

9000

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Biokimya Anabilim Dalı

HEMOGLOBİN ve ELASTİNİN  
NONENZİMATİK GLİKOZİLENMELERİ ÜZERİNE  
AMİNOGUANİDİN ETKİSİNİN  
İN VİTRO İNCELENMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Sabiha CİVELEK

Biolog



İstanbul - 1989

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

## T E Ő E K K Ü R

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime olanak sağlayan Biokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. NEVZAT BABAN'a;

Çalışmalarımın her aşamasında içten ilgi, yardım ve desteklerini gördüğüm, değerli bilgi ve fikirlerinden her zaman yararlandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. GÜLDEN CANDAN'a;

Eğitimim süresi içinde değerli bilgilerinden yararlandığım diğer hocalarım, yakın ilgi ve desteği ile daima yanımda olan can arkadaşım Sayın Doç. Dr. Nurhayat SÜTLÜ-PINAR'a teşekkürlerimi sunuyorum.

**Sabiha CİVELEK**

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	Sayfa No
I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARI	3
1.1. Enzimatik Glikozillenme Reaksiyonları	3
1.2. Nonenzimatik Glikozillenme Reaksiyonları	4
1.2.1. Nonenzimatik Glikozillenme Reaksiyon Hızını Etkileyen Faktörler	7
1.2.2. Nonenzimatik Glikozillendiği Saptanan Proteinler	8
1.2.3. Proteinlerin Nonenzimatik Glikozillenme Sonucu Değişime Uğrayan Özellikleri	9
2. HEMOGLOBİN ve ÖZELLİKLERİ	9
2.1. Glikozillenmiş Hemoglobin	11
2.1.1. Glikozillenmiş Hemoglobinin Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri	11
2.1.2. Glikozillenmiş Hemoglobinin Klinik Önemi	13
2.1.3. Glikozillenmiş Hemoglobin Parametresinin Ölçümü	15
3. ELASTİN ve ÖZELLİKLERİ	18
3.1. Glikozillenmiş Elastin	18

4. NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARININ İNHİBİSYONU	20
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
5. GEREÇLER	24
6. KİMYASAL MADDELER	24
7. ÇÖZELTİLER	25
7.1. Dulbecco Çözeltisi	25
7.2. Earle Çözeltisi	25
7.2.1. Earle A Çözeltisi	25
7.2.2. Earle B Çözeltisi	25
7.3. 0.15 M Sodyum Klorür Çözeltisi	25
7.4. 0.5 M Oksalik Asid Çözeltisi	26
7.5. % 40 Triklorasetik Asid Çözeltisi	26
7.6. 0.05 M Tiobarbitürik Asid Çözeltisi	26
7.7. 0.1 N Sodyum Hidroksid Çözeltisi	26
7.8. Standart Fruktoz Çözeltisi	26
7.8.1. Stok Standart Çözelti	
7.8.2. Çalışma Standart Çözeltileri	26
7.9. Hemoglobin Analizi İçin Kullanılan Hemoglobin Kitinde (Boehringer Mannheim Gmbh kat No:124729) Bulunan Çözelti	27
7.10. Hemoglobin Analizinin Standardizasyonunda Kullanılan Siyanmethemoglobin Standart Setinde (Boehringer Mannheim Gmbh kat No: 125482) Bulunan Çözelti	27
IV. MATERYEL	28
V. YÖNTEMLER	29

	Sayfa No
8. İNKÜBASYON DENEYLERİ	29
8.1. Hemoglobinin Nonenzimatik Glikozillenmesi Üzerine Aminoguanidin Etkisinin İncelenmesi	29
8.2. Elastinin Nonenzimatik Glikozillenmesi Üzerine Aminoguanidin Etkisinin İncelenmesi	30
9. HEMOLİZATLARDA HEMOGLOBİN KONSANTRASYONUNUN SAPTANMASI	32
10. HEMOGLOBİNİN GLİKOZİLLENME DEĞERİNİN SAPTANMASI	33
11. ELASTİN GLİKOZİLLENME DEĞERİNİN SAPTANMASI	34
12. BULGULARIN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ	36
VI. BULGULAR	37
13. HEMOGLOBİNİN İN VİTRO NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME BULGULARI	37
14. ELASTİNİN İN VİTRO NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME BULGULARI	44
VII. İRDELEME ve SONUÇ	48
VIII. ÖZET	53
IX. KAYNAKLAR	54

## I. GİRİŞ ve AMAÇ

Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları ile proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişim olduğunu bildiren çok sayıda araştırma vardır (7,13,16,19,24,25,34,37). Proteinlerden ayrı olarak nükleik asitlerin de, nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları ile modifikasyona uğradıkları bildirilmiştir (21).

Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının katarakt, nöropoti, nefropati, retinopati mikro ve makroangiopatilerin etiyojilerinde önemli olabilecekleri birçok araştırmacı tarafından öne sürülmektedir (7,9,19,33,34). Bilindiği gibi bu komplikasyonlar diabetiklerde ve yaşlılarda sıklıkla görülen komplikasyonlardır (21). Nondiabetiklerde genellikle ileri yaşlarda görülen bu komplikasyonlar, diabetiklerde özellikle kan glukoz düzeyi yüksek seyredenlerde daha erken yaşlarda görülebilmektedir. Bu yaklaşımla, fizyolojik bir olay olan yaşlanmayı diabetin hızlandırdığı kabul edilmektedir (21).

KontROLSUZ olarak gerçekleştiği bilinen nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları ile oluşan erken ve ileri glikozillenme ürünlerinin birikim miktarını belirleyici etkenler glisemi yüksekliği ve birikim süresidir. Uzun ömürlü proteinler üzerindeki nonenzimatik glikozillenme ürün birikiminin, nondiabetiklerde, yaşlanmaya bağlı olarak artması fizyolojik bir olaydır. Diabetiklerde ise hiperglisemi nedeni ile sözkonusu birikim fizyolojik düzeylerin üzerine çıkar. Diğer bir deyişle nondiabetiklerde ileri yaşlarda ulaşılan birikim düzeyine diabetiklerde daha erken yaşlarda ulaşılır.

Nondiabetiklerde ileri yaşlarda, diabetiklerde ise daha erken yaşlarda görülebilen katarakt, nöropati, nefropati, retinopati mikro ve makroangiopatilere yol açma olasılığı farklı araştırmacılar tarafından öne sürülen nonenzimatik glikozillenme ürün birikiminin, düşük düzeyde tutulmasının çok büyük önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Diabetiklerde birikimin, metabolik kontrolün sağlanması ile ancak aynı yaşlardaki nondiabetiklerdeki düzeye kadar azaltılabileceği teorik olarak düşünülebilir. Ancak bu birikimin tamamen engellenme olasılığı var mıdır? Bu olasılığı düşünen araştırmacılar tarafından **aminoguanidin** (6,8,21), **asetil salisilik asid** (3,49), **D-lizin** (51), **1-benzil-3-imidazol oksidasetik asid**'in sodyum tuzu (10) ve **ketoaldehid dehidrogenazın** (42) albumin, kollajen, hemoglobin, fibrinojen gibi proteinlerin ve glomerul bazal membranın nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine inhibitör etki gösterip göstermedikleri araştırılmıştır.

Literatür araştırması, bu konuda sınırlı sayıda, çalışma yapılmış bulunduğunu göstermiştir.

Yaşlılarda ve diabetiklerde sıklıkla görülen komplikasyonların önlenmesi amacıyla yönelik bu araştırmaların önemi büyüktür. Bu düşünce ile programlanan bu tez çalışmasında globuler yapıda çözünen bir protein olan hemoglobin ile bir skleroprotein olan elastinin **in vitro** nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine aminoguanidinin etkileri incelenmiştir.

## II. GENEL BİLGİLER

### 1. GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARI

Karbohidrat molekülleri protein moleküllerine enzimatik ve nonenzimatik reaksiyonlarla bağlanarak, proteinleri posttranslasyonel değişime uğratırlar.

#### 1.1. ENZİMATİK GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARI

Glikozil transferazların etkinliğinde proteinlerin serin, treonin, hidroksilizin aminoasidlerine O-glikozid bağı ile, asparagine ise N-glikozid bağı ile galaktoz, mannoz, fukoz ve N-asetilglukozamin, N-asetilmannozamin ve sialik asidlerin bağlanması sonucunda glikoproteinler oluşurlar (7,19,34).

Golgi aygıtında glikozil transferazların etkinliğinde  $Mn^{++}$  iyonları varlığında ve dolikol fosfatın kofaktör olarak kullanıldığı biosentezlerde, N-Glikozid bağı; fosforillenmiş karbohidrat moleküllerinin kullanıldığı biosentezlerde ise, O-Glikozid bağı oluşmaktadır (2,34,53).

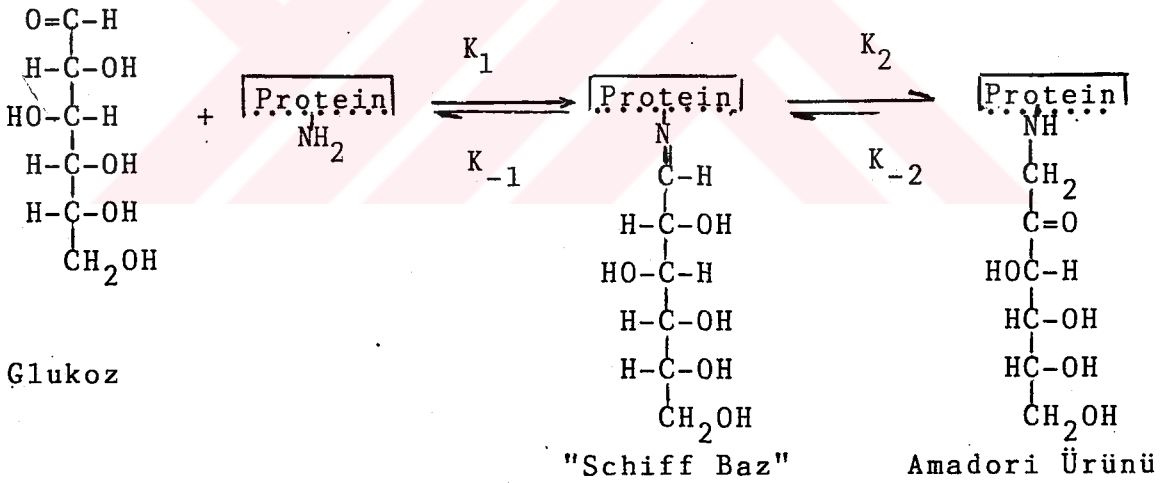
Biosentezleri kontrol altında gerçekleşen glikoproteinler yapısal, taşıyıcı, hormonal, enzimatik, reseptör fonksiyonlu oldukları gibi, hücre ve dokulara özgün anti-jenik karakter kazandırma, kayganlaştırıcı ve koruyucu mukoz salgıların temel bileşenlerini oluşturma gibi özelliklere de sahiptirler (16,36).



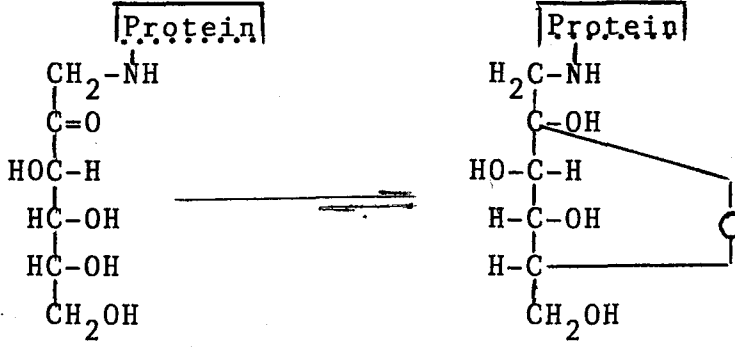
## 1.2. NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARI

Proteinlerin N terminal amino gruplarına ve lizin amino asidlerine ait amino gruplarına glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, fruktoz, riboz, sialik asidler ve bazı heksozların fosforillenmiş şekilleri serbest karbonil grupları ile bağlanırlar. Bağlanma glikoprotein oluşumundan farklı olarak glikozid bağları aracılığı ile olmaz. Amino grubunun, karbonil grubu üzerine nukleofilik bir atak yapması ile oluşan ilk kovalan ürün aldimin yapıları "Schiff baz"dır.

Labil olan "Schiff baz" birinci reaksiyona göre daha yavaş ve daha az tersinir olan ve "Amadori çevrilmesi" olarak adlandırılan bir reaksiyonla ketoamin yapıları Amadori ürününe dönüşür (6,7,19).



Hemoglobinin  $\beta$  N terminal pozisyonlarda glukoz ile oluşan ve bir Amadori ürünü olan HbA<sub>1c</sub>'nin diğer ketoamin bağlı glukoz bileşikleri gibi büyük oranda halkasal konformasyonda bulunduğu bildirilmiştir (2,16).



B-N-valil 1-dezoksifruktoz

Genel olarak nonenzimatik glikozillenme, glukozun bağlanması halinde ise nonenzimatik glukozillenme olarak adlandırılan bu reaksiyonlar in vivo ve in vitro koşullarda gerçekleşir (7,14,34).

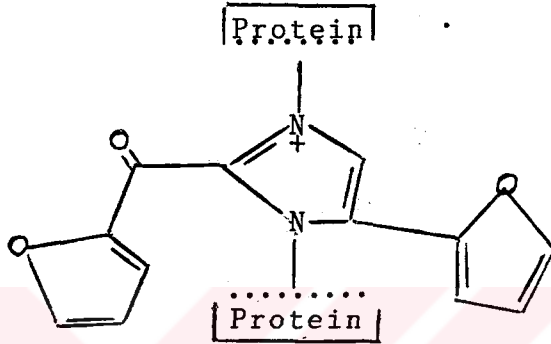
Biolojik ömrü kısa olan proteinlerden bu reaksiyonlar ile ketoamin yapılar oluşur (7). Bunlar erken glikozillenme ürünleridir. Uzun ömürlü proteinlerin ketoamin türevleri ise bir seri reaksiyonla kahverenkli ve fluoresans özellik gösteren ve "ileri glikozillenme ürünleri" olarak adlandırılan maddelere dönüşürler (6,7,19,21).

Bunların oluşumu tersinir olmadığından proteinlerin ömürleri süresince birikime uğrarlar.

Amadori ürünü → → → → İleri glikozillenme ürünleri

İleri glikozillenme ürünlerinin bir bölümü diğer proteinlerin amino gruplarına kovalan olarak bağlanarak protein molekülleri arasında çapraz bağ oluşumuna neden olurlar.

Çapraz bağlanmanın, iki adet glukoz molekülü ile iki adet lizinin amino grubu arasındaki heterosiklik kondansasyon ile olduğu in vivo ve in vitro gösterilmiştir (2). Bu şekilde oluşmuş bir çapraz bağ bileşiminin (2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1 H-imidazole (FFI) olduğu saptanmıştır. (6,8,21).



Glukoz türevi çapraz bağ

(2-Furoyl) 4 (5) - (2-furanyl)-1 H imidazole (FFI).

Protein ve karbohidrat molekülleri arasında nonenzimatik olarak gerçekleşen ve renkli fluoresans özellikli maddelerin oluşumu ile sonuçlanan glikozillenme reaksiyonları "Maillard reaksiyonları" olarak da bilinir. Maillard bileşiklerinin maddelerin dejenerasyon ve denatürasyonuna neden olduğu ve yaşlanma ile ilişkileri bildirilmiştir (40, 41).

Nonenzimatik glikozillenme olayının aydınlatılması amacıyla hemoglobinin çeşitli monosakkaridler ile in vitro sistemde glikozillenmesi gerçekleştirilmiştir (7,13).

### 1.2.1. Nonenzimatik Glikozillenme Reaksiyon Hızını Etkileyen Parametreler

İn vitro koşullarda, nonenzimatik glikozillenme hızını etkileyen parametrelerin, monosakkarid ve protein konsantrasyonları ile ortamın ısı ve pH'ı olduğu belirlenmiştir. Reaktan konsantrasyonları ve ısıнын arttırılması ile reaksiyonlaşmanın arttığı saptanmıştır. Hemoglobinin pH 7'nin altında önemli oranda glikozillenmediği, pH'ın 7'den 9'a kadar yükseltilmesi ile glikozillenmenin arttığı gösterilmiştir (19).

İn vivo koşullarda ise, proteinlerin ne ölçüde nonenzimatik glikozilleneceğini belirleyen iki etken, ortamın glukoz konsantrasyonu ve proteinin ömrüdür. Glukoz konsantrasyonunun yükselmesi ile ve yarı ömrün uzaması ile nonenzimatik glikozillenmenin arttığı bilinmektedir (8).

Proteinler ile, aldozların, ketozlardan daha hızlı reaksiyonlaştıkları gösterilmiştir (7,13,34). Araştırmacılar, aldoz ve ketozlar arasındaki reaktivite farkını karbonil grubunun aldehid yapısı içinde daha elektrofilik olması ile açıklamışlardır (13).

Ancak Oimomi, M, ve ark. tarafından yapılan bir in vitro deneysel çalışmanın sonucu olarak, albumin'in fruktoz ile, glukoz ile olduğundan daha fazla glikozillendiği açıklanmıştır (43).

Monosakkaridler ile proteinler arasındaki nonenzimatik glikozillenme hızınının, monosakkaridin açık zincir yapıda bulunma olasılığının artması ile yükseldiği saptanmıştır (13). Bilindiği gibi glukoz organizma sıvılarında hal-kasal konformasyonda bulunur. Bu konformasyon içinde

hidroksil gruplarının ekvatoryal olarak yerleşmiş olması glukozun halkasal konformasyonunu stabilizeştir, reaktivitesini azaltır. Organizma sıvılarında yüksek konsantrasyonda bulunan glukozun belirtilen nedenle, proteinleri nonenzimatik glikozillenme etkinliği azdır (13).

### 1.2.2. Nonenzimatik Glikozillendiği Saptanan Proteinler

Diabetik olgularda, ekstrasellüler proteinlerin, plazma membran proteinlerinin ve glukoz girişinin insuline bağımlı olmadığı dokularda hücre içi proteinlerinin nondiabetik olgularda olduğundan daha yüksek oranda glikozillendiği gösterilmiştir (7,34).

Hemoglobin, eritrosit membran proteinleri, fibrinogen, albumin, düşük dansiteli lipoprotein, kollajen (bazal membran, deri, aorta, tendon), periferik sinir proteini, myelin proteinleri, tubulin, lens kristallinleri, lens kapsülü proteinleri, kemik proteinleri ve insülinin in vivo; antitrombin III, fibrin, endotelial hücre membranı, yüksek dansiteli lipoprotein, katepsin B,  $\beta$ -N-asetil D glukoz aminidaz, pankreatik ribonükleaz A ve ferritinin in vitro glikozillendikleri saptanmıştır (7,19,34).

Ömürleri kısa olan proteinler (albumin, hemoglobin) üzerinde ketoamin yapılı "erken glikozillenme ürünleri" (Amadori ürünleri), ömürleri daha uzun olan proteinler (kollajen, lens proteinleri) üzerinde ise "ileri glikozillenme ürünleri"nin oluştuğu gösterilmiştir (6,7,8,21,34).

### 1.2.3. Proteinlerin Nonenzimatik Glikozillenme Sonucu Değişime Uğrayan Özellikleri

Proteinler üzerinde oluşan erken ve ileri glikozillenme ürünlerinin proteinlerin yapılarını değişime uğrattıkları ve fonksiyonlarını olumsuz olarak etkiledikleri saptanmıştır (7,21,34).

Proteinlerin çapraz bağ oluşturma ve agregasyon, moleküler büyüklük, şekil, yük, çözünürlük, ısı ve enzimlere karşı dayanıklılık gibi yapısal özelliklerinde ve biyolojik ömür enzimatik aktivite, hormonal aktivite, yapısal bütünlüğün korunması, düzenleyici moleküllere bağlanma, antijenik özellik kazanma ve antikor oluşumuna yol açma, reseptör tarafından tanınma ve endositoz gibi biyolojik özelliklerinde nonenzimatik glikozillenme sonucunda değişim olduğu saptanmıştır (7,19,34).

## 2. HEMOGLOBİN ve ÖZELLİKLERİ

Hemoglobin, hem ve globinden oluşmuş, tetramerik yapıya bileşik bir proteindir. Hemoglobin molekülünde 4 hem halkası ve 2 adet  $\alpha$ , 2 adet  $\beta$  olmak üzere 4 polipeptid zinciri bulunur.  $\alpha$  polipeptid zincirleri 141,  $\beta$  polipeptid zincirleri ise 146 amino asit içerir. 68.000 molekül ağırlıklı, globüler bir proteindir.

Prostetik kısım hem, protoporfirin IX'dur. Fe atomu protoporfirin IX halkasının N atomlarına 4. koordinasyon bağı ile bağlanır, 5. koordinasyon bağı ile  $\alpha$  zincirlerinde 58 No'lu,  $\beta$  zincirlerinde 63 No'lu pozisyonlarda bulunan histidinlere bağlanır (Proksimal histidin).

Fe atomunun 6. koordinasyon bağına hemoglobin molekülünde  $H_2O$ , oksihemoglobin molekülünde ise  $O_2$  reversibl olarak bağlanır. Fe atomunun 6. koordinasyon pozisyonuna yakın pozisyonda— $\alpha$  zincirlerinde 87 No'lu,  $\beta$  zincirlerinde 92 No'lu— histidin amino asidi (distal histidin) bulunur.

Hemoglobin molekülünde  $O_2$ 'i bağlayan bileşen hem'in 2 değerlikli Fe atomu; bu bağlanmanın reversibl olmasını sağlayan ve oksijenasyon sırasında  $Fe^{2+}$  atomunun oksidasyona uğramadan  $O_2$  ile dayanıklı bir kompleks oluşturmasını sağlayan, globindir.

Hemoglobinin globüler yapısı içinde 4 polipeptid zinciri tetrahedral bir düzen oluşturmuştur. Hemoglobin molekülünün dış yüzeyindeki aminoasitler polar, iç kısımda bulunanları ise apolardır. Bu yapısı ile hemoglobin suda çözünen fakat suya karşı geçirgen olmayan bir proteindir. Her bir monomer, apolar karakterli amino asitler tarafından çevrelenen bir "cep" içinde, hem halkasını taşır. Tetrahedral düzen içinde hemler, aralarında herhangi bir temas olmaksızın birbirlerinden uzakta bulunurlar.

Hemoglobin molekülünde  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  zincirleri arasında tuz köprüleri vardır. Bu köprüler hemoglobinin 4. yapısını stabilize eder (36,53).

Hemoglobin molekülünün merkezinde  $\beta$  zincirlerine ait amino asitler tarafından oluşturulmuş 6 (+) yüklü bir boşluk bulunur. Fizyolojik pH'da 4 (-) yük taşıyan 2,3 difosfogliserat (2,3 DPG) bu boşluğa yerleşir ve  $\beta$  zincirlerini çapraz bağlayarak hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltır.

Hemoglobin akciğerlerden dokulara  $O_2$ 'nin, dokulardan akciğerlere  $CO_2$ 'nin taşınmasında ve dokulardaki metabolik aktiviteye bağlı olarak eritrositlerde karbonik anhidraz aktivitesi ile oluşan  $H^+$ 'ların tamponu edilmesinde görev yapar. Tetramerik yapıda allosterik bir protein olan hemoglobinin belirtilen fonksiyonlarını kan pH'ı, kanın  $pCO_2$ , eritrosit (2,3 DPG), plazma trigliseridleri etkilemektedir.

Yapısı ve özellikleri özetlenen hemoglobin erişkin insan eritrositinin majör hemoglobini olan ve total hemoglobinin yaklaşık % 90'ını oluşturan Hemoglobin A'dır.

Erişkin eritrositlerinde HbA'dan ayrı olarak minör hemoglobin komponentleri de bulunur. Bu komponentlerden  $HbA_2(\alpha_2 \delta_2)$  % 2,5 oranında HbF ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) eser düzeyde, başlıca glikozillenmiş hemoglobin ( $HbA_1$ ) komponenti olan  $HbA_{1c}$  ise yaklaşık % 5 oranında bulunur (53).

## 2.1. GLİKOZİLLENMİŞ HEMOGLOBİN

### 2.1.1. Glikozillenmiş Hemoglobinin Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

In vitro ve in vivo koşullarda nonenzimatik glikozillenmeye uğradığını gösterilen ilk protein hemoglobindir (24,25,26,56).

Erişkin insan eritrositinin başlıca hemoglobini olan HbA'nın glikozillenmiş komponentleri ilk defa Allen ve ark. tarafından 1958 yılında iyon değiştirici kolon kromatografisi ile izole edilmiş ve sırasıyla  $HbA_{1a}$ ,  $HbA_{1b}$  ve  $HbA_{1c}$  olarak isimlendirilmiştir (1).



HbA<sub>1a</sub> 1978 yılında Mc Donald ve ark. tarafından HbA<sub>1a1</sub> ve HbA<sub>1a2</sub> olmak üzere 2 alt fonksiyona ayrılmıştır (37).

Hemoglobinin  $\beta$ N ve  $\alpha$ N terminal pozisyonlarda ve bazı lizin aminoasidlerinin  $\epsilon$  amino gruplarında nonenzimatik glikozillendiği bilinmektedir (52).

Glikozillenmenin  $\alpha$ ,  $\beta$  dimerinde bulunan 25 lizin kalıntısı arasından sadece  $\beta$  66,  $\alpha$  61,  $\beta$  17,  $\alpha$  40,  $\beta$  8 pozisyonlarındaki lizinlerde olduğu saptanmıştır (16).

Glikozillenmenin " $\beta$  N terminal" ve "non  $\beta$  N terminal" pozisyonlarda birbirine eşit oranda olduğu Fluckiger ve ark. tarafından hem normoglisemik ve hem de hiperglisemik kişilerde gösterilmiştir (25).

HbA'nın  $\beta$  N terminal pozisyonlarda glikozillenmesi ile oluşan ve en yüksek oranda bulunan HbA<sub>1</sub> komponenti olan HbA<sub>1c</sub>'nin in vitro koşullarda sentezi 1976 yılında Fluckiger ve ark. tarafından ilk olarak gerçekleştirilmiştir (14,19,24).

In vitro sentezlenen HbA<sub>1c</sub> ile in vivo oluşan HbA<sub>1c</sub>'nin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin aynı olduğu saptanmıştır (24).

In vivo koşullarda Bunn ve ark. tarafından yapılmış bulunan biosentetik çalışmalarda HbA<sub>1c</sub>'nin ve diğer HbA<sub>1</sub> komponentlerinin yavaş ve devamlı olarak eritrositin yaşamı süresince oluştuğu gösterilmiştir (15).

Hemoglobinin O<sub>2</sub>'e olan ilgisini belirleyici etkenler arasında bulunan 2,3-DPG, molekülün,  $\beta$  N terminal NH<sub>2</sub> gruplarını da içine alan (+) yük yoğunluklu özel bölgesine

bağlanır. In vitro yapılan deneyler  $\beta$  N terminal glikozillenmenin bu bölgenin 2,3- DPG'i bağlama yeteneğini azalttığını göstermiştir (38). Ancak in vivo koşullarda hemoglobin glikozillenmesinin, molekülün  $O_2$  taşıma yeteneğinde etki yapıp yapmadığı konusu henüz kesinliğe kavuşmamıştır (33). Bu konuda araştırmalar sürdürülmektedir (12,18,44).

Bazı araştırmacılar diabetiklerde hemoglobinin  $O_2$ 'e olan ilgisinde glikozillenmeye bağlı bir artış olduğunu ve bu nedenle diabetiklerde doku oksijenasyonunun bozulabileceğini ve doku hipoksisinin oluşabileceğini bildirmektedirler. Bilindiği gibi uzun süre hipoksik koşullarda kalan dokularda harabiyet gözlenebilir (11).

Doku hipoksisinin de diabetes mellitusun kronik komplikasyonlarının gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir (14,44,56).

### 2.1.2. Glikozillenmiş Hemoglobinin Klinik Önemi

HbA<sub>1c</sub> düzeyinin kanın alınmasından önceki dönemin kan glukoz düzeyinin bir göstergesi olduğu bilinmektedir. Ancak araştırmacılar kanın alınmasından önceki hangi dönemin kan glukoz düzeyini yansıttığı hususunda farklı görüşler bildirmektedirler.

Bu dönemin, Bunn ve ark. 2-3 ay (14,15,16,29), Kennedy ve ark. birkaç hafta (31), Goldstein ve ark. 3-4 ay (27), Yue ve ark. 2-3 ay (34), Parker ve ark. 2-4 ay (46), Koenig ve ark. 4-6 hafta (35), Dunn ve ark. 4-5 hafta (23) Ditzel ve ark. 3,5-11 hafta (22) olduğunu bildirmişlerdir.

HbA<sub>1</sub> komponentlerinin hızlı oluştukları fakat daha yavaş yıkılıma uğadıkları bilindiğinden (31) Koenig R.J. ve ark. glikozillenmiş hemoglobin değerinin belirtilen

süreler içindeki kan glukozunun ortalama düzeyinden ziyade yüksek düzeylerini yansıttığı bildirilmektedir (35).

HbA<sub>1c</sub> konsantrasyonunun diabetiklerin eritrositlerinde nondiabetiklere göre daha yüksek olduğu farklı araştırmacılar tarafından saptanmıştır (14,15,31,48).

Koenig, Cerami ve ark. diabette kan glukoz değerleri ile glikozillenmiş hemoglobin değerleri ile glikozillenmiş hemoglobin değerleri arasında anlamlı ilişki bulunduğunu gerek insanlarda ve gerekse de farelerde göstermişlerdir (35).

Glikozillenmiş hemoglobin parametresinin diabetin tanısında, diabetiklerin kontrolünde ve diabet komplikasyonlarının tanınmasında bir gösterge olarak değerinin belirlenmesi amacı ile çok sayıda araştırma yapılmıştır (7, 14,27,30,33,56). Bu araştırmaların bulguları, kanın glikozillenmiş hemoglobin değerinin saptanması ile diabet tanısının konulamayacağını, fakat diabetiklerin metabolik durumlarının sağlıklı olarak kontrol edilebileceğini göstermektedir (30).

Diabetik hastalarda normal ya da düşük HbA<sub>1c</sub> değerlerinin saptanmış olmasının hipoglisemi riskinin işareti olduğu bildirilmektedir (26,27).

Glikozillenmiş hemoglobin parametresinin değerinde azalma olabilmesi için geçmesi gereken minimal sürenin 3,5-4 hafta olduğu bilindiğinden (22,23) diabetiklerin insulin ile kontrol altına alınmaları sırasında kan glukoz düzeyindeki değişimlerin izlenmesi amacı ile glikozillenmiş hemoglobin ölçümünün uygun olmadığı açıklanmıştır. Belirtilen amaçla yarı ömrü hemoglobininkinden daha kısa olan ve

bu nedenle kan glukozunun daha kısa süre ile (1-2 hafta) içindeki ortalama değerini yansıtan glikozillenmiş albumin parametresinin ölçümünün uygun olduğu bildirilmiştir (19).

Hemolitik anemi ve hemoglobinopatisi olan ya da yakın geçmişte kan transfüzyonu uygulanmış olan kişilerde saptanan glikozillenmiş hemoglobin değerlerinin yanıtıcı olabileceği açıklanmıştır (56).

### 2.1.3. Glikozillenmiş Hemoglobin Parametresinin Ölçümü

Glikozillenmiş hemoglobin parametresinin ölçümünde kromatografik (iyon değiştirici kolon kromatografisi, yüksek basınçlı likid kromatografisi, affinite kromatografisi) (16,45), elektroforetik, izoelektrik odaklama (16), immunolojik (16) kimyasal (fluorometrik, kolorimetrik) (16, 26,46) yöntemler uygulanmaktadır.

Bu yöntemlerden iyonik yük esasına göre ayırım sağlayan iyon değiştirici kromatografi, yüksek basınçlı likid kromatografi (HPLC), agar jel elektroforezi, izoelektrik odaklama ile hemoglobinin sadece  $\beta$ -N terminal pozisyonlardaki glikozillenme ile oluşan  $HbA_{1c}$  komponentinin % oranı saptanabilmektedir. Oysa hemoglobinin  $\beta$  N terminal pozisyonları dışında da glikozillendiği bilindiğinden molekülün tüm glikozillenmesinin ölçülmesi gerekir. Bu amaçla affinite kromatografisi, kolorimetrik yöntemler ya da immunolojik yöntemlerin kullanılması uygundur. Genellikle Bio-rex 70 katyon değiştirici reçine kullanılarak uygulanan iyon değiştirici kromatografi yöntemleri  $HbA_{1c}$  ile birlikte "hızlı hemoglobinler" adı verilen  $HbA_{1a_1}$ ,  $HbA_{1a_2}$ ,  $HbA_{1b}$  ve  $preA_{1c}$ 'i de birlikte ölçer (16).

İyon değiştirici kolonda HbF, HbS ve HbC, HbD ve HbG gibi diğer hemoglobın varyantları da HbA<sub>1c</sub>'ninkine benzer iyonik davranışı gösterirler (16). İyon değiştirici kromatografik yöntemlerde hemolizatların uzun süre bekletilmeleri halinde (+) hatalı sonuçlar alınabildiği ve hata oranının ortam ısısına bağlı olarak değiştiği açıklanmıştır (26).

Lipemik kan örneğinin hızlı çalışan bir kromatografi yöntemi ile analizinin de (+) hatalı sonuç verebileceği bildirilmiştir (16).

remililerde, kurşun ile zehirlenmiş olanlarda ve muhtemelen alkoliklerde HbA<sub>1</sub> için yüksek değerler saptandığı bildirilmiştir (16).

Poliakrilamid jel üzerinde yapılan izoelektrik odaklama ise HbA<sub>1c</sub>'i, HbA<sub>0</sub>'dan belirgin olarak ayırdığı halde, bu tekniğin yüksek hüner ve kantitatif değerlendirme için yüksek kaliteli dansitometre gerektirmesi, kullanılımını sınırlar (16).

pH'ı 6,5 olan agar jel üzerindeki elektroforez daha iyi bir ayırım sağladığından ve kantitatif değerlendirilmesi daha kolay olduğundan bazı araştıracılar tarafından HbA<sub>1c</sub>'nin rutin ölçümlerinde kolon kromatografisine alternatif bir teknik olarak önerilmiştir (15).

İmmunolojik yöntemlerin güvenilirliği anti HbA<sub>1c</sub> antikörlerinin HbA ile çapraz reaksiyon vermesi nedeni ile, az olduğundan HbA<sub>1c</sub> analizinde kullanılılmaları sınırlıdır (16).

Bu tez çalışmasında uygulanan yöntem tiyobarbitürik asidli (TBA) kolorimetrik yöntemdir (46).

Standardize edilmiş TBA yöntemi ile güvenilir kesin ve doğru sonuçlar elde edilebildiği açıklanmıştır (15,16).

Hemolizatlardaki hemoglobin konsantrasyonu, otoklavın basınç ve temperaturü, numunelerin otoklavda tutulma süresi yöntemin standardizasyonunda gözönünde bulundurulacak önemli hususlardır.

Oda ısısında olmamak koşuluyla 4°C, -20°C ve -80°C' de saklanan kan örneklerinde en stabil sonuçların TBA yöntemi ile elde edildiği bildirilmiştir (47).

TBA'lı kolorimetrik yöntemde ölçümün ketoamin bağlı glukoza özgü olması HbF, hemoglobin varyantları ya da hemoglobinin diğer posttranslasyonel modifikasyonlarının (16) sonucu etkileme olasılığını ortadan kaldırır. Bu özelliği ile kolorimetrik yöntem iyon değiştiricili kolon kromatografisi ve elektroforetik yöntemlerden daha avantajlıdır.

Yöntem, basit bir kolorimetre ve oldukça ucuz reaktifler kullanılarak uygulanabilmektedir. Kullanılan reaktiflerin uzun süre dayanıklı kalabilmeleri de yöntemin avantajları arasındadır.

Ayrıca TBA yöntemi hemoglobin dışında diğer proteinlerin de glikozillenmesini ölçebildiğinden kullanımı iyon değiştiricili kromatografi ve elektroforetik yöntemlerden daha yaygındır.

Fenil boronik asid reçineli kolonlarda kolay bir teknikle uygulanan affinite kromatografisi ile de kolorimetrik yöntemlerde olduğu gibi hemoglobin molekülünün tüm glikozillenmesi ölçülebilmekte, diğer glikozillenmiş proteinlerin de kantitatif analizi yapılabilmektedir.

### 3. ELASTİN ve ÖZELLİKLERİ

Elastin, organizmada ligaman, arter cidarları, akciğer plevrası ve parankimi ve diğer esnek bağ dokularında elastik liflerin yapısını oluşturan mezankimal kaynaklı soluk sarı renkli ultraviyole ışıkta mavimsi fluoresans gösteren bir skleroproteindir. Sarı bağ dokusunda beyaz bağ dokusuna göre daha yüksek oranda bulunur (53).

Tripsin ve kimotripsin gibi proteazlara, asid ve alkalilere karşı dirençli olan; pH 2'de pepsin ile yavaş hidrolize uğrayan ve bir pankreas enzimi olan elastaz ile sindirilen proteindir (4). Bileşiminde % 70'den daha yüksek oranda hidrofobik aminoasidler, % 27 oranında glisin, % 8-9 oranında ise hidrofilik amino asidler bulunur.

Elastinin hidroliz ürünleri arasında bulunan desmozin, izodesmozin, merodesmozin ve lizininorlosin, moleküldeki çapraz bağların oluşumunda görevli olan amino asidlerdir (28).

#### 3.1. GLİKOZİLLENMİŞ ELASTİN

Yapılan literatür araştırması elastinin nonenzimatik glikozillenmesi konusunda sadece iki çalışma yapılmış bulunduğunu göstermektedir (17,20). Aynı araştırmacı grubu tarafından yapılmış bulunan bu deneysel çalışmaların sonuçları elastinin in vitro glikozillenebildiğini (17) ve elastinin nonenzimatik glikozillenmesi üzerine  $ZnCl_2$ 'ün etkisi olmadığını (20) göstermektedir.

Elastine benzer bir protein olan kollajenin nonenzimatik glikozillenmesi ile ilgili daha çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Yapılan araştırmalar ileri glikozillenme ürün birikimine bağlı olarak kollajen molekülleri arasında çapraz bağ oluştuğunu göstermektedir (8,21,33,34,50). Araştırmacılar glikozillenmiş kollajen molekülleri arasındaki çapraz bağlanmalar sonucunda proteinin çözünürlüğünde, elastikiyetinde, proteazlara karşı duyarlılığında azalma ve ısıya karşı duyarlılığında artma olduğu bildirilmektedir (34).

Cerami ve ark. diabetiklerde ve yaşlılarda glikozillenmiş kollajenin, diğer kollajen molekülleri gibi albumin, immunoglobulin ve düşük dansiteli lipoproteinleri de çapraz bağlıyabildiğini açıklamışlardır (21).

Araştırmacılar bir ekstrasellüler matriks proteini olan kollajenin belirtilen bu proteinleri çapraz bağlaması sonucunda ekstrasellüler matrikste değişme, bazal membranda kalınlaşma, bağ dokusunda sertleşme olabileceğini açıklamışlardır (33).

Araştırmacılar yaşlılar ve diabetikler arasında sıklıkla görülen aterosklerozun patojenezinde bu mekanizmanın da rolü olabileceğini öne sürmektedirler (21).

İnsuline bağımlı diabetiklerde eklemlerin hareketliliğinde görülen azalmaya, kollajen glikozillenmesinin neden olabileceği bildirilmektedir (32).

Dermal kollajenin insuline bağımlı diabetiklerde, aynı yaştaki nondiabetiklere göre daha kahverengi ve daha fluoresanslı olduğu saptanmıştır (39).

Diabetik kollajenin absorbands ve fluoresans spektrumlarının nondiabetik kollajeninkinden farklı olduğu ve proteinler ile glukoz arasında in vitro koşullarda kahverengileşme (Maillard) reaksiyonları ile oluşan melanoidinlerinkine çarpıcı bir şekilde benzediği saptanmıştır (33).



#### 4. NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME REAKSİYONLARININ İNHİBİSYONU

Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının diabetiklerde ve yaşlılarda sıklıkla görülen komplikasyonların nedenleri arasında yer alabileceği bazı araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir (6,8,21,51). Bu komplikasyonların gelişiminin önlenmesi ya da geciktirilmesi amacıyla yönelik olarak bazı araştırmacılar nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının inhibisyonu konusunda deneysel çalışmalar yapmışlardır (3,6,8,10,21,42,49,51).

Brownlee ve ark. nükleofilik bir hidrazin türeviden olan aminoguanidinin ketoamin yapılı Amadori ürününün karbonil gruplarına bağlanarak ileri glikozillenme ürün oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (6,21).

Brownlee ve ark. yaptıkları in vitro deneylerde; aminoguanidinli ortamda albuminin nonenzimatik glikozillendiğini (21), protein üzerinde Amadori ürününün oluştuğunu ancak ileri glikozillenme ürün oluşumunda % 90 oranında inhibisyon olduğunu gözlemlemişlerdir (8).

Araştırmacılar kollajenin glukoz ile inkübasyonunda kollajen molekülleri arasında oluşan aşırı çapraz bağlanmanın, ortama aminoguanidin katılması ile önlendiğini açıklamışlardır (21).

Aynı araştırmacı grubu glikozillenmiş kollajen molekülleri arasındaki aşırı çapraz bağlanmanın polianyonik proteoglikanların kollajen fibronektin ve bazal membrana bağlanmalarını bozduğunu ve aminoguanidinin bu durumu düzelttiğini bildirmişlerdir (6).

Cerami, A. ve ark., aminoguanidinin, in vivo koşullar-  
da da, nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları üzerine  
inhibisyon yaptığını diabetik sıçanlarda göstermişlerdir.  
Araştırmacılar, aminoguanidin uygulanan diabetik sıçanlarda  
aminoguanidin uygulanmayanlara göre aortada daha az ileri  
glikozillenme ürün birikimi, daha az çapraz bağlanma oldu-  
ğunu, arter çeperine bağlanan lipoprotein, böbrek kapiller  
bazal membranına bağlanan immunglobülin miktarlarında azal-  
ma olduğunu saptamışlardır (21).

Brownlee ve ark. tarafından aminoguanidin letal do-  
zunun hayvanlarda 2-3 g/Kg olduğunu ve bir yıl süre ile  
sürekli olarak kullanımının toksik etki yapmadığı bildiril-  
miştir (6).

Brownlee 66 insana 2 hafta sürekli olarak uyguladığı  
aminoguanidinin toksik etki yapmadığını açıklamıştır (6).

Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarında inhibis-  
yonun sağlanması amacı ile Sensi ve ark. tarafından ise  
D-lizin kullanılmıştır. D-lizin insanda bulunmayan bakteri  
hücre duvarında, spor duvarında ve bakteriyel ürünler olan  
antibiyotiklerde bulunan bir amino asiddir. Araştırmacılar  
in vitro koşullarda D-lizinin albumin, IgG, kollajen ve  
glomerular bazal membranın glikozillenmelerini inhibisyona  
uğrattığını ve inhibisyonun ortamdaki D-lizin konsantrasyo-  
nu ile doğru orantılı olarak arttığını açıklamışlardır  
(51).

Araştırmacılar, in vivo, D-lizinin serbest amino  
grupları aracılığı ile glukozun karbonil grubuna bağlanarak  
glikozillenme reaksiyonlarını inhibe edebileceğini öne sür-  
müşler, D-lizinin belirtilen etkisinin normal ve diabetik  
deney hayvanlarında incelenmesinin gerekli olduğunu ve

fizyolojik, farmakolojik kimyasal ve fiziksel özellikleri belirlendikten sonra insanlarda da denenebileceğini bildirmişlerdir (51).

Aminoguanidin ve D-lizin gibi aspirinin de nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları üzerine inhibitör etki yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

Aspirinin in vitro ve in vivo albumin ve hemoglobinin nonenzimatik glikozillenmelerini inhibe ettiği Rendell ve ark. tarafından açıklanmıştır (49).

Araştırmacılar aspirinin asetil gruplarının proteinlerin yapılarında bulunan lizinelere ait  $-NH_2$  gruplarını asetilasyon ile bloke ederek belirtilen inhibisyona neden olduğunu açıklamışlardır (51,57).

Rendell ve ark. diabetik sıçanlara oral olarak verdikleri 100 mg/Kg dozda aspirinin insanlarda 7 g/gün doza eşdeğer olduğunu ve bu dozun da oldukça yüksek bir doz olduğunu bildirmişlerdir.

Yüksek dozda aspirin alan kişilerde albumin, hemoglobin ve trombosit proteinlerinin asetilasyonla modifiye oldukları (49) ve uzun süreli aspirin kullanımının mide mukozasını tahriş ettiği açıklanmıştır (51).

⊗ Keto aldehid dehidrogenazın (tavşan karaciğerinden izole edilmiş) glikozillenmiş sığır serum albumini üzerinde ileri glikozillenme ürün birikimini engellediği in vitro olarak M. Oimomi ve ark. tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar deneysel bulgularına dayanarak organizmada Maillard reaksiyonlarının benzer bazı mekanizmalarla kontrol altında tutulabilme olasılıklarının bulunduğunu öne sürmüşlerdir (42).

Salisilat, benzoat ve formatın, sığır serum albumininin nonenzimatik glikozillenmesi üzerine etkili olup olmadıkları Azevedo ve ark. tarafından araştırılmış, benzoatın etkisiz olduğu, salisilatın % 20, formatın % 40 oranında inhibisyon yaptığı bulunmuştur (3).

1-benzil-3 indazol oksiosetik asid sodyum tuzunun (Bendazac) insan serum albumini, fibrinojen ve izole glomerular bazal membranın glikozillenmelerini in vitro koşullarda engellediği Bruno ve ark. tarafından bildirilmiştir (10).

### III. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 5. GEREÇLER

Çalkalanma aygıtı	"Tabor"
Desikatör	
Etüv	"Heraeus"
Et kıyma makinesi	
Otoklav	"Veb"
pH metre	"PYE mode 78"
Santrifüj	"Chriss 11 KS"
Subanyosu	"Elektromag"
Spektrofotometre	"Bausch Lomb" Spectronic 70

#### 6. KİMYASAL MADDELER

Etil alkol\* (99.9<sup>0</sup>), aminoguanidin hidrojen karbonat\*\*, aseton, disodyum hidrojen fosfat, dietil eter, fruktoz, glukoz, heparin, kalsiyum klorür, magnezyum klorür, oksalik asid, potasyum dihidrojen fosfat, potasyum klorür, sodyum azid, sodyum bikarbonat, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum hidroksid, sodyum klorür, 2-tiobarbitürik asid\*\*\* , triklorasetik asid.

---

\* Madde Tekel

\*\* Madde Jennsen

\*\*\* Madde Sigma ve diğerleri Merck ürünüdür.

## 7. ÇÖZELTİLER

### 7.1. DULBECCO ÇÖZELTİSİ

NaCl	: 8.00 g
KCl	: 0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	: 2.89 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: 0.20 g

Maddeler destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

### 7.2. EARLE ÇÖZELTİSİ

60 ml Earle A çözeltisine 0.2 ml Earle B çözeltisi katıldı ve çözelti hacmi destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

#### 7.2.1. Earle A Çözeltisi

NaCl	: 6.80 g
KCl	: 0.40 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: 0.17 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	: 0.14 g
NaHCO <sub>3</sub>	: 2.20 g

Maddeler destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 600 ml'ye tamamlandı.

#### 7.2.2. Earle B Çözeltisi

10 g CaCl<sub>2</sub> destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### 7.3. 0.15 M SODYUM KLORÜR ÇÖZELTİSİ

9 g NaCl destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

#### 7.4. 0.5 M OKSALİK ASİD ÇÖZELTİSİ

6.3 g  $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

#### 7.5. % 40 TRİKLORASETİK ASİD ÇÖZELTİSİ

% 100 Triklorasetik asid çözeltisinden 40 ml destile su ile 100 ml'ye seyreltildi.

#### 7.6. 0.05 M TİOBARBITÜRİK ASİD ÇÖZELTİSİ

0.721 g 2-tiobarbitürik asid destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile pH'ı 6'ya ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

#### 7.7. 0.1 N SODYUM HİDROKSİD ÇÖZELTİSİ

4 gr NaOH destile suda çözüldü ve çözelti hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

#### 7.8. STANDART FRUKTOZ ÇÖZELTİSİ

##### 7.8.1. Stok Standart Çözelti (1 mM)

180 mg fruktoz 0.15 M NaCl içinde çözüldü ve çözelti hacmi 0.15 M NaCl ile 1000 ml'ye tamamlandı.

##### 7.8.2. Çalışma Standart Çözeltileri

40 nmol/ml ve 60 nmol/ml konsantrasyonlarındaki çalışma standart çözeltileri 2:50 ve 3:50 oranlarında seyreltme yapılarak hazırlandı.

**7.9. HEMOGLOBİN ANALİZİ İÇİN KULLANILAN HEMOGLOBİN KİTİNDE (Boehringer Mannheim GmbH kat No:124729) BULUNAN ÇÖZELTİLER**

Potasyum ferrisiyanür / Potasyum siyanür çözeltisi  
(Hemoglobin ayırıcı)

Potasyum ferri siyanür	: 0.015 mMol/L
Potasyum fosfat tamponu pH 7,2	: 0.075 mMol/L
Potasyum siyanür	: 0.018 mMol/L
Deterjan	: 0.0025 g/L

**7.10 HEMOGLOBİN ANALİZİNİN STANDARDİZASYONUNDA KULLANILAN SİYANMETHEMOGLOBİN STANDART SETİNDE (Boehringer Mannheim GmbH kat No: 125482) BULUNAN ÇÖZELTİLER**

% 19.9 mg Siyanmethemoglobin	△	% 5 g Hb
% 39.8 mg Siyanmethemoglobin	△	% 10 g Hb
% 59.7 mg Siyanmethemoglobin	△	% 15 g Hb
% 79.6 mg Siyanmethemoglobin	△	% 20 g Hb



#### IV. MATERYEL

Hemoglobinin nonenzimatik glikozillendirildiği deneyler, nondiabetik kişilerden 12 saatlik ağlık sonunda heparinize enjektörle alınan kan örneklerinden ayrılan eritrositler; elastinin nonenzimatik glikozillendirildiği deneyler ise sığır torasik aorta dokusundan izole edilen elastin örnekleri kullanılarak yapıldı.

## V. YÖNTEMLER

### 8. İNKÜBASYON DENEYLERİ

#### 8.1. HEMOGLOBİNİN NONENZİMATİK GLİKOZİLLENMESİ ÜZERİNE AMİNOGUANİDİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

- Nondiabetik kişilerden alınan 25 ml heparinize kan buz içine konuldu ve 20 dak. içinde 2000 devir/dak.'da 10 dak. süre ile santrifüj edildi.

- Eritrositler, soğuk (4-10°C) Dulbecco çözeltisi ile 5 kez yıkandı.

- Kontrol inkübasyon deneyleri :

1 ml hacmindaki eritrositlere 2,8 mM konsantrasyonda sodyum asid içeren, pH'ı 7.6 olan 9 ml Earle çözeltisi ve 1 ml plazma katıldı. 37°C'da 90 saat süre ile inkübe edildi.

- Glukozlu inkübasyon deneyleri :

1 ml hacmindaki eritrositlere 41.6 mM konsantrasyonda glukoz ve 2,8 mM konsantrasyonda sodyum asid içeren, pH'ı 7.6 olan 9 ml Earle çözeltisi ve 1 ml plazma katıldı. 37°C'da 90 saat süre ile inkübe edildi.

- Glukoz ve aminoguanidinli inkübasyon deneyleri :

1 ml hacmindaki eritrositlere 41.6 mM konsantrasyonda glukoz, 22,7 mM konsantrasyonda aminoguanidin ve 2.8 mM

konsantrasyonda sodyum asid içeren, pH'ı 7.6 olan 9 ml Earle çözeltisi ve 1 ml plazma da katıldı. 37°C'da 90 saat süre ile inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda 3 kez 0.15 M NaCl ile yıkanan eritrositler, eşit hacimde destile su ile lize edildi. Hemolizatın minimal hemoglobin konsantrasyonu 15 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

- Hemolizatlarda hemoglobin konsantrasyonu siyan-Methemoglobin yöntemi (54), hemoglobinin glikozillenme değeri Parker (46) yöntemi ile saptandı.

## 8.2. ELASTİNİN NONENZİMATİK GLİKOZİLLENMESİ ÜZERİNE AMİNOGUANİDİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ .

### - Elastinin elde edilmesi

Balo ve Banga yöntemi (5) uygulanarak sığır aortasından elastin elde edildi.

- 10 adet torasik aorta kesiminden sonra 15 dak. içinde kandan temizlenerek serum fizyolojik içine kondu.

- Aortalar makroskobik olarak temizlendikten sonra ince doğranarak kıyma makinesinden 3-4 kez geçirildi.

- İnce kıyılmış aortalar 2 L şişeye 2 defada konulup üzerine yaklaşık 800 mL aseton katıldı.

- Çalkalama aygıtında 2 saat çalkalandı ve süzüldü.

- Süzgeç kağıdı üzerinde kalan kısımlar şişeye tekrar alınarak yaklaşık 800 mL asetonla 20 dak. çalkalandı, tekrar süzüldü. Bu işlem yaklaşık 400 mL asetonla tekrarlandı.

- Çökelti, hacminin 5-6 katı yaklaşık 800 ml eterle 30 dak çalkalandı ve 500 ml eterle bu işlem 2 kez tekrarlandı.

- Yağsızlaştırılmış ve aseton ile suyu çekilmiş aorta parçacıkları, süzgeç kağıdı tabakaları arasında hava alacak şekilde 3-4 gün oda ısısında bırakıldı.

-  $\text{CaCl}_2$ 'lü desikatörde 15 gün süre ile tutulan aorta örnekleri kahve değirmeninden çekilerek yağsız aorta tozu elde edildi.

- Yağsız aorta tozundan 25 g. alınarak 700 ml 0.1 N NaOH ilave edildi ve  $98^\circ\text{C}$ 'da 60 dak. ısıtıldı.

- 2000 devir/dak. da santrifüj edildikten sonra çökelti nuçeye alındı, destile su ile, yıkama suyu turnusol kağıdı ile alkali reaksiyon vermeyinceye kadar yıkandı.

- Nuçe muhteviatı % 96 alkol ile bir kez daha yıkandıktan sonra süzgeç kağıdı tabakaları arasında hava alacak şekilde 1 gün oda ısısında bekletildi.

-  $\text{CaCl}_2$ 'lü desikatörde 4-5 gün tutulduktan sonra kahve değirmeninden geçirilerek elastin elde edildi.

- Kontrol inkübasyon deneyleri

30 mg elastin üzerine 2.8 mM konsantrasyonda sodyum asid içeren, pH'ı 8,3 olan 20 ml Earle çözeltisi konuldu.  $37^\circ\text{C}$ 'da 20 gün süre ile inkübe edildi.

- Glukozlu inkübasyon deneyleri

30 mg elastin üzerine 50 mM konsantrasyonda glukoz ve 2.8 mM konsantrasyonda sodyum asid içeren, pH'ı 8.3 olan

20 ml Earle çözültüsü konuldu. 37°C'da 20 gün süre ile inkübe edildi.

- Glukoz ve aminoguanidinli inkübasyon deneyleri:  
30 mg elastin üzerine 50 mM konsantrasyonda glukoz, 27.24 mM konsantrasyonda aminoguanidin ve 2.8 mM sodyum asid içeren, pH'ı 8,3 olan 20 ml Earle çözültüsü konuldu. 37°C'da 20 gün süre ile inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda 6 kez 0.15 M NaCl ile yıkandı ve CaCl<sub>2</sub>'lü desikatörde kurutuldu.

- Elastinin glikozillenme değeri Parker yöntemi (46) ile saptandı.

## 9. HEMOLİZATLARDA HEMOGLOBİN KONSANTRASYONUNUN SAPTANMASI

Hemolizatların hemoglobin konsantrasyonları Van Kampen ve ark. tarafından (54) önerilen siyanmethemoglobin yöntemi uygulanarak saptandı.

Yöntem, hemoglobinin potasyum ferrisiyanür ve potasyum siyanür ile reaksiyonlaştırılması sonucunda oluşan siyanmethemoglobinin kolorimetrik olarak analizlenmesi esasına dayanır.

Analiz, "Test-Combination hemoglobin" Boehringer Mannheim GmbH Kat No: 124729 kiti kullanılarak yapıldı :

2.5 ml hemoglobin ayıracağına 0.01 ml hemolizat katıldı. 5 dak. içinde destile suya karşı 546 nm'de optik dansite ölçümü yapıldı. Ölçülen optik dansite değerlerine teka-bül eden hemoglobin konsantrasyonları (% g) kit'de bulunan ve doğruluğu siyanmethemoglobin standart seti kullanılarak kontrol edilen tablodan bulundu.

## 10. HEMOGLOBİNİN GLİKOZİLLENME DEĞERİNİN SAPTANMASI

Hemoglobin ve elastinin glikozillenme değerleri Fluckiger ve ark. tarafından önerilen, Parker ve ark. tarafından modifiye edilen TBA'lı kolorimetrik yöntem (46) uygulanarak saptandı.

Yöntem, protein bağlı karbohidrat kalıntısının 100°C da ve oksalik asid varlığında dehidratasyona uğrayarak 5-hidroksimetil furfural oluşturması ve oluşan 5-hidroksimetil furfuralin de tiobarbitürik asid ile renk reaksiyonu vermesi esasına dayanır (16,19).

- 13x100 mm boyutlu cam kapaklı tüplerde çalışıldı.

Numune olarak işaretlenmiş 2 tübe minimal 15 mg/ml konsantrasyonda hemoglobin içeren hemolizattan 1'er ml konuldu.

Standart olarak işaretlenmiş olan 2 tübe ise çalışma standart çözeltisinden 1'er ml konuldu.

- 0.5 M oksalik asidden numune ve standart tüplerine 1'er ml katıldı, karıştırıldı. Kapakları sıkıca kapatılarak otoklavda 1 Atmosfer basınç altında 124 ± 1°C'da 60 dak süre ile tutuldu.

- Oda ısısına getirilen tüplere % 40 triklorasetik asidden (TCA), numune ve standart tüplerine 1'er ml katıldı, karıştırıldı. 15 dakikalık bekleme süresinden sonra süzme işlemi yapıldı.

- Numune olarak işaretlenmiş 3 tüpün herbirine numune süzüntüsünden 1,5 ml; standart olarak işaretlenmiş 3 tüpün herbirine ise standart süzüntüsünden 1,5 ml konuldu.

Numune körü ve standart körü olarak işaretlenmiş tüplere 0.5 ml destile su, diğerlerine 0.5 ml 0.05 M tio-barbitürük asid (TBA) katıldı, karıştırıldı. 30 dak. 40°C; 15 dak. oda ısısında tutulan tüplerin optik dansite değerleri suya karşı 443 nm dalga boyunda ölçüldü.

- Hemoglobinin glokozilenme değeri :

$$\frac{\text{nmol Fruktoz}}{\text{mg Hemoglobin}} = \frac{(\text{OD})_N - (\text{OD})_{NKör}}{(\text{OD})_{Std} - (\text{OD})_{Stdkör}} \cdot C_{std} \frac{100}{C_{hem} \cdot 1000}$$

formülü ile saptandı.

(OD) <sub>N</sub> ve (OD) <sub>Std</sub>	: Numune ve standart için ölçümlenen optik dansite değerleri
(OD) <sub>NKör</sub> ve (OD) <sub>std kör</sub>	: Numune ve standart körleri için ölçümlenen optik dansite değerleri
C <sub>std</sub>	: Çalışma standart çözeltisinin fruktoz konsantrasyonu (nmol/ml).
C <sub>hem</sub>	: Hemolizatın hemoglobin konsantrasyonu (g/100 ml).

## 11. ELASTİNİN GLİKOZİLLENME DEĞERİNİN SAPTANMASI

- 13x100 ml boyutlu cam kapaklı tüplerde çalışıldı. Numune olarak işaretlenmiş tübe 25-30 mg elastin ve 2 ml 0.15 M NaCl konuldu, karıştırıldı. Standart olarak işaretlenmiş olan 2 tübe ise çalışma standart çözeltisinden 1'er ml konuldu.

- 0.5 M oksalik asidden numune tüpüne 2 ml standart tüplerine 1'er ml katıldı, karıştırıldı. Kapakları sıkıca kapatılarak otoklavda 1 Atmosfer basınç altında 124°C'da 60 dak. süre ile tutuldu.

- Oda ısısına getirilen tüplere % 40 triklorasetik asidden numune tüpüne 2 ml, standart tüplerine 1'er ml katıldı, karıştırıldı. 15 dakikalık bekleme süresinden sonra süzme işlemi yapıldı.

- Numune olarak işaretlenmiş 3 tüpün herbirine numune süzüntüsünden 1,5 ml; standart olarak işaretlenmiş 3 tüpün herbirine ise standart süzüntüsünden 1,5 ml konuldu.

Numune körü ve standart körü olarak işaretlenmiş tüplere 0.5 ml destile su, diğerlerine 0.5 ml 0.05 M tio-barbitürik asid katıldı, karıştırıldı. 30 dak. 40°C'da; 15 dak. oda ısısında tutulan tüplerin optik dansite değerleri suya karşı 443 nm dalga boyuda ölçüldü.

- Elastinin glikozillenme değeri :

$$\frac{\text{nmol Fruktöz}}{\text{mg Elastin}} = \frac{(\text{OD})_N - (\text{OD})_{NKör}}{(\text{OD})_{std} - (\text{OD})_{stdkör}} \cdot C_{std} \cdot \frac{2}{m} \text{ formülü ile saptandı.}$$

$(\text{OD})_N$  ve  $(\text{OD})_{std}$  : Numune ve standart için ölçümlenen optik dansite değerleri

$(\text{OD})_{NKör}$  ve  $(\text{OD})_{stdkör}$  : Numune ve standart körleri için ölçümlenen optik dansite değerleri

$C_{std}$  : Çalışma standart çözeltisinin fruktoz konsantrasyonu (nmol/ml)

$m$  : Tartılan elastin miktarı (mg).



## 12. BULGULARIN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

Hemoglobin ve elastine ait glikozillenme bulguları küçük eşlendirilmiş serilerde "t" testi uygulanarak değerlendirildi (55).

$$S^2 = \frac{T_2 - \frac{T_1^2}{n}}{n - 1}$$

$$t = \frac{(m - 0)}{s/\sqrt{n}}$$

n : Farklar dizisindeki birim sayısı

m : Farklar dizisinin ortalaması

S : Farklar dizisinin standart sapması

T<sub>1</sub> : Farkların toplamı

T<sub>2</sub> : Farkların karelerinin toplamı

## **VI. BULGULAR**

### **13. HEMOGLOBİNİN İN VİTRO NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME BULGULARI**

Eritrosit membranının kişisel farklılıklar gösterebileceği gözönüne alınarak 10 diabetik kişiden sağlanan farklı eritrosit örnekleri ile çalışıldı.

Bir kişiden sağlanan eritrosit örnekleri ile kontrol, glukozlu ve glukoz (+) aminoguanidinli inkübasyon deneyleri hemzaman olarak yapıldı.

Herbir eritrosit örneği ile çalışılan, belirtilen inkübasyon deneylerine ait glikozillenmiş hemoglobin değerleri tablo 1, tablo 2 ve tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 1 : Kontrol İnkübasyon Deneilerine Ait Glikozillenmiş Hemoglobin Değerleri

Glikozillenmiş hemoglobin (nmolFruktoz/mg Hb)

Eritrosit örnekleri n = 10	A.C	O.Y	N.S	F.K	İ.K	Ş.C	V.A	Y.S	B.A	K.A
	5.07	2.74	4.80	2.85	3.77	3.09	3.06	3.00	2.66	3.91
	4.60	3.14	4.90	2.93	3.90	3.13	4.00	3.34	2.47	3.68
	4.66		4.10	2.93		3.38	3.00	3.35	2.74	
				2.78					3.39	
$m^1$	4.77	2.94	4.60	2.87	3.83	3.20	3.35	3.23	2.81	3.79
$m \pm SD$					$3.53 \pm 0.69$					

Tablo 2 : Glukozlu (41.60 mM) İnkübasyon Deneylerine Ait  
Glikozillenmiş Hemoglobin Değerleri

Glikozillenmiş hemoglobin (nmolFruktoz/mg Hb)

Eritrosit örnekleri n = 10	A.C	O.Y.	N.S	F.K	İ.K	Ş.C	V.A	Y.S	B.A	K.A
	6.46	5.90	5.75	4.89	5.04	6.40	5.75	5.85	3.62	4.84
	7.00	5.10	5.06	4.75	5.84	7.50	6.14	6.50	4.63	4.90
	7.20	5.18	6.60	5.09	6.50	5.57	4.92		4.93	4.80
			6.10				5.53			3.60
$m^I$	6.88	5.39	5.87	4.92	5.79	6.49	5.58	6.17	4.19	4.84
$m \pm SD$					5.61 $\pm$ 0.81					

Tablo 3 : Glukozlu (41.60 mM) ve Aminoguanidinli (22.70 mM) İnkübasyon Deneilerine Ait Glikozillenmiş Hemoglobin Değerleri

Glikozillenmiş hemoglobin (nmolFruktoz/mg Hb)

Eritrosit örnekleri n = 10	A.C	O.Y	N.S	F.K	İ.K	Ş.C	V.A	Y.S	B.A	K.A
	6.08	4.44	4.86	4.03	3.94	4.30	4.60	3.77	3.38	4.18
	5.54	4.30	4.97	4.29	3.00	5.30	4.60	4.10	3.22	4.42
	5.64	4.10	4.50	4.10	4.50	5.00	4.56		3.06	4.14
	6.40	4.60	3.75	3.96	4.90	5.40	3.62		3.49	
$m^1$	5.91	4.36	4.52	4.00	4.08	5.00	4.34	3.93	3.29	4.24
$m \pm SD$					4.37 $\pm$ 0.70					

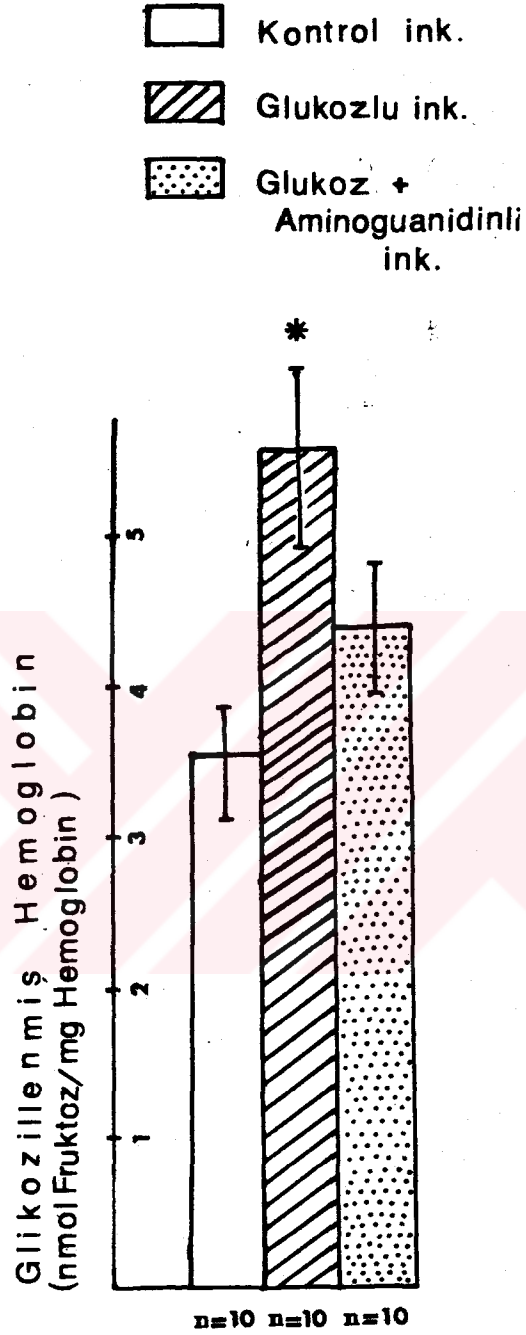
Tablo 1, tablo 2 ve tablo 3'de sunulan bulguların sentezi tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4 : Kontrol, Glukozlu (41.60 mM) ve Glukoz (41.60 mM) + Aminoguanidinle (22.70 mM) İnkübasyon Deneylerine Ait Glikozillenmiş Hemoglobin

Glikozillenmiş Hemoglobin (nmol Fruktoz/mg Hb)

Eritrosit örnekleri n = 10	Kontrol İnkübasyon	Glukozlu İnkübasyon	Glukoz+Aminoguanidinli İnkübasyon
A.C	4.77	6.88	5.91
O.Y	2.94	5.39	4.36
N.S	4.60	5.87	4.52
F.K	2.87	4.92	4.00
İ.K	3.83	5.79	4.08
Ş.C	3.20	6.49	5.00
V.A	3.35	5.58	4.34
Y.S	3.23	6.17	3.93
B.A	2.81	4.19	3.29
K.A	3.79	4.84	4.24
m	3.53	5.61	4.37
SD	0.69	0.81	0.70

Tablo 4'deki değerlere göre şekil 1 çizilmiştir.



Şekil 1 : Hemoglobin in vitro nonenzimatik glikozillenme bulguları.

\* İstatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.001$ ).

Tablo 4'de görüldüğü gibi glukozsuz (kontrol) ve glukozlu ortamlarda inkübe edilmiş olan eritrositlerdeki hemoglobinin ortalama glikozillenme değeri (nmol Fruktoz/mg Hb) sırası ile  $3.53 \pm 0.69$  ve  $5.61 \pm 0.81$ 'dir.

Kişisel farklılık gösterebilen eritrosit membranının geçirgenlik özelliğinin, hemoglobinin in vitro glikozillenme bulgularını etkileyebileceği gözönüne alınarak bulguların istatistik değerlendirilmesinde küçük eşlendirilmiş serilerde "t" testi uygulandı (55).

Glukozsuz ve glukozlu ortamlarda inkübe edilmiş eritrositlerin glikozillenmiş hemoglobin değerleri arasında ileri derecede anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0.001$ ).

Bu bulgu çalışılan in vitro deney koşullarında hemoglobinin nonenzimatik glikozillendiğini göstermektedir.

Tablo 4'de görüldüğü gibi aminoguanidinsiz ve aminoguanidinli ortamlarda glukoz ile inkübe edilmiş eritrositlerdeki hemoglobin ortalama glikozillenme değeri (nmolFruktoz/mg Hb) sırası ile  $5.61 \pm 0.81$  ve  $4.37 \pm 0.70$ 'dir.

Bulguların belirtilen yöntemle istatistiksel değerlendirilmesi; aminoguanidinsiz ve aminoguanidinli ortamlarda glukoz ile inkübe edilmiş eritrositlerin glikozillenmiş hemoglobin değerleri arasında ileri derecede anlamlı farklılık bulunduğunu göstermiştir.

Bu bulgu çalışılan in vitro deney koşullarında aminoguanidinin hemoglobinin glikozillenmesi üzerine inhibitör etki yaptığını göstermektedir.

Aminoguanidinin hemoglobinin nonenzimatik glikozillenmesini ortalama % 22.20 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.



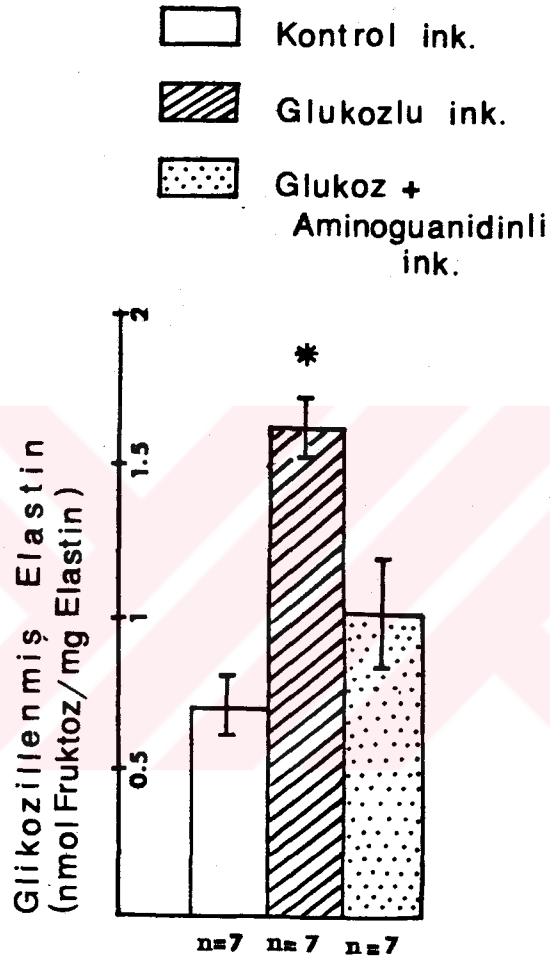
#### 14. ELASTİNİN İN VİTRO NONENZİMATİK GLİKOZİLLENME BULGULARI

Elastin ile kontrol, glukozlu ve glukoz (+) aminoguanidinli inkübasyon deneyleri hemzaman olarak yapıldı. Belirtilen inkübasyon deneylerine ait glikozillenmiş elastin değerleri tablo 5'de sunulmuştur.

Tablo 5 : Kontrol, Glukozlu (50 mM), Glukoz (50 mM)+ Aminoguanidinli (27.24 mM) İnkübasyon Deneylerine Ait Glikozillenmiş Elastin Değerleri

Deneyler n = 7	Glikozillenmiş Elastin (nmolFruktoz/mg Elastin)		
	Kontrol İnkübasyon	Glukozlu İnkübasyon	Glukoz+Aminoguanidinli İnkübasyon
1	0.59	1.57	1.29
2	0.72	1.84	1.20
3	0.66	1.60	0.68
4	0.76	1.68	0.86
5	0.65	1.66	1.04
6	0.87	1.74	1.05
7	0.87	1.42	0.94
m	0.73	1.64	1.01
SD	0.11	0.13	0.21

Tablo 5'deki değerlere göre şekil 2 çizilmiştir.



Şekil 2 : Elastinin in vitro nonenzimatik glikozillenme bulguları.

\* İstatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir (p<0.001).

Tablo 5'de görüldüğü gibi glukozsuz (kontrol) ve glukozlu ortamlarda inkübe edilmiş olan elastinin ortalama glikozillenme değeri (nmolFruktoz/mg Elastin) sırası ile  $0.73 \pm 0.11$  ve  $1.64 \pm 0.13$ 'dür.

Bulgulara küçük eşlendirilmiş serilerde "t" testi uygulanarak yapılan istatistiksel değerlendirme glukozsuz ve glukozlu ortamlarda inkübe edilmiş elastinin glikozillenme değerleri arasında ileri derecede anlamlı farklılık bulunduğunu göstermiştir ( $p < 0.001$ ).

Bu bulgu çalışılan in vitro deney koşullarında elastinin nonenzimatik glikozillendiğini göstermektedir.

Tablo 5'de görüldüğü gibi aminoguanidinsiz ve aminoguanidinli ortamlarda glukoz ile inkübe edilmiş elastinin ortalama glikozillenme değeri (nmolFruktoz/mg Elastin) sırası ile  $1,64 \pm 0.13$  ve  $1.01 \pm 0.21$ 'dir.

Bulguların belirtilen yöntemle istatistiksel değerlendirilmesi aminoguanidinsiz ve aminoguanidinli ortamlarda glukoz ile inkübe edilmiş elastinin glikozillenmiş elastin değerleri arasında ileri derecede anlamlı farklılık bulunduğunu göstermiştir ( $p < 0.001$ ).

Bu bulgu çalışılan in vitro deney koşullarında aminoguanidinin elastinin glikozillenmesi üzerine inhibitör etki yaptığını göstermektedir.

Aminoguanidinin elastinin nonenzimatik glikozillenmesini ortalama % 38.66 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.

Hemoglobinin ve elastinin nonenzimatik glikozillenmesi üzerine aminoguanidinin inhibitör etkisine ilişkin sonuçlar tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6 : Hemoglobin ve Elastinin İn Vitro Nonenzimatik Glikozillenmeleri Üzerine Aminoguanidinin İnhibitör Etkisi

	Glukozlu İnkübasyon	Gluko +Aminoguanidinli İnkübasyon	% İnhibisyon
Glikozillenmiş Hemoglobin nmolFruktoz/mg Hb	5.61 <sup>±</sup> 0.81	4.37 <sup>±</sup> 0.70	22.20
Glikozillenmiş Elastin nmolFruktoz/mg Elastin	1.64 <sup>±</sup> 0.13	1.01 <sup>±</sup> 0.21	38.66

## VII. İRDELEME ve SONUÇ

Proteinler organizmada nonenzimatik glikozillenme reaksiyonları ile posttranslasyonel değişime uğramaktadır (7,34).

İn vitro olarak da gerçekleşen bu reaksiyonlarla proteinlerin yapılarında ve bazı özelliklerinde değişim olduğu farklı araştırmacılar tarafından saptanmıştır (7,13, 16,19,24,25,34,37).

Hipergliseminin, proteinlerin nonenzimatik glikozillenmelerini arttırdığı ve birçok doku proteinin diabetiklerde, nondiabetiklere göre daha yüksek oranda glikozillenmiş oldukları saptanmıştır (7, 34).

İrreversibl nonenzimatik glikozillenme reaksiyon ürünlerinin uzun ömürlü proteinler üzerinde birikime uğradığı ve bu birikimin hem diabetiklerde ve hem de yaşlılarda yüksek olduğu bildirilmiştir (21).

Genellikle diabetiklerde erken yaşlarda görülen komplikasyonların nondiabetiklerde de ileri yaşlarda görülüyor olması bazı araştırmacılara bu komplikasyonların gelişiminde nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bu düşünce ile bazı araştırmacılar, diabet ve yaşlılık komplikasyonlarının geciktirilme ya da önlenmelerinin nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının inhibisyonu ile mümkün olabileceğini öne sürmektedirler (6,8,21,51).

Aminoguanidin, D-Lizin, aspirin, salisilat, benzoat format gibi kimyasal maddelerin ve  $\alpha$  keto aldehyd dehidrogenaz'ın nonenzimatik glikozillenme reaksiyonu üzerine inhibitör etki yapıp yapmadıkları, in vitro ve in vivo deneysel çalışmaları ile araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında da nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının inhibisyonu amaçlanmış, Brownlee ve ark. tarafından inhibitör olduğu öne sürülen aminoguanidinin etkinliği çözünen bir protein olan hemoglobin ile, bir skleroprotein olan elastin üzerinde in vitro koşullarda denenmiştir.

Hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğinde glikozillenme nedeni ile azalma olduğu bildirilmiş (14,15), diabetiklerde artan hemoglobin glikozillenmesinin doku hipoksisine yol açabileceği ve mikroangiopatilerin yerleşmesine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (7,14,15,19).

Hemoglobin glikozillenmesinin diabetik mikroangiopatilerdeki etyolojik önemi halen incelenmektedir. Ligaman ve büyük arterlerin çeperlerinde yüksek oranda bulunan elastinin glikozillenmesinin ise diabetikler ve yaşlılar arasında yaygın görülen ateroskleroz etyolojisinde önemli olabileceği düşünülebilir.

Hemoglobin glikozillenmesinin inhibisyonu konusu diabetik mikroangiopatilerin önlenmesi, elastin glikozillenmesinin inhibisyonu konusu ise aterosklerozun önlenmesi bakımından önem taşıyan çalışma konuları olduğu halde literatür araştırması elastine ilişkin bir çalışma olmadığını, hemoglobine ilişkin ise yalnız bir çalışma yapılmış olduğunu göstermiştir (49).

Hemoglobin glikozillenmesinin inhibisyonu konusunda inhibitör madde olarak aspirin kullanılmış, aspirin etkisi in vitro ve in vivo koşullarda denenmiş ve aspirinin inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (49).

Araştırmacılar, aspirinin protein yapısındaki lizinlere ait  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> gruplarını asetilleyerek bloke ettiğini ve bu mekanizma ile inhibisyon yaptığını açıklamışlardır. Araştırmacılar diabetik sıçanlara oral olarak verdikleri 100 mg/Kg dozun insanlarda 7 g/gün doza eşdeğer olduğunu ve bu dozda oldukça yüksek bir doz olduğunu bildirmişlerdir (49).

Bazı araştırmacılar yüksek doz aspirin kullanımının albumin, hemoglobin ve trombosit proteinlerinin asetillenmelerine, mide mukozasının tahriş olmasına yol açtığını bildirerek, Rendell ve ark.nın deneysel bulgularının fizyolojik öneminin sınırlı olduğunu açıklamışlardır (51).

Bu çalışmada in vitro, albumin ve kollajen; in vivo, aorta, arter çeperi ve böbrek kapiller bazal membran glikozillenmelerinde inhibisyon yaptığı bildirilen (6,8,21) ve en önemlisi, insanlarda (66 olgu) 2 haftalık süre içinde toksik etkili olmadığı açıklanan aminoguanidin inhibitör olarak kullanılmıştır.

Aminoguanidinin in vitro deney koşullarında hemoglobin glikozillenmesini % 22.20, elastin glikozillenmesini ise % 38.66 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

Brownlee ve ark. in vitro deney koşullarında aminoguanidinin varlığında albuminden Amadori ürün oluşumunun inhibisyona uğramadığını, ileri glikozillenme ürün birikiminin % 90 oranında inhibe olduğunu saptamışlar ve aminoguanidinin Amadori ürünlerine bağlanarak etkisini gösterdiğini açıklamışlardır (21).

Bu çalışmada ise, hemoglobin için 4 gün ve elastin için 20 gün olan inkübasyon süreleri içinde proteinler üzerinde ileri glikozillenme ürün birikimi sözkonusu olamayacağından ve proteinlerin glikozillenme değerlerinin saptanmasında kullanılan yöntem Amadori ürünlerinin ölçümüne özgü olduğundan; aminoguanidinin Amadori ürün oluşumunu inhibisyona uğrattığı düşünülebilir.

Aminoguanidinin bu in vitro çalışmanın koşullarında hangi mekanizma ile Amadori ürün oluşumunu inhibe ettiği konusunda şu yorumlar yapılabilir.

Aminoguanidinin amino grupları aracılığı ile glukozun karbonil gruplarına bağlanarak, elastinin glikozillenmesini inhibisyona uğrattığı düşünülebilir.

Sensi ve ark. tarafından, albumin, IgG ve kollajenin in vitro nonenzimatik glikozillenmelerini D-lizinin bu mekanizma ile inhibe ettiği bildirilmiştir (51).

Aminoguanidinin hemoglobin glikozillenmesi üzerine olan inhibisyon etki mekanizması yorumlanırken inkübasyon ortamında glukoz moleküllerinin hemoglobin ile eritrosit membranının geçirgenliği ölçüsünde temas halinde olduğu gözönüne alınmalıdır. Aminoguanidinin bu geçirgenliği değiştirmesi durumunda, aminoguanidin varlığından, hemoglobin glikozillenmesinin doğal olarak etkileneceği düşünülebilir. Dolayısıyla aminoguanidinin hemoglobin glikozillenmesini eritrosit membranının glukoz geçirgenliğini azaltarak ve/veya elastin örneğinde açıklandığı gibi glukozla bağlanarak inkübe ettiği öne sürülebilir.

In vivo koşullarda da aminoguanidinin benzer mekanizma ile glikozillenme reaksiyonlarını inhibe edebileceği düşünülebilir.



Organizmanın glukozdan yararlanmasını sınırlayıcı bu tür bir inhibisyon mekanizmasının fizyolojik önemi ise tartışmalıdır.

Sürdürülecek in vitro çalışmalarla aminoguanidinin diğer organizma proteinlerinin de nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine olan etkileri incelenmeli; aminoguanidinin Brownlee ve ark. tarafından önerildiği gibi ileri glikozillenme ürün birikimini mi yoksa bu çalışmada öne sürüldüğü gibi Amadori ürün oluşumunu mu inhibe ettiği konuları açıklığa kavuşturulmalıdır.

Sonuç olarak bu in vitro çalışmada aminoguanidinin hemoglobin ve elastinin nonenzimatik glikozillenmelerini inhibe (% 22.20 ve % 38.66 oranlarında) ettiği saptanmıştır. Aminoguanidinin glukozun karbonil gruplarına bağlanarak ve/veya glukozun hücrelere girişini azaltarak inhibisyon yaptığı öne sürülmüştür.

## VIII. ÖZET

Bu tez çalışmasında diabet ve yaşlılık komplikasyonlarının etiyolojilerinde önemli olabilecekleri bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen nonenzimatik glikozillenme reaksiyonlarının inhibisyonu amaçlandı ve inhibitör olduğu öne sürülen ve insanlarda da kullanıldığı açıklanan aminoguanidinin çözünür bir protein olan hemoglobin ile bir skleroprotein olan elastinin nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine etkileri in vitro koşullarda incelendi.

Aminoguanidinin çalışılan in vitro deney koşullarında hemoglobinin glikozillenmesini % 22.20 elastinin glikozillenmesini % 38.66 oranında inhibe ettiği bulundu.

Aminoguanidinin elastinin glikozillenmesini amino grupları aracılığı ile glukozun karbonil gruplarına bağlanarak inhibe ettiği, hemoglobinin glikozillenmesini ise aynı mekanizma ile ve/veya eritrosit membranının glukoz geçirgenliğini azaltarak inhibe ettiği öne sürüldü.

Organizmanın glukozdan yararlanmasını sınırlayıcı bu tür bir inhibisyon mekanizmasının fizyolojik öneminin tartışmalı olacağı belirtildi ve aminoguanidinin diğer organizma proteinlerinin de nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine olan etkilerinin in vitro çalışmalarla saptanması gerektiği açıklandı.

## IX. KAYNAKLAR

- 1- Allen, D.W., Schroeder, W.A., Balog, J. : Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. J. Am. Chem. Soc. 80: 1628-1634 (1958).
- 2- Anna, J.F. : Methods for assaying nonenzymatic glycosylation. Analytical biochemistry 175: 347-360 (1988).
- 3- Azevedo, M.S., and Aquilar, Manso, C.F. : Inhibition of nonenzymatic glycosylation of proteins by different compounds. Diabetologia 29 (8) : 531 A (1986).
- 4- Baban, N. : Protein biokimyası. İ.Ü. Cer. Tıp. Fak. 47-48, İstanbul, (1980).
- 5- Banga, I., Balo, J., and Horvath, M. : Nephelometric determination of elastase activity and method for elastoproteolytic measurements. Biochem. J. 71: 544-551 (1959).
- 6- Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H. : Advanced glycosylation end product in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. New. Eng. J. Med. 318 (20): 1315-1321 (1988).
- 7- Brownlee, M., Vlassara, H., and Cerami, A. : Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, Ann. Int. Med. 101: 527-537 (1984).

- 8- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., Cerami, A. : Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232: 1629-32 (1986).
- 9- Brownlee, M., and Cerami, A. : The biochemistry of the complications of the diabetes mellitus. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 385-432 (1981).
- 10- Bruno, M.R., Sensi, M., Beales, P., Pagani, S., Velente, L., Giovanelli, M., et al : A new agent for inhibiting the nonenzymatic glycosylation of proteins in diabetes mellitus. *Diabetologia* 30 (7): 503 A (1987).
- 11- Bunn, H.F., Haney, D.N., Kamin, S. : The biosynthesis of human hemoglobin A<sub>1c</sub>: Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J Clin. Invest.* 1652-59 (1976).
- 12- Bunn, H.F., Haney, D.N., Kamin, S., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. : The biosynthesis of human hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 57: 1662-69 (1976).
- 13- Bunn, H.F., and Higgins, P.J. : Reactions of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science* 213: 222-224 (1981).
- 14- Bunn, H.F. : Nonenzymatic glycosylation of protein relevance to diabetes. *Am. J. Med.* 70: 325-330 (1981).
- 15- Bunn, H.F. : Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes* 30: 613-617 (1981).
- 16- Bunn, H.F. Forget, B.G. :  
Kitap: Hemoglobin : Molecular genetic and clinical aspect. W.B. Saunders Company 75-90 (1986).
- 17- Candan, G., Baban, N., Ahbap, E. : Elastinin in vitro glikozillenmeleri. *Biokimya dergisi kongre özel sayısı*, XII (2) : 183 (1987).

- 18- Candan, G., Şahin, G., Sipahioğlu, F., Hatemi, H., Yiğit, G., Terzioğlu, M. : Tip I diabetiklerde glikozillenmiş hemoglobin (HbG1c) ve 2,3- difosfogliserat (2,3-DPG) düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. Diabet yıllığı 5: 425-433 (1987).
- 19- Candan, G. : Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri Editör Hatemi, H., Diabetes Mellitus. 117-125, İstanbul, (1988).
- 20- Candan, G., Baban, N., Civelek, S., Ahabap, E. : Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri üzerine  $ZnCl_2$ 'ün etkileri. Cerrahpaşa Tıp Fak. Dergisi (1989) (baskıda).
- 21- Cerami, A., Vlassara, H., and Brownlee, M. : Glucose and aging. Scientific. Am. 256 (5):82-88 (1987).
- 22- Ditzel, Y., Kjaergaard J.J. : Hemoglobin  $A_{1c}$  concentrations after initial insulin treatment for newly discovered diabetes. Br. Med. J. 1: 741-742 (1978).
- 23- Dunn, P.J., Cole, R.A., Soeldner, J.S. et al : Temporal relationship of glycosylated hemoglobin concentrations to glucose control in diabetics. Diabetologia 17: 213-220 (1979).
- 24- Fluckiger, R., and Winterhalter, K.H. : In vitro synthesis of hemoglobin  $A_{1c}$ . Febs. Lett. 71: 356-60 (1976).
- 25- Fluckiger, R., Woodtli T., Berger. : Quantitation of glycosylated hemoglobin by boronate affinity chromatography. Diabetes 33: 73-76 (1984).

- 26- Goldstein, D.E., Parker, M.K., England, D.J., et al :  
Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. Diabetes 31 (Supply 3) : 70-78 (1982).
- 27- Goldstein, D.E. : Is glycosylated hemoglobin clinically useful. The new. England journal of medicine 310:9 384-85 (1984).
- 28- Güner Gül : Sığır aorta elastininin etanol-hidroklorik asid ile elde edilen kısa süreli hidroliz ürününün (çözünür elastin türevi Ç.E.T) antijenik özellikleri. Doktora tezi. 6-13 1982, İstanbul, (Biokimya kürsüsü).
- 29- Higgins, P.J., Bunn, H.F. : Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation hemoglobin. The journal of biological chemistry 256. May 25, 5204-208 (1981).
- 30- Javanovic, L., Peterson, C.M. : The clinical utility of glycosylated hemoglobin. The American Journal. Med. 70: 331-338 (1981).
- 31- Kennedy, L., Mehl, T.D., Riley, W.J., and Merimee, T.J.: Nonenzymatically glycosylated serum protein in diabetes mellitus: An Index of short-term glycameia. Diabetologia 21: 94-98 (1981).
- 32- Kennedy, L., Beacom, R., Archer, D.B., Carson, D.J., Campbell, S.L., Johnston, P.B., Maguire C.J. : Limited joint mobility in type I diabetes mellitus. Postgrad med. J. 58: 481-484 (1982).
- 33- Kennedy, L., and Baynes J.W. : Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. Diabetologia 26: 93-98 (1984). ;

- 34- Kirschenbaum, D.M. : Glycosylation of proteins: It's implications in diabetic control and complications. *Pediatr, clin. North. Am.* 31 (3) : 611-621 (1984).
- 35- Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.L., Saudek, C., Lenman, M., Cerami, A. : Correlation of glucose regulation and hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus, *N. Eng. J. Med* 295: 417-420 (1976).
- 36- Martin, D.W., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. : Harper's review of biochemistry. 43-48,, 464 Twentieth edition. Du Liban 1985.
- 37- Mc Donald, M.J., Shapiro, R., Bleichman, M., Solway, J., Bunn H.F. : Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem* 253: 2327-32 (1978).
- 38- Mc Donald, M.J., Bleichman, M., Bunn, H.F., Noble, R.W.: Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin *J. Biol. Chem.* 254: 702-707 (1979).
- 39- Monnier, V.M., Kohn, R.R., Cerami, A. : Accelerated browning of collagen in diabetic humans. *Diabetes* 31 (Supply 2): 28 A (1982).
- 40- Oimomi, M., Hatanaka, H., Ishikawa, K. : Effects of glycosylation on physiological and biological activities of substances. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 3: 59-64 (1984).
- 41- Oimomi, M. : Evaluation of the role of nonenzymatic glycation of tissue proteins in aging and diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 3: 115-117 (1987).

- 42- Oimomi, M., Hata, F., Nakamichi, T., Masuda, S., Maeda, Y., Kitamura, Y., Nishimoto, S., Matsumoto, S., Baba, S., and Kato, H. : Study on the enzyme inhibition advanced products in the maillard reaction. Diabetes supply (1)- 207 A - (1987).
- 43- Oimomi, M., Nakamichi, T., Ohara, T., Sakai, M., Igaki, N., Hata, F., Baba, S. : Fructose related glycation. diabetes research and clinical practice 7: 137-39 (1989).
- 44- Paulsen, E.P., Koury, M. : Hemoglobin A<sub>1c</sub> levels in insulin-dependent and independent diabetes mellitus. Diabetes 25 (Supply 2) : 890-96 (1976).
- 45- Pecoraro, E.H., Graf, J.R., Halter, B.J., and Porte, D. JR. : Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. Diabetes 28: 1120-1125, December (1979).
- 46- Parker, M.K., England, J.D., Costa, J.D., Hess, R.L., and Goldstein, D.E. : Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. Clin. Chem. 27 (5): 669-72 (1981).
- 47- Peterson, C.M., Javanovic, L., Raskin, P., and Goldstein D.E. : A comparative evaluation of glycosylated hemoglobin assays; Feasibility of references and standards. Diabetologia 26: 214-217 (1984).
- 48- Rahbar, S. : An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta 22: 296-98 (1968).



- 49- Rendell, M., Nierenberg, J., Brannan, C., Velentine, Y.L., Stephen, P.M., Dodds, S., Mercer, P., Smith, P., and Wolder, Y. : Inhibition of glycation of albumin and hemoglobin by acetylation in vitro and in vivo. J. Lab. Clin. Med 108: 286-296 (1986).
- 50- Rosenberg H., Modrak, J.B., et al : Glycosylated collagen. Biochem. Biophys. Res. Com. 91: 489-501 (1979).
- 51- Sensi, M., Pricci, F., De Rossi M.G., Morano, S., and Di Mario U. : D-Lysine effectively decreases the nonenzymic glycation of proteins in vitro. Clin. Chem 35/3, 384-387 (1989).
- 52- Shapiro, R., Mc Manus, M., Zalut, C., and Bunn, H.F. : Sites of nonenzymic glycosylation of human hemoglobin A J. Biol. Chem 255: 3120-27 (1980).
- 53- Smith, L.E., Hill, R.L., Handler, P., White, A. : Principles of biochemistry. 99-100., 105-120., 225 General aspects 7. edit. (1981).
- 54- Van Kampen E.J., Zijlstra, W.G., : Mannheim Boehringer "GmbH" Test-combination hemoglobin Kat no: 124729, Clin. Chim. Acta 6: 538 (1961).
- 55- Velicangil, S. : Biyoistatistik. Filiz Kitabevi, İstanbul, 165 (1984).
- 56- Yue, D.K., Morris, K., Mc Lennon, S., and Turtle, Y.R. : Glycosylation of plasma protein and its relation to glycosylated hemoglobin in diabetes. Diabetes 29. April, 296-300 (1980).

57- Yue, D.K., Mc Lennon, S., Handelsman, D.J., Delbridge, L., Reeve T., and Turtle, Jr : The effect of salicylates on nonenzymatic glysoylation and thermal stability of collagen in diabetic rats. Diabetes 33 - August, 745-751 (1984).

**Y. C.**  
**Yükseköğretim Kurulu**  
**Dokümantasyon Merkezi**

