolizatlarındaki hidroksiprolin ve bu hidroksiprolin'in özgül aktivitesi (cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin) ile gözlenen prokollajen miktarı  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat ile %45,  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ile ise %41 azalmıştır. İlacın her iki dozunda ortamdaki prokollajen miktarındaki bu düşüşler, prokollajen'in salınımının azalmasına bağlı olmayıp muhtemelen daha önceki kademeler olan ( $^3$ H) prolin'in peptide katılmasının ve hidroksilasyonun inhibisyonuna bağlıdır. Bu bulgu glukokortikoidlerin kollajen sentezi üzerine etkisini inceleyen diğer araştırmacıların da önerdikleri inhibisyon mekanizmasına uygundur (27-29).

Bu gurup deneylerde ortamlardaki, cpm/ $\mu$ g protein olarak ifade edilen total protein miktarları ilacın her iki dozunda da belirgin olarak etkilenmemiştir. BAPN ve PMSF ile ise ortamdaki total protein miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu BAPN ve PMSF'nin genel protein sentezini stimüle etmesinden çok ortamda kontrole oranla çözünür protein (nötral ortamda çözünür prokollajen)'in artmış olmasına bağlanabilir.

$10^{-6}$  ve  $10^{-3}$  M deksametazon-21-fosfat ve BAPN + PMSF'in 21 günlük rat paryetal kemiklerindeki ( $^3$ H) prolin'in peptide katılması ile gözlenen ve cpm/ $\mu$ g protein olarak ifade edilen protein sentezine, ayrı ayrı ve beraberce etkileri karşılaştırıldığında, total protein sentezinin BAPN + PMSF ile %27 inhibe olduğu,  $10^{-3}$  M deksametazon-21 fosfat'dan etkilenmediği,  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat ile ise %21 inhibe olduğu görül-

mektedir. Bu gurup deneylerde, bizim için ortamda saptanan değerler daha kıymetlidir. Ancak  $10^{-6}$  M deksametazon-21-fosfat in ortam ve homojenatlardaki protein sentezi üzerine etkileri karşılaştırılacak olursa ortamdaki azalma %15 homojenattaki ise %21 dir.

Bu çalışmada olduğu gibi kollajen sentezine glukokortikoidlerin etkisinin incelendiği diğer bazı çalışmalarda da, kollajen sentezi işaretli hidroksiprolinin özgül aktivitesi (cpm/ $\mu$ g hidroksiprolin) üzerinden, protein sentezi ise total proteinin özgül aktivitesi (cpm/ $\mu$ g protein) olarak ifade edilmiş ve böylece elde edilen bulgular yorumlanmıştır (29, 30, 33, 52). Bulguların bir inhibitörün etkisi ile mukayesesi ve oluşan radyoaktif preprokollajen veya prokollajen miktarının, tuz çöktürmesi ile daha özgül olarak ifade edildiği deneylere raslanmamıştır.

1976'da Blumenkrantz ve diğerleri (26) embriyonik kemik dokusu ile yaptıkları bir çalışmada hidrokortizon asetat'ın kollajen sentezine etkisini kemik homojenatlarındaki, doku ağırlığı başına  $^{14}$ C-hidroksiprolin ve  $^{14}$ C-hidroksilizin miktarları ile ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise doku ağırlığı yerine, özgül amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen protein miktarının kullanılması kollajen sentezinin inhibisyonunu daha özgül olarak gösterirken eğer ilacın genel protein sentezi üzerine inhibitör etkisi varsa bu yanılığın ortadan kaldırmaktadır.

Böylece bu çalışmada deksametazon-21-fosfat'ın kollajen biyosentezini inhibe ettiği ve bu inhibisyon'un iki türlü olabileceği kanısına varıldı. Bunlardan biri ilacın genel protein sentezini inhibe etmesine bağlı olarak hidroksilaz enzimlerinin sentezinin azalması dolayısıyla indirek yoldan hidroksilasyonun azalmasına bağlanabilir. Diğer ise özgül inhibitörler gibi ( $\alpha, \alpha'$ -DP) doğrudan prolil hidroksilaz enzimi üzerine inhibitör etki yapmasına bağlanabilir Hidroksilasyonun inhibe olduğu ilacın her iki dozu ile ve her iki inhibitörlü deney guruplarıyla gösterilmiştir. Genel protein sentezinin inhibisyonu ise doza bağımlı olarak değişiklik göstermektedir.

Ö Z E T

L-(3,4-<sup>3</sup>H) Prolin kullanılarak 21 günlük rat pariyetal kemiklerinde yeni sentezlenen kollajen üzerine bir prednizolon türevi olan deksametazon-21-fosfat'ın iki ayrı dozda etkisi incelenmiştir. Kollajen sentezini iki kademe de inhibe etmek suretiyle ilacın etkisi inhibitörlerin etkisi ile karşılaştırılmıştır.  $3 \times 10^{-4}$  M  $\alpha, \alpha'$ -DP ile hücre içinde biriken, <sup>3</sup>H-prolin taşıyan preprokollajen miktarı, %30 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu homojenat da tayin edilen hidroksprolin'in spesifik aktivitesi üzerinden ifade edilmiştir. BAPN ve PMSF inhibitörlerinin kullanıldığı deneylerde ise ilacın ortama salınan proteinlere ve prokollajen'e etkisi incelenmiştir.

Deksametazon-21-fosfat'ın kullanılan her iki dozda da kollajen biyosentezini hidrokasilasyon kademesinde inhibe ettiği olasılığı önem kazanmıştır.

K I S A L T M A L A R

- $\alpha, \alpha'$ -DP :  $\alpha, \alpha'$ -Dipiridil  
BAPN :  $\beta$ -Aminopropiyonitril  
PMSF : Fenilmetilsülfonilfulorür  
SP : Streptomisin penisilin

K A Y N A K L A R

1. Fessler, H, J. ve Fessler, I.L. 1978  
Ann. Rev. Biochem. 47: 129-62.
2. Lazarides, E. ve Lukens, L.L. 1971  
Nature New Biol. 232: 37 -40
3. Kretsinger, R, H., Manner, G., Gould, B,S. ve Rich, A. 1964  
Nature 202: 438-41.
4. Bankowski, E. ve Mitchell, V.M. 1973  
Biophys. Chem 1: 73-86.
5. Bornstein. P. 1974  
Ann Rev. Biochem 43: 567-603.
6. Tuderman, L., Kuutti, E, R. ve Kivirikko, K.I. 1975  
Eur. J. Biochem 52: 9-16.
7. Tryggvason, K., Risteli, J. ve Kivirikko, K.I. 1977  
Biochem, Biophys. Res. Commun, 76: 275-81.
8. Ryhanen, L., 1976.  
Biochem. Biopys. Acta. 438:71-89
9. Halme, J., Kivirikko, K.I. ve Simons, K. 1970  
Biochem, Biophys. Acta, 198: 460-70.
10. Rhoads, R, E. ve Udenfriend, S. 1970.  
Arch, Biochem. Biophys. 139: 229-39.

11. Berg, R, A. ve Prockop, D.J. 1973  
J. Biol, Chem, 248:1175-82.
12. McGee, J, O. ve Udenfriend, S. 1972.  
Arch. Biochem, Biophys. 152: 216-21.
13. Robert, L., Margolis, L., ve Lukens N. 1971.  
Arch. Biochem. Biophys. 147: 612-18.
14. Grant, M, E. ve Prockop D,J. 1972  
New, Eng. J. Med. 286: 194 -99
15. Raili Myllyla. 1976  
Eur. J. Biochem. 70:225-31.
16. Grant, M, E. ve Prockop, D,J. 1972  
New, Eng.J. Med. 286: 242-49, 291-300.
17. Duskin, D. ve Bornstein, P. 1977  
J. Biol. Chem. 252: 955-62
18. Fessler, J, H. ve Doege, K, J. 1977  
Fed. Proc. 36: 680.
19. Prockop, D, J. ve Juva, K. 1965.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 53: 661-68.
20. Jimenez, S, A., Dehm, P. ve Prockop. D, J. 1973  
J. Biol. Chem. 248: 720-29.
21. Kerwar, S, S. ve Felix, A, M. 1976.  
J. Biol.Chem. 251: 503-509.
22. Bora, F, W., Lane, M. ve Prockop, D, J. 1972  
J. Bone, Joint Surg. 54: 1501-1508.
23. Bornstein, P. 1970.  
Am. J. Med. 49: 429-35.

24. Siegel, R, C. ve Martin, G.R. 1970  
J.Biol. Chem. 245: 1653-1658.
25. Desmukh, Nimni ve Kalindi. 1969  
J. Biol. Chem. 244: 1787-1795.
26. Blumenkrantz, N. ve Hansen, G, A. 1976  
Acta Endocrinologica 83: 673-83.
27. Okarinen, A. 1977  
Biochem. Pharmacol. 26: 875-79.
28. Cutreneo, K, R. ve Counts, D.F. 1975  
Mol. Pharmacol., 11: 632-39.
29. Uitto, J. ve Mustakallio, K.K. 1971  
Biochem. Pharmacol. 20: 2495-503.
30. Uitto, J., Teir. H. ve Mustakallio, K.K. 1972.  
Biochem Pharmacol. 21: 2161-2167.
31. Nakagawa, H., Fukuhara, M. ve Tsurufuji, S., 1971  
Biochem. Pharmacol. 20: 2253-56
32. Nakagawa, H. ve Tsurufuji, S. 1972  
Biochem. Pharmacol. 21: 1884-1886
33. Cruess, R.L. ve Hong. K.C., 1975.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148: 887-890.
34. Manthorpe, R., Helin, G., Kofod, B. ve Lorenzen, I. 1974  
Acta Endocrinologica 77: 310-324.
35. Shapira, Y. ve Shoshan, S. 1972  
Archs oral Biol. 17: 1699-1703.
36. Cohen, K.I., Diegelmann, R.F. ve Johnson, M.L. 1977  
Surgery 82: 15-20



37. Saarni, H. ve Hopsu-Havu, V.K. 1972  
J. Bone and Joint Surgery 54: 566-567.
38. Harvey, W., Grahame, R. ve Panayi, G.S. 1974  
Ann. rheum. Dis. 33: 437-440.
39. Nakagawa, H., Ikeda, M. ve Tsurufiji, S. 1975.  
J. Pharm. Pharmacol. 27: 794-796.
40. Doherty, N.S. ve Saani, H. 1976.  
J. Pharm. Pharmacol. 28: 656-57.
41. Prockop, D, J. ve Berg, R.A. 1973.  
Biochemistry. 12: 3395-401.
42. Lichtenstein, R.J. ve Byers, H.P. 1975.  
Biochemistry. 14: 1589-94
43. Rhoads, R.E., Roberts, N, E. ve Udenfriend. S.  
"Methods in Enzymology" Colowick, S, P., Kaplan, N.O.  
(Derleyenler). Acad Press, New York and London.  
Cilt XVIII.B Sayfa 313 (1971).
44. Weir, D.M. 1978  
Handbook of Experimental Immunology Cilt.2 Cellular  
Immunology.
45. Snyder ve Fred.  
Atomlight, No 58 February 1967.
46. Bergman, I. ve Loxley, R. 1963.  
Anal. Chem. 35: 1961-65
47. Aalto, M. ve Kulonen, E. 1972  
Biochem. Pharmacol. 21:2835-40.
48. Srivastava, R., Lefebvre, N. ve Onkelinx, C. 1976  
Toxicology and Applied Pharmacology. 37: 229-35

49. Diegelmann, F, R., Rothkopf, L, C. ve Cöhen, K. 1975.  
J. Surg. Res. 19: 239-43.
50. Lowry, O,H., Rosebrough, N, J., Farr, A.L. ve Randall,  
R.J. 1951.  
J. Biol, Chem, 193:265.
51. Sümbülođlu, K. 1978  
Sağlık bilimlerinde araştırma teknikleri ve istatistik  
sayfa 153-56
52. Pietrich, J.W., Raisz, L, G., Canolis, E.M. ve Maina,  
D.M. 1976.  
Endoc. 98:943-49.