

T603

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**DIABETİK VE AMİNOGUANİDİN UYGULANAN DIABETİK
SIÇANLARDA GLİKASYONUN KORPUS KAVERNOZUM
DOKULARINDAKİ KOLLAJEN TİPLERİNE ETKİSİ**

Dr. Yusuf ÇELİKDEN

T603 / 1-1

Uzmanlık Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Aslı BAYKAL**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2001.01.0103.01 proje no ile desteklenmiştir.

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

Antalya, 2004

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkı ve desteklerinden dolayı, başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aslı Baykal olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Akın Yeşilkaya'ya ve bölümümüzdeki tüm değerli hocalarıma, tezin proje aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Faruk Usta'ya, deneyler sırasında teknik bilgi ve yardımlarından dolayı Arş. Gör. Süreyya Bilmen Sarıkçıoğlu, Dr. Ümit Ali Kayışlı ve Dr. Emin Türkay Korgun'a, uzmanlık eğitim sürem boyunca birlikte çalıştığım tüm uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Yusuf Çelikden

Antalya, 2004

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Teşekkür	i
İçindekiler Dizini	ii
Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitusun Tanımı	3
2.2. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflaması	3
2.2.1. Tip I Diabet	3
2.2.2. Tip II Diabet	3
2.2.3. Diğer Spesifik Diabet Tipleri	4
2.3. Diabetes Mellitusun Patogenezi	7
2.3.1. Tip I Diabetin Patogenezi	7
2.3.2. Tip II Diabetin Patogenezi	8
2.4. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları	9
2.4.1. Akut Komplikasyonlar	9
2.4.2. Kronik Komplikasyonlar	10
2.5. Diabet Komplikasyonlarının Patogenezi Açıklayan Mekanizmalar	11
2.5.1. Sorbitol Yolu	11
2.5.2. Proteinlerin Enzimatik Olmayan Glikasyonu	12
2.5.3. Protein Kinaz C Aktivasyonu	14
2.5.4. Diabetik Mikroanjyopatiye Görülen Damar Değişimleri	14
2.5.5. Otoimmünite	15
2.6. Kollajen	15
2.6.1. Moleküler Yapısı	15
2.6.2. Kollajenin Sınıflandırması	18
2.6.3. Kollajenin Genetiği	22
2.6.4. Kollajen Sentezi	23

2.6.5. Kollajenin Yıkımı	24
2.7. Diabetes Mellitus ve Erektıl Fonksiyon Bozukluğu	25
2.7.1. Ereksiyon Fizyolojisi	25
2.7.2. Diabetle İlgili Erektıl Fonksiyon Bozukluğunun Patofizyolojisi	26
2.8. Aminoguanidin	29
3. MATERYAL ve METODLAR	34
3.1. Diabetin Oluşturulması	34
3.2. Grupların alışılan Serum Parametreleri	35
3.2.1. Glukoz Ölçümü	35
3.2.2. BUN Ölçümü	36
3.2.3. Kreatinin Ölçümü	36
3.2.4. Total Kolesterol Ölçümü	37
3.2.5. Trigliserit Ölçümü	37
3.2.6. HbA _{1C} Ölçümü	38
3.2.7. Osmolarite Ölçümü	39
3.2.8. Elektrolit Ölçümü	39
3.3. Doku Örneklerinin Glikasyon Düzeyinin Belirlenmesi	39
3.3.1. Yöntemin Prensibi	39
3.3.2. Kullanılan özeltiler	39
3.3.3. Standart Solüsyonlar	40
3.3.4. Standart Grafiği	40
3.3.5. Ölçüm Yöntemi	41
3.3.6. Çalışma Solüsyonları	41
3.3.7. Standart Solüsyonlar	42
3.3.8. Ölçüm Yöntemi	43
3.3.9. Kollajen Miktarının Hesaplanması	44
3.4. Protein Miktar Tayini	45
3.4.1. Prensip	45
3.4.2. Gerekli Reaktifler	45
3.4.3. Ölçüm Yöntemi	46
3.5. Doku Örneklerinden Kollajen Ekstraksiyonu	46
3.5.1. Pepsinde özünen Kollajenin Hazırlanması	46

3.6.	Protein Elektroforezi	47
3.6.1.	Gerekli Solüsyonlar	47
3.6.2.	Elektroforez Jelinin Hazırlanması	49
3.7.	Jelin Coomassie Mavisi ile Boyanması	51
3.7.1.	Gerekli Solüsyonlar	51
3.8.	Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	52
3.8.1.	Gereçler	52
3.8.2.	Kimyasal Maddeler	53
3.9.	İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR		54
4.1.	Kan Glukoz ve HbA _{1C} Düzeyleri	54
4.2.	Böbrek Fonksiyonları (BUN ve Kreatinin Düzeyleri)	56
4.3.	Total Kolesterol ve Trigliserit Düzeyleri	58
4.4.	Elektrolitler (Sodyum, Potasyum, Klor) ve Osmolarite Düzeyleri	60
4.5.	Penis Korpus Kavernozum Dokusunda Ölçülen 5-HMF Düzeyleri	64
4.6.	SDS-PAGE ile Korpus Kavernozum Dokusunda Kollajen Düzeylerinin Belirlenmesi	65
5. TARTIŞMA		72
ÖZET		82
KAYNAKLAR		83

KISALTMALAR DİZİNİ

AG	Aminoguanidin
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
ANP	Atrial Natriüretik Peptid
AR	Aldoz Redüktaz
BSA	Bovin Serum Albumin
BUN	Kan Üre Azotu
CMV	Cytomegalovirus
DAG	Diaçil Gliserol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPTC	4,5-dimetil-3-fenaciltiazolium klorit
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EDS	Ehlers Danlos Sendromu
FACITs	Fibrille İlişkili Kollajenler
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
Gly	Glisin
HbA_{1C}	Hemoglobin A _{1C}
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HLA	Human Leucocyte Antigen
5-HMF	5-Hidroksimetil Furfural
HSPG	Heparan Sülfat Proteoglikan
IDDM	İnsüline Bağımlı Olan Diabetes Mellitus
IGF	İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1	İnterlökin-1
ISE	İyon Selektif Elektrot
kDa	Kilo Dalton
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MODY	Gençlerde Görülen Erişkin Tipi Diabet
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NEG	Non-Enzimatik Glikasyon
NIDDM	İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
NK	Natural Killer

NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
OD	Otozomal Dominant
OHpro	Hidroksiprolin
PGE	Prostaglandin E
PIP	Fosfatidil İnozitol-4-Fosfat
PIP2	Fosfatidil İnozitol-4,5-Bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
Pro	Prolin
SDH	Sorbitol Dehidrojenaz
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
STZ	Streptozotosin
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TGF	Transdermal Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL		SAYFA
Şekil 2.1.	Proteinlerin nonenzimatik glikasyonu	13
Şekil 2.2.	Kollajenin üçlü sarmal yapısı	17
Şekil 2.3.	Prokollajen geninin bir bölümü	23
Şekil 2.4.	Çapraz bağ oluşumunun aminoguanidin yoluyla önlenmesi	31
Şekil 2.5.	Amadori ürünü sonrası α -oksoaldehitlerin oluşumu	32
Şekil 3.1.	5-HMF standart grafiği	40
Şekil 3.2.	OHpro standart grafiği	43
Şekil 3.3.	BSA standart grafiği	45
Şekil 4.1.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait kan glukoz düzeyleri	55
Şekil 4.2.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait HbA _{1C} düzeyleri	56
Şekil 4.3.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait BUN düzeyleri	57
Şekil 4.4.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait kreatinin düzeyleri	58
Şekil 4.5.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait total kolesterol düzeyleri	59
Şekil 4.6.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait trigliserit düzeyleri	60
Şekil 4.7.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait sodyum düzeyleri	61
Şekil 4.8.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait potasyum düzeyleri	62
Şekil 4.9.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait klor düzeyleri	63
Şekil 4.10.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait osmolarite düzeyleri	63
Şekil 4.11.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik	

	grupların penis korpus kavernozum dokularında ölçülen 5-HMF düzeyleri	65
Şekil 4.12.	Korpus kavernozumdan kollajen pürifikasyonu sonrası örneklerin SDS-PAGE ile gösterimi (%6'lık ayrışma jeli).	66
Şekil 4.13.	Üç gruba ait örneklerin kollajenaz uygulanması sonrası SDS-PAGE ile gösterimi (%6'lık ayrışma jeli)	67
Şekil 4.14.	SDS-PAGE sonrası dansitometrik olarak ölçülen total kollajen düzeyleri	69
Şekil 4.15.	SDS-PAGE sonrası dansitometrik olarak ölçülen tip I kollajen düzeyleri	70
Şekil 4.16.	SDS-PAGE sonrası dansitometrik olarak ölçülen tip III kollajen düzeyleri	71

TABLolar DİZİNİ

TABLO		SAYFA
Tablo 2.1.	Fibriler kollajenler	20
Tablo 2.2.	Kesintili üçlü sarmallı fibrille ilişkili kollajenler	21
Tablo 3.1.	20 ml ayrışma jeli için gerekli çözelti miktarları	50
Tablo 3.2.	%5'lik yükleme jeli için gerekli çözelti miktarları	51
Tablo 4.1.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait kan glukoz ve HbA _{1C} düzeyleri	54
Tablo 4.2.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait BUN ve kreatinin düzeyleri	57
Tablo 4.3.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait total kolesterol ve trigliserit düzeyleri	59
Tablo 4.4.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait sodyum, potasyum, klor ve osmolarite düzeyleri	61
Tablo 4.5.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik grupların penis korpus kavernozum dokularında ölçülen 5-HMF düzeyleri	64
Tablo 4.6.	Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik grupların penis korpus kavernozum dokularında ölçülen total, tip I ve tip III kollajen düzeyleri	68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus, kronik komplikasyonları nedeniyle mortalite ve morbiditesi yüksek olan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. Hipergliseminin mikrovasküler diabetik komplikasyonları başlatan veya tetiği çeken bir etken olduğu düşünülmektedir. Diabette hipergliseminin azaltılması için, vücutta hücresele düzeyde, birtakım patolojik metabolik yollar çalışmaya başlar. Bu yollardan birisi, dokuların non-enzimatik glikasyona (NEG) uğramasıdır. Diabette, hipergliseminin süresine ve derecesine bağlı olarak, NEG gerçekleşmektedir. Sonrasında ise "advanced glycation end products": [ileri glikasyon son ürünleri (AGE)] oluşmaktadır (1,2). Oluşan bu glike ürünler, primer olarak uzun ömürlü makromoleküllerde birikerek, patolojik süreçleri başlatırlar. Kollajen, bağ dokularının çoğunda bulunan ve oldukça önemli fonksiyonlara sahip olan bir makromoleküldür. Kollajenöz proteinler, serbest amino grubu içeren dibazik aminoasit kalıntıları içerdiklerinden, NEG'a özellikle hassastırlar. Düşük yıkılım hızlarından dolayı da, yüksek düzeyde glukoza maruz kalırlar (3). Glikasyon nedeniyle kollajenin termal stabilitesinde artma, elastisitesinde ve çözünürlüğünde azalma gibi bazı sonuçlar ortaya çıkar (4,5). Dokularda biriken AGE'ler, proteinler arasında çapraz bağ oluşumuna neden olmaktadır. Bu çapraz bağlanmaların, yaşlılık ve diabetik komplikasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (6,7,8)

Aminoguanidin (AG), AGE oluşumunu önlemek için kullanılan prototip bir tedavi edici ajandır. İlerlemiş Maillard reaksiyonu yoluyla oluşan AGE-modifiyeli protein oluşumunu inhibe eder. Bu amaçla hızlıca α,β -dikarbonil öncüllerinden AGE oluşumunu önler. İlk defa Brownlee ve arkadaşları tarafından, *in vivo* Maillard reaksiyonunu inhibe etmek ve böylece diabetik komplikasyonların başlamasını önlemek veya geciktirmek üzere, ümit verici bir farmakolojik ajan olarak tanıtılmıştır (9). O zamandan bu yana, *in vitro* ve *in vivo* AGE oluşumunu önlemede kullanılan AG, çeşitli anormal fizyolojik durumların ve bir çok hastalık süreçlerinin, ilerlemiş glikasyonla bağlantılı olduğuna dair

ispat sağlamıştır. *In vivo* farmakolojik konsantrasyonlarda AG'in , aynı zamanda nitrik oksit sentetaz (NOS) ve amin oksidaz inhibisyonu gibi aktivitelere sahip olduğu da gösterilmiştir (10,11). AG'in NOS aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle de, diyabetin vasküler komplikasyonlarının önlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (12) AG'in özellikle diyabetin başlangıcında verildiğinde, etkili olduğu gösterilmiştir (13,14,15)

Farklı dokulardaki kollajen tipleri arasındaki oranın değişiminin etkileri gösterilmiştir (16,17,18). Eretil disfonksiyonda da, korpus kavernozumdaki kollajen tipleri arasındaki oranın değiştiği bulunmuştur (19). Yine, veno-okluziv disfonksiyon ve Peyronie hastalığı gibi farklı erektil disfonksiyon etyolojilerinde, kollajen tipleri arasındaki oranın bozulduğu gözlenmiştir (20). Ancak, erektil disfonksiyonun etyolojilerinden biri olan diyabetes mellitus'ta kollajen tipleri arasındaki oran gösterilmemiştir. Diabette, kollajen glikasyonu nedeniyle oluşan değişiklikler, erektil disfonksiyonun bir nedeni olabilir.

Yine diyabetik hastalarda sık görülen Peyronie hastalığındaki (21) kollajen tipleriyle karşılaştırma yapılarak, bu hastalığın kesin olarak bilinmeyen etyolojisindeki, diyabetin rolü sorgulanabilir.

Çalışmamızda, 8 haftalık diyabetik ve AG uygulanan diyabetik ratların, penis korpus kavernozum dokularındaki kollajen glikasyonunu, çeşitli yöntemlerle inceledik. Bu amaçla, kontrol grubu, diyabetik ve AG uygulanan diyabetik gruptaki hayvanları 8 hafta boyunca izledik. 8 hafta sonunda, hayvanların serumunda, glukoz, kan üre azotu (BUN), kreatinin, total kolesterol, trigliserit, sodyum, potasyum, klor, osmolarite ve HbA_{1c} gibi parametrelere bakarak, glikasyonun bu parametreler üzerindeki etkisini inceledik. Yine, korpus kavernozumdaki 5-Hidroksimetil furfural (5-HMF) düzeyini ölçerek, doku glikasyon düzeyini saptamaya çalıştık. Ayrıca, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemini kullanarak, korpus kavernozumdaki kollajen tipleri arasındaki oranın değişip değişmediğini bulmaya çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitusun Tanımı

Diabetes Mellitus, insülin sekresyonu ve / veya insülinin etkili olmasındaki bazı bozukluklar sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat, protein ve lipit metabolizması bozukluklarına yol açan, kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diabet prevalansı, toplumlar arasında oldukça farklı bulunmuştur. Bazı toplumlarda hemen hiç görülmezken, bazı toplumlarda %50' lere varan prevalanslar saptanmıştır (22, 23). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise, diabet prevalansı %7,2 bulunmuştur (24).

2.2. Diabetes Mellitusun Etyolojik Sınıflaması

2.2.1 Tip I Diabet

İnsüline bağımlı olan diabetes mellitus (IDDM) adıyla da bilinir. Genellikle genç ve şişman olmayan kişilerde görülmekle birlikte, her yaşta görülebilir. Farklı etyolojik nedenleri arasında en sık görüleni, pankreas beta hücrelerinin otoimmün idyopatik yıkımıdır. Bu yüzden tedavide insülin mutlak gereklidir. Dışarıdan insülin verilmesiyle, gliseminin düzenlenmesi ve hastaların ketoasidoza girmesi engellenir. Belli HLA antijenlerine sahip kişilerde, tip I diabet oluşma riskinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu gruptaki hastalar, tüm diabetik popülasyonun %10-20 kadarını oluşturur.

2.2.2 Tip II Diabet

İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) olarak da bilinir. Toplumda en sık görülen diabet tipidir. Daha çok, 40 yaş üzerindeki şişman kişilerde görülür. Bu gruptaki hastalar ketoasidoza dirençli olup, insülin tedavisine gerek duymazlar. Obez ve obez olmayan NIDDM olarak iki gruba ayrılabilir. Obezlerde insülin direnci daha önemliyken, obez olmayanlarda insülin

sekresyon bozukluğu ön plandadır (25, 26). Aile öyküsü hemen bütün hastalarda olmasına karşılık, hastalık henüz tek bir genetik zemine oturtulamamıştır.

2.2.3. Diğer Spesifik Diabet Tipleri

a) Beta Hücre Fonksiyonunda Genetik Bozukluklar

- Kromozom 20, HNF-4 α (MODY 1)
- Kromozom 7, glukokinaz (MODY 2)
- Kromozom 12, HNF-1 α (MODY 3)
- Kromozom 13, IPF 1 (MODY 4)
- Mitokondrial DNA 3243 mutasyonu
- Diğerleri

Maturity-onset diabetes of the young = Gençlerde görülen erişkin tipi diabet (MODY) ve mitokondrial diabet bu gruptandır. MODY, otozomal dominant (OD) geçişli olup, 25 yaşından önce başlar. Farklı kromozomlardaki üç genetik lokusta anomali saptanmıştır. NIDDM'un bir alt tipi olarak tarif edilen mitokondrial diabette, mitokondrial DNA nokta mutasyonları gösterilmiştir.

b) İnsülin Etkisinde Genetik Bozukluk

- Tip A insülin rezistansı
- Leprechaunizm
- Rabson-Mendenhall sendromu
- Lipoatrofik diabet
- Diğerleri

İnsülin reseptör mutasyonlarıyla birlikte görülen metabolik bozukluklar, hafif hiperglisemiden ağır diabete kadar farklılık gösterebilir.

c) Ekzokrin Pankreas Hastalıkları

- Pankreatit
- Travma/Pankreatektomi

- Neoplazm
- Kistik fibroz
- Hemakromatoz
- Fibrokalküloz pankreas
- Diğerleri

Pankreasta yaygın hasar oluşturan her türlü olay, diabete neden olabilir.

d) Endokrinopati

- Akromegali
- Cushing sendromu
- Glukagonoma
- Feokromasitoma
- Hipertiroidizm
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma
- Diğerleri

İnsülin etkisini antagonize eden büyüme hormonu, kortizol, glukagon, epinefrin gibi hormonların aşırı salgılanması diabete neden olur.

e) İlaç ya da Kimyasallara Bağlı

- Pentamidin
- Nikotinik asit
- Vakor
- Glukokortikoidler
- Tiroid hormonu
- Diazoksit
- Beta adrenerjik agonistler
- Tiazidler
- Dilantin
- Alfa-interferon tedavisi

-Diğerleri

Bu ilaçlar, insülin direnci olan kişilerde diabet oluşumunu hızlandırır. Vakor ve intravenöz pentamidin gibi toksik maddeler, beta hücrelerinde kalıcı hasara yol açarlar.

f) Enfeksiyonlar

-Konjenital rubella

-Sitomegalovirüs

-Diğerleri

Konjenital rubella hastalarında oluşan diabette, tip I diabetekine benzer Human Leucocyte Antigen (HLA) gruplarına rastlanmıştır. Ayrıca sitomegalovirüs, koksaki ve kabakulak virüsünün diabet oluşumuna yol açtığı ileri sürülmüştür (27, 28).

g) İmmün Diabetin Nadir Formları

-Anti-insülin antikoru

-Stiff-man sendromu

-Diğerleri

h) Diabetle Birlikte Görülebilen Genetik Sendromlar

-Down sendromu

-Klinefelter sendromu

-Turner sendromu

-Wolfram sendromu

-Friedreich ataksisi

-Huntington koresi

-Laurence-Moon-Biedl sendromu

-Myotonik distrofi

-Porfiria

-Prader-Willi sendromu

-Diğerleri

Down, Klinefelter ve Turner sendromu gibi kromozom anomalilerinin olduğu genetik sendromlar, artmış diabet sıklığı ile birlikte. Tip I ve Tip II diabet aynı zamanda primer diabetes mellitus olarak da bilinir ve diabetik hastalıkların büyük kısmını oluşturur. Bunun dışında kalan diabet tipleri sekonder diabetes mellitus başlığı altında incelenir.

2.3. Diabetes Mellitusun Patogenezi

2.3.1 Tip I Diabetin Patogenezi

a) Genetik Yatkınlık ve İmmünojenetik Patogenez

Tip I diabet riskini artıran çeşitli genler saptanmıştır (29, 30, 31). Bu genler içerisinde en önemlisi IDDM I genidir. Bu gen, 6 kromozomun kısa kolu üzerinde HLA (Human Leucocyte Antigen) bölgesinde bulunan Class II molekülleriyle ilişkilidir. MHC (Major Histocompatibility Complex) Class II molekülleri spesifik otoimmüniteden sorumludur.

b) Çevresel Etkenler

Virüsler beta hücrelerini infekte ederek ya da yıkıma uğratarak tip I diabet gelişiminde rol oynayabilirler. Rubella, Retrovirüs, CMV (Cytomegalovirus), kabakulak virüsü bunlara örnektir (32). İnek sütünün fazla kullanıldığı ülkelerde, tip I diabet insidansı yüksektir. Sığır serum albüminine karşı gelişen bir antikorun, otoimmün reaksiyonu başlattığı gösterilmiştir (33). Bu nedenle tip I diabetiklerin, diabetik olmayan birinci derece akrabalarında, anne sütünün uzun süreli verilmesi önerilir. Bazı gıda maddelerinde kullanılan nitrosamin türevleri, tütülenmiş balık gibi gıdaların da otoimmün diabeti başlatabileceği bildirilmiştir (34).

c) İnsülitis

Virüs ya da toksinlerle doğal yapısı bozulan beta hücreleri, salgıladığı interferon- α (IFN α) gibi sitokinlerle ya da antijenik peptidlerle immün sistemi uyandır. Sonuçta adacıklar makrofajlar, CD8+ ve CD4+ T lenfositleri, NK (Natural Killer) hücreleri ve B lenfositlerince infiltre edilerek yıkıma uğratılır (35, 36).

d) Beta hücre otoantijen ve otoantikorları

T hücreleriyle etkileşerek immün reaksiyonu başlatan bir çok beta hücre otoantijeni saptanmıştır (37, 38, 39).

2.3.2 Tip II Diabetin Patogenezi

a) İnsülin Salgılanmasında Bozukluk

Genellikle beta hücre kitlesi %80 azaldığında diabet olduğu bilinmektedir. Tip II diabetlilerde ise beta hücre kitlesinin %20-40 dolayında olduğu söylenmektedir. Ayrıca düşük doğum ağırlığı olanlarda, ileri yaşlarda NIDDM gelişebileceği ileri sürülmüştür (40, 41). Yüksek glukozla sürekli maruz kalan beta hücrelerinde, insülin sentez ve sekresyonunun azaldığı gözlenmiştir (glukoz toksisitesi). Tip II diabetiklerde, pankreasta amilin (adacık amiloid polipeptid) birikiminin saptanması ve sıçanlarda, amilinin insülin salgılanmasını baskılaması bu hormonun patogeneizde rol oynayabileceğini göstermiştir (42, 43).

b) İnsülin Direnci

Hüresel olarak prereseptör, reseptör ve postreseptör düzeyinde insülin direnci görülebilir.

- Prereseptör düzeyinde insülin direnci: İnsülin gen mutasyonları nedeniyle defektif insülin salgılanması ve dolaşımında insülin antagonistlerinin varlığı dirence neden olabilir. Yine hedef dokulardaki yetersiz kan akımı sebeplerden biridir.
- Reseptör düzeyinde insülin direnci: Reseptör sayısında azalma ve reseptör mutasyonları nedeniyle oluşur. Tanımlanan mutasyonların çoğu, insülin reseptör fonksiyonlarındaki spesifik bir defektle ilişkilidir. Yine de reseptör sayısındaki azalma tek başına insülin direncini açıklayamamaktadır (40, 41, 42).

- Postreseptör düzeyinde insülin direnci: İnsülin direnci gelişiminin, en çok bu düzeydeki patolojiler nedeniyle ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Kas dokusunda bozulmuş glukoz metabolizması, insülin reseptör tirozin kinaz aktivitesindeki azalma ve sinyal iletim yollarındaki defektler bunlara örnektir (43-49).

2.4. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

2.4.1 Akut Komplikasyonlar

a) Diabetik Ketoasidoz

Mutlak ya da göreceli insülin yetersizliği sonucu gelişen; ağır hiperglisemi, hiperketonemi ve ketoasidoz gibi biyokimyasal bulguları olan, akut bir komplikasyondur. Öncelikle tip I diabetiklerde görülse de, bazı durumlarda tip II diabetiklerde de görülür. Tüm diabetiklerde, bu komplikasyon nedeniyle ortaya çıkan mortalite %6-10 kadardır (50).

b) Hiperglisemik Hiperosmolar Nonketotik Koma

Genellikle 60 yaş üzerindeki tip II diabetik hastalarda görülür. Ketoz genellikle görülmez. İleri derecede hiperglisemi (600-1200 mg/dl), plazma hiperosmolaritesi, dehidratasyon ve mental değişikliklerle karakterize, mortalite oranı yüksek bir komplikasyondur (51, 52).

c) Hipoglisemi

İnsülin ya da sülfonilüre tedavisi sırasında ilaç dozu, gıda alımı ve enerji tüketimindeki problemler nedeniyle ortaya çıkabilen hipoglisemi, sık rastlanan bir akut komplikasyondur. Uzamış ağır hipoglisemi, kalıcı nörolojik sekellere yol açabilir (53)

d) Laktik asidoz

Laktik asidozun, diabetiklerde sık görülen iki nedeni; diabetik ketoasidoz ve biguanid tedavisi sonrası görülen laktik asidozdur. Özellikle vasküler komplikasyonları yerleşmiş diabetiklerde, gelişen ani bir hastalık sonucu kolayca doku hipoksisi gelişebilmekte ve bu da laktik asidoza yol açabilmektedir.

2.4.2. Kronik Komplikasyonlar

a) Büyük Damar Hastalığı (Ateroskleroz)

Bozulmuş glukoz toleransı, kardiyovasküler olayların gelişebileceğinin göstergesidir. Diabet, ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı gelişimi açısından bir risk faktörüdür. Yine, diabetik hastalarda en sık morbidite ve mortalite nedenleri aterosklerotik komplikasyonlardır. Kan basıncı, total kolesterol, trigliserit, düşük dansiteli lipoprotein (LDL), çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) kolesterolü ve fibrinojen gibi aterojenik risk faktörleri diabetiklerde, normal kişilere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu da, aterosklerotik komplikasyonların, diabetiklerde daha erken yaşta ve daha sık görülmesine neden olur (54).

b) Diabetik Nefropati

Son dönem böbrek yetmezliğinin en sık nedeni diabettir. Tip I diabet hastalarının % 30-40, tip II diabetlilerin % 5-10 kadarında diabetik nefropati gelişir. Diabette böbrekte görülebilen patolojiler; nodüler glomerüloskleroz (diabetik nefropati için patognomonik), diffüz glomerüler lezyonlar, eksüdatif ve arteriyel lezyonlardır (55).

c) Göz Komplikasyonları

Diabetik retinopati: Nonproliferatif ve proliferatif olarak ikiye ayrılır. Nonproliferatif retinopati; retinal mikroanevrizmalar, eksüda, kanama ve venöz değişikliklerle birlikte. Proliferatif retinopati ise vitreus içi hemorajiler, retina dekolmanı ve ileri dönemde görme kaybına neden olur.

- Konjonktival değişiklikler

- Orbital infeksiyonlar
- Katarakt
- İris dejenerasyonu (56, 57)

d) Diabetik Nöropati

- Duyusal ve sensorimotor polinöropati
- Simetrik alt ekstremitte motor nöropatisi
- Otonom nöropati
- Kranial nöropati

e) Diabetik Ayak

f) Diabetin Gastrointestinal Sistem Komplikasyonları

2.5. Diyabet Komplikasyonlarının Patogenezini Açıklayan Mekanizmalar

Hipergliseminin azaltılabilmesi için, hipergliseminin tetiklediği, hücresel seviyelerdeki bir takım patolojik yollar çalışmaya başlar. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

2.5.1 Sorbitol Yolu

Sorbitol, insan organizmasında bulunan 6 karbonlu bir polyoldür. “ Polyol Yolu” olarak da bilinen metabolik olayda, glukozdan sorbitol ve sorbitolden fruktoz oluşur. Tek yönlü gerçekleşen bu reaksiyonların ilki aldoz redüktaz (AR) ile, ikincisi sorbitol dehidrojenaz (SDH) ile katalizlenir. Lens, beyin, eritrosit, böbrek ve karaciğerde sorbitol yolu etkindir. Ayrıca bu dokuların ortak özelliği, hücrelere insülininden bağımsız glukoz girebilmesidir. Hiperglisemide, AR aktivitesi artarken, SDH aktivitesi azalmaktadır. Bu nedenle, dokularda sorbitol birikir. Biriken sorbitolün su çekme özelliği nedeniyle, hücrede ödem, hidropik dejenerasyon ile hasarlanma ortaya çıkar.

Myoinozitol hücre içinde ekstrasellüler ortama göre daha fazla bulunan bir siklik hekzahidroksi-hekzanoldür. Besinlerle alınabileceği gibi, glukoz ve glukoz-6-fosfattan da sentezlenebilir. Myoinozitol yapısal olarak glukozu benzerdir. Bu sebeple, hiperglisemi durumunda glukoz, myoinozitol taşıyıcılarıyla yarışarak, hücreye myoinozitol girişini engeller. Böylece hiperglisemiye paralel olarak, hücre içi myoinozitol seviyeleri düşer. Hücre içinde myoinozitol azalması, fosfatidil inozitol-4-fosfat (PIP) ve fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat (PIP2) düzeylerini azaltmaktadır.

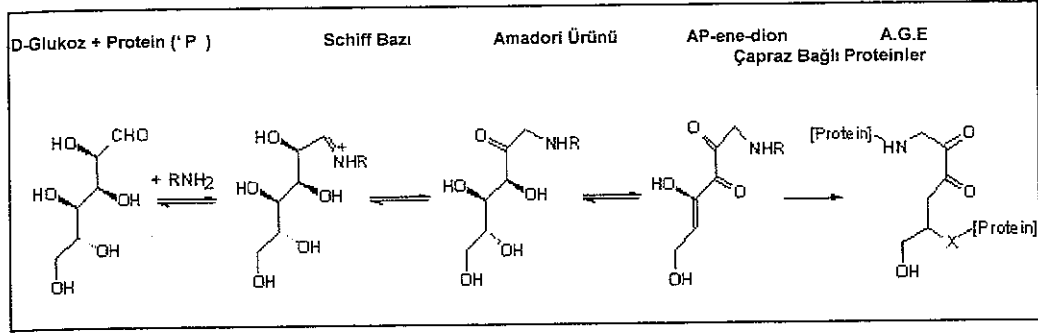
Fosfoinozid metabolizmasının bozulması dolaylı olarak, protein kinaz C ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya yol açar. Zaten azalmış olan hücre içi myoinozitol miktarı, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki azalma nedeniyle (Na^+ bağımlı myoinozitol transportu) daha da düşer. Na^+/K^+ ATPaz sinir hücrelerinde enerji sağlamada kullanılan bir enzimdir. Azalan enzim aktivitesi nedeniyle sinir hücrelerinde sodyum birikimi gerçekleşir. Bu birikim nedeniyle sinir iletim hızında yavaşlama görülmüştür.

Sorbitol yolunun etkinlik kazanması nedeniyle farklı dokularda da sorbitol birikimi ve hücre içi myoinozitol miktarında azalma bildirilmiştir (58).

2.5.2. Proteinlerin Enzimatik Olmayan Glikasyonu

Nonenzimatik glikasyon, indirgeyici şekerlerin protein ve nükleik asitlerin bazik amino gruplarıyla olduğu kadar, aminlerle de reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Böylece şeker-protein kompleksi bir N-glikozid bağıyla kovalan olarak birbirine bağlanır.

Yaşlanma sürecine bağlı olarak, nonenzimatik glikasyona fizyolojik olarak rastlanabilir. Ancak, diabet gibi glukoz konsantrasyonunun arttığı durumlarda bu durum daha hızlı ve yoğun biçimde görülür (1, 5).



Şekil 2.1. Proteinlerin nonenzimatik glikasyonu

(www.faculty.smu.edu/svik/5310/projects2001/lmage16.gi)

Fizyolojik pH'da lizin ve arjininin ε-amino grupları gibi serbest amino grupları içeren proteinlerin, glukoz gibi şekerlerin aldehit veya keton gruplarıyla reaksiyonu sonucu nonenzimatik glikasyon başlar. Önce stabil olmayan Schiff bazları oluşur. Bu bazlar, glikasyonun devam etmesiyle, haftalar içinde daha stabil bir bileşik olan ketoamin türevi Amadori ürününe dönüşürler.

Kısa yarı ömürlü proteinler, hiperглиsemik ortamda, geri dönüşümlü glikasyon ürünlerine çevrilirler. Ancak uzun ömürlü yapısal proteinler ise, glukoz konsantrasyonu yüksek kaldığı sürece glikasyona uğrayarak, ileri glikasyon son ürünlerine (advanced glycation end products=AGEs) dönüşürler (2, 3).

AGE'ler uzun ömürlü olan nükleik asitlerde birikerek kromozom hataları, DNA iplikçiklerinde kopmalar, DNA tamir, replikasyon ve transkripsiyonunda bozukluklar gibi sonuçlar ortaya çıkmasına neden olabilirler (59).

AGE reseptörleri, endotel hücreler, monosit/makrofajlar, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve mezengial hücrelerde bulunurlar (60). AGE'ler bu reseptörler tarafından tanınır ve uzaklaştırılır. Ancak AGE reseptörlerinin sadece yakalayıcı reseptörler olarak görev yapmayıp, aynı zamanda hücrel fonksiyonda bazı değişiklikleri indükledikleri ve hücre içi sinyalizasyona aracılık ettikleri gözlenmiştir. AGE proteininin spesifik reseptörüne bağlanması, makrofajlardan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), interlökin-I (IL-I) ve insülin-benzeri büyüme

faktörü (IGF) salınımına neden olur. Bu sitokinler tip IV kollajen sentezinin artışına ayrıca endotel, mezengial ve düz kas hücre proliferasyonunun artmasına katkıda bulunurlar (1, 2).

2.5.3 Protein Kinaz C Aktivasyonu

Protein kinaz C (PKC), vasküler dokunun permeabilite, kontraktilite, koagülasyon, büyüme faktörlerinden etkilenme gibi olaylarında etkili olan bir enzimdir. Hiperglisemi ve asidik ortamda enzim aktivitesi artar. Beraberinde diaçil gliserol (DAG) seviyesi de yükselir. Bu artışlar beyin, eritrosit ve böbrek dışındaki dokularda fonksiyon bozukluklarına yol açar. Dokularda kontraktilite bozukluğu, koagülasyona eğilim ve büyüme faktörlerine karşı duyarlılık gelişir. Hiperglisemi ortadan kalktığında, fonksiyonlar normalleşir (61).

Forbol esterleri de PKC aktivitesini uyarabilirler. Hayvan aort kültürlerindeki endotel hücrelerinde PKC' nin kronik uyarılması, heparan sülfat proteoglikan (HSPG) sentezinde artışa yol açmıştır. Kronik hiperglisemiye maruz kalan büyük arterlerin endotel hücrelerindeki HSPG azalmasının, diabetteki *in vivo* şartlar için de geçerli olduğu düşünülmektedir. Çünkü diabetik hastalardan alınan aort intima tabakalarında, heparan sülfat/dermatan sülfat oranının oldukça düşük olduğu bulunmuştur (62).

2.5.4 Diabetik Mikroanjiopatide Görülen Damar Değişimleri

Diabette renal glomeruluslarda kan akımının artmış olduğu saptanmıştır. Renal kan akımının ve filtrasyon hızının artışına, atrial natriüretik peptid (ANP), büyüme hormonu ve IGF gibi maddelerin neden olabileceği bildirilmiştir (63,64). Diabetik damar hastalığının diğer önemli bir belirtisi, kapiller geçirgenlikteki artıştır. Bu, en belirgin olarak retina ve renal glomeruluslarda görülür. Artmış damar geçirgenliği, makromoleküllerin ve proteinlerin damar dışına çıkmasına

neden olur Bu durum mezengial ve bazal membran hücrelerinin artışına yol açar Bu hipotez özellikle, böbreklerde görülen diabetik değişiklikleri açıklamak için kullanılmıştır.

2.5.5. Otoimmünite

Diabetik otonom nöropatisi olan hastaların otonom ganglionlarında, inflamatuvar infiltrasyonların bulunması nedeniyle immünolojik bozuklukların da patogeneizde rolü olabileceği düşünülmüştür. Yine yapılan çalışmalarda, nöropatisi olan NIDDM' lilerde glutamik asit dekarboksilaz (GAD) otoantikorları bulunmuştur. Hastalığın başlangıcında yüksek olan ve zamanla azalan GAD otoantikorları nöropati gelişimiyle tekrar artmaktadır (65,66).

2.6. Kollajen

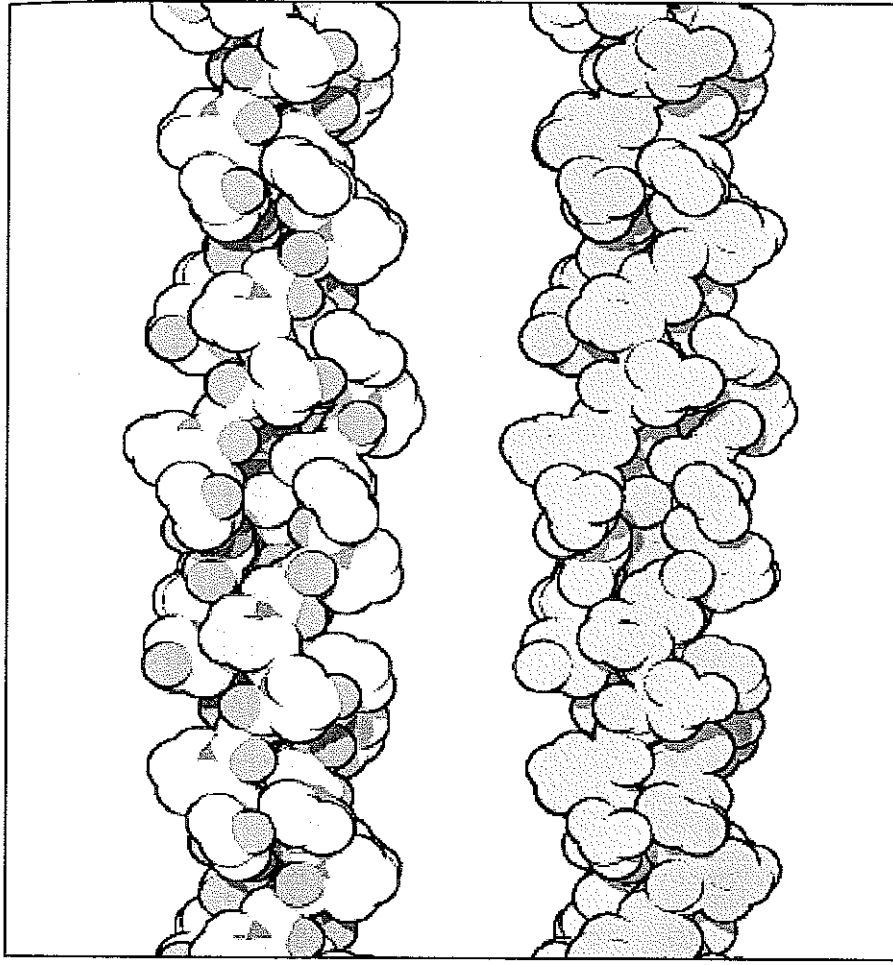
Kollajen denilince, hem bağ dokunun fibröz elementleri hem de, spesifik fibröz proteinleri kodlayan çeşitli gen aileleri akla gelir. İnsan vücudundaki proteinlerin %30 kadarını oluşturan kollajen, en yaygın olan proteindir. Temel fonksiyonu vücut organ ve dokularını şekillendirmek ve yapısal güç sağlamaktır.

2.6.1. Moleküler Yapısı

Kollajen, α -zinciri denilen ve her biri yaklaşık 95 kDa molekül ağırlığında olan üç polipeptid zincirinden oluşmuştur. Bu zincirler birbiri içine geçerek, üçlü sarmal ya da süper sarmal denilen yapıyı oluşturur. Her bir α -zinciri yaklaşık 1000 aminoasit içerebilir. Globüler yapıdaki proteinlerden farklı olarak, kollajenin yapısında yüksek oranda (%33) glisin bulunur. Prolin %10, hidroksprolin %10, hidrosilizin %1 gibi oranlardadır. Polipeptid zincirin yapısında, X ve Y herhangi bir aminoasit olmak üzere, Gly-Pro-Y ve Gly-X-OHpro şeklinde sıkça tekrarlanan

üçlü aminoasit dizilimlerine rastlanır. Bu aminoasit dizilim tekrarları neredeyse polipeptid zincirinin %60 kadarını oluşturur.

Polipeptid zincirinde, her üç aminoasitten birinin glisin olması, süper sarmal yapının oluşumunda önemlidir. Sarmalın merkezinde bulunan glisin, sterik engel oluşturmaz. Polipeptid zincirindeki prolin ve hidroksiprolin halkasal yapılarından dolayı, zincirlerin rotasyonunu kısıtlar ve zincir içi hidrojen bağ oluşumunu engeller. Bu özellikleriyle, süper sarmal yapıya stabilite sağlarlar (67).



Şekil 2.2. Kollajenin üçlü sarmal yapısı (www.rcsb.org/pdb/molecules/collagen)

Kollajen molekülleri, kovalent çapraz bağlar ile birbirine bağlıdır. Prokollajen molekülünün lizil veya hidroksilizil kalıntısının aldehit grubu ile diğer kollajenin ϵ -amino grubu arasında Schiff bazı şeklinde kovalent bağlar oluşmaktadır. Reaksiyon yapısında bakır iyonu bulunan lizil oksidaz tarafından katalizlenir. Çapraz bağ ile bağlanan prokollajen molekülleri, destek fonksiyonunu gerçekleştirebilecek kuvveti kazanmaktadırlar.

Yapılan çalışmalarda, prokollajen moleküllerini birbirine bağlayan polifonksiyonel bazı yeni bileşikler bulunmuştur. Pentosidin, karboksi metillizin, metilglioksal ve 3-deoksiglukazon bunlara birer örnektir (68-70).

Kollajen yapısındaki çapraz bağ oluşumu süreklilik göstermektedir. Yaşlanmanın yanı sıra diabette de, kollajen çapraz bağ oluşumunda artış olduğu bilinmektedir (6,7,8,9,14).

2.6.2 Kollajenin Sınıflandırması

Farklı kollajen alt birimlerinin birikimiyle farklı kollajen tipleri ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, en az 30 değişik gen dizilimi ile kodlanan 25 kadar değişik kollajen polipeptidinin bulunduğu gösterilmiştir. ECM'de bu değişik polipeptidler, 13 farklı kollajen tipi şeklinde bulunmaktadır (71).

1. Grup Kollajenler (Tip I, II, III, V, XI)

Bağ dokularının çoğunda bulunan fibriler kollajenlerdir. Rutin elektron mikroskopunda kolaylıkla görülebilen, çizgili kollajen fibrillerinden oluşmuşlardır. Yaklaşık 300 nm uzunluğunda kesintisiz bir sarmal bölge ile karakterizedirler. İlk önce prokollajen prekürsörleri olarak sentezlenirler. Tip I kollajen, diğer kollajen tipleri için model olmakla birlikte, ayrı ayrı $[\alpha_1(I)]_2$ ve $[\alpha_2(I)]$ zincirleri içeren heterojen bir moleküldür. Kollajen tip II ve III ise üç aynı polipeptid zincirine sahiptir ($[\alpha_1(II)]_3$ ve $[\alpha_1(III)]_3$).

Tip III kollajen; yapısında yüksek oranda hidroksiprolin bulunması, glisin miktarının fazla olması (kalıntıların %33'ünden fazlası) ve üçlü sarmalın karboksi uç bölgesine yakın iki sistein kalıntısı içeren molekül içi disülfit bağlarının bulunması gibi özelliklere sahiptir. Tip III kollajen, tip I kollajen içeren dokulardan elde edilebilir. Her ikisi birlikte, karışık fibriller oluşturabilirler.

Tip III kollajenin fetal derideki rölatif oranı, neonatal veya erişkin derisinden oldukça yüksektir. Bu yüzden, bu kollajene fetal veya embriyonik kollajen de denilmiştir. Genelde, tip III kollajenin tip I kollajene göre miktarı, doku uzanabilirliği ile ilişkilidir. Bu da, tip III kollajeni oluşturan fibrillerin biyomekanik özelliklerine bağlanabilir. Ehlers-Danlos sendromu (EDS) tip IV'de,

tip III kollajen genleri mutasyona uğramıştır. Buna bağlı olarak, azalmış esneklik ve deri, kan damarlarında artmış kırılabilirlik izlenir (72).

2. Grup Kollajenler (Tip IV ve VII)

Desement membranı ve bazal membranlar bunlara örnektir. Büyük molekül ağırlıklı (>160 kDa) ve uzamış üçlü sarmal (>350 nm) yapıya sahiptirler. Fibriler kollajenlerden farklı olarak üçlü sarmal yapıda kesintileri vardır. Bu kesintiler kollajenin dokuya spesifik özellik kazanmasına neden olur (72).

3. Grup Kollajenler (Tip VI, VIII, IX, X, XII)

Molekül ağırlıkları 60-280 kDa arasında değişen kısa zincirli, fibriler olmayan kollajenlerdir. Tip IX ve XII kollajende kesintili sarmal bölgeler bulunmaktadır. Kesintili üçlü sarmalları olan fibrille ilişkili kollajenler (FACITs), fibrilleri diğer matriks elemanlarına bağlarlar (71)

Tip	Moleküler Polimer	Doku Dağılımı	Fonksiyonu	Molekül Ağırlığı (kDa)
I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ $[\alpha_1(I)]_3$	Gingiva, periodontal ligament, kemik, sementum, deri ve tendon gibi pek çok bağ dokusu	Gerilme direnci sağlar	285
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Kıkırdak, vitröz humor	Gerilme direnci sağlar	285
III	$[\alpha_1(III)]_3$	Gingiva, periodontal ligament, kemik, sementum, deri, tendon, fetal doku ve kan damarları	Gerilme direnci sağlar	285
V	$[\alpha_1(V)]_3$ $[\alpha_1(V)]_2[\alpha_2(V)]$ $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$	Deri, kan damarları, iskelet kası, düz kas, gingiva ve periodontal ligament gibi interstisyel dokularda	Bazal membran ve stroma arasında bağlayıcı	300
XI	$\alpha_1(IX)\alpha_2(IX)\alpha_3(IX)$	Kıkırdak, vertebralar arası disk	Tip II kollajen proteoglikan etkileşimlerini düzenler	300

Tablo 2.1. Fibriler kollajenler (www.uic.edu/classes/peri/peri_612/persyb5)

Tip	Moleküler polimer	Doku dağılımı	Fonksiyonu	Molekül Ağırlığı (kDa)
IX	$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})$	Vitröz humor, kırıkta perisellüler bölge	Tip II kollajene bağlanır ve diğer bağ doku elemanlarının bağlanmasına aracılık eder	210
XII	$[\alpha_1(\text{XII})]_3$	Embriyonik deri, tendon ve periodontal ligament	Tip I kollajene bağlanır ve diğer bağ doku elemanlarının bağlanmasına aracılık eder	220
XIV	$[\alpha_1(\text{XIV})]_3$	Gingiva, periodontal ligament, kemik, sementum, deri, tendon, fetal doku ve kan damarları	Bilinmiyor	220

Tablo 2.2. Kesintili üçlü sarmallı fibrille ilişkili kollajenler.

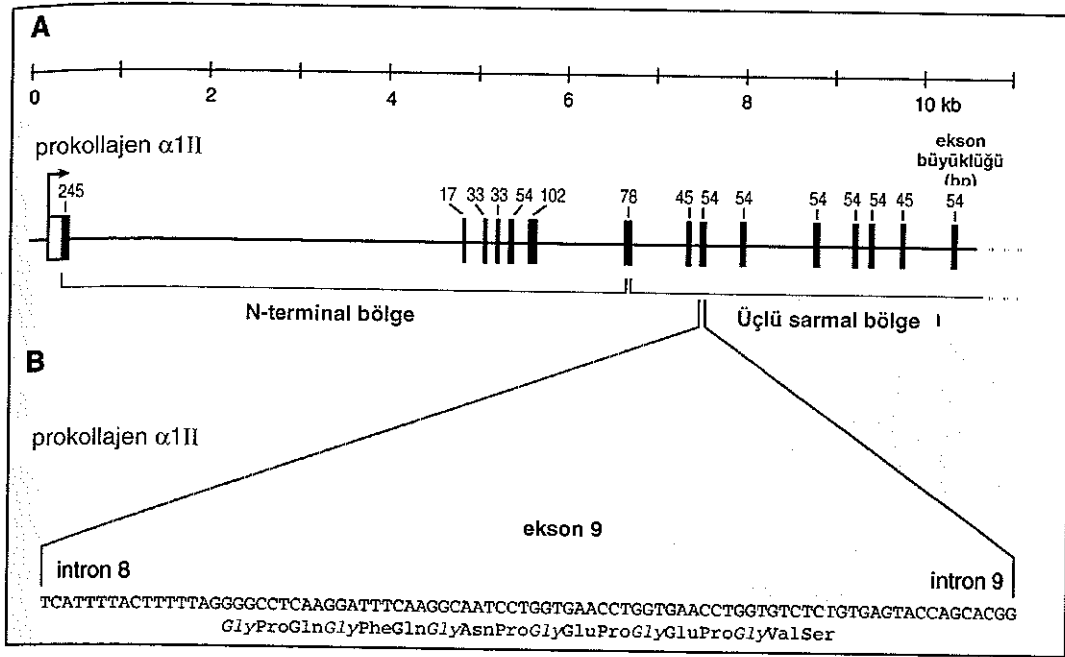
(www.uic.edu/classes/peri/peri_612/persyb5)

2.6.3. Kollajenin Genetiği

Rekombinant DNA teknolojisi, kollajen gen ve proteinlerini anlamamızda etkili olmuştur. Böylece I, II, III ve V kollajenin genleri saptanabilmiştir. Hücre hibridizasyonu yöntemiyle 17. kromozomun tip I' kollajen α_1 ve α_2 zincirlerini kodlayan bilgiyi içerdiği gösterilmiştir (73). Pro- α_1 (I) için (COL1A1) ve Pro- α_2 (I) için (COL1A2) genomik düzenlemeleri benzer fibriler kollajenlerin düzenlemelerini de yansıtır. Kollajen tip I in merkezi üçlü sarmalı 42 ekson tarafından, karboksi ve amino uç propeptidleri sırasıyla 4 ve 6 ekson tarafından kodlanmıştır.

Karboksi uçtan başlayıp amino uca doğru ilerleyen üçlü sarmal modeli, Gly-X-Y bloklarının devamlılığı ile belirlenir. Osteogenesis imperfekta (tip I kollajen sarmalı), bazı kondrodizplaziler (tip II kollajen sarmalı) ve EDS (tip III kollajen sarmalı) hastalıklarında olduğu gibi bozulmuş üçlü sarmalın yol açtığı hastalık örnekleri vardır.

Merkezi üçlü sarmaldan oldukça farklı olan amino ve karboksi uç propeptidlerin, globüler düzenleri vardır. Sıralamayı kodlayan Gly-X-Y blokları art arda ekson sıraları halinde organizedirler. Eksonlar karboksi ucunu kodlayan sıraları içerir. Karboksi propeptidi olan prolin zincirin toplanmasında başlangıç noktası olarak görev alır ve spontan olarak bir sonraki üçlü sarmala eşlik eder. Kritik aralarla çok önemli stabilize edici disülfid bağları yerleştirilmiştir (73).



Şekil 2.3. Prokollajen geninin bir bölümü ([www.unc.edu/.../2003ss1/biol/050/001/collagen](http://www.unc.edu/~.../2003ss1/biol/050/001/collagen))

2.6.4. Kollajen Sentezi

Çekirdekte DNA molekülünden ribonükleik asit (RNA) molekülünün oluşturulduğu transkripsiyon ile ribozomlarda mRNA yapısının taşıdığı bilgiye göre protein zincirinin sentezlendiği translasyon aşamaları, kollajen sentezinin ilk iki basamağını oluşturur. Karboksi propeptidi olan prolin zincirin toplanmasında başlangıç noktası olarak görev alır ve daha sonra, kollajen yapısında posttranslasyonel değişiklikler gerçekleşir. Hücre içinde gerçekleşen bu olaylar sonrasında tropokollajen adını alan molekül, golgi cisimciğinin salgı vezikülleri ile, hücre dışına salgılanmaktadır. Hücre dışındaki bazı biyokimyasal tepkimelerden sonra kollajen fibrilleri ve lifleri oluşmaktadır.

Prokollajenin pürtüklü endoplazmik retikuluma taşınmasında preprokollajen molekülü görev alır. Bir sinyal aminoasit dizilimi içeren preprokollajenin yapısından sinyal peptidaz ile sinyal peptidi koparılmakta ve prokollajen serbestleşmektedir. Prokollajenin karboksil ucunda, kollajende

bulunmayan 200-300 aminoasit kalıntısı bulunmaktadır. Her bir pro- α zincir, kollajenin α zincirinden %30-40 daha uzundur. Prokollajen yapısında posttranslasyonel değişiklikler oluşmaktadır. Karboksil ucundaki sistein kalıntılar zincirler arası disülfid köprülerini, amino ucundaki sistein kalıntıları ise zincir içi disülfid köprülerini oluşturmaktadır. Bu disülfid köprüleri, üçlü sarmal yapının oluşumunda büyük önem taşımaktadır.

Diğer bir modifikasyon, prolin ve lizin kalıntılarının hidroksillenmesidir. Kollajene özel bir aminoasit olan hidroksiprolinin sentezinde prolin-4-hidroksilaz, ve hidroksilizin sentezinde ise lizil hidroksilaz enzimleri kullanılır. Katalizledikleri tepkimede O_2 ve α -ketoglutarat kullanan bu enzimler için Fe^{+2} ve askorbik asit gerekmektedir.

Oluşan üçlü sarmal, endoplazmik retikulumdan golgi cisimciğine translokale olmakta ve daha sonra hücre dışına salgılanmaktadır. Hücre dışında, ilk olarak karboksipeptidaz enzimi karboksil, aminopeptidaz enzimi ise amino ucundan propeptidleri ayırmaktadır. Bu propeptidlerin ayrılmasından sonra kollajen molekülleri, kollajen liflerini oluştururlar. Kollajenin güç kazanabilmesi için, lifler arasında kovalent bağların oluşması gerekmektedir. İlk basamakta, lizil ve hidroksilizil kalıntılarının oksidatif deaminasyonu, lizil oksidaz enzimi ile gerçekleşmektedir. Bu aşamada lizin aminoasitindeki amino grubu ayrılmakta ve karbon, aldehite yükseltgenmektedir. Böylece kollajenin yapısındaki normal çapraz bağ oluşumu gerçekleşmektedir (74)

2.6.5. Kollajenin Yıkılması

Canlılardaki kollajenin büyük kısmının belirli bir yenilenme süreci olduğu ve en sağlam liflerin bile zamanla yeni sentezlenen liflerle değiştirildiği bilinmektedir. İster fibriler ister çözölmüş durumda olsun, işlem görmemiş doğal kollajen, proteolitik enzimler tarafından yıkıma karşı çok dayanıklıdır.

Nötral pH'da üçlü sarmal yapıyı kırabilen enzimler ilk kez Clostridium histolyticum bakterisinin kültür filtrelerinde izlenmiştir (75,76). Proteolitik enzimler olan kollajenazlar, kollajen molekülünün amino ucuna daha yakın bir yüzeye bağlanarak kollajen yıkımını başlatırlar. Üçlü sarmal yapıdaki kollajen molekülüne etkili olan enzim, kollajen molekülünden iki tane sarmal yapıda molekül açığa çıkarır. Sarmal yapıları dayanıklı olmayan bu küçük moleküllerin vücut sıcaklığında bozulması ile elde edilen polipeptidler, spesifik peptidazlar tarafından daha küçük peptidlere veya serbest aminoasitlere yıkılmaktadır. Kollajen yapısında çapraz bağlanmanın artması, yıkım hızını azaltmaktadır (74). İdrarda hidroksiprolin, in vivo kollajen yıkılımının belirleyicisi olarak kullanılmaktadır.

2.7. Diabetes Mellitus ve Eretil Fonksiyon Bozukluğu

Penisin temelini, bir çift korpus kavernozum ve bir korpus spongiozum adı verilen silindirik cisimler oluşturur. Kavernoöz cisimler, tunika albuginea adlı kollajen liflerinden zengin, elastik liflerden yoksun, kalın bir fibröz kılıfla sarılıdır. Çok sayıda kollajen lifler dışta longitudinal, içte ise vertikal olarak seyredir. Tunika albugineada, elastik lifler az olduğu için ereksiyon sırasında penis kollajen liflerin izin verdiği ölçüde genişler. Böylece rijidite sağlanmış olur. Penis erektile dokuları olan korpus kavernozumlar, süngere benzeyen bir yapıya sahiptirler. Bu yapının temel ünitesi, tunika albugineadan kaynaklanan kollajen sütunlarının şekillendirdiği diskoid yapıdaki boşluklardır.

2.7.1. Ereksiyon Fizyolojisi

Penil ereksiyon vasküler bir olaydır. Ereksiyon da diğer vasküler olaylar gibi santral sinir sistemi, düz kas ve endotel gibi faktörlerin birlikte rol oynadıkları hemodinamik bir olaydır.

Ereksiyon olabilmesi için,

- a) Kavernöz arterler ve trabeküler düz kasların tam gevşemesiyle sinüzoidal boşluklara kan girişinin artması gerekir.
- b) Ayrıca gevşeyen ve dolan sinüzoidal boşlukların tunika albuginea altındaki venülleri ve emisser venleri sıkıştırması gereklidir

Bu durumda kavernöz cisimlerin içindeki basıncın, diastolik basıncın üzerine çıkması, yani rijit ereksiyon oluşması için de venöz dönüş engellenmelidir. Venöz dönüşün engellenmesi için başka tıkaçıcı mekanizmalar da rol oynamaktadır. Aktif venöz kontraksiyon bunlardan biridir. Bu olay nöropeptid Y denilen bir mediatörün aktif ven kontraksiyonu yapmasına bağlıdır. Perineal çizgi kaslarının kontraksiyonu ve trombositlerin tıkaç oluşturmaları da yardımcı mekanizmalardandır.

2.7.2. Diabetle İlgili Eretil Fonksiyon Bozukluğunun Patofizyolojisi

Eretil fonksiyon bozukluğuna neden olan hastalıkların başında Diabetes Mellitus gelir. Ancak bu bozukluk hormonal değil kronikleşmiş hasarların ortaya çıkardığı bir komplikasyondur. Asıl patoloji nörojenik, vaskülojenik ve psikojeniktir. Nörojenik olarak otonomik sinirlerin aracılık ettiği olaylarda bozukluk vardır. Vazo-vazorumlarda iletim bozukluğu ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF)'ün rol oynadığı düz kas gevşemesinde bozukluklar da damar kaynaklı sorunlardır. Korpus kavernozumdaki NO'nun kaynağı, nöronlar (nNOS, tip I), endotel (eNOS, tip III) ve düz kastır (iNOS, tip II).

Diabetik erkeklerde eretil fonksiyon bozukluğunun patogenezi henüz tam olarak belirlenememiştir. Ancak doku proteinlerinde biriken ileri derecede glikelmiş son ürünler, pek çok diabetik komplikasyonda rol oynamakta olup, bunların olasılıkla penil NOS izoenzimlerini etkileyerek NO aktivitesini azalttığı ve endotele bağımlı gevşemeyi kısıtladığı gösterilmiştir (77).

a) Damar Kaynaklı Eretil Fonksiyon Bozukluğu

Diabetik mikroanjiopati, lokal mikrovasküler kan akımında değişikliklere yol açmaktadır. Diabetik mikroanjiopatide, endotelial hücre metabolizmasında ve fonksiyonunda bozukluk, damar duvarının bazal membranında kalınlaşma, oksijen taşınması ve hemostaz mekanizmasında değişiklikler olmaktadır. Aterosklerotik vasküler hastalıkla erektil fonksiyon bozukluğu arasında güçlü bir ilişki vardır. Arteriyoskleroz, erektil fonksiyon bozukluğuna yol açan organik bozuklukların en sık sebebidir. Penis besleyen ana arteryel desteğin %50'sinden fazlasında aterosklerotik tıkaçıcı hastalık oluşturuğu zaman, erektil fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Yine, diabetik hastaların otopsilerinde; intimada fibröz proliferasyon, mediyal fibrozis ve kalsifikasyon, lümenin daralması ve tıkanması gibi penil arteryel damar anormalliklerine rastlanmıştır.

Damar kaynaklı erektil fonksiyon bozukluğunda, korpus kavernosumda bir takım yapısal ve moleküler değişiklikler olmaktadır. Histolojik çalışmalarda, penil arteryel yetmezlik, kollajen birikimi ve erektil fonksiyon bozukluğu arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda ayrıca, düz kas hücre hipoplazisi ve atrofisi ile birlikte ECM' de esas temel olarak kollajen fibrillerinin biriktiği gösterilmiştir (78).

Halen damar kaynaklı hastalıkların, trabeküler düz kas hücrelerinin kaybının ve bağ doku artışının erektil disfonksiyondaki etkileri tartışmalıdır. Sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin, bağ doku proteinlerinin sentezinin kontrolünde önemli rol oynayabileceği düşünölmektedir. TGF- β_1 , korpus kavernozumda fibrotik cevabi artırmaktadır.

Prostaglandinlerin de kollajen sentezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. PGE₁ ve PGE₂, trabeküler düz kas hücreleri üzerinde sadece gevşeme etkili olmayıp, aynı zamanda kollajen sentezini de engellemektedir. TGF- β_1 'in kollajen sentezini indükleyici etkisi PGE₂ tarafından baskılanmaktadır.

b) Nörojenik Eretil Fonksiyon Bozukluğu

Diabetik hastalardaki erektil fonksiyon bozukluğunda esas rol oynayan patoloji, otonom nöropatidir. Eretil fonksiyon bozukluğu olan diabetik hastalardaki periferik ve otonom nöropati insidansı, diğer diabetik hastalardan daha yüksektir. Mesane ve penisin innervasyonunun aynı kaynaktan olması dolayısıyla, mesanede oluşabilecek bir fonksiyon bozukluğu, otonom kavernoöz sinirlerde bir bozukluk olabileceğini gösterebilir. Diabetik erektil fonksiyon bozukluğu olan kişilerin çoğunda bu mesane fonksiyon bozukluğu patolojisi saptanmıştır. Yine Melman (79) diabetik hastaların sinirlerinde, norepinefrin düzeyinin farklı olduğunu saptamıştır [Yenigün ve Altuntaş (78)]. Ayrıca, Lincoln (80) diabetik hastaların korpus kavernozumlarındaki asetilkolin esteraz bulunan fibrillerinde azalma olduğunu saptamıştır [Yenigün ve Altuntaş (78)]. Bu bulgular bize, diabetik hastaların korpus kavernozumlarındaki kolinerjik sinirlerde bir bozukluk olabileceğini düşündürmektedir.

Penil ereksiyonun en önemli mediatörü nitrik oksit (NO) yapımında anahtar enzimler olan nNOS ve eNOS'un azalmasıyla birlikte ileri glikasyon ürünlerinin üretilen NO ile etkileşimi (NO süperoksit ile birleşerek peroksinitrit oluşturur ve proteindeki tirozin rezidülerini nitroziller) periferik nöropati oluşumuna zemin hazırlamaktadır (81).

c) Hormonal Kaynaklı Eretil Fonksiyon Bozukluğu

Eretil fonksiyon bozukluğunda hipotalamik-hipofizer-testiküler eksenin etyolojik önemi tam olarak açık değildir. Diabetik hastalarda erektil fonksiyon bozukluğu; tiroid hastalıkları, hipofizer bozukluklar, adrenal hastalıklar, hiperprolaktinemi ya da hipogonadizm ile ilişkili olabilir.

Delcour (82) bazı diabetik hastaların prolaktin düzeylerini yüksek bulmuştur [Yenigün ve Altuntaş (78)]. Hiperprolaktinemili hastalarda libidoda azalma ve erektil fonksiyon bozukluğu gelişir. Bu durum aynı zamanda düşük serum testosteron düzeyleri ile de ilişkilidir. Çünkü prolaktin, gonadotropin salgılatıcı hormonun pulsatil salgılanmasını engellemektedir.

2.8. Aminoguanidin

Kollajen çok yavaş bir seyirle yıkılan uzun ömürlü bir bağ doku proteindir. Uzun ömürlü proteinler de glikasyonda öncelikli hedeflerdir. AGE'lerin özellikle hasar verici etkileri damar kollajeni üzerindedir. Bu da, ateroskleroz ve koroner hastalık, böbrek hasarı, retinal patolojiler, zayıf periferik dolaşım ve diğer lezyonları artırır. Lens kristalleri de uzun ömürlü bir hedeflerdir ve sonuçta katarakt gelişir.

Normal kollajen fibrilleri oluşumunda, ϵ -amino gruplarını aldehite çevirmek üzere bazı kollajen lizin ve hidroksilizin kalıntıları lizil oksidaz tarafından oksitlenir. Bu aldehitler sonra, fibrillerdeki komşu kollajen moleküllerinin lizin veya hidroksilizin kalıntıları ile çapraz bağ oluşumuna katılırlar. Kollajen molekülü ile yakından çapraz bağlı olan lizinlerin sterik olarak erişilmez durumda olmalarından dolayı, bu süreç devam edemez ve sonlanır. Ancak küçük moleküller tarafından oluşturulan AGE çapraz bağları olgun kollajen molekülünde bile bu sürecin devam etmesine neden olurlar. Kan ve doku glukozundaki yükselmeler proteinlerdeki lizin rezidüleri arasındaki etkileşimlerle Schiff bazı oluşumuna yol açar. Daha sonra kimyasal bir yeniden düzenlenme ile daha stabil olan Amadori ürünü oluşur. Amadori ürünü de tekrar yüksek aktiviteye sahip ürünlere dönüşür. Bu ürünlerle, diğer serbest amino grupları, farklı ara ürün ve ileri glikasyon ürünleri tekrar reaksiyona girer. AGE aracılı çapraz bağlar elastikiyet kaybına ve kırılabilirlikte artışa neden olurlar.

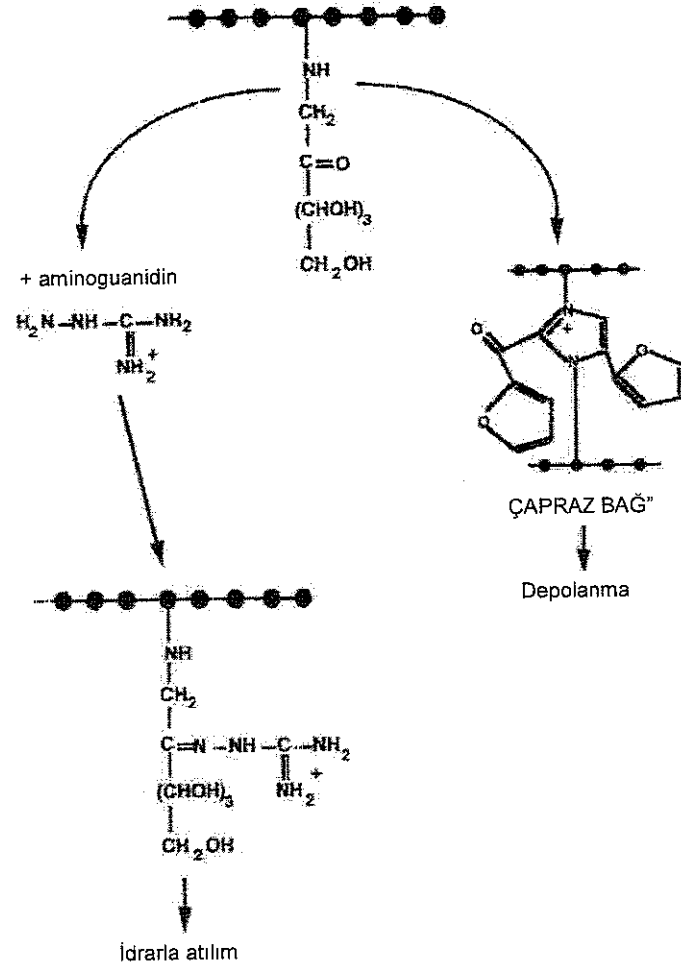
Proteinlerdeki AGE kaynaklı çapraz bağ oluşumu, onların üç boyutlu yapılarını ve fonksiyonlarını etkileyebilir. AGE'nin neden olduğu biyokimyasal değişimler, damar duvarlarında, damar tonüsünde patolojik değişikliklere yol açar. Arter elastikiyeti ve damar geçirgenliğinde değişikliğe neden olabilir (83)

Diabetteki sekonder komplikasyonların gelişimi (özellikle makrovasküler), hastalardaki mortalite oranını artırmaktadır. Yaşlanma, ateroskleroz ve diabetteki

damar kaynaklı komplikasyonların patogenezinde, non proteinlerin enzimatik glikasyonunun rol oynayabileceği düşünülmektedir.

AGE oluşumuna karşı kullanılan maddeler iki ana mekanizmayla etkili olurlar. Birincisi AGE oluşumunun AG gibi karbonili engelleyici ajanlar tarafından inhibisyonu; ikincisi ise, daha yeni bir yaklaşım olmak üzere, 4,5-dimetil-3-fenaçiltiazolium klorit (DPTC) gibi, oluşmuş olan AGE protein-protein çapraz bağlarının dikarbonil kırıcı bileşikler tarafından kırılmasıdır.

Amadori ürünündeki 1-amino 1-deoksi fruktoz kalıntısının keton grubunun takibindeki AGE oluşturu reaksiyonlarda anahtar role sahip olduğu ve bu keton grubunun kimyasal olarak aktivitesinin önlenmesiyle AGE oluşumunun önlenebileceği düşünüldü. Böylece keton gruplarıyla hızlıca reaksiyona giren, onları kimyasal olarak eylemsiz duruma getiren, aynı zamanda toksik olmayacak bir madde arayışına girildi. AG, düşük molekül ağırlıklı, aşırı nükleofilik bir bileşik olarak aldehit ve ketonlarla çok çabuk reaksiyona girer (9). Bugün, başlangıçtaki Amadori ürününün değil de, bir α -dikarbonil ara ürününün AGE inhibisyonunun hedefi olduğu düşünülmektedir.

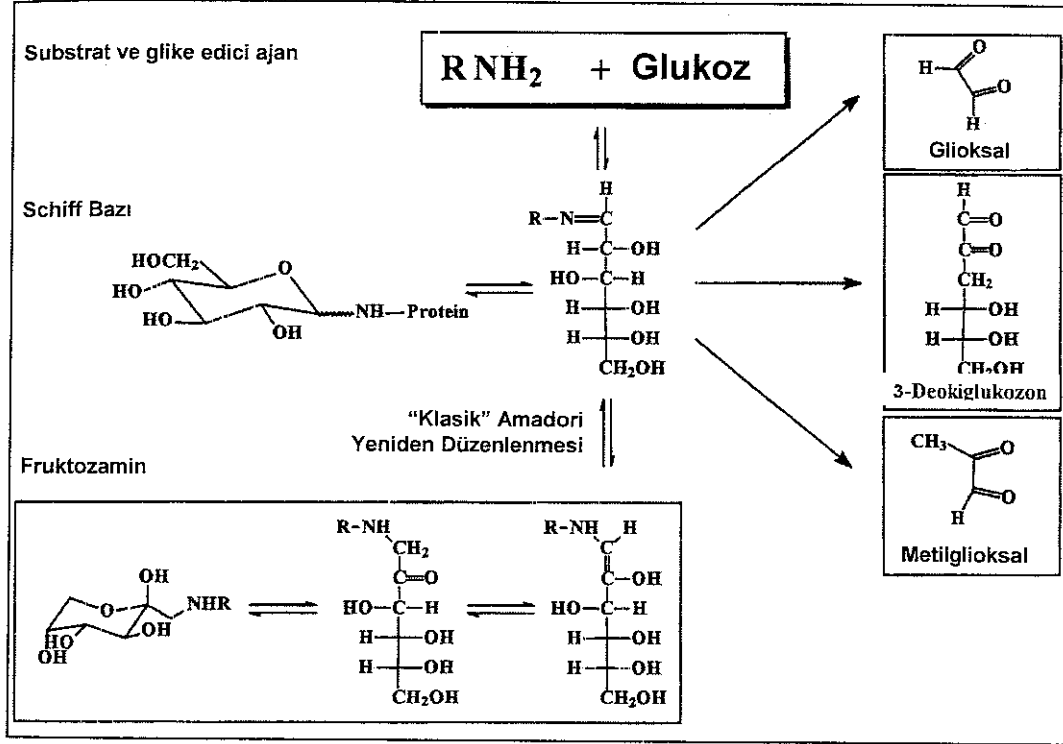


Şekil 2.4. Çapraz bağ oluşumunun aminoguanidin yoluyla önlenmesi (84)

Aminoguanidin (AG), AGE oluşumunu önlemek için kullanılan prototipik bir tedavi edici ajandır. AGE oluşumunun AG tarafından önlenmesiyle ilgili ilk bilgi, diyabetin neden olduğu arter duvarındaki protein çapraz bağlarının önlenmesiyle ilgiliydi (9). O zamandan bu yana, *in vitro* ve *in vivo* AGE oluşumunu önlemede kullanılan AG, anormal fizyolojik durumlarda ve bir çok hastalıkta ilerlemiş glikasyonun önlenmesiyle bağlantılı olduğuna dair ispat sağlamıştır.

AG, AGE oluşumunu engelleyen bir bileşiktir. Erken glikasyon (Amadori) ürünleri, bitişik proteinlerdeki lizin grupları yerine AG ile bağlanmayı tercih eder. Böylece, örneğin kollajendeki çapraz bağlanmada olduğu gibi, *in vivo* proteinlerde AGE oluşumu engellenir. Kronik AG tedavisi, diyabetik hayvanlarda,

diabetle ilişkili oluşan retinal değişiklikler (mikroanevrizmalar), böbrek hasarı (glomerüler matris artışı, artmış glomerüler geçirgenlik, mikroalbuminüri), yapısal ve fonksiyonel sinir anormallikleri (iskemi ve azalmış iletim hızı) ve kan damarı hasarları (artmış damar albümin geçirgenliği ve azalmış arter elastikiyeti) gibi çeşitli anormallikleri engellemiştir (12-14,85).



Şekil 2.5. Amadori ürünü sonrası α -oksoaldehitlerin oluşumu

(www.biochemj.org/bj/344/0109/bj3440109a05.gif-)

AG, yapısında nükleofilik bir hidrazin grubu $-NHNH_2$ ve dikarbonil içeren yapılarla birleşebilen guanidino grubu $-NH-C(=NH)$ bulundurur (86). Birbirine bağlı olan bu iki grup α,β -dikarbonil glikasyon ajanlarının özellikle de metilglioksal, glioksal ve 3-deoksiglukozon gibi α -oksoaldehitlerin, reaktif bir temizleyicisini oluşturur. Eğer bu olmasaydı, α -oksoaldehitler arjinin ve lizin rezidüleri ile reaksiyona girip AGE oluştururlardı.

α -oksoaldehitlerin farmakolojik temizlenmesi veya α -oksoaldehit detoksifikasyonunu stimüle etmek , diabet komplikasyonları ve AGE ile ilişkili diğer hastalıkları önlemede değerli bir tedavi edici metottur α -oksoaldehitlerin temizlenmesiyle, AGE oluşumu ve dolayısıyla proteinlerdeki çapraz bağ oluşumu engellenmiş olur. İn vitro olarak rat kuyruk tendon kollajeninde, glikasyon nedenli çapraz bağlanmanın AG tarafından engellendiği gösterilmiştir (87).

AG ile ilgili sorunlardan birisi, oldukça reaktif bir bileşik olması nedeniyle diğer karbonil grubu içeren bileşiklerle reaksiyona girebilmesidir. Pridoksal fosfat, glukoz, malondialdehit gibi bir çok biyolojik molekülle reaksiyona girer. Bu etki in vitro yüksek dozda AG kullanıldığında ortaya çıkar. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan AG, hidrojen peroksiti yavaşça parçalayarak pro-oksidan etki gösterir. Ancak bu parçalanma, in vivo farmakolojik konsantrasyonlarda oksidatif stresin kaynağı olacak kadar önemli değildir.

AG in vivo kullanılan farmakolojik konsantrasyonlarda, NOS ve semikarbazid duyarlı amin oksidaz (SDAO) inhibisyonu gibi farmakolojik aktivitelere sahiptir. AG, geri dönüşümsüz olarak SDAO'ı inhibe eder. Bu enzim metilaminin formaldehite ve aminasetonun metilglioksala dönüşümünü katalizler. Böylelikle AG, amin substratlarından karbonil bileşiklerinin oluşumunu engelleyerek, glikasyon reaksiyonlarına katılmalarını önlemiş olur (88).

3. MATERYAL ve METODLAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Fizyoloji Anabilim Dalları, Merkezi Araştırma laboratuvarları ve Deneysel Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada, ağırlıkları 220-330 gr arasında değişen 50 tane sağlıklı, erkek, 8 haftalık Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanların 9 tanesi kontrol grubu olarak ayrılırken, kalan 41 tanesine diabet oluşturmak üzere streptozotosin uygulanmıştır. Hayvanlar her kafeste 5 sıçan olacak şekilde çalışma süresince ayrılmışlardır. Bu süre boyunca hayvanlar ticari rat yemi ve musluk suyuyla beslenmişlerdir. 8 haftalık çalışma süresi sonunda oluşturulan 3 gruptaki hayvan sayıları şöyledir:

1. Kontrol grubu, 9 sıçan
2. Diabetik grup, 10 sıçan,
3. Aminoguanidin verilen diabetik grup, 12 sıçan

3.1. Diabetin Oluşturulması

Etik kurul onayı alındıktan sonra, diabet oluşturulacak 40 adet sıçana bir günlük açlığı takiben, anestezi altında 0,1 M sitrat tamponu (pH=4,5) içinde çözülen streptozotosin 60 mg/kg olacak şekilde (89), intraperitoneal olarak tek doz enjeksiyon şeklinde uygulandı. Enjeksiyondan 1 saat sonra, hayvanların kafeslerindeki sularına %10' luk sükröz çözeltisi konularak bir gün boyunca içmeleri sağlandı.

İlk grup 9 sıçandan oluşan kontrol grubuydu. Enjeksiyon sonrası, ikinci grup olan diabetik grubu oluşturacak sıçanların 20 tanesi, çalışma süresi olan 8 hafta boyunca standart laboratuvar diyetini ve musluk suyunu almaya devam ettiler. Üçüncü grubu oluşturacak olan diğer 20 sıçanın içme sularına ise enjeksiyondan bir gün sonra 1 gr/L olacak şekilde (90) aminoguanidin verilmeye başlandı. Bu gruptaki sıçanlar 8 hafta boyunca bu suyu kullandılar

Streptozotosin enjeksiyonundan 2 gün sonra sıçanların yine bir günlük açlığı takiben, kuyruk venlerinden kanları alınarak Accutrent-GC kan glukozu ölçüm cihazı ile açlık glukozları belirlendi. Kan glukoz değeri 250 mg/dl altında olan hayvanlar çalışmaya alınmadı.

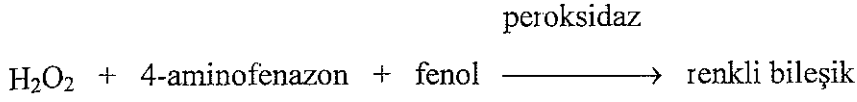
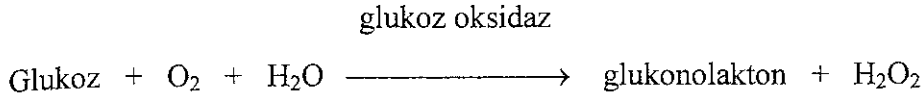
8 hafta boyunca tüm gruplardaki hayvanların günlük yem, su tüketimleri ve haftalık ağırlıkları takip edildi. 8 hafta sonunda elimizde 9 kontrol, 10 diabetik ve 12 aminoguanidin verilen diabetik gruptan sıçan kaldı. 8 haftanın sonunda yine bir günlük açlığı takiben, tüm gruplardaki hayvanların, üretan anestezisi altında biyokimyasal parametreler için kan örnekleri ve glikasyonun araştırılması için penil doku örnekleri alındı. Biyokimyasal parametreler aynı gün Roche Modüler otoanalizöründe çalışıldı. Doku örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Grupların Çalışılan Serum Parametreleri

Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplardaki hayvanların biyokimyasal parametreleri Roche Modüler otoanalizöründe çalışıldı. HbA_{1C} haricindeki parametrelerin ölçümü serumda çalışıldı. HbA_{1C} ölçümü, tam kanda yapıldı. Glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, trigliserit mg/dl olarak, HbA_{1C} % olarak, sodyum, potasyum ve klor gibi elektrolitler mEq/L olarak, osmolarite mosm/L olarak ölçüldü.

3.2.1. Glukoz Ölçümü

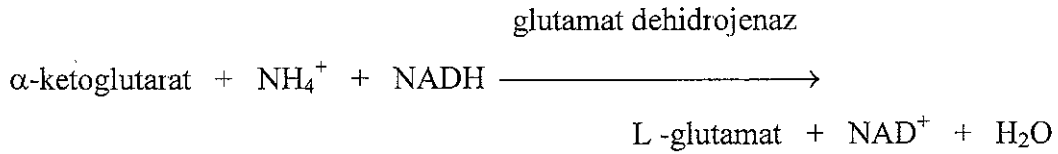
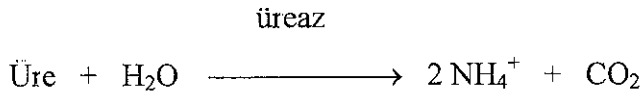
Glukoz, glukoz oksidaz ile oksijen varlığında glukonolaktona okside olur. Açığa çıkan hidrojen peroksit 4-aminofenazon ve fenolle reaksiyona girerek renkli bir bileşik oluşturur. Oluşan renk yoğunluğu, glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır. Renkli bileşiğin absorbanı 505 nm' de ölçüldü.



Oluşan renkli bileşiğin absorbanansı 505 nm'de ölçülür.

3.2.2. BUN Ölçümü

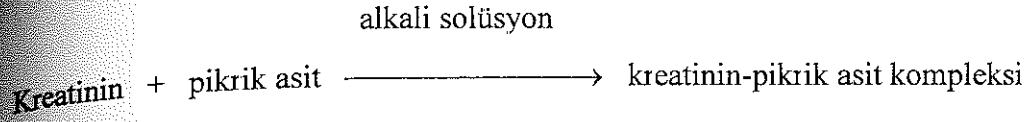
Üre, üreaz enzimiyle karbondioksit ve amonyağa dönüşür. Amonyak α -ketoglutarat ile NADH varlığında glutamat dehidrojenaz enzimi yardımıyla glutamat ve NAD^+ yi oluşturur



Reaksiyonda koenzim olarak NADH kullanılır. NADH miktarında meydana gelen azalma 340 nm'de kinetik olarak okunur.

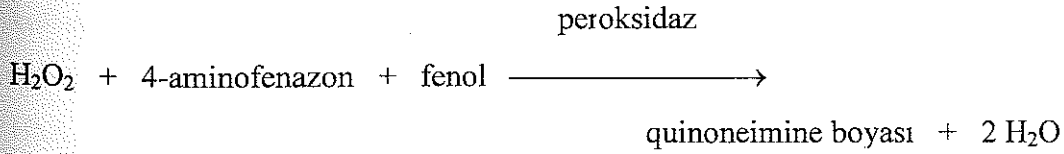
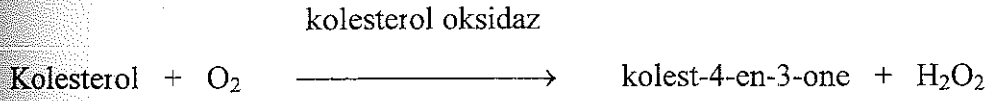
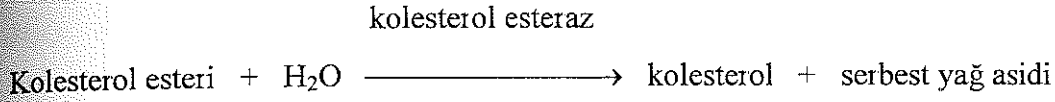
3.2.3. Kreatinin Ölçümü

Alkali solüsyonda kreatinin pikrik asitle sarı- turuncu renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan renk yoğunluğu kreatinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu renk yoğunluğu fotometrik olarak 505 nm'de ölçülür.



3.2.4. Total Kolesterol Ölçümü

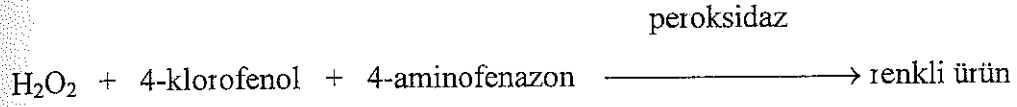
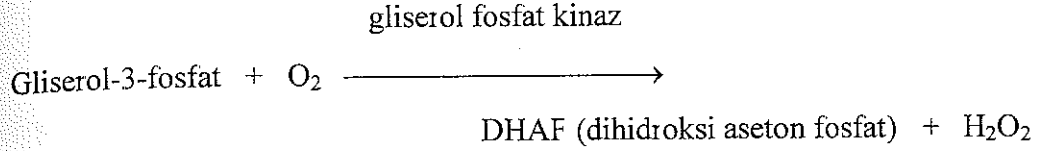
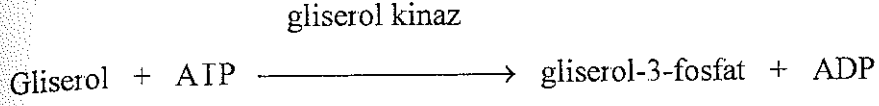
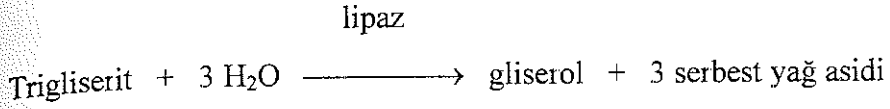
Yöntemin prensibi şöyledir: kolesterol esteri, kolesterol esterazla hidroliz edilerek, serbest kolesterol elde edilir. Kolesterol oksidaz, oksijen kullanarak H_2O_2 oluşumunu sağlar. H_2O_2 çeşitli bileşiklerle reaksiyona girerek renkli quinoneimine oluşturur.



Üçüncü reaksiyon ile oluşan quinoneimine boyasının absorbanı 500 nm'de ölçülür.

3.2.5. Trigliserit Ölçümü

Trigliserit düzeyi aşağıdaki reaksiyonların gerçekleştiği kit kullanılarak ölçülmüştür.



Oluşan kırmızı renkli ürünün absorbansı 510 nm'de ölçülür.

3.2.6. HbA_{1C} Ölçümü

Hemolize tam kanda, türbidimetrik inhibisyon immünoassay yöntemi kullanılmıştır. Örneklerdeki glikehemoğlobin (HbA_{1C}), HbA_{1C} antikoru ile reaksiyona girer. Böylece eriyebilen antijen-antikor kompleksleri oluşturur. HbA_{1C} üzerinde sadece bir spesifik HbA_{1C} antikor alanı olduğundan kompleks bir oluşum meydana gelmez. Polihaptenler, fazla HbA_{1C} antikorumu ile reaksiyona girerler ve erimeyen antikor-polihapten kompleksleri oluştururlar. Oluşan bu kompleksler türbidimetrik olarak 340 nm'de belirlenebilir.

İkinci bir kanalla hemoglobin konsantrasyonu belirlenir. Hemolize örneklerden salınan hemoglobin, karakteristik absorpsiyon spektrumuna sahip derivatiline dönüştürülür ve 546 nm'de ölçüm yapılır. Böylece türbidimetrik inhibisyon immünoassay yöntemiyle ölçülen glike hemoglobin miktarının spektrofotometrik yolla ölçülen total hemoglobin miktarına oranlanmasıyla % HbA_{1C} düzeyi saptanmış olur.

3.2.7. Osmolarite Ölçümü (91)

$$(\text{Sodyum} \times 2) + (\text{Glukoz} / 18) + (\text{BUN} / 2,8) = \text{Osmolarite (mosm / L)}$$

3.2.8. Elektrolit Ölçümü

Direkt iyon selektif elektrot (ISE) metoduyla ölçülmüştür. Bu yöntemde, örnek dilüe edilmeden ölçülür. Özel bir iyon için ölçüm sistemi, bir referans elektrodu ve elektronik devreleri içerir. Elektronik devreler, test iyon konsantrasyonunu vermek için, elektriksel potansiyeli ölçer. Kullanılan sodyum ve potasyum elektrotları nötral taşıyıcı temelli, klor elektrotları iyon değişim temellidir.

3.3. Doku Örneklerinin Glikasyon Düzeyinin Belirlenmesi

3.3.1 Yöntemin Prensibi

Glukoz proteinlerin amino gruplarıyla, çoğunlukla da lizine bağlı epsilon amino gruplarıyla non enzimatik bir reaksiyona girerek bir ketoamin bağı oluşturur. Protein glikasyonunun derecesi, proteinlere ketoamin bağı ile bağlı heksozlara özgü olan kolorimetrik bir yöntemle ölçülebilir. Bu yöntemde, karbonhidratlar asit ortamda ısıtıldığı zaman açığa çıkan 5-Hidroksimetil 2-furaldehit (5-HMF), ortama 2-Tiyobarbitürik asit (2-TBA) eklendikten sonra spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu çalışmada glikasyon ölçümü için Kasai yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (92).

3.3.2. Kullanılan Çözeltiler

- a) 0.33 M oksalik asit
- b) % 40 lık triklorasetik asit

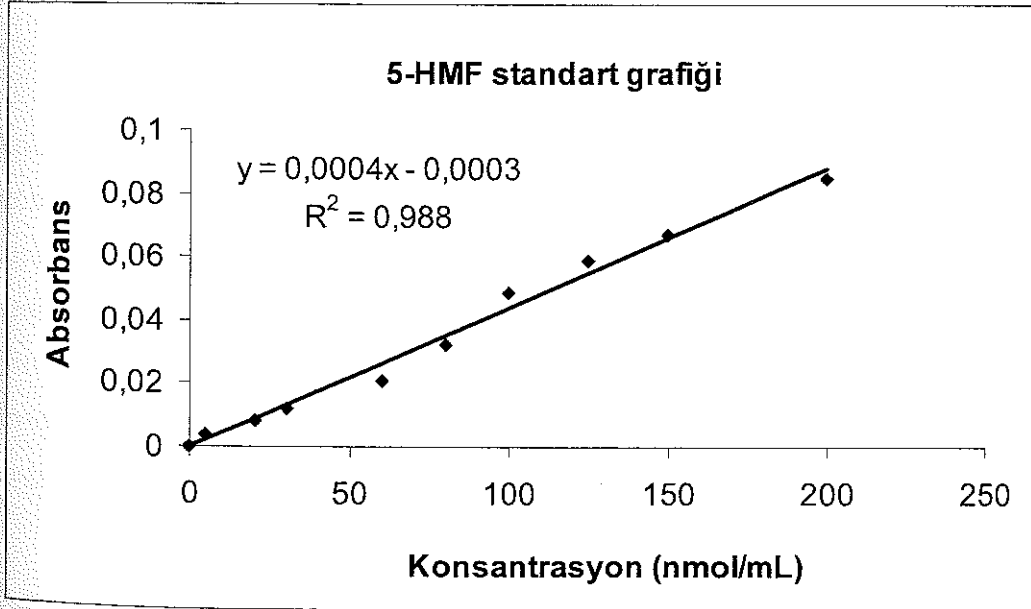
c) 0.05 M tiyobarbitürük asit

3.3.3. Standart Solüsyonları

Proteinlerle birleşen glukoz ısıtma sonucu 5-hidroksimetil 2-furaldehite (5-HMF) dönüşür. Dokulardaki glikasyon düzeyini hesaplayabilmek için önce 25.2 mg 5-HMF bir litre 0.33 M oksalik asitte çözülerek 200 nmol/ml'lik 5-HMF solüsyonu hazırlandı. Daha sonra konsantrasyonları 5, 20, 30, 60, 80, 100, 125, 150 ve 200 nmol/ml arasında değişen 9 farklı 5-HMF solüsyonu, dilüsyonlarla elde edildi.

3.3.4. Standart Grafiği

Standartların absorbansı 400-480 nm arasında tarandı ve en yüksek absorbans 443 nm de saptandı. Tüm standartların absorbansı 443 nm de ölçüldü ve lineer bir standart grafiği elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 5-HMF standart grafiği

3.3.5. Ölçüm Yöntemi

Glikasyon düzeyi TBA ölçüm yöntemi ile belirlendi (93) 10 mg kurutulmuş ve dondurulmuş penil doku alınarak 5 ml 0.33 M oksalik asit içinde 5 saat boyunca 100 °C'lik su banyosunda kaynatılarak hidrolize edildi. 5 saat sonunda bağlı glukoz hidrolize olarak 5-HMF ye dönüşür. Hidrolizat buz üzerinde soğutuldu ve 3 ml soğuk, %40 lık TCA eklenerek, proteinlerin presipite olması ve 1500 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak çökeleğin tamamen dipte toplanması sağlandı. Üstteki sıvının bir kısmı (2 ml) alınarak üzerine 0.5 ml 0.05 M TBA eklendi ve 30 dakika 37 °C'lik su banyosunda inkübe edildi. Doku örneklerinin 443 nm'deki absorbansı ölçülerek salınan 5-HMF konsantrasyonu hesaplandı. Kör olarak distile su kullanıldı.

Dokuların kollajen içeriği hidroksiprolin (OHpro) düzeylerinden yararlanılarak hesaplandı. OHpro kollajene özgü olduğu için, çeşitli dokularda kollajen miktarının belirlenmesi için sıklıkla bu amino asitin ölçümü yapılmaktadır

Bu çalışmada OHpro miktarı Tougaard yöntemi modifiye edilerek kolorimetrik olarak belirlenmiştir (94). 4-hidroksi L-prolin ölçümünde kullanılan yöntemin temeli OHpro'in pirole okside olmasına dayanır. Pirel, p-dimetil aminobenzaldehit ile reaksiyona girerek spektrofotometrik olarak belirlenebilen renkli bir bileşik oluşturur. Bu yöntem, OHpro'in (suda çözünür) kimyasal olarak pirole (toluende çözünür) dönüşümünü içerdiği için, çok miktarda kontaminan madde içeren örneklerdeki küçük miktarda OHpro'in dahi ölçülebilmesine olanak sağlar.

3.3.6. Çalışma Solüsyonları

a) Sitrat tamponu (pH=6.0)

852 mg trisodyum sitrat (2 H₂O) ile 575 mg sitrik asit (H₂O) suda eritilerek distile suyla 25 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok tampon 4°C de saklandı.

b) Sitrat çalışma solüsyonu

Bir hacim sitrat tamponu beş hacim 2-propanol ile karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

c) Asetat/Sitrat tamponu (pH = 6.0)

2.844 g sodyum asetat (susuz), 2.21 g trisodyum sitrat (2 H₂O), 284.3 mg sitrik asit (H₂O) 19.1 ml distile suda çözüldü ve 30.9 ml 2-propanol ile karıştırılarak hazırlandı. Bu stok tampon oda ısısında renkli şişede saklandı

d) Kloramin T çalışma çözeltisi

Bu oksitleyici reaktif, 175 mg Kloramin T'yi 2.5 ml distile suda çözdükten sonra 10 ml asetat/sitrat tamponu ile karıştırılarak her çalışma sırasında taze olarak hazırlandı.

e) Ehrlich reaktifi

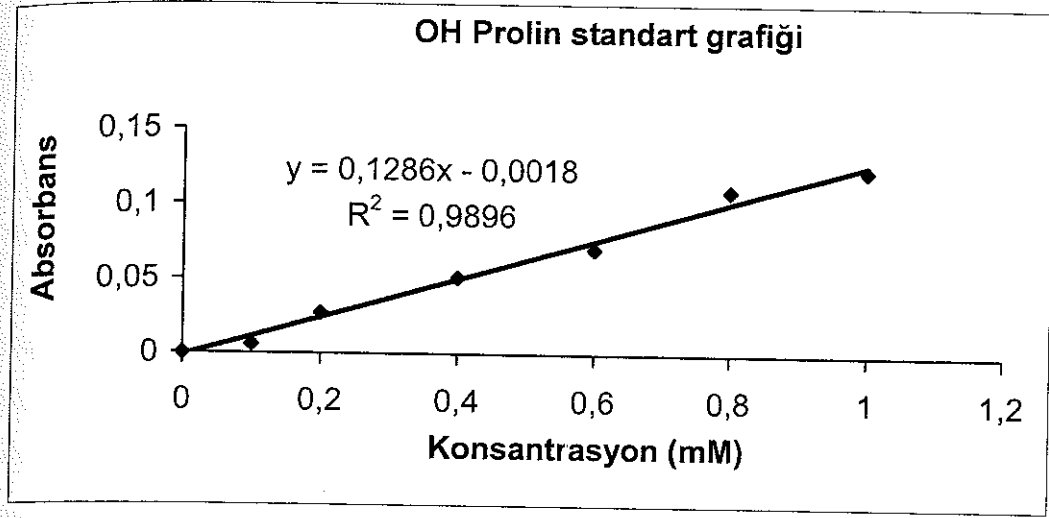
16 g 4-aminobenzaldehit, 10 ml derişik HCl içinde bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Çözelti 4°C de renkli şişede saklandı (Sarı renkli bu karışımın yeşilimsi renge dönmesi ve içinde çökelekler oluşması reaktifin bozulduğunu gösterir)

f) Ehrlich çalışma çözeltisi

Ehrlich reaktifi ile 2-propanol 1'e 8 oranında karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

3.3.7. Standart Solüsyonları

OHpro standart solüsyonu hazırlamak için 26.5 mg OHpro 200 ml distile suda çözülerek 1 mmol/L' lik bir solüsyon elde edildi. Daha sonra bu solüsyondan dilüsyonlarla konsantrasyonları 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 mmol / L arasında değişen standart solüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonları 560 nm dalga boyunda ölçülerek lineer bir standart grafiği elde edildi (şekil 3.2).



Şekil 3.2. OHpro standart grafiği

3.3.8. Ölçüm Yöntemi

Öncelikle ölçüm yapacağımız örneklerdeki peptid bağıyla bağlı olan OH prolinin, örneklerin hidrolizi yoluyla salınması sağlanmalıdır. Bu amaçla çevre yağ dokusundan temizlenmiş ve suyu alınmış doku örnekleri 6 N HCl içinde 12 saat boyunca, 100°C' lik su banyosunda hidrolize edildiler. Her sıçan için, 10 mg penil doku 6 ml 6 N HCl içinde kapaklı cam tüplere konarak su banyosuna yerleştirildi.

Doku örnekleri, hidroliz sırasında içlerinde oluşan ağır pigmentleri ortadan kaldırmak amacıyla 5000 rpm'de santrifüj edildiler. Hidrolize süpernatant solüsyonunun ortalama olarak 1-10 µg OHpro içeren kısmı (0.05 ml) ayrı bir tübe yerleştirildi ve kaynar su banyosunda uçurularak kurutuldu. Böylece HCl ortadan kaldırılmış oldu.

Buharlaştırılmış örneklerin üzerine 1 ml sitrat çalışma solüsyonu eklendi ve 10 saniye vorteks ile karıştırıldılar. Tüplere 0.25 ml Kloramin T reaktifi

eklendi ve tekrar vortekslendi. Tüm tüpler oda ısısında 15 dakika bekletildiler, böylece OH pro'in oksitlenerek pirole dönüşmesi sağlanmış oldu. 15 dakika sonunda örnekler buz banyosuna konarak reaksiyon sonlandırıldı.

Tüplere 2'şer ml Ehrlich reaktifi eklendi ve iyice karıştırıldı. Böylece ara bileşik olan pirolün Ehrlich reaktifi ile birleşerek pembe bir renk oluşturması sağlandı. Örnekler Ehrlich reaktifi ile iyice karıştıktan sonra, renk gelişmesini sağlamak amacıyla oda ısısında ve karanlıkta iki saat boyunca inkübasyona bırakıldılar. Bu süre sonunda bir santimetre ışık yollu küvetlere konularak 560 nm' de absorbanları okundu. Küvetlerin kuru olmasına dikkat edilmelidir çünkü çok küçük miktarlarda su bile Ehrlich reaktifinin çökmesine yol açabilir. Oluşan renkli bileşik oldukça dayanıklıdır. Ehrlich reaktifinin eklenmesinden sonra, birkaç saate kadar absorbansta düşme görülmez.

Doku hidrolizatlarının yerine 6 N HCl kör olarak kullanıldı. OHpro ölçümü için kullanılan bu yöntemin 300 µg OH pro için hassas olduğu belirtilmiştir. Bu hassasiyet sınırı bizim ölçümlerimiz için yeterlidir.

3.3.9 Kollajen Miktarının Hesaplanması

Bir doku örneğinin kollajen yüzdesi, Neuman ve Logan'ın 7.46 faktörü kullanılarak hesaplanabilir. Bu şekilde, bulunan OHpro miktarı 7.46 ile çarpılarak kollajen miktarına dönüştürülebilir (95).

$$\% \text{ Kollajen} = \frac{\mu\text{g OHpro} / \text{ml}}{\mu\text{g doku} / \text{ml}} \times 7.46 \times 100$$

3.4. Protein Miktar Tayini

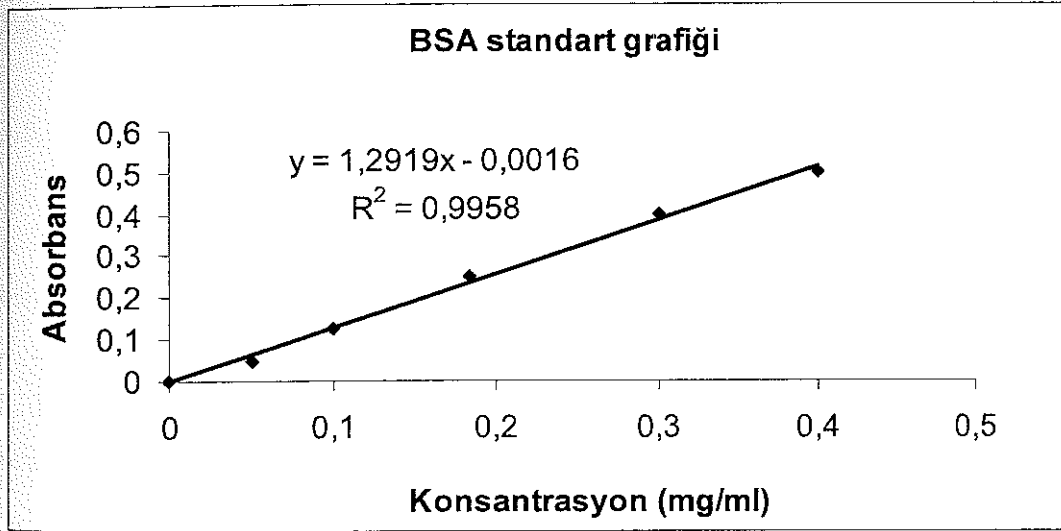
3.4.1. Prensip

Bradford protein ölçüm yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntem, Coomassie Brilliant mavisi G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir (96). Duyarlılık sınırı 20-200 µg olan bu yöntemde asidik boya proteinlere bağlanır ve 495-595 nm arasında maksimum absorpsiyon değerleri elde edilir.

3.4.2. Gerekli Reaktifler

a) Protein standartları

Bovine serum albumin (BSA)'nın 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4 mg/ml konsantrasyonları hazırlanarak standart grafiği çizildi (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. BSA standart grafiği

b) Deney solüsyonu

Boya stok solüsyonu (Bio-Rad protein ölçüm solüsyonu-500-0006) kullanılacağı zaman 5 kat dilüe edildi. Bu amaçla 1 volüm boya stoğuna 4 volüm distile su eklendi. Solüsyon kahverengi görünümünde ve pH'sı 1.0 civarında olmalıdır. Renkli şişede 4 °C'de 2 hafta stabildir.

3.4.3. Ölçüm Yöntemi

Ekstraksiyon sonunda elde edilen süpernatandan 20 µl alınarak gerçekleştirilen ölçümle bulunan protein miktarı, BSA standart grafiğinde karşılık gelen absorbans değerinden hesaplanmıştır.

1. 20 µl ekstraksiyon tamponu içindeki doku örneği, 980 µl Bradford deney solüsyonu ile karıştırılıp vortekslendi.
2. 5 dakikalık inkübasyondan sonra örneklerin absorbansı köre karşı 595 nm'de okundu (Kör olarak distile su kullanıldı).

3.5. Doku Örneklerinden Kollajen Ekstraksiyonu (97)

3.5.1. Pepsinde Çözünen Kollajenin Hazırlanması

1. Doku örnekleri (yaş ağırlıkları yaklaşık 20 mg) bistüri ile parçalanarak, gece boyunca 0.5 M 3 ml asetik asitte bekletildi.
2. Sonra homojenizatörle her bir örnek 5 dakika kadar homojenize edildi.
3. Homojenize edilen doku örnekleri, 30 dakika süreyle 29.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatan atıldı.
4. Elde edilen pellet 2 mg/ml pepsin ile 4°C'de 24 saat boyunca yeniden çözülerek ikinci kez 30 dakika süreyle 29.000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatan saklandı.
5. Yine pellet bu defa 1 mg/ml pepsin ile 4°C'de 24 saat boyunca çözüldü. Tekrar 30 dakika süreyle 29.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatan ilk süpernatan ile karıştırıldı.

6. Süpernatant karışımları, gece boyunca 0.02 M Na_2HPO_4 'e karşı dializ edildiler (Dializ için por büyüklüğü 12.000 Dalton olan dializ membranı kullanılmıştır).
7. Membran içindeki süpernatant karışımları önce 0.5 M, daha sonra 0.1 M asetik asite karşı 8 saat süreyle dializ edildiler.
8. En son distile suya karşı dializ yapıldı.

Süpernatantlardan elde edilen dializ solüsyonlarından sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) öncesinde protein miktar tayini yapılarak örnekler elektroforez jeline yüklemeye hazır hale getirildiler.

3.6. Protein Elektroforezi

Laemmli'nin SDS-PAGE metodu, Skyes ve arkadaşlarının da tanımladığı şekliyle uygulanmıştır (98). Pürifikasyon işlemlerinden geçen doku örneklerinin, sırasıyla % 3 ve % 6'lık yükleme ve ayırma jellerinden geçmeleri sağlanmıştır.

3.6.1. Gerekli Solüsyonlar

- a) Monomer (akrilamid/bis) solüsyonu

-29 g Akrilamid

-1 g Bisakrilamid distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Karanlıkta 4 °C'de saklanır

- b) 4X Yükleme jeli tamponu (Stacking buffer)

Tris-HCl (0.5 M pH=6.8)

-3 g Tris, 5 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Buzdolabında 4 °C'de saklanır.

- c) 4X Ayırma jeli tamponu (Resolving buffer)

Tris-HCl (1.5 M pH=8.8)

-18.5 g Tris, 3 N HCl ile pH=8.8'e ayarlanır. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Buzdolabında 4 °C'de saklanır.

d) %10'luk SDS Solüsyonu

-10 g SDS distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

e) APS (Amonyum persülfat)

-10 mg APS distile su ile 1 ml'de çözülür. APS polimerizasyonu başlatıcı olarak kullanılır.

f) Ayırma jeli yüzey tamponu (0.375 M Tris, %0.1 SDS, pH=8.8)

-25 ml Tris (4X Ayırma jeli tamponu) , 1 ml %10 SDS alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Ayırma ve yükleme jelleri aynı gün içinde dökülürse bu tampon kullanılmayabilir.

g) 5X Elektroforez tamponu

-15 g Tris

-94 g Glisin

-50 ml %10 SDS distile su ile 1L'ye tamamlanır. Buzdolabında 4°C'de saklanır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek 5 kez dilue edilir.

h) 2X Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptolanol, pH=6.8)

-2.5 ml Tris (4X yükleme jeli tamponu)

-4 ml %4'lük SDS

-2 ml %20'lik gliserol

-1 ml %10'luk 2-merkaptolanol

-0.01 g bromfenol mavisi distile suyla 10 ml'ye tamamlanır.

250 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C' de saklanır.

i) IEMED

Sigma firmasından hazır olarak alındı (T 9281).

i) Kollajen Standartları

Sigma firmasından alınan kollajenin tip 1, 3 ve 4 standartları kullanıldı (C 8897, C 4407 ve C 7521).

3.6.2. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Jeli hazırlamadan önce, jelin döküleceği camlar, ayırıcı çubuklar (spacer) ve tarak distile suyla iyice yıkanıp kurutuldu.

1. Camlar hazırlandıktan sonra ön ve arka camın arasına iki yana ayırıcı çubuklar yerleştirildi ve kenarlarından sıkıştırıldı.
2. Jelin akmasını engellemek için camların alt kısmı bantla yapıştırılarak kapatıldı.
3. Alt jelin (ayırışma jeli) tamponu tablo 3.1'e göre % 6'lık olarak hazırlandı ve APS ve TEMED eklenmeden önce solüsyon iyice karıştırıldı. En son TEMED eklendikten sonra jel karışımı tekrar karıştırıldı ve elektroforez camlarının arasına döküldü. Bu arada üst kısımda hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi.
4. Jelin üzerine 1-2 ml % 0.1'lik SDS pipetlenerek havayla teması kesildi. Havayla teması kesmenin amacı jelin daha düzgün donmasını sağlamaktır.
5. Alt jel donduktan sonra, üzerindeki SDS ters çevrilerek döküldü. Ayırışma jeli distile suyla birkaç kez yıkandıktan sonra üst jel (yükleme jeli) tablo 3.2'ye göre hazırlandı.
6. Tarak yerleştirildi Üst jelin tamponu hazırlandı ve en son TEMED eklendikten sonra, üst jel 1ml'lik bir pipetle tarağın kenarından pipetlendi. Jelin dökümü sırasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi
7. Üst jel donunca tarak dikkatlice çekildi. Kalan jel artıkları temizlendikten ve bantlar çıkarıldıktan sonra, camlar elektroforez tankı içine yerleştirildi.
8. Daha sonra tank, ön camın üst kısmına kadar tank tamponu ile dolduruldu. Tarakların oluşturduğu kuyucuklar, tank tamponu ve bir enjektör yardımıyla iyice yıkanarak jel artıklarının uzaklaştırılması sağlandı.
9. Daha önceden protein konsantrasyonları hesaplanmış örnekler ve kollajen standartları alınıp 2X yükleme tamponu ile eşit hacimde bir eppendorf içinde karıştırıldı.

10. Clostridium histolyticum'dan izole edilmiş tip F kollajenaz (Sigma C 7926) her üç gruba ait örneklerle karıştırıldı. Kuyucuklara pipetlenmeye hazır hale getirildi. Böylece kollajen pürifikasyonu sonrası ortaya çıkan bantların kollajenaz muamelesiyle kaybolup kaybolmadıklarının izlenmesi amaçlandı. Hazırlanan karışımlar, eppendorf tüplerinde 90 saniye süreyle kaynar suda bırakıldı. Daha sonra buradan alınıp buz içersine konularak jele yüklenmeye hazır hale getirildiler.

11. Örnekler ve kollajen standartları kuyucuklara 10 µl'lik pipetle hızlıca pipetlendi

12. Örnekler yükleme tamponundayken akım 80 volt kadar ve amper 45 mA civarında tutuldu. Örnekler yükleme jelinden çıkıp ayrışma jeline geçtikten sonra akım 100-110 volta ayarlandı ve amper 55 mA civarında tutuldu.

13. Yaklaşık 3-4 saat sonra, protein örneklerinin hareketini izlemeyi sağlayan bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi renkli bant, alt jelden çıkınca elektroforez sona erdirildi

14. Daha sonra elektroforez tamponu döküldü, jelin bulunduğu cam plaka çıkarıldı. Yanlardaki ayırıcı çubuklar çıkarılarak üst cam jele zarar vermeden alındı.

15. Kuyucukların sırasını belirlemek için, alt jelin yükleme jeline ait olan tarafındaki kenarlardan biri kesilip atıldı

16. Jel deiyonize suya konuldu.

Tablo 3.1. 20 ml ayrışma jeli için gerekli çözelti miktarları (bütün miktarlar ml olarak belirtilmiştir)

Jel %'si	7 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	10	7.7	7	4.7
Ayrışma Tamponu	5	5	5	5
Bis-Akrilamid	4.7	7	8	10
10 % SDS	0.2	0.2	0.2	0.2
10 % APS	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02

Tablo 3.2. %5'lik yükleme jeli için gerekli çözelti miktarları (bütün miktarlar ml olarak belirtilmiştir).

	5 ml için	10 ml için
H ₂ O	3	6
Yükleme Tamponu	1.25	2.5
Bis-Akrilamid	0.625	1.25
10 % SDS	0.05	0.1
10 % APS	0.05	0.1
TEMED	0.005	0.01

3.7. Jelin Coomassie Mavisi ile Boyanması (97)

“Coomassie brilliant mavisi” proteinlere rastgele bağlanan bir boyadır. Aktif maddesi $-SO_3H$ 'tır. Asidik ortamda proteinlerin serbest amino gruplarına bağlanır. Boyanın sülfonik asit grubuyla aminoasitin “+” yüklü amino grubu bağlanır. Saptama sınırları protein bandı başına 0.3-1 μg 'dır. Bu yöntemde jeldeki proteinler alkol (metanol veya izopropanol)/asetik asit içeren karışım ile çöktürülür. Jel üzerinde proteinlerin çöktüğü bölgeler boya ile maviye boyanır. Zemindeki fazla boya, bağlanmamış boyayı uzaklaştırma (destaining) çözeltisi ile giderilir.

3.7.1. Gerekli Solüsyonlar

a) Boya solüsyonu

%50 Metanol

%10 Asetik asit

%0.25 Coomassie mavisi distile suda çözülerek 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

b) Boya çıkarıcı solüsyon

Glacial asetik asit (%10) 10 ml

Metanol (%25) 25 ml

Distile su 65 ml

Boyanma öncesinde bir kap içinde, deiyonize suda bekleyen jelin suyu boşaltıldı. Boyanmaya hazır hale gelen jel, içinde boya solüsyonu olan bir kaba alındı. Oda ısısında, çalkalamalı su banyosunda, 1 saat çalkalandı. Boyama işleminden sonra kap birkaç kez distile suyla yıkandı. Boya çıkarıcı solüsyona alınan jeldeki protein bantları ortaya çıkıncaya kadar, çalkalanmaya devam edildi. Bu arada boya çıkarıcı solüsyonun rengi değiştikçe, yeni solüsyonla değiştirildi. Bantlar görünüp jel şeffaflaşınca çalkalama işlemine son verildi.

Daha sonra kurutulan jel fotoğraflandı. İmage master VDS-CL ve Storm 840 jel görüntüleme sistemleriyle kollajen bantlarının kantitatif analizi yapıldı.

3.8. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

3.8.1. Gereçler

1. Kan glukozu ölçüm cihazı: Accutrend GC, Almanya
2. PH metre: Schott CG 840, Almanya
3. Manyetik karıştırıcı: Corning PC 420, ABD
4. Çalkalamalı su banyosu: Memmert marka, Almanya
5. Hassas terazi: Sartorius 2472, Almanya
6. Otoanalizör: Roche Modüler, Almanya
7. Derin dondurucu:
 - a) -30 °C Uğur marka, Türkiye
 - b) -80 °C Sanyo marka, Japonya
8. Spektrofotometre: Shimadzu u v 1601, Japonya
9. Cam el homojenizatörü: Thomas marka, ABD
10. Santrifüj
 - a) Hettich Rotina 35, Almanya
 - b) Heraeus Sepatech Biofuge 15R, Almanya
 - c) Ultrasantrifüj: Beckmann Optima TL, Almanya
11. Dializ tüpü: Sigma D 9777, ABD
12. Elektroforez seti: Biorad Mini-Protean 3, ABD

13. Güç kaynağı: Biorad Power Pac 300, ABD
14. Biorad model 583 jel kurutucu, ABD
15. Dansitometre ve kantitatif ölçüm:
 - a) İmage master VDS-CL, ABD
 - b) Storm 840-imageQuant TL, ABD

3.8.2. Kimyasal Maddeler

Tüm kimyasal maddeler Sigma, Merck, Amresco ve Serva firmalarından sağlandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklılığı saptamak için, non parametrik Kruskal Wallis testi yapıldı. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak içinse, Mann-Whitney U testi kullanıldı.

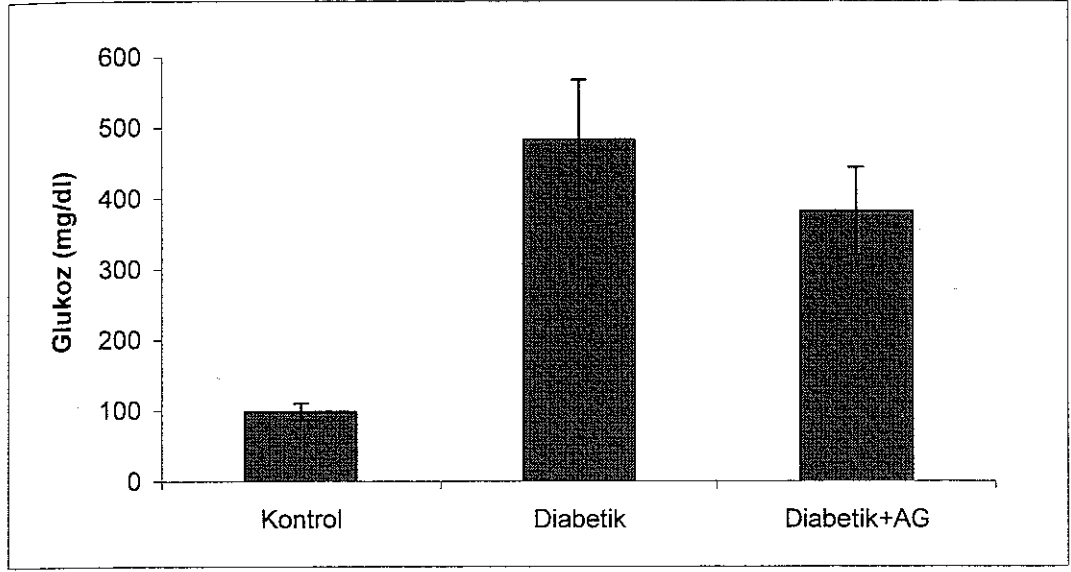
4. BULGULAR

4.1. Kan Glukoz ve HbA_{1C} Düzeyleri

Sıçanlara STZ enjeksiyonundan 8 hafta sonra çalışma sonlandırılarak, hayvanların kanı alındı ve biyokimyasal parametrelerine bakıldı. Kontrol (K) grubunda kan glukoz düzeyi 98.56 ± 12.27 mg/dl olarak bulundu. STZ uygulanmasıyla Diabetik (D) gruptaki glukoz düzeyi 483.10 ± 84.67 mg/dl ye yükseldi. D grubundaki glukoz düzeyi yüksekliği, K grubuna göre anlamlı bulundu. ($p < 0,05$). Aminoguanidin verilen diabetik (D+Ag) grupta glukoz düzeyi 381.83 ± 62.17 mg/dl olarak bulundu ve bu değer K grubuna göre anlamlı yüksekti ($p < 0,05$). Yine sıçanlara aminoguanidin uygulanmasının D grubuna göre kan glukoz düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1).

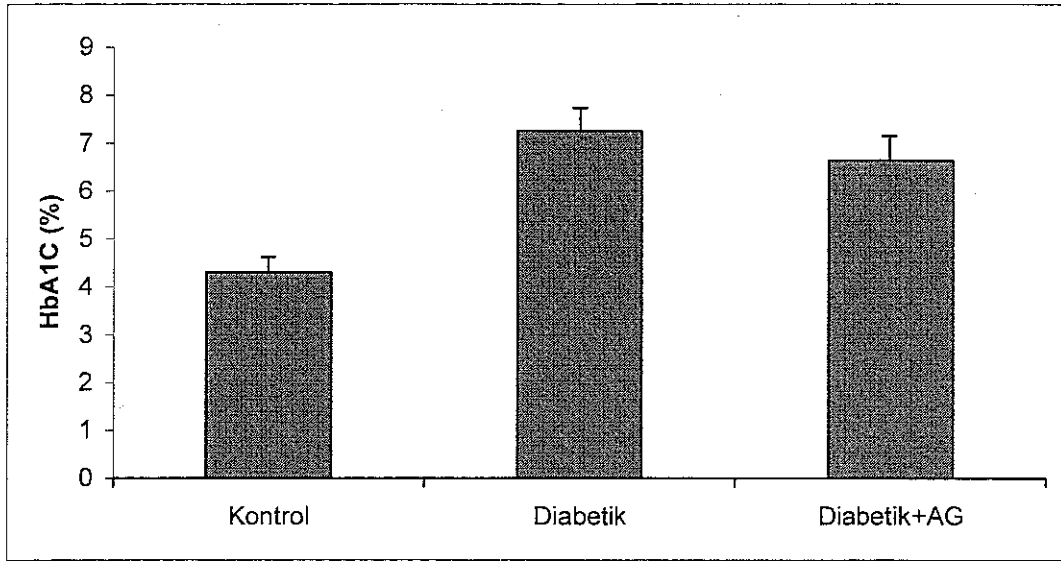
Tablo 4.1. Kan glukoz ve HbA_{1C} düzeyleri (ortalama \pm standart sapma) a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması.

	Kontrol (K)	Diabetik (D)	Diabetik+Aminoguanidin (D+Ag)
n	9	10	12
Glukoz (mg/dl)	98.56 ± 12.27	483.10 ± 84.67	381.83 ± 62.17
p	^a : $p < 0,05$	^c : $p < 0,05$	^b : $p < 0,05$
HbA _{1C} (%)	4.3 ± 0.32	7.25 ± 0.48	6.63 ± 0.51
p	^a : $p < 0,05$	^c : $p < 0,05$	^b : $p < 0,05$



Şekil 4.1. Kan glukoz düzeyleri

Benzer şekilde, HbA_{1c} düzeyleri K grubunda 43 ± 0.32 olarak bulunurken, D grubunda 72.5 ± 0.48 düzeyine yükseldi D grubundaki bu yükseklik K grubuna göre anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Aminoguanidin verilen D+Ag grubunda HbA_{1c} düzeyi 66.3 ± 0.51 bulundu. Bu değer K grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0,05$), D grubuyla karşılaştırıldığında aminoguanidinin HbA_{1c} düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.2. HbA_{1C} düzeyleri

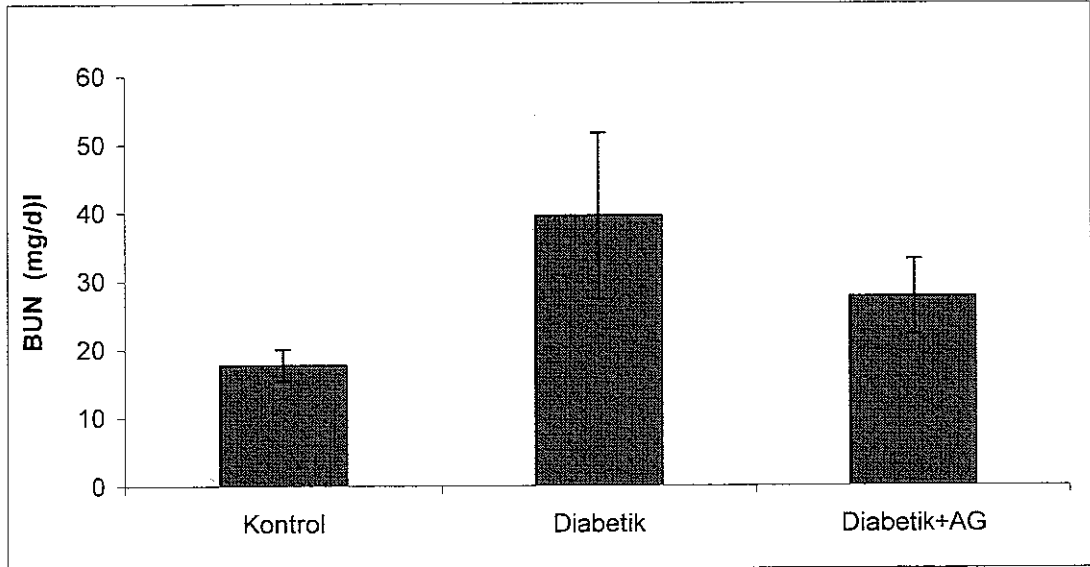
4.2. Böbrek Fonksiyonları (BUN ve Kreatinin Düzeyleri)

K grubunda BUN düzeyi 17.67 ± 2.35 mg/dl olarak bulundu. D grubundaki BUN düzeyi ise 39.5 ± 12.12 mg/dl ye yükseldi. D grubundaki BUN düzeyi yüksekliği, K grubuna göre anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Aminoguanidin uygulanan D+Ag grubunda BUN düzeyi 27.67 ± 5.50 mg/dl olarak bulundu. K grubuyla karşılaştırıldığında bu değer anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0,05$), D grubuyla karşılaştırıldığında aminoguanidin uygulanmasının BUN düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.2. BUN ve kreatinin düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma) a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması. b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması.

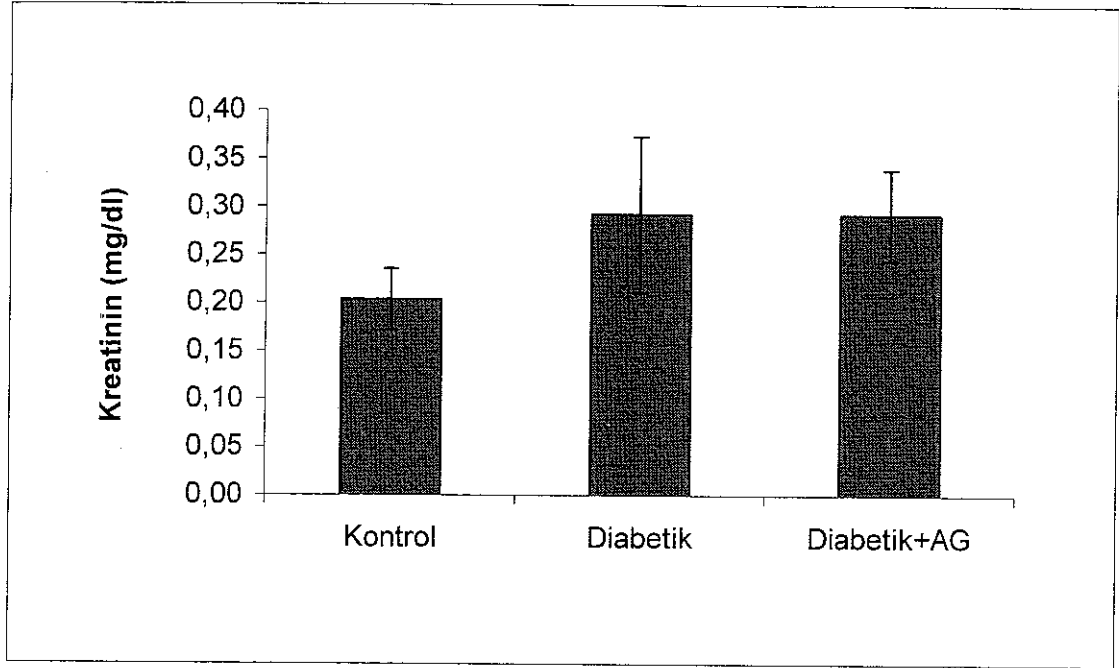
	K	D	Diabetik+AG
n	9	10	12
BUN (mg/dl)	17.67 \pm 2.35	39.5 \pm 12.12	27.67 \pm 5.50
p	^a : p<0,05	^c : p<0,05	^b : p<0,05
Kreatinin (mg/dl)	0.20 \pm 0.03	0.29 \pm 0.08	0.29 \pm 0.05
p	^a : p<0,05	^c : p>0,05	^b : p<0,05

K grubunda kreatinin düzeyi 0.20 \pm 0.03 mg/dl olarak bulundu. D grubundaki kreatinin düzeyinin 0.29 \pm 0.08 mg/dl ye yükseldiği saptandı D grubundaki kreatinin düzeyi yüksekliği, K grubuna göre anlamlı bulundu (p<0,05). D+Ag grubunda kreatinin düzeyi 0.29 \pm 0.05 mg/dl olarak saptandı.



Şekil 4.3. BUN düzeyleri

D grubu ile D+Ag grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$), K grubuna göre aminoguanidin uygulanan D+Ag grubundaki kreatinin düzeyi yüksekliği anlamlı bulundu ($p<0,05$). (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kreatinin düzeyleri

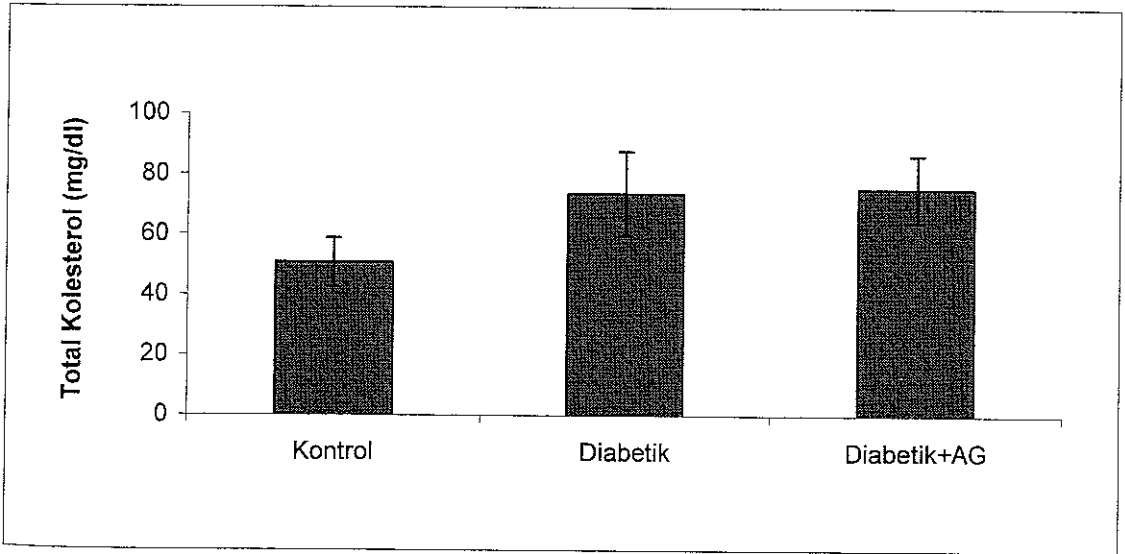
4.3. Total Kolesterol ve Trigliserit Düzeyleri

Total kolesterol düzeyleri K grubunda $50,67 \pm 8,08$ mg/dl olarak bulunurken, D grubunda $73,60 \pm 13,99$ mg/dl ye yükseldi. K grubuyla karşılaştırıldığında, D grubundaki bu değer anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). D+Ag grubunda total kolesterol düzeyi $75,25 \pm 11,09$ mg/dl olarak saptandı. Bu değer K grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken ($p<0,05$), sıçanlara aminoguanidin uygulanmasının total kolesterol düzeyleri açısından diabetik grupta anlamlı bir fark oluşturmadığı bulundu ($p>0,05$) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.3. Total kolesterol ve trigliserit düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma). a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması. b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması. c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması.

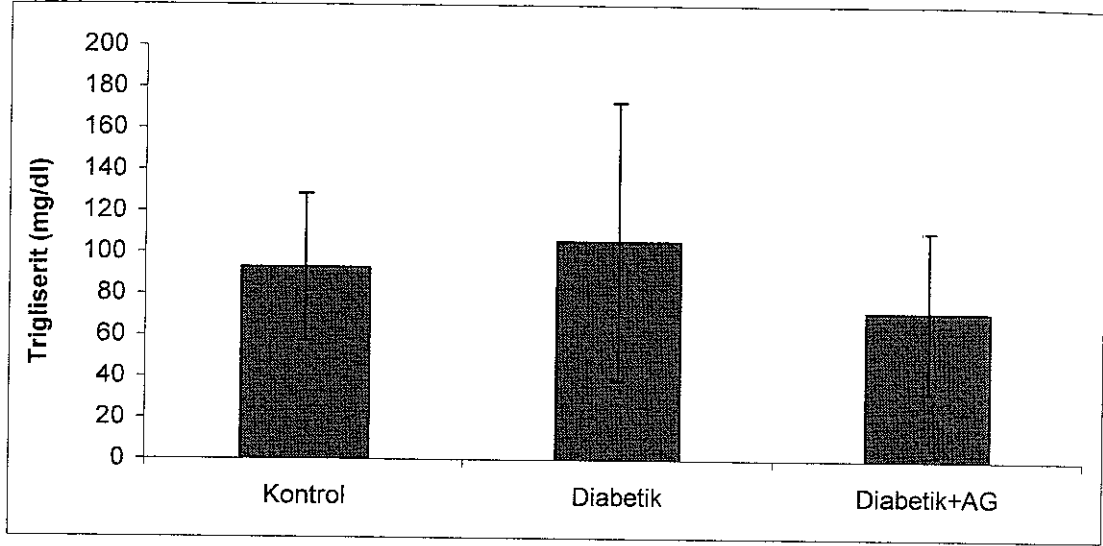
	K	D	D+Ag
N	9	10	12
Total kolesterol (mg/dl)	50.67 \pm 8.08	73.60 \pm 13.99	75.25 \pm 11.09
P	^a : p<0,05	^c : p>0,05	^b : p<0,05
Trigliserit (mg/dl)	93.00 \pm 35.46	105.70 \pm 67.20	71.75 \pm 38.92
P	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05

K grubunda trigliserit düzeyi 93.00 \pm 35.46 mg/dl olarak bulundu. D grubunda trigliserit düzeyi 105.70 \pm 67.20 mg/dl ye yükseldi. D grubundaki bu yükselme K grubuna göre anlamlı bulunmadı (p>0,05). D+Ag grubunda trigliserit düzeyi 71.75 \pm 38.92 mg/dl olarak bulundu. Bu değer K grubuna göre düşüktür ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05).



Şekil 4.5. Total kolesterol düzeyleri

Yine aminoguanidin uygulanmasıyla trigliserit düzeyleri diabetik gruba göre düştü ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.6).



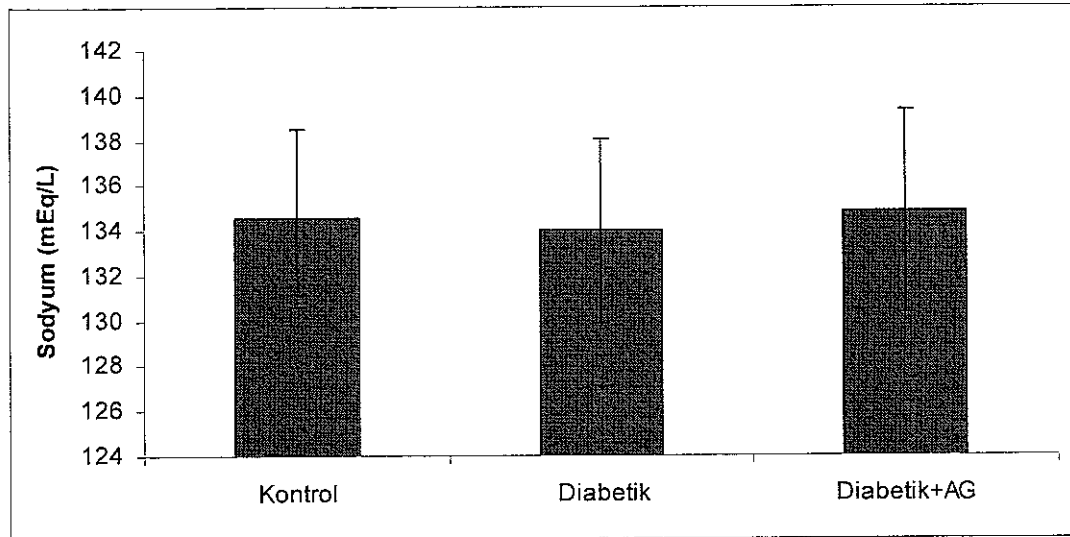
Şekil 4.6. Trigliserit düzeyleri

4.4. Elektrolitler (Sodyum, Potasyum, Klor) ve Osmolarite Düzeyleri

Sodyum düzeyleri K grubunda 134.56 ± 3.91 mEq/L olarak bulunurken, D grubunda 134 ± 4.08 mEq/L olarak bulundu. K grubuyla D grubu karşılaştırıldığında sodyum düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). D+Ag grubunda sodyum düzeyi 134.83 ± 4.47 mEq/L olarak saptandı. Aminoguanidin verilen grubun sodyum düzeyleri açısından hem D hem K grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.4 ve Şekil 4.7).

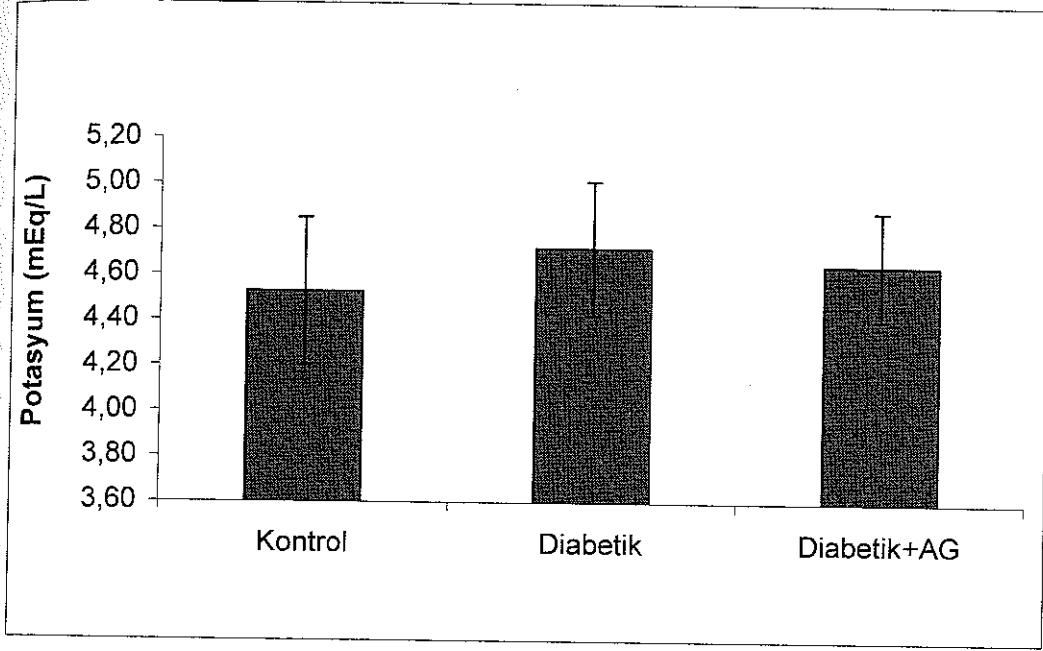
Tablo 4.4. Sodyum, potasyum, klor ve osmolarite düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma). a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması. b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması. c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması

	K	D	D+Ag
n	9	10	12
Sodyum (mEq/L)	134.56 \pm 3.91	134 \pm 4.08	134.83 \pm 4.47
p	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05
Potasyum (mEq/L)	4.53 \pm 0.33	4.72 \pm 0.29	4.65 \pm 0.24
p	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05
Klor (mEq/L)	101.44 \pm 5.43	99 \pm 6.73	100.33 \pm 6.57
p	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05
Osmolarite (mosm/L)	303.89 \pm 4.59	309 \pm 7.12	306 \pm 6.11
p	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05



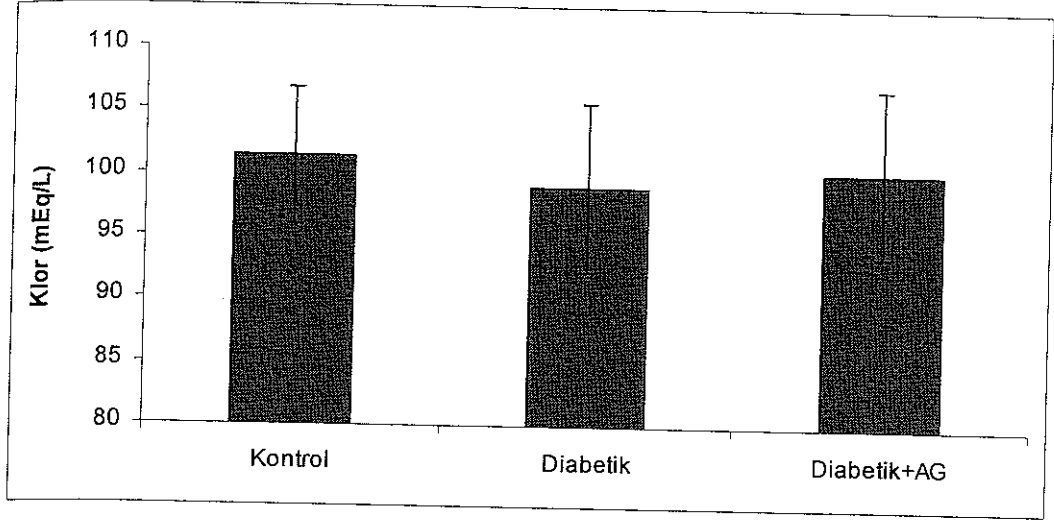
Şekil 4.7. Sodyum düzeyleri

K grubunda potasyum düzeyi 4.53 ± 0.33 mEq/L olarak bulundu. D grubunda potasyum düzeyi 4.72 ± 0.29 mEq/L ye yükseldi D grubundaki bu yükselme K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$).



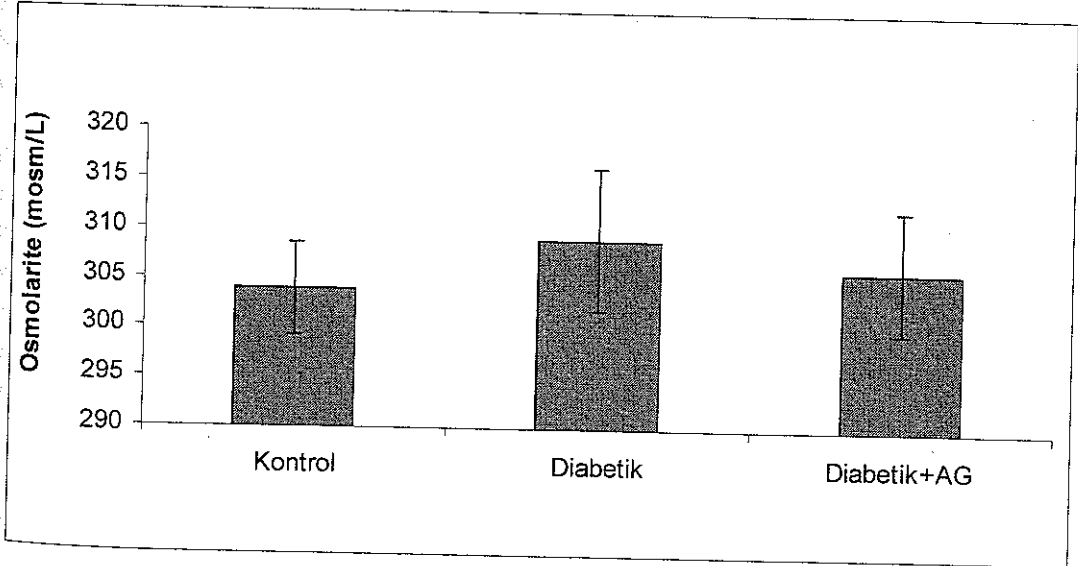
Şekil 4.8. Potasyum düzeyleri

Potasyum düzeyi D+Ag grubunda 4.65 ± 0.24 mEq/L olarak bulundu. D grubuna göre bu değer daha düşüktür ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Yine K grubu ile D+Ag grubu potasyum düzeyleri açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.4 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Klor düzeyleri

Klor düzeyi K grubunda 101.44 ± 5.43 mEq/L olarak bulundu. D grubunda klor düzeyi 99 ± 6.73 mEq/L ye düştü. D grubundaki bu düşme K grubuna göre anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). D+Ag grubunda klor düzeyi 100.33 ± 6.57 mEq/L olarak bulundu. D+Ag grubu ile D grubu arasında klor düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$), ayrıca K ile D+Ag grupları arasında da anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.4 ve Şekil 4.9)



Şekil 4.10. Osmolarite düzeyleri

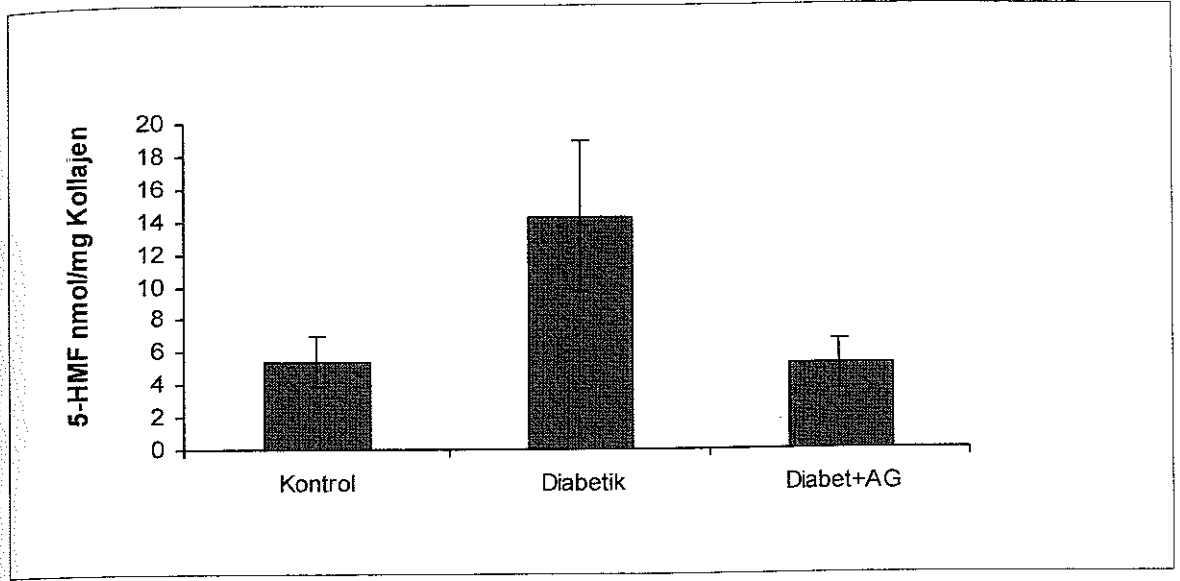
K grubunda osmolarite düzeyi 303.89 ± 4.59 mosm/L olarak bulundu. D grubunda osmolarite düzeyi 309 ± 7.12 mosm/L ye yükselmiştir. Fakat D grubundaki bu yükselme K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Osmolarite düzeyi D+Ag grubunda 306 ± 6.11 mosm/L olarak bulundu. Bu değer D grubuna göre biraz düşüktür, ancak her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). D+Ag grubuyla K grubu osmolarite değeri açısından karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). (Tablo 4.4 ve Şekil 4.10)

4.5. Penis Korpus Kavernozum Dokusunda Ölçülen 5-HMF Düzeyleri

K grubunda 5-HMF düzeyi 5.42 ± 1.56 nmol 5-HMF/mg kollajen olarak bulundu. D grubunda 5-HMF düzeyi 14.28 ± 4.64 nmol 5-HMF/mg kollajene yükseldi. D grubundaki bu yükselme K grubuyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p<0,05$). D+Ag grubunda 5-HMF düzeyi 5.19 ± 1.53 nmol 5-HMF/mg kollajen olarak bulundu. Diabetik gruba göre aminoguanidin uygulanan gruptaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Yine aminoguanidin uygulanmasıyla 5-HMF düzeylerinin düştüğü ve K grubuyla arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.11).

Tablo 4.5. 5-HMF düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma). a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması. b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması. c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması

	K	D	D+Ag
N	9	10	11
5-HMF (nmol 5-HMF/mg kollajen)	5.42 ± 1.56	14.28 ± 4.64	5.19 ± 1.53
P	^a : $p<0,05$	^c : $p<0,05$	^b : $p>0,05$



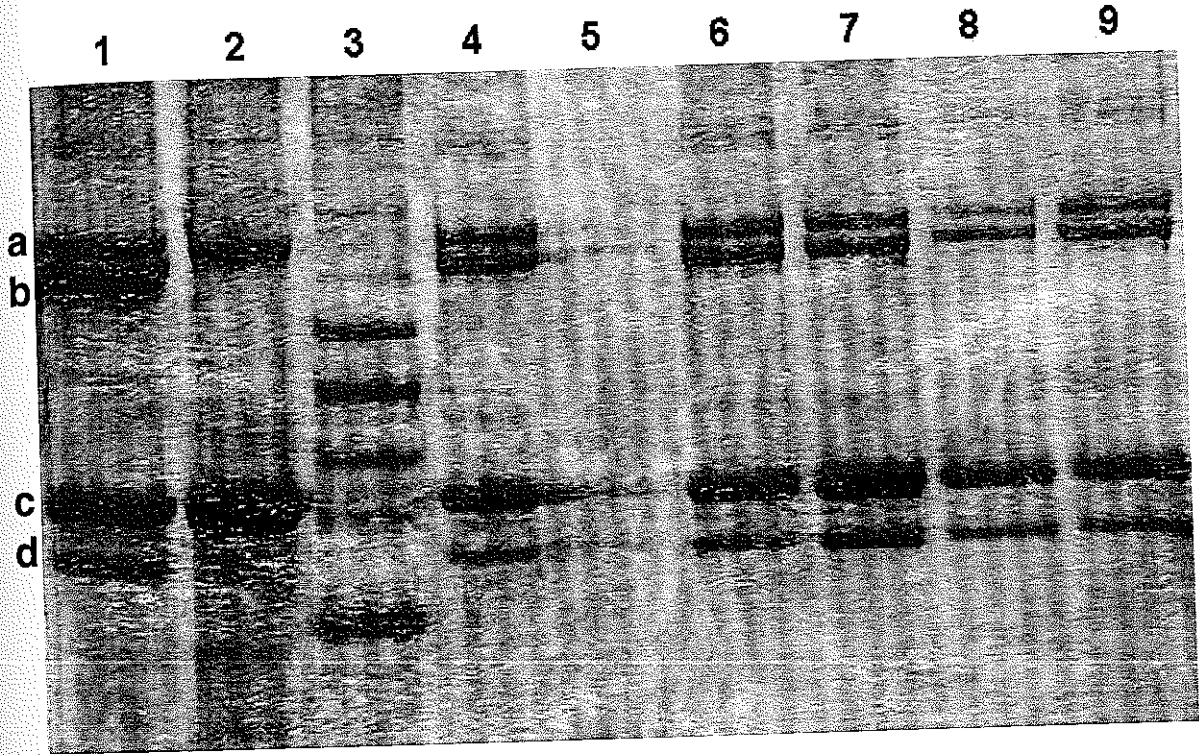
Şekil 4.11. 5-HMF düzeyleri

4.6. SDS-PAGE ile Korpus Kavernozum Dokusunda Kollajen Düzeylerinin Belirlenmesi

Doku örneklerinden kollajen pürifikasyon işleminden sonra, SDS-PAGE jeline uygulanmasıyla şekil 4.12'de görüldüğü gibi a, b, c ve d olarak adlandırdığımız bantlar ortaya çıktı.

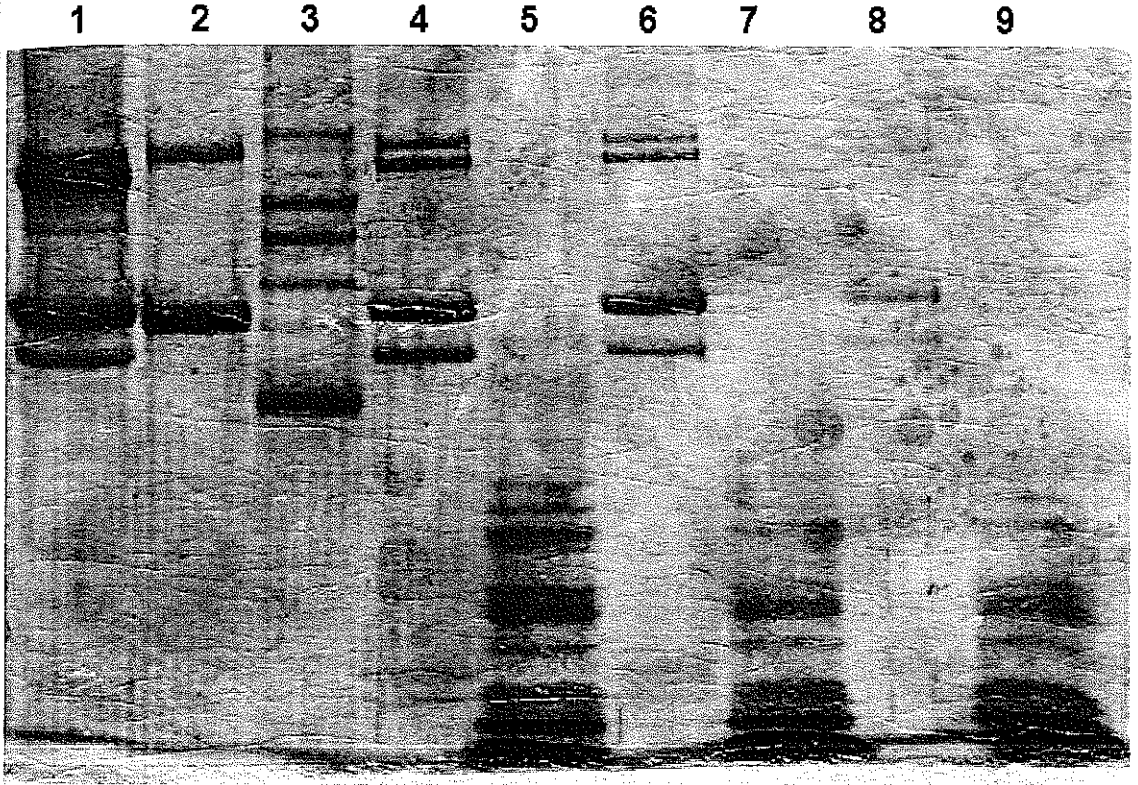
Total kollajen miktarı dansitometrik olarak ölçülürken a, b, c ve d bantlarının toplam değeri alındı. Kontrol, diabetik ve aminoguanidin uygulanan diabetik gruplara ait doku örneklerinde görülen a ve c bantları, tip I ve tip III kollajen standartlarında görülen a ve c bantları ile uyumludur. Doku örneklerimizde görülen a ve c bantlarının tip I ve tip III kollajenin her ikisini de içerdiğini söyleyebiliriz. Ancak b ve d bantları sadece tip I kollajen standardında bulunduğu için doku örneklerinde görülen b ve d bantlarının tip I kollajen olabileceği görülmektedir. Dolayısıyla b ya da d bantlarının dansitometrik olarak ölçülmesiyle doku örneklerindeki tip I kollajen miktarı saptanabilir. Bu amaçla

her üç gruba ait tüm doku örneklerinde b bandının dansimetrik olarak ölçülmesiyle tip I kollajen düzeylerini saptadık



Şekil 4.12. Tunika albugineadan kollajen pürifikasyonu sonrası örneklerin SDS-PAGE ile gösterimi (%6'lık ayrışma jeli) 1-Tip I kollajen standardı, 2-Tip III kollajen standardı, 3-Tip IV kollajen standardı, 4,7-Kontrol grubu, 5,8-Diabetik grup, 6,9-Aminoguanidin uygulanan diabetik grup

Doku örneklerindeki a ve c bantlarında tip I ve tip III kollajenin birlikte bulunması dolayısıyla, tip III kollajen miktarı ancak bu bantlardaki tip I kollajen miktarının, dansimetrik olarak belirlenen total kollajen miktarından çıkarılmasıyla bulunabilir. Bu amaçla biz, tip I kollajen standardındaki a ve b bantlarının dansimetrik değerlerinin her üç gruba ait a ve b bantlarının dansimetrik değerlerine oranlanmasıyla, a bandındaki tip I kollajen miktarını bulduk. Bu değer a bandının toplam dansimetrik değerinden çıkarılmasıyla doku örneklerine ait tip III kollajen miktarını hesapladık.



Şekil 4.13. Üç gruba ait örneklerin kollajenaz uygulanması sonrası SDS-PAGE ile gösterimi (%6'lık ayırma jeli). 1-Tip I kollajen standardı, 2-Tip III kollajen standardı, 3-Tip IV kollajen standardı, 4-Kollajenaz uygulanmayan kontrol grubu, 5-Kollajenaz uygulanan kontrol grubu 6-Kollajenaz uygulanmayan diabetik grup, 7-Kollajenaz uygulanan diabetik grup, 8- Kollajenaz uygulanmayan aminoguanidin verilen diabetik grup, 9-Kollajenaz uygulanan aminoguanidin verilen diabetik grup.

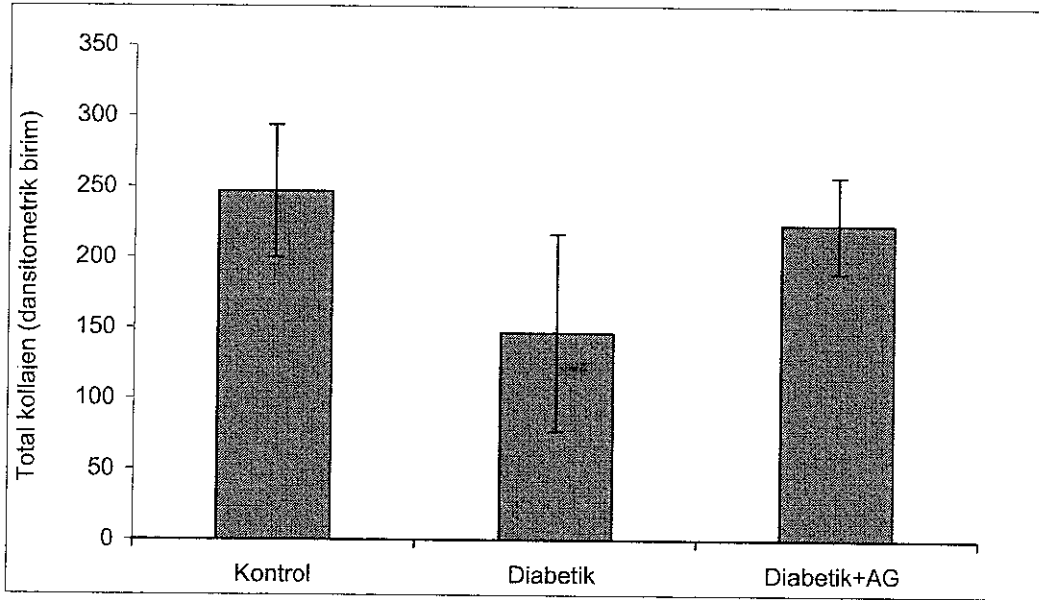
Şekil 4.13'de görüldüğü gibi *Clostridium histolyticum*'dan izole edilmiş tip F kollajenaz (Sigma C 7926) her üç gruba ait örneklerle karıştırılarak, SDS-PAGE jeline yüklendi (5, 7 ve 9 numaralı kuyucuklar). Böylece kollajen pürifikasyonu sonrası ortaya çıkan bantların kollajenaz muamelesiyle kaybolup kaybolmadıklarının izlenmesi amaçlandı. Gerçekten de örneklerin kollajenazla birlikte uygulandığı kuyucuklarda pürifikasyon sonrası görülen bantlar kayboldu, bunların yerine daha düşük molekül ağırlıklı çok sayıda bant ortaya çıktı. Bu

şekilde biz, uyguladığımız kollajenaz ile kollajen pürifikasyonu sonrası ortaya çıkan bantların daha küçük alt birimlere parçalandığını göstermiş olduk. Yine kollajenaz uygulanması sonucu parçalanan bu bantların pürifiye edilen kollajene ait olduğu da doğrulanmış oldu.

Tablo 4.6. SDS-PAGE sonrası dansitometrik olarak ölçülen total kollajen, tip I ve tip III kollajen düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma). a; kontrol ile diabetik grubun karşılaştırılması. b; kontrol ile diabetik+Ag grubunun karşılaştırılması. c; diabetik grubun diabetik+Ag grubu ile karşılaştırılması.

	K	D	D+Ag
N	8	9	10
Total kollajen miktarı (Dansitometrik birim)	246.63 \pm 46.95	146.77 \pm 69.76	223.08 \pm 34.07
P	^a : p<0,05	^c : p<0,05	^b : p>0,05
Tip I kollajen miktarı (Dansitometrik birim)	61.50 \pm 17.23	35.45 \pm 15.02	52.78 \pm 14.84
P	^a : p<0,05	^c : p<0,05	^b : p>0,05
N	6	7	9
Tip III kollajen miktarı (Dansitometrik birim)	13.86 \pm 4.88	6.30 \pm 1.47	9.80 \pm 3.35
P	^a : p>0,05	^c : p>0,05	^b : p>0,05

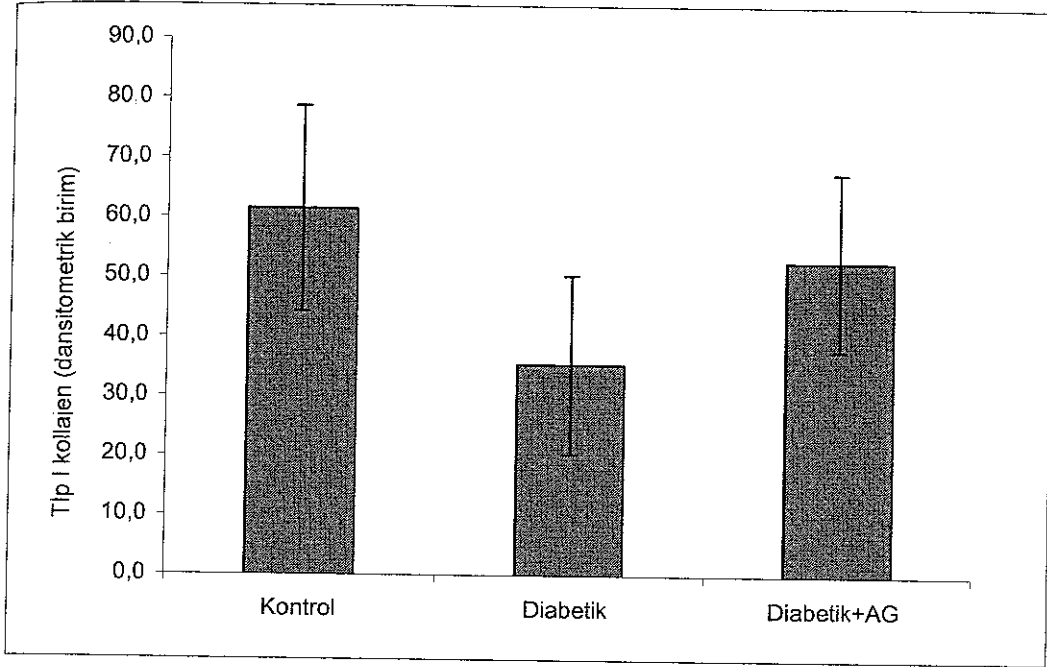
K grubunda dansitometrik olarak ölçülen total kollajen düzeyi 246.63 ± 46.95 dansitometrik birim olarak bulundu. D grubunda total kollajen düzeyi 146.77 ± 69.76 dansitometrik birime düştü. D grubundaki bu düşme K grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Aminoguanidin uygulanmasıyla total kollajen düzeyi 223.08 ± 34.07 dansitometrik birime çıkarak K grubuna yakın bir düzeye ulaştı. Bu değer D grup değeriyle karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Yine K grubu ile D+Ag grup değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Total kollajen düzeyleri

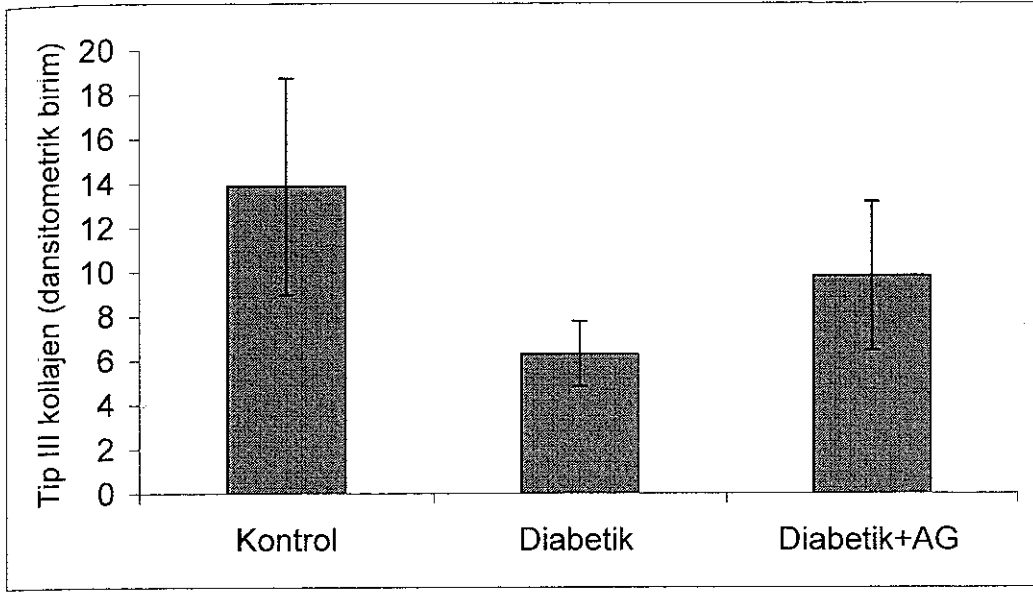
Tip I kollajen düzeyi K grubunda 61.50 ± 17.23 dansitometrik birim olarak bulundu. D grubunda bu değer 35.45 ± 15.02 dansitometrik birime düşmüştür. D grubundaki bu düşme K grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Total kollajen ölçümlerinde görülene benzer şekilde, diabetik grupta tip I kollajen düzeyinde azalma olduğu görülüyor. D+Ag grubunda tip I kollajen düzeyi 52.78 ± 14.84 dansitometrik birim olarak bulundu. D+Ag ve D grubu değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). K

grubu ile D+Ag grup değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Tip I kollajen dőzeyleri

Tip III kollajen dőzeyi K grubunda 13.86 ± 4.88 dansitometrik birim olarak bulundu. D grubunda Tip III kollajen dőzeyi 6.30 ± 1.47 dansitometrik birime dőřmüřtü. Ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). D+Ag grubunda tip III kollajen dőzeyi 9.80 ± 3.35 dansitometrik birim olarak bulundu. Bu değer diabetik gruba göre yőksektir ama iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). K grubu ile D+Ag grubu arasında da anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tip III kollajen düzeyleri

5. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus insülin hormon salınımının ve/veya insülin etkisinin mutlak ya da göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemiyle seyreden bir hastalıktır. Toplumlar arasında oldukça farklı prevalanslar gösteren diabetes mellitus, akut ve kronik komplikasyonlarıyla insan hayatını tehdit eder (22,23)

Hiperglisemi durumlarında, genetik uygunluk da varsa sorbitol yolu, protein kinaz C-diaçil gliserol yolu ve dokular arası redoks potansiyelinde değişiklikler gibi normal olmayan metabolik yollar çalışmaya başlar. Bunlardan biri de non enzimatik glikasyon (NEG) yoludur (58,59,61)

Enzimatik glikasyon, proteinlerin translasyon sonrası geçirdikleri normal fizyolojik bir süreç olmasına rağmen, NEG yaşlanma sürecinde görülse de esas olarak diabet gibi glukoz konsantrasyonunun kalıcı olarak yükseldiği patofizyolojik durumlarda sıklıkla görülür (1,5)

Kısa yarı ömürlü proteinler (gün veya haftalar gibi) yüksek glukoz konsantrasyonunda, kimyasal olarak geri dönüşümlü glikasyon ürünlerine çevrilirler. Bu olay, fizyolojik pH'da lizin ve arjininin ϵ -amino grupları gibi, serbest amino grupları içeren proteinlerin, glukoz gibi şeker, aldehit veya keton grupları ile non enzimatik reaksiyona girmesiyle başlar ve hızlı gerçekleşen bu reaksiyonun sonunda, stabil olmayan Schiff bazları oluşur. Bu bazlar haftalar içerisinde yavaş olarak stabil bir bileşik olan, Amadori (ketoamin türevi) ürününe döner. Bu reaksiyonlar, kan glukozu yüksek olduğu sürece devam eder ve kan glukozunun normale dönmesiyle bu ürünlerde azalma görülür (99,100)

Uzun ömürlü proteinler glikasyonda öncelikli hedeftir. Kollajen gibi uzun ömürlü yapısal proteinler daha yavaş olarak, Amadori sonrası glikasyona uğrayarak ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüşürler. Kollajenöz proteinler, serbest amino grubu içeren dibazik aminoasit kalıntıları içerdiklerinden, NEG'a

özellikle hassastırlar. Düşük yıkılım hızlarından dolayı da, yüksek düzeyde glukozu maruz kalırlar. AGE'ler hiperglisemi süresince artarak, damar endoteli, ekstrasellüler matriks, glomeruler bazal membran gibi çeşitli yerlerde birikerek patolojik süreçleri başlatırlar. Kollajenin yapısında oluşan non enzimatik glikasyon kollajen metabolizmasının değişmesine yol açar. Kollajen çözünürlüğünde, elastisitesinde ve proteazlara duyarlılığında azalma non enzimatik glikasyonun bir sonucudur. Böylece kollajen fonksiyonlarındaki bozukluk bulunduğu dokuya göre farklı klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olur (6,7,8).

Aminoguanidin (AG), non enzimatik glikasyon ürünlerinin karbonil gruplarının bağ oluşumunu önleyen bir guanidino hidrazin bileşimidir. Erken glikasyon (Amadori) ürünleri, bitişik proteinlerdeki lizin grupları yerine AG ile bağlanmayı tercih eder. Böylece kollajendeki çapraz bağ oluşumu, dolayısıyla AGE oluşumu önlenmiş olur (12,13).

Dokulardaki kollajen tipleri arasındaki oranın değişimi, fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Venokluziv disfonksiyon ve Peyronie hastalığı gibi farklı erektil disfonksiyon etyolojilerinde, korpus kavernozum dokusunda kollajen tipleri arasındaki oranın bozulduğu gözlenmiştir (20). Diabetes mellitus da bir erektil disfonksiyon sebebidir. Ancak diabette korpus kavernozum dokusunda kollajen tipleriyle ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Bu amaçla yaptığımız bu çalışmada, STZ ile diabet oluşturduğumuz 8 haftalık sıçanlarda, çalışma süresi olan 8 hafta boyunca AG kullanımının hayvanların serum glukoz, HbA_{1c}, böbrek fonksiyonları (BUN ve kreatinin), elektrolit ve osmolariteleri üzerindeki etkilerini inceledik. Ayrıca sıçanların penis korpus kavernozumlarındaki 5-HMF düzeyi, kollajen miktarı ve kollajen tiplerini saptayarak bunun erektil disfonksiyonla ilişkisini bulmaya çalıştık. Aminoguanidin uyguladığımız grupta (D+Ag) bulduğumuz sonuçları yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol (K) ve diabet gruplarının (D) sonuçlarıyla karşılaştırdık.

STZ enjeksiyonundan iki gün sonra glukometreyle ölçülen kan glukoz düzeylerinde 250 mg/dl üzerinde glukoz düzeyine sahip sıçanlar çalışmaya alındı. Çalışma süresi olan 8 haftanın sonunda kan glukoz düzeyi D grubunda 483.10 ± 84.67 mg/dl ve D+Ag grubunda 381.83 ± 62.17 mg/dl bulundu (tablo 4.1). Crijs ve ark., 6 haftalık çalışma süresince D grubunda glukoz düzeyini 432 mg/dl bulurken D+Ag grubunda 414 mg/dl bulmuşlardır. Bu bulgular glukoz düzeyleri açısından bizim bulgularımıza benzerdir ancak farklı olarak AG uygulanmasıyla glukoz düzeyinin değişmediğini saptamışlar (101). Yapılan bir başka çalışmada ise, AG kullanımının diabetik sıçanlarda bizim bulgularımıza benzer şekilde glukoz düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (102).

Diabetik sıçan grubunda 8 haftalık çalışma süresi sonunda HbA_{1C} düzeylerini glisemi düzeylerine paralel şekilde 7.25 ± 0.48 , D+Ag grubunda ise 6.63 ± 0.51 olarak bulduk. AG kullanımıyla HbA_{1C} düzeyindeki düşme anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (tablo 4.2) Forbes ve ark., 12 haftalık diabetik sıçanlarda HbA_{1C} düzeyini 10.6 olarak bulurken, AG uygulanmasıyla bu değer 9.7 ye düştüğünü saptadılar (103). Ancak Degenhardt ve ark., bizim bulgularımızdan farklı olarak AG kullanımıyla HbA_{1C} düzeyinde bir düşme olmadığını saptamışlardır (104). Başka bir çalışmada ise, diabetik hastalarda bir aylık AG tedavisi sonrası Hb-AGE düzeyinin 30 azaldığı saptanırken HbA_{1C} düzeylerinin değişmediği bulunmuştur (105).

Çalışmamızda, diabetin neden olduğu kan glukozu ve HbA_{1C} düzeyi yüksekliğinin AG uygulanmasıyla düştüğü gösterilmiş oldu. Eritrositlere glukoz girişi insülinin bağımsız olarak gerçekleşmektedir (106). Hücre içi glukoz konsantrasyonu doğrudan doğruya kan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. HbA_{1C} glukozun hemoglobin β zincirindeki N-terminal valine non enzimatik olarak bağlanmasıyla oluşur. Uzun bir süreçteki ortalama kan glukoz düzeyini gösterir. Dolayısıyla HbA_{1C} non enzimatik glikasyonda oluşan bir Amadori ara ürünüdür. Kısa süreli dalgalanmalardan etkilenmemesi nedeniyle kan glukozu kontrolünde HbA_{1C} ölçümü tercih edilir. Hb-AGE, HbA_{1C} oluşumundan sonra hipergliseminin devam etmesiyle ortaya çıkan ileri glikasyon son ürünüdür.

Bu bulgulara göre AG uygulanmasının ileri glikasyon ürünleri oluşumunu daha spesifik olarak engellediği söylenebilir.

Çalışmamızda böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için ölçülen BUN değeri K grubuna göre D grubunda daha yüksek bulunmuştur (39.5 ± 12.12 mg/dl). AG uygulanmasıyla bu düzey 27.67 ± 5.50 mg/dl ye düşmüştür. Yine kreatinin düzeyi K grubuna göre D grubunda daha yüksek bulunmuş (0.29 ± 0.08), AG uygulanmasıyla bu düzey değişmemiştir (tablo 4.2). Rumble ve ark., bulgularımızdan farklı olarak AG kullanımının D grubuna göre BUN ve kreatinin düzeylerini değiştirmedini saptamışlardır (107)

Sıçanlarda diabet gelişiminden sonra birkaç hafta içinde AGE konsantrasyonlarının böbreklerde artmaya başladığı çeşitli çalışmalarda saptanmıştır. Bir çalışmada diabetik grupta böbrek AGE düzeyi 5 haftalık süreçte kontrol grubuna göre 16 kat yüksek bulunmuştur (108). Dolayısıyla bizim oluşturduğumuz 8 haftalık diabetik süreçte D grubundaki BUN ve kreatinin düzeylerindeki yükselmeler AGE birikiminin böbrek fonksiyonlarını etkilemesinin bir sonucu olabilir. Ayrıca STZ'nin böbrekler üzerindeki toksik etkisi de bu yükselmelerde etkili olabilir. AG kullanımı 8 haftalık süreçte AGE oluşumunu engellemede sınırlı yarar sağlayabilir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar 40 haftalık diabetik sıçanlarda ortaya çıkan mezengial proliferasyon ve bazal membran kalınlaşması gibi böbrek patolojilerinin ancak uzun süreli AG uygulanmasıyla önlenebildiğini göstermiştir (109).

Total kolesterol düzeyleri D grubunda K grubuna göre yükselmiş (73.60 ± 13.99 mg/dl), AG kullanımı total kolesterol düzeyini değiştirmemiştir (75.25 ± 11.09 mg/dl). D grubunda K grubuna göre yüksek (105.70 ± 67.20 mg/dl) bulunan trigliserit düzeyi AG kullanımıyla 71.75 ± 38.92 mg/dl ye düşmüştür (tablo 4.3). Liptakova ve ark., 8 hafta boyunca izledikleri diabetik ratlarda bizim bulgularımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir (110).

Çalışmamızda diabetik ratlarda kontrol grubuna göre total kolesterol ve trigliserit düzeyini yükselmiş bulduk. Lipoproteinlerin in vivo ve in vitro olarak glikasyona uğradıkları bilinmektedir. LDL nin apoprotein B kısmının non enzimatik glikasyona uğraması, arter duvarında LDL reseptörü bulunan hücrelerce içeri alınmasını engelleyerek, makrofajlar tarafından daha kolay alınabilecek duruma gelmesini sağlar. Böylece LDL yıkımı yavaşlayarak plazma LDL düzeyi yükselir. HDL nin yapısındaki apoprotein A1 in glikasyonu ise HDL yıkımını yavaşlatır. Non enzimatik olarak glikozillenen HDL₃ ün karaciğer dışı dokulardan kolesterolü uzaklaştırma yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca glike-VLDL nin trigliseritlerin yıkımını önlediği saptanmıştır (111,112)

Lipitlerin dolaşımından temizlenmesinden sorumlu olan makrofajlar, AGE etkileşimiyle fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Diabette yükselmiş serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri bozulmuş olan bu makrofaj fonksiyonlarının bir göstergesi olabilir. AGE etkileşiminin bu olumsuz etkisinin AG ile önlenmesi, trigliserit düzeylerindeki düşmenin nedeni olabilir.

Sodyum, potasyum, klor elektrolitleri ve osmolarite düzeyleri arasında üç grup arasında anlamlı bir fark bulamadık (tablo 4.4). Cartledge ve ark., 8 haftalık diabet sürecinde AG kullanımının diabette oluşan hiponatremiye etkisi olmadığını, potasyum düzeyinde diabetik gruba göre düşme olduğunu saptamışlardır (113).

Sıçanların penis korpus kavernozum dokularındaki 5-HMF düzeyi D grubunda K grubuna göre yüksek bulundu (14.28 ± 4.64 nmol 5-HMF/mg kollajen) AG uygulanması ile 5-HMF düzeyi K grubundaki düzeylere düştü (5.42 ± 1.56) (tablo 4.5). Diabetik sıçanlarda 5-HMF düzeyiyle ilgili yapılan çalışmalarda, kontrol gruplarından daha yüksek değerler elde edilmiştir (114,115,116)

D+Ag grubunda D grubuna göre 5-HMF düzeyindeki düşme HbA_{1C} de olduğu gibi hiperglisemiyle orantılı değildir. D+Ag grubunda yüksek glukoz ve

HbA_{1C} düzeyine karşılık, 5-HMF düzeyi K grubundaki sıçanlara benzer şekilde bulunmuştur. HbA_{1C} ve 5-HMF ketoamin yapısında Amadori ürünleridir. Eritrositlere glukoz girişinin insülininden bağımsız olarak gerçekleşmesi ve kan glukoz düzeyinin hücre içine doğrudan yansması HbA_{1C} düzeyinin AG kullanımıyla 5-HMF’de görüldüğü gibi düşmemesinin bir nedeni olabilir. Korpus kavernozum dokusunda AG kullanımıyla daha düşük 5-HMF düzeylerinin elde edilmesi AG’ in doku düzeyinde daha etkin olarak protein glikasyonunu engellediğini gösterebilir

Kontrol sıçan grubunda 246.63 ± 46.95 dansitometrik birim bulunan total kollajen miktarı diabetik grupta 146.77 ± 69.76 dansitometrik birime düşmüştür. AG uygulanmasıyla total kollajen miktarı 223.08 ± 34.07 birime çıkmıştır

Ereksiyon sırasında kavernoöz arterler ve trabeküler düz kasların tam gevşemesiyle sinüzoidal boşluklara kan girişi artmaktadır. NOS aracılığıyla L-arjininden sentezlenen NO, sinir uçları ve endotelden salgılanarak kavernoöz düz kasların gevşemesinde rol oynar. Diabetik hastalarda çeşitli nedenlere bağlı olarak NO salgılanmasında ya da NO’nun fonksiyon görmesinde sorun vardır (77,81).

Diabette serbest oksijen radikallerinin düzeyinde artış görülür. Bu radikaller glukozun oksidasyonu, AGE oluşumu ya da polyol yolunun aktive olması nedeniyle ortaya çıkabilirler. Süperoksit anyonu bir çok reaktif oksijen türünün kaynağıdır. Süperoksit anyonu NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Peroksinitrit normal koşullar altında glutatyon ile inhibe edilir. Ancak hiperglisemide glutatyon fonksiyonu bozulduğu için, peroksinitritin DNA ve proteinleri okside edici etkileri ortaya çıkar (97).

Diabette L-arjinin miktarının azalması ya da transportunun bozulması endotel fonksiyon bozukluğunun nedeni olabilir. Serbest oksijen radikallerinin inhibe ettiği endotel kaynaklı gevşetici faktör, endotel gevşeme süresinin kısalmasına neden olmaktadır (12)

Hiperglisemik ortamda aktivite kazanan metabolik yollardan biri olan sorbitol yolunda AR enzim aktivitesinde artış görülür. Bu reksiyonda NADPH kullanıldığından ortamda bulunan NADPH miktarı düşecektir NOS, NADPH'ı kofaktör olarak kullandığından NADPH eksikliğinde NO sentazinde azalma gözlenir (99).

Korpus kavernozumdaki NO'nun kaynağı nöronlar (nNOS tip I), endotel (eNOS tip III), ve düz kastır (iNOS tip II) Diabetin vasküler düz kas gevşemesi üzerindeki olumsuz etkileri AG kullanımıyla önlenabilir. AG, korpus kavernozum dokusunun asetilkolin kaynaklı gevşemesi üzerine zıt etki yapar. Ancak yapılan bir çalışmada, diabetik sıçanlarda nNOS inhibe olurken eNOS inhibe olmamıştır (109). AGE'ler vasküler düz kas gevşemesini damar gerilimini azaltarak ve NO'nun endotelden düz kas hücrelerine girişini önleyerek bozarlar. AG ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunu önlerken, NOS inhibisyonu yapması nedeniyle ereksiyonun gerçekleşmesi için gereken NO sentezini de engelliyor gözükmektedir. Ancak AG'in eNOS üzerindeki etkisinin diğer izoformlarına göre daha az olması, diabette oluşan AGE'lerin zararlı etkilerinden korunmak için tercih edilmesini gerektirebilir. Benzer çalışmalarda AG kullanımının iNOS düzeyini artırarak erektil disfonksiyon üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir (117,118).

Diabetik sıçan dokularındaki kollajen miktarının kontrol grubuna göre azalmasının nedeni yeni sentezlenen anormal prokollajen moleküllerinin hızla yıkımı olabilir (8).

Kontrol sıçan grubunda 61.50 ± 17.23 dansitometrik birim bulunan tip I kollajen miktarı diabetik grupta 35.45 ± 15.02 dansitometrik birime düşmüştür. AG uygulanmasıyla 52.78 ± 14.84 dansitometrik birime çıkmıştır (tablo 4.6). Tip I kollajen glukoz kaynaklı çapraz bağlanmaya tip III e göre daha duyarlıdır. Çalışmamızda diabetik sıçanlarda tip I kollajen miktarını kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulduk

Tip I kollajen glukoz aracılı çapraz bağlanmaya tip III kollajenden daha yatkındır. Bu farklılığın kanıtı, kollajenin primer yapısında bulunabilir. Kollajen sentezi hücre içi ve hücre dışında olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Hücre içi aşamada oluşan prokollajen, hücre dışına salgılanarak kollajene dönüşür. Salgılanan bu yapılar kollajen fibrillerine dönüşür. Tip I, II, ve III kollajenin pro- α_1 zincirleri neredeyse aynı olmasına rağmen, pro- α_1 (III) ün pro- α_1 (I) ve pro- α_2 (I) zincirlerine benzerliği azdır. Tip III kollajenin çapraz bağlanmada tip I ve tip II kollajenden farklı olmasının nedeni buna bağlanmaktadır.

Diğer farklılıklar moleküler organizasyon ve yapıda bulunabilir. Ekstrasellüler bir işlem olan propeptidin karboksi ve amino uçlarının kollajen yapısından ayrılmasında, pro- α_1 (I) ve pro- α_2 (I) öncülük eder. Pro- α_1 (III) ise propeptidin amino ucunda sağlam bir yapı oluşumunu sağlar. Bu mekanizma ekstrasellüler parçaların bir araya gelmesinde önemli rol oynayabilir. Propeptidin amino ucundaki tip III kollajen moleküllerinin sterik menteşe görevi yapmasıyla ekstrasellüler parçaların birleşmesi sağlanır (119). Tip III kollajen bu sterik menteşe özelliği nedeniyle glukozla tip I kollajene göre daha az birleşme eğilimindedir.

Tip III kollajen doku ve organlarda farklı gerilim güçlerine cevap verebilecek yapısal bir iskelet oluşturur. Fonksiyon görebilmeleri için esnekliğin gerektiği kan damarları gibi yapılar için bu gereken bir özelliktir. Geç embriyonal ve erken postnatal dönemde deride bol miktarda bulunan tip III kollajen, yetişkinlerde ancak granüloamatöz dokularda bol miktarda görülür. Yine yara iyileşmesi ve kırıkların iyileşme sürecinde tip III kollajen düzeylerinde artış görülür. Yara iyileşmesinin erken döneminde, belirgin olarak artan tip III kollajen ekspresyonu, geç dönemde yerini tip I kollajen fibrillerine bırakır (120). Yaşla birlikte kollajende çapraz bağlanma artışı oluğu bilinmektedir. Bu çapraz bağlar glukozun tip I kollajene olan ilgisi ve dokulardaki tip I kollajen oranının çok daha fazla olması nedeniyle daha çok tip I kollajende görülür.

Doku örneklerinin kollajenzla birlikte uygulanmasıyla pürifikasyon sonrası örneklerde ortaya çıkan a, b, c ve d bantlarının şekil 4 13'de kaybolması bu bantların korpus kavernozum dokusundan elde edilen kollajenler olduğunu göstermektedir.

Kontrol sıçan grubunda 13.86 ± 4.88 dansitometrik birim bulunan tip III kollajen miktarı diabetik grupta 6.30 ± 1.47 dansitometrik birime düşmüştür. AG uygulanmasıyla 9.80 ± 3.35 dansitometrik birime çıkmıştır. Ancak D grubundaki azalma K gruna göre anlamlı bulunmamıştır. Tip III kollajen, tip I kollajen içeren dokulardan elde edilebilir. Her ikisi birlikte karışık fibriller oluşturabilirler (72). Çalışmamızda pürifikasyon sonrası SDS-PAGE ile elde ettiğimiz jel örneklerinde tip I ve tip III kollajenin a bandında birlikte bulunduğunu gördük.

Tip III kollajenin fetal derideki göreceli oranı, neonatal veya erişkin derisinden oldukça yüksektir. Bu yüzden bu kollajen fetal ya da embriyonik kollajen adını alır. Genelde tip III kollajenin tip I kollajene göre oranı doku uzanabilirliği ile ilişkilidir. Yani bağ dokusunun hassas kısmını oluşturur. Bu tip III kollajeni oluşturan fibrillerin biyomekanik özelliğine bağlanabilir. Tip III kollajen yapısında yüksek oranda hidroksiprolin bulunması, glisin miktarının fazla olması (kalıntıların %33'ünden fazlası) ve üçlü sarmalın karboksi uç bölgesine yakın iki sistein kalıntısı içeren molekül içi disülfid bağlarının bulunması gibi özelliklere sahiptir. Ehlers-Danlos sendromu tip IV'de, tip III kollajen genleri mutasyona uğramıştır. Bunun sonucunda kollajen esnekliğinde azalma, deri ve kan damarlarının kırılabilirliğinde artış gözlenir (72).

D grubunda tip I kollajen düzeyindeki düşüklük anlamlı bulunurken, tip III kollajendeki düşüklüğü anlamlı bulmadık. Buradan diabette tip III kollajenin tip I e göre daha az azaldığı sonucunu çıkarabiliriz. Korpus kavernozum dokusundaki tip III lehine görülen bu değişiklik diabette görülen erektil disfonksiyonun patogenezinde rol oynayabilir.

Bu bulgular bize diabette kollajen düzeyinin normal sıçanlara göre düştüğünü gösteriyor. Bu görüş, çeşitli çalışmalarda da desteklenmiştir (3,8,14). Diabette %28 gibi (121) oldukça sık görülen bir komplikasyon olan erektil fonksiyon bozukluğunun patogeneğinde korpus kavernozumdaki kollajen tipleriyle ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu konuya açıklık getirmek amacıyla yaptığımız bu çalışma, kollajen tipleri arasındaki dengenin bozulduğunu gösteriyor. Bu dengenin bozulması büyük ölçüde glikasyonla ilgilidir. Bu açıdan erektil fonksiyon bozukluğunun tedavisi için, AGE oluşumunu önleyen AG benzeri ilaçların kullanımının yararlı olacağını düşünüyoruz. AG'in erektil fonksiyon bozukluğunu önlemesinin NOS inhibisyonundan çok AGE oluşumunu önlemesiyle ilgili olduğunu söyleyebiliriz. Yine de erektil fonksiyon bozukluğunun kollajen tipleriyle ilişkisinin aydınlatılabilmesi için bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada STZ ile diabet oluşturduğumuz 8 haftalık sıçanlarda, çalışma süresi olan 8 hafta boyunca AG kullanımının hayvanların serum glukoz, HbA_{1C}, böbrek fonksiyonları (BUN ve kreatinin), total kolesterol ve trigliserit elektrolit ve osmolariteleri üzerindeki etkilerini inceledik. Yine sıçanların penis tunika albuginea dokularındaki 5-HMF düzeyi, kollajen düzeyleri ve tiplerini saptayarak, bunun erektil fonksiyon bozukluğuyla ilişkisini bulmaya çalıştık.

Çalışma gruplarımızı 9 K, 10 D ve 12 D+Ag grubundan oluşan Wistar tipi erkek sıçanlardan oluşturduk. 8 haftalık diabet süresince D+Ag grubuna içme sularına 1gr/L olacak şekilde AG verildi.

8 haftanın sonunda gruplardaki bütün sıçanlar öldürülerek serumlarında otoanalizör yardımıyla biyokimyasal parametreler ölçüldü. Penis korpus kavernozum dokusunda 5-HMF düzeyi spektrofotometrik olarak, kollajen düzeyleri ve tipleri SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlendi.

Diabetik grupta serum glukoz ve HbA_{1C} düzeyleri K grubuna göre anlamlı yüksekti ($p<0.05$). AG uygulanmasıyla her iki parametrede anlamlı düşme gözlemlendi ($p<0.05$). Böbrek fonksiyonları (BUN ve kreatinin) anlamlı olarak yükselmişti ($p<0.05$). AG etkisiyle BUN düzeyi düşerken ($p<0.05$), kreatinin düzeylerinde anlamlı değişiklik görülmedi. D grubunda total kolesterol ve trigliserit düzeyleri anlamlı yüksek bulunurken ($p<0.05$), AG sadece trigliserit düzeylerinde düşme sağladı ($p<0.05$). Elektrolitler (sodyum, potasyum, klor) ve osmolarite düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Penis tunika albuginea dokusunda 5-HMF düzeyi diabetiklerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekken ($p<0.05$), AG uygulanmasıyla D grubuna göre anlamlı düşüş saptandı. Yine diabetiklerde total ve tip I kollajen K grubuna göre anlamlı düşük bulunurken ($p<0.05$), AG uygulanmasıyla D grubuna göre anlamlı yükselme sağlandı. Tip III kollajen düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Diabetik sıçanlarda AGE oluşumunun penil ereksiyon için gerekli olan NO üzerindeki olumsuz etkilerinin AG kullanımıyla önlenebileceği gösterildi. Tunika albuginea dokusundaki tip I ve tip III kollajen arasındaki oranın bozulmasının erektil disfonksiyonun bir nedeni olabileceği düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. **Brownlee M.** Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-34.
2. **Vlassara H.** Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 1997; 46 (2): 19-25.
3. **Turk Z, Misur I, Turk N, Benko B.** Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37 (8): 813-820.
4. **Monnier VM, Kohn RR, Cerami A.** Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 583-7
5. **Kennedy L, Baynes JW.** Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 1984; 26: 93-8.
6. **Chang K, Uitto J, Rowold EA, Grant GA, Kilo C, Williamson JR.** Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by β -aminopropionitril and D-penicilamine. *Diabetes* 1980; 29: 778-81.
7. **Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW.** Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes* 1992; 41: 42.
8. **Brennan M.** Changes in the cross-linking of collagen from rat tail tendons due to diabetes. *J Biol Chem* 1989; 264 (35): 20953-60.
9. **Brownlee M, Vlassara H, Kooney T, Ulrich P, Cerami A.** Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; 232: 1629-32

10. **Yu HP, Zou DM.** Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia* 1997; 40: 1243-50.
11. **Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Smith SR, Petrash JM, Misko TP.** Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines; inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. *Diabetes* 1993; 42: 221-32.
12. **Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL.** Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992; 41: 552-6.
13. **Huijberts MSP, Wolffenbuttel BHR, Struijker Boudier HAJ, et al.** Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rat. *J Clin Invest* 1993; 92: 1407-11.
14. **Kochakian M, Manjula BN, Egan JJ.** Chronic dosing with aminoguanidine and novel advanced glycosylation end product formation inhibitors ameliorates cross-linking of tail tendon collagen in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1694-700.
15. **Kumari K, Umar S, Bansal V, Sahib MJ.** Inhibition of diabetes-associated complications by nucleophilic compounds. *Diabetes* 1991; 40: 1079-84.
16. **Klinge U, Si ZY, Zhang H, Schumpelick V, Bhardway RS, Klosterhalfen B.** Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res* 2000; 32 (1): 43-8.

17. **Hilska M, Collan Y, Peltonen J, Gullichsen R, Paajanen H, Laato M.** The distribution of collagen types I, III and IV in normal and malignant colorectal mucosa. *Eur J Surg* 1998; 164 (6): 457-64.
18. **Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Ronnema T, Seppanen E, Vilkari JS.** Dupuytren's disease in type I diabetic subjects: investigation of biochemical markers of type III and I collagen. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18 (2): 215-9.
19. **Raviv G, Venegas JP, Petein M, Schulman C, Danguy A, Kiss R.** Biochemical alterations of tunica albuginea in impotence. *J Urol* 1997; 158: 1778-82.
20. **Somers KD, Sismour EN, Wrigt GL, Devine CJ, Gilbert DA, Horton CE.** Isolation and characterization of collagen in Peyronie's disease. *J Urol* 1989; 141: 629-31.
21. **Culha M, Alici B, Acar O.** The relationship between diabetes mellitus, impotence and veno-occlusive dysfunction in Peyronie's disease. *Urol Int* 1998; 60: 101-4
22. **Bennet PH, Rewers M, Knowler WC.** Epidemiology of diabetes mellitus. In: **Rifkin H. (ed):** Textbook of diabetes. Appleton Lange, London, 1998: 373-400.
23. **Vale T, Tuomilehto J, Eriksson J.** Epidemiology of NIDDM in europoids. In: **Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H. (eds):** International textbook of diabetes mellitus. John Wiley & Sons Ltd, New York, 1997: 125-142.

24. **Satman I, Yılmaz MT, Baştar I, Şengül A, Sargın M and TURDEP Groups.** Diabetes epidemiology study in Turkey: first step data results. *Diabetes* 1998; 47: 1480.
25. **Golay A, Felber JP, Jequier E, De Fronzo RA, Ferranni E.** Metabolic basis of obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Metab Rev* 1988; 4 (8): 727-47.
26. **Reaven GM, Hollenbec CB, Chen Y.** Relationship between glucose tolerance, insulin secretion and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* 1989; 32: 52-9.
27. **Karjalainen J, Knip M, Hyoty H, Linikki P, Ilonen J, Akerblom HK.** Relationship between serum insulin antibodies, islet cell antibodies and Coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type I diabetes. *Diabetologia* 1988; 31: 146-52.
28. **Pak CY, Eun H, McArthur RG, Yoon J.** Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type I diabetes. *Lancet* 1988; 2: 1-4.
29. **Davies JL, Kawaguchi Y, Benett ST et al.** A genome wide search for human type I diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130-6
30. **Todd JA, Acha-Orbea H, Bell CM et al.** A molecular basis for MHC Class H-associated autoimmunity. *Science* 1988; 240: 1003-9.
31. **Khalil, d'Aurial L, Gobet M et al.** A combination of HLA-DQ Asp 57 negative and HLA DQ Arg 52 confers susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 85: 1315-19.
32. **Szopa TM, Tichener PA, Portwood NO, Taylor KW.** Diabetes mellitus due to viruses some recent developments. *Diabetologia* 1993; 36: 687-95.

33. **Karam JH, Marten JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E.** A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1992; 327: 302-7
34. **Dasch HM, Karjalainen J, Morkowski J, Martin JM, Robinson BH.** Nutritional triggers of IDDM. *Pediatr Adolse Endocrinol* 1992; 21: 202-17.
35. **Roeb B, Kalhan AA, De Vries RRP.** B-cell antigen specific lysis of macrophages by CD4 T-cell clones from newly diagnosed IDDM patient *Diabetes* 1992; 41: 1380-4
36. **Hehmke B, Michaelis D, Gens E, Laube F, Kohnert KD.** Aberrant activation of CD8+ T-cell and CD8+ T-cell subsets in patients with newly diagnosed IDDM *Diabetes* 1995; 44 (12): 1414-9
37. **Karounas DG, Neil LJ, Thomas JW.** Autoantibodies present at onset of type I diabetes recognize multipl islet cell antigens. *Autoimmunity* 1990; 6: 79-91
38. **Shimada S, Takei L, Kasatani T, Nomaguchi H, Ishii M, Ozawa Y.** Heat shock protein and insulinitis. *Autoimmunity* 1993; 15: 80.
39. **Harrison L, Chu X, De Aizpurua H, Graham M, Honeyman M, Colman P.** Islet reactive T-cells are a marker of preclinical insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992; 16: 45-50.
40. **Hales CN, Barker DJP, Clark PM et al.** Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64 years. *BMJ* 1991; 303: 1019-22.
41. **Eriksson UJ.** Life long consequence of metabolic adaptations in utero? *Diabetologia* 1996; 39: 1126-30.

42. **Mulder H, Ahren B, Sundler F.** Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo rats. *Am J Physiol* 1996; 271: 1008-14.
43. **Kapurniotu A, Bernhagen J, Greenfield N, Al-Abed Y, Teichberg S, Frank RW.** Contribution of advanced glycosylation to the amyloidogenicity of islet amyloid polypeptide. *Eur J Biochem* 1998; 251: 208-16.
44. **Comi RJ, Grunberger G, Gorden P.** Relationship of insulin binding and insulin stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes. *J Clin Invest* 1987; 79: 453-62.
45. **Trichitta V, Brunetti A, Chiavetta A, Benzi L, Papa V, Vigneri R.** Defects in insulin receptor internalization and processing in monocyte of obese subjects. *Diabetes* 1989; 38: 1579-84.
46. **Seino S, Seino M, Bell GI.** Human insulin receptor gene. *Diabetes* 1990; 39: 129-33.
47. **Maegwa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M.** Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in non obese subjects with NIDDM. *Diabetes* 1993; 40: 813-19
48. **De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E.** Pathogenesis of NIDDM. In: **Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H (eds).** International textbook of diabetes mellitus. John Wiley & Sons Ltd, New York, 1997; 31: 635-89.
49. **Yki-Jarvinen H.** Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1378-88.

50. **Schade DS, Easton RP, Alberti KGMM, Johnston DG.** Diabetic coma, ketoacidotic and hyperosmolar. Albuquerque: University of New Mexico Pres, 1981.
51. **The Diabetes Control and Complications Trial Researc Group.** The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Eng J Med 1993; 329: 977-86.
52. **Karşıdağ K.** Hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma. İçinde: **Yenigün M, Altuntaş Y (ed):** Her yönüyle diabetes mellitus Nobel tıp kitabevi, İstanbul, 2001: S. 301.
53. **Yılmaz C, Yılmaz MT, İmamoğlu Ş.** Diabetes mellitus, İstanbul, 2000: S. 110.
54. **Yenigün M.** Diabetik mikroanjiopati ve diabetik makroanjiopati. İçinde: **Yenigün M, Altuntaş Y (ed):** Her yönüyle diabetes mellitus Nobel tıp kitabevi, İstanbul, 2001: S. 339.
55. **Altıparmak MR.** Diabetik nefropati. İçinde: **Yenigün M, Altuntaş Y (ed):** Her yönüyle diabetes mellitus Nobel tıp kitabevi, İstanbul, 2001: S. 393.
56. **Ergin M.** Diabetik retinopatinin sınıflandırılması. İçinde: **Özkan Ş, Akar S (ed):** Diabetik retinopati. Dilek ofset, İstanbul, 2000: S.11-15.
57. **Atmaca SI, Gündüz K.** Diabetik retinopatinin tedavisi. Özkan matbaacılık, Ankara, 1993: S. 29-46.
58. **Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK.** Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nevre dysfunction in Streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia 1993; 36: 299-304.

59. **Edelstein D, Brownlee M.** Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 1992; 41: 26-9.
60. **Wisotzky J, et al.** Die Akkumulation von AGE im Alterungsprozess, bei Diabetes mellitus und bei der chronischen Niereninsuffizienz. *Medizinische Klinik* 1996; 91: 454-7.
61. **Giugliano D, Ceriello A, Paolissa G.** Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-64.
62. **Struder RK, Craven PA, De Rubertis FR.** Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta mesengial cell. *Metabolism* 1997; 46: 918-25.
63. **Sawicki PT, Mühlhauser I, Bender R, Pethke W, Heinemann L, Berger M.** Effect of smoking on blood pressure in patients with diabetic nephropathy. *J Int Med* 1996; 239: 345-52.
64. **Chiarelli F, Santilli F, Mohn A.** Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 1154-60.
65. **Dotta F, Gianani R, Previtì M, Lenti L, Dionisi S, D'Erme M.** Autoimmunity to the GM2-1 islet ganglioside before and at the onset of type I diabetes. *Diabetes* 1996; 45: 1193-6.
66. **Roll U, Christie MR, Standl E, Ziegler AG.** Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies and insulin autoantibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetes* 1994; 43: 154-60.

67. **Eadray RAJ, Leigh IM, Pope FM.** Anatomy and organization of human skin. In: **Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnack SM (eds).** Textbook of dermatology, Blackwell science, London, 1998; 72-3.
68. **Biemel KM, Reihl O, Conrad J, Lederer MO.** Formation pathway for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of pentosidine precursor. *J Biol Chem* 2001; 276: 23405-12.
69. **Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J.** Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999; 22: 1186-90.
70. **Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS.** Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999; 344: 109-16.
71. **Vuorio E, Crombrughe B.** The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 837-72.
72. **Tryggvason K.** Molecular properties and disease of collagens. *Kidney Int* 1995; 47: 24-28.
73. **Burgeson RE, Nimm ME:** Collagen Types: Molecular structure and tissue distribution. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1992; 282: 252-4.
74. **Güner G.** Bağ dokusu İçinde: **Onat T, Emerk K (ed):** Temel biokimya Saray kitabevleri, İzmir, 1998: S. 840-5.

75. **Bornstein P.** Comparative sequence studies of rat skin and tendon collagen. Evidence for incomplete hydroxylation of individual prolyl residues in the normal protein. *Biochemistry* 1967; 6: 3082-93.
76. **Stark M, Kühn K.** The properties of molecular fragments obtained on treated calfskin collagen with collagenase from *Clostridium histolyticum* on native collagen. *Eur J Biochem* 1968; 6: 534-41.
77. **Corbett JA, Tilton RG, Chang K.** Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992; 41: 552-556.
78. **Yenigün M, Ener M.** Diabetes mellitus ve erektil fonksiyon bozuklukları. İçinde: **Yenigün M, Altuntaş Y (ed):** Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2001: S. 383-93.
79. **Melman A, Henry DP, Felton DI, O'Connor B.** Effects of diabetes upon penile sympathetic nerves in impotent patients. *South Med J* 1980; 73: 307-9.
80. **Lincoln J, Crowe R, Blacklay PF.** Changes in the VIPergic, colinergic and adrenergic innervation of human penile tissue in diabetic impotent males. *J Urol* 1987; 137: 1053-9.
81. **Keegan A, Cotter MA, Cameron NE:** Effects of diabetes and treatment with antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. *Diabetologia* 1999; 42: 343-50.
82. **Delcour C, Wespes E, Vandebosh G, Schulmann CC, Sturyven J.** The effect of papaverine arterial and venous hemodynamics of erection. *J Urol* 1987; 11: 187.
83. **Ulrich P, Cerami A.** Protein glycation, diabetes and aging. *Endoc Soc* 2001; 1-21.

84. **Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.** AGEs and their interaction with AGE receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovas Res* 1998; 37: 586-600.
85. **Yagihashi S, Kamijo M, Baba M.** Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of STZ-induced diabetic rat. *Diabetes* 1992; 41: 47-52.
86. **Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ.** Assay of advanced glycation endproduct (AGEs). *Biochem J* 2002; 364: 15-24.
87. **Fu MX, Knecht W, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW.** Glycation, glycooxidation and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms and inhibition of late stages of the Maillard reactions. *Diabetes* 1994; 43: 676-83.
88. **Thornalley PJ.** Use of aminoguanidine (Pimagedine) prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 31-40
89. **Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JFB.** Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. *BJU Int* 2001; 87: 402-7.
90. **Sell DR, Nelson JF, Monnier VM.** Effect of chronic aminoguanidine treatment on age-related glycation, glycooxidation and collagen cross-linking in the Fischer 344 rat. *J Gerontol* 2001; 56(9): 405-11.
91. **Tietz NW.** Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, 1999, p.1066.

92. **Kasai K, Nakamura T, Kase N, Hiraoka T, Suzuki R, Kogure F.** Increased glycosylation of proteins from cataractous lenses in diabetes. *Diabetologia* 1983; 25: 36-8.
93. **Kennedy L, Mehl TD, Riley WJ, Merime TJ.** Non enzymatically glycosylated serum proteins in diabetes mellitus: An index of short term glycaemia. *Diabetologia* 1981; 21: 94-8
94. **Tougaard L.** The degree of mineralization in bone tissue *J Clin Lab Invest* 1973; 32: 351-5.
95. **Neuman RE, Logan MA.** The determination of collagen and elastin in tissues. *J Biol Chem* 1950; 184: 549-56.
96. **Bradford MM.** A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-54.
- 97 **Chiang PH, Chiang CP, Shen MR, Huang CH, Wang CJ.** Study of the changes in collagen of the tunica albuginea in venogenic impotence and peyronie's disease. *Eur Urol* 1992; 21: 48-51.
- 98 **Sykes B, Puddle B, Francis M, Smith R.** The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 72: 1472-80.
- 99 **Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF.** Glycosylated hemoglobin in human and animal red cell. Role of glucose permeability. *Diabetes* 1982; 31(9): 743-8.
- 100 **Vague P, Moulin JP.** The defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia *Metabolism* 1982; 31(2): 139-42.

- 101 **Crijns FRL, Struijker HAJ, Wolffenbuttel BHR.** Arteriolar reactivity in conscious diabetic rats influence of aminoguanidine treatment. *Diabetes* 1998; 47: 918-23.
- 102 **El-Seweidy MM, El-Sweify SE, Ameen RS, Hashem RM.** Effect of AGE receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in STZ diabetic rats. *Pharm Res* 2002; 45(5): 391-8.
- 103 **Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar G.** Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51: 3274-82
- 104 **Degenhardt TP, Fu MX, Voss E, Reiff K, Neidlein R, Strein K.** Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. *Diab Res Clin Pract* 1999; 43: 81-9
- 105 **Huby R, Harding JJ.** Non-enzymatic glycation of lens proteins by galactose and protection by aspirin and reduced glutathione. *Exp Eye Res* 1988; 47: 53-9
- 106 **Aksu TA.** Endokrinolojinin biyokimyasal temeli. İçinde: Pankreas ve gastrointestinal sistem hormonları. Antalya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1998: S 132.
- 107 **Rumble RJ, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S.** Vascular hypertrophy in experimental diabetes role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1997; 99(5): 1016-27
- 108 **Nakayama H, Tanade S, Mitsuhashi T et al.** Characterisation of antibody to advanced glycation end products on protein. *J Immunol Methods* 1991; 140: 119-25.
- 109 **Yamaguchi A, Takei I, Makita Z, Nakamoto S, Ohashi N, Kiguchi H.** Effect of aminoguanidine on serum advanced glycation end products, urinary albumin excretion,

mesangial expansion, and glomerular basement membran thickening in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diab Res Clin Pract* 1997; 34: 127-33.

110 Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bozek P, Durackova Z. Influence of β -resorcylicidene aminoguanidine on selected metabolic parameters and antioxidant status of rats with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 277-84.

111 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity *New Engl J Med* 1989; 320: 915-924

112 Mamo JCL, Szeto L, Steiner G. Glycation of very low density lipoprotein from rat plasma impairs its catabolism. *Diabetologia* 1990; 33: 339-45.

113 Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JFB. Nitric oxide-mediated corpus cavernosal smooth muscle relaxation is impaired in aging and diabetes. *BJU Int* 2001; 87: 394-402

114 Black CT, Patrick MD, Hennessey PJ, Ford EG, Andrassy RJ. Protein glycosylation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. *J Surg Res* 1989; 47: 200-2.

115 Turk Z, Misur I, Turk N. Temporal association between lens protein glycation and cataract development in diabetic rats. *Acta Diabetol* 1997; 34: 49-54.

116 Baykal-Erkılıç A, Erkılıç M, Özben T. The effect of streptozotocin-induced diabetes on renal plasma flow. *Exp Clin Endocrinol* 1995; 103: 367-72.

117 Usta MF, Tuncer M, Baykal A, Çiftçioğlu MA, Erdoğan T, Köksal T. Impact of chronic renal failure and peritoneal dialysis fluids on advanced glycation end product and iNOS levels in penile tissue: An experimental study. *Urol* 2002; 59(6): 953-7.

- 118 **Usta MF, Bivalacqua TJ, Yang DY, Ramanitharan A, Sell DR, Viswanathan A.** The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin diabetic rats. *J Urol* 2003; 170: 1437-42
- 119 **Miller EJ.** Collagen types: structure, distribution, and functions. In: **M.E. Nimni (ed).** Collagen biochemistry vol. I, CRC Press, Boca Raton 1988, pp. 139-56
- 120 **Matsumoto F, Trudel G, Uthoff HK.** High collagentype I and low collagen type III levels in knee joint contracture. *Acta Orthop Scand* 2002; 73(3): 335-43.
- 121 **Lue TF.** Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism *Campbell's Urology*, 8th ed, Chap 45, 2003; 1591-613.