

35144

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

DIABETLİ HASTALARDA LÖKOSİT MEMBRAN
PROTEİNLERİNİN GLİKASYONU

Ar.Gör.Yaşar DEMİR

Yönetici : Doç.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Doktora tezi

ÖZET

Diabetli hastalarda yüksek kan glukoz seviyesinin bir sonucu olarak plazma ve doku proteinleri gibi uzun yarılanma - ömrüne sahip olan proteinler nonenzimatik bir reaksiyonla glikasyona maruz kalırlar. Kanın şekilli elemanlarından biri olan nötrofillerin plazma membran proteinleri de diabetli hastalarda glikasyona maruz kalır. Diabetli hastalardaki bu glikasyon nötrofil fonksiyon bozukluklarının sebeplerinden biri olabilir. Bu düşünceden hareketle nötrofiller, 21 diabetli hasta ve 20 sağlıklı kişiden alınan kan örneklerinden dextran sedimentasyonu metodu ile izole edildi. Ayrıca yine aynı şekilde 15 diabetli hasta ve 15 sağlıklı kişiden alınan kan örneklerindeki lökositler Histopaque-1119 metodu ile granülositler ve monositler olarak iki fraksiyon halinde izole edildi. Hücreler parçalandıktan sonra periferik (iç ve dış) ve integral proteinler ayrıldı. Bu fraksiyonlarda total protein ve glikasyon tayinleri yapıldı ve sonuçlar mmol Fruktozamin/mg protein olarak verildi. Diabetli hasta total lökositlerin, granülositlerin ve monositlerin integral membran proteinlerinde istatistiki olarak önemli yüksek glikasyon bulunurken ($P<0,0001$) periferik proteinlerdeki değerleri istatistiki olarak önemli bulunmadı. Diabetli hastalardaki nötrofil fonksiyon bozuklukları ve integral membran proteinlerinin glikasyonu arasında bir bağıntı olabileceği sonucuna varıldı.

SUMMARY

As a result of high glucose levels in serum in diabetic patients, the proteins of long half life, such as plasma and tissue proteins, can undergo glycation, which is a nonenzymatic reaction. Neutrophils, one of the formed elements of blood may also show a glycation in their plasma membrane proteins in diabetic patients, which may be one cause of neutrophil dysfunctions in these patients. On the basis of this thought, neutrophils were isolated by dextran sedimentation method from the blood samples of 21 diabetic and 20 healthy controls. On the basis of this thought, granulocytes and monocytes were isolated by Histopaque-1119 method from the blood samples of 15 diabetic and 15 healthy controls. After disruption of the cells, the peripheral (inner and outer) and integral proteins were isolated. In the fractions the total protein and glycation were determined and the results were as mmol Fructozamin/mg protein. The statistically significant high glycation ($P < 0.0001$) was found in integral membrane proteins of diabetic neutrophils, while no significant levels in peripheral proteins. It was concluded that there may be a relationship between the glycation of integral membrane and neutrophil dysfunction in diabetics.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen bir proje olup Doç.Dr.Ö.Irfan KÜFREVİOĞLU'nun yöneticiliğinde gerçekleşmiştir. Çalışmamın her safhasında ilgi ve desteklerini gördüğüm sayın hocam Doç.Dr.Ö.Irfan KÜFREVİOĞLU'na, sayın Prof.Dr.Ebubekir BAKAN'a, Araştırma Hastanesi başhekimisi sayın Mehmet GÜNDOĞDU'ya sayın Doç.Dr.Nuri BAKAN'a, sayın Yrd.Doç.Dr. Nazan DEMİR'e,bölümün bütün imkanlarını kullanmamı sağlayan Kimya bölüm başkanı sayın Prof.Dr.Metin BALCI'ya ayrıca doktora çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen sayın Prof.Dr. Şerif AKTAŞ'a, sayın Prof.Dr. Hasan ERDOĞAN'a, sayın Prof.Dr. Mansur HARMANDAR'a, sayın Doç.Dr. Samih BAYRAKÇEKEN'e, Biyokimya grubundaki ve Kimya Bölümündeki bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

4.4.1994

Arş.Gör.Yaşar DEMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
 1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER.....	 1
1.1.Membran Yapısı ve Fonksiyonları.....	1
1.1.1.Fosfogliseridler.....	1
1.1.2.Sfingolipidler.....	3
1.1.3.Kolesterol.....	4
1.2.Lipid Agregatların Özellikleri.....	4
1.2.1.Miseller ve Bilayerler.....	4
1.2.2.Lipozomlar.....	6
1.3.Membran Proteinleri.....	6
1.4.Membran Yapısının Akışkan Mozaik Modeli.....	7
1.5.Vücudun Enfeksiyonlara Karşı Direnci Lökositler ve Makrofaj Sistemi.....	8
1.5.1.Lökositler (Akyuvarlar).....	8
1.5.2.Lökositlerin Genel Karakteristikleri.....	9
1.5.3.Nötrofil, Monosit ve Makrofajların Özellikleri.....	10
1.5.4.Fagositoz.....	11
1.5.4.1.Kemotaksis.....	11
1.5.4.2.Opsonizasyon.....	12
1.5.4.3.Fagositoz (Yutma).....	13
1.5.4.4.Hücre İçi Öldürme ve Degranülasyon (sindirim).....	13
1.6.Diabetes Mellitus (Şeker Hastalığı).....	15
1.6.1.Diabetli Hastalarda Nötrofil Fagositozu ve Enfeksiyon.....	16
1.7.Proteinlerin Glikasyonu.....	19
1.8.Çalışmanın Amacı.....	21

2.MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	23
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
2.2.Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	23
2.3.Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	24
2.4.Yöntemler.....	27
2.4.1.Total Lökosit Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	27
2.4.1.1.Kan Numunelerinin Alınması.....	27
2.4.1.2.Dextran Sedimentasyonu Metodu ile Lökositlerin.....	27
2.4.1.3.Dış Perifer Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	28
2.4.1.4.İç Perifer Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	28
2.4.1.5.İntegral Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	29
2.4.2.Granülosit ve Monosit Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	29
2.4.2.1.Kan Numunelerinin Alınması.....	29
2.4.2.2.Histopaque-1119 Metodu ile Granülosit ve Monositlerin Ayrılması.....	29
2.4.2.3.Granulosit ve Monositlerin Membran Proteinlerinin Ayrılması.....	31
2.4.3.Coomassie-Brillant Blue Metodu ile Protein Tayini.....	31
2.4.4.Glikasyon Tayini.....	32
2.4.5.Membran Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	33
2.4.6.Kullanılan İstatistikî Metodlar.....	35
3.DENEY SONUÇLARI.....	38
3.1.Coomassie-Brillant Blue Yöntemi ile Yapılan Protein Tayini.....	38
3.2.Glikasyon Tayini İçin Kullanılan Standart Grafikler.....	38
3.3.Total Lökosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları.....	40
3.4.Granülosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları.....	46
3.5.Monosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları.....	52
3.6.Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Total Lökosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları.....	58

3.7.Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Granülosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları.....	62
3.8. Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Monosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları.....	68
3.9.Membran Proteinlerinin Sodyum Dodesil -Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	70
4. TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR	75



1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Membran Yapısı ve Fonksiyonları

Membranlar organize biyolojik proseslerin gerçekleşmesi için onları bölmelendiren yapılardır. Örneğin hücre canlılığın temel birimidir ve plazma membranı tarafından ferdiyet kazanır. Ökaryotlarda çekirdek, mitokondri, kloroplast, endoplazmik retikulum ve golgi cisimcikleri gibi bir çok hücre içi organel de membranlar tarafından sarılmıştır.

Membranlar maddelerin geçişini engelleyen bariyerlerdir. Hücre dışından hücre içine besin maddelerinin, suda çözünen ürünlerin, iyonların v.b. kontrollü bir şekilde girişini sağlarlar ve hücre içi ortamın kompozisyonunu düzenlerler. Membranlar bu işlemlerini, içlerine gömülü olan "pompalar" ve "kapılar" yardımıyla gerçekleştirirler. Membranların gerçekleştirdikleri bu transport fonksiyonları, spesifik bir maddeye karşı ya elektrokimyasal bir gradient veya geçişi sağlayacak başka bir gradiente karşı gerçekleştirilir¹.

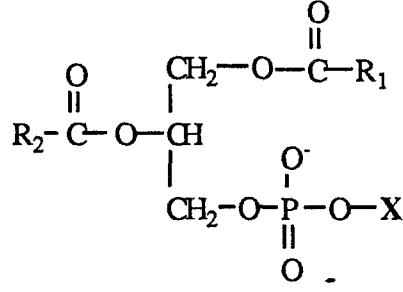
Birçok temel biyokimyasal proses membran içinde meydana gelir². Meselâ, mitokondri iç membranında organize olmuş enzim toplulukları tarafından fosforilasyon prosesi gerçekleştirilir. Aynı şekilde kloroplastların iç membranlarında da ışık enerjisi yardımıyla su ve karbondioksitten karbohidratları sentezleyen enzimler bulunur.

Canlı organizmanın dışarıdan aldığı bilgilerin (sinir uyarılarının) iletimi, hücreler arası iletişimin sağlanması ve hormonlar ile besin maddelerinin tanınması membranlara bağlı reseptörler vasıtasıyla olur.

Biyolojik membranlar : Lipidler, proteinler ve çok az miktarda da karbohidratlardan oluşan organize topluluklardır.

1.1.1. Fosfogliseridler

Fosfogliseridler biyolojik membranların ana lipid bileşenidir ve 1 ila 2 nolu karbonlarından yağ asitleri ile esterleşmiş gliserol-3-fosfat'tan ibarettir. Bir fosfogliseridin genel formülü şöyledir:



Fosforil grubu da yaygın olarak Tablo 1.1'de görülen gruplardan birini bağlar. Fosfogliseridler daima polar bir "baş" kısma (fosforil grubu) ve apolar bir "kuyruk" kısmına sahiptirler. Bundan dolayı da "amfibilik" moleküllerdir.

Biyolojik membranlarda yaygın olarak bulunan fosfogliseridlerde baş gruplar polar alkollerden oluşmuştur. 1 nolu karbondan 16 veya 18 karbonlu bir doymuş yağ asidi esterleşmişken, 2 nolu karbondan 16-20 karbonlu doymamış bir yağ asidi esterleşmiştir.

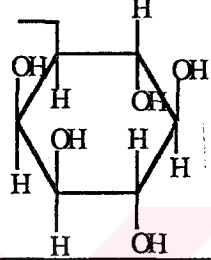
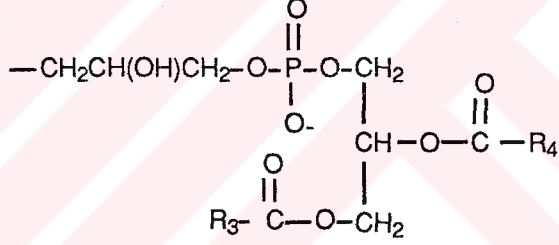
1.1.2. Sfingolipidler

Biyolojik membranların bileşenlerindendir. C₁₈ amino alkoller olan sfingozin, dihidrosfingozin ve bunların C₁₆, C₁₇, C₁₉ ve C₂₀ homologlarının türevleridirler. N-acil yağ asidi türevleri "seramidler" olarak bilinir. Hayvan ve bitki dokularında az bulunmalarına rağmen bir çok sfingolipidin ana yapı bileşenidirler³.

Sfingomiyelinler

Sfingolipidlerin en yaygın olarak bulunanıdır. Seramid yapısına fosfokolin veya fosfatidiletanolamin gruplarından biri bağlanmıştır. Yapılarında bulunan fosfat grubundan dolayı fosfolipid sınıfına da girerler. Birçok sinir hücresinin aksonlarında elektriksel yalıtım sağlayan membranlı miyelin kılıfı sfingomiyelinlerce zengindir³.

Tablo 1.1. Bazı yaygın fosfolipidlerin bileşenleri ve isimleri

X-OH' in adı	-X'in formülü	Fosfolipidin adı
Su	- H	Fosfatidik asit
Etanolamin	- CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Fosfatidiletanolamin
Kolin	- CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺	Fosfatidilkolin (lesitin)
Serin	- CH ₂ CH(NH ₃ ⁺)COO ⁻	Fosfatidilserin
miyo-Inositol		Fosfatidilinisitol
Gliserin	- CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Fosfatidilgliserol
Fosfatidilgliserin		Difosfatidilgliserol

Serebrosidler

Basit sfingoglikolipidlerdendir. Seramid yapısının primer hidroksil grubuna bağlı olarak bir şeker rezidüsü bulundurulur. Galaktoserebrosit beynin nöral hücre membranlarında çok bol olarak bulunur ve β -D-galaktoz baş grubuna sahiptir. Glukoserebrositlerde baş grup β -D-glukozdur, ve diğer dokuların membranlarında bulunurlar. Serebrositler fosfolipidler gibi fosfat grubu içermezler bu nedenle de çok bol bulunan noniyonik bileşiklerdir. Bazı galaktoserebrositler galaktoz rezidüsünün 3 nolu karbonundan sülfat grubu bağlarlar ve sülfatidler olarak bilinen iyonik bileşikler oluştururlar. Kompleks sfingolipidlerin bir çoğunda dört veya daha çok dallanmamış şeker rezidüsü ihtiva eden oligosakkarit bir baş grup bulunur.

Gangliosidler

Sfingolipidlerin çok kompleks bir şeklidir. Seramid oligosakkaritlerin şeker grupları arasında en az bir tane sialik asit rezidüsü bulunur. Hücre yüzey membranlarının esas bileşenidirler ve beyin lipidlerinin % 6'sını oluştururlar, diğer dokularda daha az miktarda bulunurlar⁴.

Gangliosidler oldukça büyük fizyolojik ve tıbbi önemleri vardır. Kompleks karbohidrat baş grupları hücre membran yüzeyinden dışarıya doğru uzanırlar ve çok sayıda önemli fizyolojik fonksiyonu düzenleyen, glikoprotein üreten hormonlara karşı reseptör olarak davranırlar⁵. Ayrıca kolera toksini gibi protein kökenli toksinlerin de reseptörüdürler⁶. Gangliosidler hücrelerin birbirini tanımalarında ve belirlemelerinde ve dokuların büyümesi ve farklılaşmasında da (kanser oluşmasında olduğu gibi) önemli rolleri vardır. Gangliosid bozulması düzensizliği tedavi edilemeyen ve öldürücü bir nörolojik bozulma olan Tay-Sachs hastalığı gibi genetik hastalıklardan da sorumludur⁷.

1.1.3. Kolesterol

Kolesterol hayvanlarda bol bulunan bir steroiddir. Steroidler genellikle ökaryotik orijinlidir ve siklopentonoperhidrofenantren'in türevleridirler. 3 nolu karbon atomunda -OH grubu ve 17 nolu karbon atomunda ise 8 veya 10 karbonlu dallanmış bir zincir olduğunda kolesterol oluşur.

Hayvan plazma membranlarının ana bileşenlerinden biridir ve subsellüler membranlarda da çok az miktarda bulunur. 3 nolu karbondaki -OH grubu kolesterole çok zayıf bir amfibilik karakter kazandırır. Fakat kolesterol halka sistemlerinden dolayı oldukça rijiddir. Membran özelliklerinin tayininde önemli bir bileşiktir^{8,9,10}. Steroid hormonların öncül maddesidir. Membrandaki lipid çift tabakasının genelde dış tabakasına yerleşmiştir.

1.2. Lipid Agregatların Özellikleri

Su üzerine yağ döküldüğü zaman lipid moleküllerinin hidrofilik baş grupları suya doğru, hidrofobik kuyruk kısımlarıda havaya doğru yönelerek bir monolayer oluştururlar. Polar baş grupların suya yönelmiş olması, su

yüzeyini pürüzlü bir hale dönüştürür ve su molekülleri arasında ki normal etkileşimler azalır, bu sebeple de suyun yüzey gerilimi düşer.

1.2.1. Miseller ve Bilayerler

Sabunlar ve deterjanlar gibi amfibilik moleküllerin sulu çözeltilerinde misel yapıları oluşur (globüler agregatlar). Bu moleküller düzenleme de hidrofobik kuyruklar miselin içine yönelir ve su ile teması kesilir. Polar baş grupların solvasyonu gerçekleşir. Misel oluşumu kooperatif bir olaydır. Amfibiller sudaki konsantrasyonları kritik misel konsantrasyonuna (CMC) erişmediği sürece seyretik sulu çözeltilerinde misel oluşturmazlar. Kritik misel konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda lipid agregatları misel yapılarına dönüşür. Kritik misel konsantrasyonunun değeri amfibilin türüne ve çözeltinin şartlarına bağlıdır¹¹.

Sabun anyonları gibi tek kuyruklu amfibiller genellikle küresel veya elipsoidal miseller oluştururlar. Çünkü polar baş grup kuyruk kısmından daha geniştir. Miselde ki molekül sayısı amfibile bağlıdır¹².

Gliserofosfolipidler ve sfingolipidler iki hidrokarbon kuyruğuna sahiptirler; bu sebeple de molekülün görünüşü dikdörtgen şeklindedir. Bu sterik zorlama nedeniyle bu moleküller disk şeklinde miseller oluştururlar ve genellikle bimoleküller yaprakları meydana getirirler¹².

Bir lipid molekülünün bilayerin bir tabakasından diğer tabakasına geçmesi olayı transvers difüzyon veya flip-flop hareketi olarak bilinir ve çok zor bir olaydır. Bu olayda lipidin polar baş grubunun bilayerin hidrokarbon çekirdeğinden geçmesi gerekir. Fosfolipidlerin flip-flop hareketlerinin yarılanma hızının en az bir kaç gün olduğu ölçülmüştür¹³.

Lipidlerin bilayer düzlemindeki hareketleri, lateral difüzyon olarak bilinir ve oldukça hızlıdır¹⁴.

Yapılan X-Ray difraksiyon çalışmaları bilayerin düzlemleri arasında $4,6\text{\AA}$ luk bir boşluğun olduğunu göstermiştir. Bu band sıvı parafin tabakaları arasındaki bandın aynısıdır. Bilayerdeki hidrokarbon zincirleri C-C bağları etrafındaki serbest rotasyondan dolayı sürekli hareket halindedir, membran

bileşimi sürekli değişir. Bu sebeple membranlar iki boyutlu akışkanlar olarak tanımlanırlar¹⁵.

Bir lipid bilayeri karakteristik geçiş sıcaklığının altına ısıtılırsa bir faz transferi gerçekleşir bu olaya order-disorder geçişi denir. Membran jelimsi bir katıya dönüşür, akışkanlığı azalır bilayer tabakaları arasındaki 4,6 Å'lık boşluk daralır 4,2 Å' e iner ve hidrofobik kuyruk parafin gibi kristallenir (bilayer enine genişler). Biyolojik membranlarda geçiş sıcaklığı aralığı 10-40 °C'tır. Lipidin yağ asidinin boyu uzayıp doygunluğu arttıkça geçiş sıcaklığı yükselir. Kolesterol yalnız başına bir bilayer yapısı oluşturamaz fakat rijid halka sistemi yağ asidi zincirlerinin hareketlerini engellediğinden membran akışkanlığını azaltır, order-disorder geçişinin sıcaklık aralığını genişletir, Yüksek konsantrasyonlarda ise tamamen yok eder. Yağ asidi zincirlerinin kristallenmesini engelleyerek bir membran plasticijeri gibi davranır.

Biyolojik membranların akışkanlıkları aynı zamanda da membran içine gömülü proteinlerinde bir fonksiyonudur. Memeli membranlarının tamamında geçiş sıcaklıkları vücut sıcaklıklarının altındadır. Bu sebeple de akışkanlıklarını daima korurlar. Bakteri ve soğukkanlı hayvanların membranları ise yaşama şartlarına adapte olduğundan akışkanlıklarını korurlar^{8,10}.

1.2.2. Lipozomlar

Fosfolipidlerin sudaki çözeltileri çok katlı yapılar oluştururlar ve bu yapılar lipid bilayerlerine düzenlenebilir. Eğer bu çok katlı veziküller ultrasonla muamele edilirse lipozomlara dönüşürler. Lipozomlar kapalı yapılardır, kendi kendilerine kapanabilirler, veziküllerin içi çözücü ile doludur ve yalnızca bir bilayer tarafından kuşatılmışlardır. Lipozomlar sentetik lipidlerle hazırlanabildikleri gibi biyolojik kaynaklardan ekstrakte edilen lipidlerle de hazırlanabilirler. Yaygın olarak biyolojik membran çalışmalarında model olarak kullanılırlar¹².

Hücre membranlarını çeviren biyolojik membranlar iki sulu kompartımanı birbirinden ayırır. Lipid membranlarının geçirgenliği ile ilgili deneyler lipozomlar yardımıyla yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda membranların su hariç diğer iyonik ve polar maddeler için geçirgen olmadığı bulunmuştur.

Membranın bir maddeye karşı geçirgenliği o maddenin nonpolar çözücülerdeki çözünürlüğü ile doğru orantılıdır¹².

1.3. Membran Proteinleri

Membran proteinleri membrana bağlanma tipleri ve görevlerine göre sınıflandırılırlar ve iki türe ayrılırlar¹⁵.

Integral (intrinsic) proteinler

Bu proteinler membranlara hidrofobik güçlerle sıkıca bağlıdır ve membranlardan membran parçalayıcı ajanlarla etkileştirilerek ayrılabilirler. Membran parçalayıcı ajanların içine organik çözücüler, deterjanlar ve kaotropik maddeler girer. Integral proteinler, deterjanlar, butanol ve gliserol gibi organik çözücülerin yokluğunda, sulu çözeltilerinde çökelek ve agregat oluşturmaya meyillidirler. Bazı integral proteinler lipidlere öyle güçlü bağlıdırlar ki ancak denatüre edici şartlar altında serbest olabilirler^{12,16}.

Periferal (extrinsic) proteinler

Bu proteinler kısmen ılımlı şartlar altında iyonik şiddeti yüksek tuz çözeltileri (1 M NaCl gibi), metal çelatlayıcı ajanlar veya pH değişimleri gibi şartlarda membranlardan ayrılırlar. Sulu çözeltilerinde kararlıdırlar, lipid bağlamazlar. Tutundukları membranın yüzeyine (çoğunlukla membranın integral proteinlerine) elektrostatik veya hidrojen bağı etkileşimleri ile tutunurlar¹².

Bütün biyolojik membranlar integral protein ihtiva ederler. membran içindeki yerleşimleri de yüzey işaretleme tekniği ile tayin edilebilir. Bu teknikle yapılan deneyler bazı integral membran proteinlerinin bilayerin yalnızca bir tarafında (ecto-veya endo-integral proteinler) bulunduğunu bazılarının ise membranı boydan boya geçtiğini (trans-membran proteinleri) göstermiştir. Bütün integral membran proteinleri bir uçları ile sulu ortamla temas halindedir. Tamamen membran içine gömülü protein yoktur. Bu sonuçlar membran proteinlerinin asimetric dağıldıklarını göstermektedir¹⁷.

Trans-membran proteinlerinde proteinin membran içinde kalan kısmı α -heliks yapısındadır. Integral membran proteinlerinin hidrofobik kısımları aktif bölgeyi membrana bağlarlar. Membran proteinlerinin asimetrik düzenlenmesi, flip-flop hızları ve asimetrikliği sağlayıcı "flippaz" enzimleri ile sağlanır¹⁸.

1.4.Membran Yapısının Akışkan Mozaik Modeli

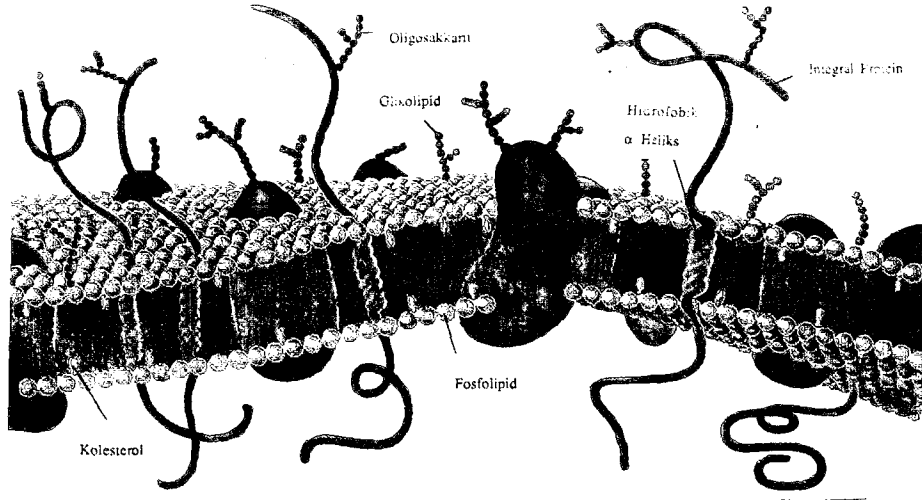
1972 yılına S.Jonathan Singer ve G.Nicolson membran yapısı hakkında akışkan mozaik modeli olarak bilinen teorilerini ortaya atmışlardır. Bu teoride integral proteinler lipid denizinde yüzen "aysberg"lere benzetilir. Bu proteinler lipid matriksi içerisinde yanlamasına difüze olabildikleri gibi bazanda diğer hücre komponentlerine tutunarak hareketsiz kalabilirler¹⁵.

Membran proteinlerinin dağılımları Freeze-Fracture ve Freeze-Etch teknikleri ve ferritin işaretli antibodilerin yer aldığı boyama teknikleri ile elektron mikroskobunda gözlenebilir^{19,20}.

Bir membrandaki lipidlerin dağılımı fosfolipidhidroliyzlar olarak bilinen fosfolipaz enzimleri yardımı ile tayin edilebilir. Yapılan çalışmalarda membran lipidlerinin de proteinlerde olduğu gibi asimetrik dağıldıkları görülmüştür¹⁷.

Karbohidratlarının ise plazma membranlarının dış yüzeylerinde lokalize oldukları görülmüştür¹⁷.

Şekil 1.1'de membran yapısı ve bileşenleri görülmektedir .



Şekil 1.1. Membranın akışkan mozaik modeli yapısı

1.5. Vücudun Enfeksiyonlara Karşı Direnci: Lökositler ve Makrofaj Sistemi

İnsan vücudu özellikle deri, ağız, solunum yolları, sindirim kanalı, gözün membranları ve idrar yolunda normal olarak bakteri, virus, mantar ve parazitlerle karşılaşır. Eğer bu ajanlar daha derin dokulara girerlerse ciddi hastalıklara sebep olurlar.

Vücudumuz çeşitli enfeksiyöz ve toksik ajanlara karşı savaşan özel bir sisteme sahiptir. Bu sistem lökositler, makrofaj sistemi ve lenfoid dokudan oluşur²¹.

Bu dokular hastalığı: istilacı ajanı fagositozla yok edersek, antikor oluşturarak veya hassas lenfositlerle yok ederek veyahut da her iki sistemi de birlikte kullanarak yok etmek gibi stratejileri uygulurlar²².

1.5.1. Lökositler (Akyuvarlar)

Lökositler vücut savunma sisteminin hareketli üyeleridir. Kemik iliğinde (granülositler, monositler ve lenfositler) ve lenf dokuda (lenfositler ve plazma hücreleri) üretildikten sonra vücuttaki kullanılacakları bölümlere kanla taşınırlar.

Akyuvarların önemleri enfeksiyon alanlarına spesifik olarak taşınabilmeleri ve herhangi bir enfeksiyon ajanına karşı yerinde, hızlı ve güçlü bir savunma sağlamalarından geçer.

Granülosit ve monositlerin yabancı ajanları "aramak ve tahrip etmek" gibi kabileyetleri de vardır.

1.5.2. Lökositlerin Genel Karakteristikleri

Kanda normal olarak altı tip lökosit bulunur. Bunlar : polimorf nüveli nötrofiller , polimorf nüveli eozinofiller, polimorf nüveli bazofiller, monositler, lenfositler ve plazma hücreleridir.

Nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller granüler yapıya sahip olduklarından "granülositler" olarak, klinik terminoloji de ise kısaca "poli" olarak isimlendirilirler. Granülositler ve monositler görevlerini fagositoz yolu ile lenfositler ve plazma hücreleri ise immün sistemle bağlantılı olarak yaparlar²³.

Yetişkin bir insanın kanının milimetre küpünde yaklaşık olarak 7000 lökosit bulunur. Çeşitli lökositlerin yüzde oranları aşağıdaki gibidir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Lökositler ve yüzde oranları.

Adı	% si
Polimorf nüveli nötrofiller	62.00
Polimorf nüveli eozinofiller	2.300
Polimorf nüveli bazofiller	0.400
Monositler	5.300
Lenfositler	30.00

Polimorf nüveli lökositler ve monositler normal olarak kemik iliğinde yapılırlar. Bunun yanında lenfositler ve plazma hücreleri ise lenf bezleri, dalak, timus, bademcikler, kemik iliğindeki lenfoid kalıntılar, barsaklar gibi lenfoid organlarda da üretilirler.

Kemik iliğinde yapılan akyuvarlar, dolaşıma geçmeden önce kemik iliğinde 1-1,5 gün kalırlar²⁴. Ayrıca kemik iliğinde vücudun altı günlük ihtiyacına yetecek miktarda lökosit sürekli olarak depolanır. Dolaşım sistemindeki

lökositlerin yarısı dolaşırken diğer yarısı kapiler cidarına yapışmış (marginasyon) olarak bulunur²⁵. Dolaşıma giren lökositler artık çoğalamazlar²⁶. Kemik iliğinden dolaşım kanına geçen lökositlerin ortalama ömürleri 14(26) veya 18 (27) gündür.

1.5.3. Nötrofil, Monosit ve Makrofajların Özellikleri

Vücuda giren yabancı ajanlara saldırarak onları fagositoz yolu ile tahrip eden lökositler: nötrofiller ve monositlerdir. Nötrofiller dolaşım kanı ile enfeksiyon bölgelerine ulaşarak görev yaparken, monositler dokulara geçerek sabit ve mobil makrofaj sistemlerini oluştururlar.

Nötrofiller ve monositler sitoplazmalarının da değişik tip ve özellikte granüller taşırlar. Bu hücreler gerçekte metabolik özellik bakımından diğer hücrelere benzerler ancak nükleoproteinlerce zengindirler²⁸. Polimorf nüveli lökositlerde glikolitik yol enzimleri, heksoz monofosfat yolu enzimleri, solunum enzimleri ve glikojen metabolizması ile ilgili enzimler yaygın olarak bulunur.

Granülositler ve monosit hücrelerinin ilk evrelerinde mitokondri boldur ve oksidatif metabolizma hakimdir²⁹. Hücreler olgunlaştıkça mitokondri sayısı azalır ve anaerobik metabolizma hakim olur²⁷. Hücrelerin böylece oksijen almadan enerji sağlayacak durumda olmaları enfekte dokuda ve iltihabi eksudaların hipoksik şartların da bile rahatca fonksiyon görmelerine, bakterilerin dokuda çoğalmasını kontrol altına almalarına ve nekrotik doku artıklarını temizleyebilmelerine imkan sağlar³⁰. Yabancı partikül hücreye alındığı zaman anaerobik glikoliz aniden artar ve daha fazla miktarda laktik asit açığa çıkar. Bu asidik ortamda da degranülasyon oluşur³¹, Nötrofiller ve monositlerin ana görevi fagositoz yapmaktır. Bu fonksiyonu ancak olgunlaşmış hücreler yerine getirebilir, Polimorf nüveli lökositler hareket kabiliyeti en fazla olan hücrelerdir³⁰. Dakika da 60 mikron yol alabilirler. Yabancı partiküle 100 mikron kala doğrudan o noktaya yönelebilirler.

1.5.4. Fagositoz

Bir hücrenin diğer bir hücreyi veya partikülü sitoplazması içerisine almasına "fagositoz" bunu yapan hücreye de "fagosit" denir³². Tek hücrelilerin beslenmek için kullandıkları bu olay, çok hücrelilerin de

başlıca savunma mekanizmalarıdır³³. Partikül şeklinde olmayan maddelerin hücre içine alınmasına ise "pinositoz" denir³⁴. Çeşitli savunma mekanizmalarından biri olan fagositoz, bakteriyal enfeksiyonların erken dönemlerinde bakterinin yayılmasını sınırlandırıp enfeksiyonun yayılmasını önlemek açısından önemlidir.

Birçok hücre fagositoz yapma özelliğine sahiptir. Bazı hücreler hareketli olup enfeksiyon bölgesine göç edebilirler (nötrofiller) bazıları ise hareketsizdir ve kan veya lenf dolaşımında ki bakterileri yakalamak için yerleşmişlerdir (monositler)³⁵. Fagositozun birbirini takipeden dört kademede vuku bulduğu kabul edilmektedir^{35,36}. Bunlar : Kemotaksis, opsonizasyon,yutma ve hücre içi öldürme (sindirim) kademeleridir.

1.5.4.1. Kemotaksis

Fagositoz olayının başlayabilmesi için lökositlerin mikroorganizmaya yaklaşmaları gerekir. Fagositik hücrelerin, kemotaktik aktiviteye sahip olan maddelerin bulunduğu odağa doğru olan göçüne kemotaksis denir^{36,37}. Kemotaksis sırasında hücrelerin hızı artmaz fakat hücreler enfeksiyon odağına doğru yönelmiş olurlar^{36,37}. Doku harabiyeti veya enfeksiyonun olduğu bölge de nötrofillerin endotel hücrelerine yapışması (marginasyon), kan damarlarının porlarından geçmeleri (diyapedez) ve hasarlı dokuya göç etmeleri sadece bir kaç dakika alır²⁷. Nötrofiller çevredeki dokuya geçmek için yol buluncaya kadar endotele paralel hareket edebilirler²⁷. Normalde lökositler devamlı olarak dokuya geçtiklerinden kemotaksis oluşturan bir maddenin sürekli olarak olması gerekir. Ancak bu maddenin ne olduğu ve nereden kaynaklandığı bilinmemektedir³⁰. Kendi başlarına kemotaktik aktivite göstermeyen fakat serum, plazma veya kompleman komponentleri ile birleştikten sonra bu aktiviteyi kazanan maddeye "sitotaksigen" direkt olarak kemotaktik aktiviteye sahip olan maddelere ise "sitotaksin" denilmektedir^{27,37}. Çoğu patojen bakterilerin kültür filtratları kemotaktik aktiviteye sahiptir^{27,39}. Bakteriler serum kompleman sistemini etkilemek suretiyle de kemotaktik maddeleri meydana getirebilirler⁴⁰. Pıhtılaşma mekanizması ile oluşan fibrinopeptidler ve fibrinin yıkım ürünleri olan kallikrein ve plazminojen aktivatörleride kemotaktiktirler³⁸.

Kemotaktik faktörlerin nötrofil yüzeyindeki reseptörlere bağlanmak suretiyle bir esteraz sistemini aktive ettiği ve bunun vasıtasıyla sitoskeletal sistemi harekete geçirdiği gösterilmiştir^{27,37,41}. Bu reseptörlerin sayısının insan lökositlerinde 2.10^3 kadar olduğu tahmin edilmektedir²⁷. Kemotaktik faktörlerin çoğunun nötrofil dışından kaynaklanmasına rağmen nötrofiller, diğer nötrofillerin kemotaktik cevabını olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilen maddeleride ihtiva ederler⁴².

Kemotaksis bir çok farmakolojik ajan tarafından da etkilenir. Sitoskeletal yapıyı bozan kolşisin, vinka alkaloidleri ve sitokalasın B gibi maddeler nötrofil hareketini inhibe ederken, siklik guanozin monofosfat seviyesini (cGMP) arttırmak suretiyle sitoskeletal yapıyı kuvvetlendiren forbol miristat ve karbamil kolin gibi maddeler olumlu yönde etki yaparlar⁴³. Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi iki değerlikli kasyonlar adezyonu arttırmak suretiyle kemotaksisi olumlu yönde etkilerler²⁷.

1.5.4.2. Opsonizasyon

Serum proteinlerinden bazılarının bakteriyi etkileyerek onu fagositoza yatkın hale getirmelerine "opsonizasyon" bu olayı gerçekleştiren maddelere de "opsonin" denir⁴⁴. Fagosit edilecek partiküllerin hücre membranına adsorbe edilebilecek özellikte bir yüzeye sahip olmaları gerekir. Halbuki bakteri ve hücre membranları negatif yük taşır⁴⁵. Bu durum hücre ile partikülün birbirlerini itmelerine yol açar. Birçok mikroorganizma yüzey antijenlerinin özellikleri ile fagositlerden kaçabilirler. Böyle antifagositik yüzey özelliklerine sahip mikroorganizmalara streptokokus pnömoni, klebsielle pnömoni hemafiluz influenza, neisseria menenjitisi, psödamonasaurizginoza ve neisseria gonore sayılabilir^{36,40}.

Opsoninlerin bakteriyi sararak, antifagositik yüzey özelliklerini değiştirdikleri veya bakteri ile fagosit arasında köprü gibi görev yaptıkları rapor edilmiştir^{35,36,44}. Fagosit ile fagosit edilecek partikül arasında sıkı bir yüzeysel temas olmazsa fagositoz başlayamaz^{27,46}. Fagosit ile bakterilerin yapışması "tanıma basamağını" oluşturur. Hücresel tanıma plazma membranı proteinlerinin rolü vardır. Bu yüzey proteinlerine de antikor ve kompleman tanıma işinde aracılık eder^{30,42}. Yapışma olayında divalen bir

köprüye ihtiyaç vardır. Bu olayda Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının çalıştıkları ve bunların etkilerinin EDTA tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir³⁰.

Antikorların opsonizasyondaki görevleri önemlidir. İmmünglobilin A sınıfından olan antikorlar opsonin olarak çalışırken immünglobilin G ve M sınıfından olan antikorlar opsonin olarak davranmazlar. Antikorlar Fab kısımları ile bakterilere Fc kısımları ile de fagosit reseptörlerine bağlanarak bakteri ile fagosit arasında köprü oluştururlar^{27,30,36,41,46}.

1.5.4.3. Fagositoz (Yutma)

Yutma olayı partikülün veya mikroorganizmanın fagositin yüzeyine yapışmasıyla başlar³⁵. Temas noktasında hücre zarı çukurlaşır, Partikül çevresinde her yönde olmak suretiyle psödopodlar (yalancı ayaklar) uzatılarak partikül sarılır. Psödopodlar birbirlerine değdikleri anda kaynaşırlar ve bir vaküol oluşur^{35,41}. Bu vaküole fagositik vaküol veya fagozom da denir⁴¹. Fagozom periferde teşekkül eder ve mikrotübüller vasıtasıyla merkeze doğru çekilir⁴¹. Fagozom oluşurken sitoplazmik granüller hızla fagozoma doğru giderler³⁷. Bu hareketin sebebi bilinmemektedir fakat mikrotübüller ve mikroflamentlerin bu olayda rolleri olduğu sanılmaktadır³⁷.

Mikroorganizma veya partikülün yutulması için gerekli olan enerji yüksek hızla cereyan eden anaerobik glikolizden sağlanır^{29,36}. Tetrasiklin, fenilbutazon, thioridazin, klorokin, kolşisin, sitokalsin B, vinblastin kortikosteoidlerinin fagositozu inhibe ettikleri bilinmektedir³⁷.

1.5.4.4. Hücre İçi Öldürme ve Degranülasyon (Sindirim)

Granüllerle fagozom temas ettiklerinde temas eden noktalarda membranları erir ve kaynaşırlar. Meydana gelen oluşuma "fagolizozom" denir^{27,36,41}. Daha sonra granüler muhteva fagolizozomun içine boşalır. Bu olaya degranülasyon denir^{27,30,36,41}. Önce sekonder daha sonra da primer granüllerin parçalanması vuku bulur³⁹.

Birçok farmakolojik ajan lökositlerden lizozomal enzim salıverilişini inhibe eder. Prostaglandin E_1 , teofilin, dibütril siklik adenozin monofosfat, 2-kloroadenozin, izoproterenol ve adrenalin gibi bileşiklerin hücre içinde

cAMP seviyesini arttırarak etki ettikleri sanılmaktadır^{47,48}. Enzim salıverişini cAMP'nin inhibe etmesi ve prostaglandin E₁ ile teofilinin beraber verilmesinin aditif etki göstermesi bu görüşü desteklemektedir⁴⁹. Bazı araştırmacılar ise lökositlerde tanecik ile teması izleyen ilk bir iki dakikalık süre içerisinde cGMP seviyesinin arttığını ve bu artışın β -glukuronidaz salıverilişi ile paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir⁴⁸. Kolinerjik bir amin olan asetilkolin lökositte cGMP seviyesini ve lizozomal enzim salıverişini arttırır ve asetilkolinin bu etkileri atropin ile bloke edilir. Bu bulgular hücre içi cGMP nin lizozomal enzim salıverişinde ilk işareti veren bileşik olduğu ve bu olayda hücrede ki cGMP/cAMP oranının mediatör olabileceği görüşünü desteklemektedir⁴⁸.

Uyarılan nötrofillerde hücre içine giren kalsiyum miktarının arttığı, bunu takiben hücre içi cGMP seviyesinin ve β -glukuronidaz salıverilmesinin arttığı tesbit edilmiştir⁴⁸. Kortikosteroidler ve klorokininin fagolizozom teşekkülüne engel olarak^{37,39}, kolşisin ve vinblastinin sitoskeletal yapıları bozarak^{37,48} degranülasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir.

Fagositin partikülle temasından bir kaç saniye sonra solunumsal patlama başlar. Bu da böyle bir metabolik hızlanmanın partikülün yutulmasından önce ve hücre ile ilk temas esnasında başladığını göstermektedir⁵⁰. Uyarılmış lökositlerde ki solunumsal patlama oksijen tüketiminde süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (1O_2) üretiminde artışa yol açar^{27,39,50}. Bu reaktif ürünlerin bakterisidal etkiye sahip oldukları ve araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezini başlattıkları kesinlikle bilinmektedir⁵¹.

Fagolizozom içerisindeki yüksek asidite (pH:3.5-4.0) bakterisidal etkiyi arttırır^{39,51}. Asidite glikolizle oluşan laktik asitten veya karbonik anhidraz varlığında teşekkül eden karbonik asitten ileri gelir^{27,29}. Bazı mikroorganizmalar pH'ya duyarlıdırlar. Aynı asidik ortam optimum pH'ları asidik olan enzimler içinde aktivatör görevi görür³⁹.

1.6. Diabetes Mellitus (Şeker Hastalığı)

Diabetes Mellitus insulinin kısmi veya mutlak eksikliğinden ileri gelen kronik bir metabolizma hastalığıdır. Akut metabolizma bozukluğunda insulinin tamamen olmaması hali hayati tehlike arzeder. Diabetes mellitus diyetle (karbohidratsız besinlerle) ve gerekli hallerde ilaçla (insulin oral antidiabetika) tedaviyi gerektirir.

Şeker hastalığına eğilim ırsidir. Bununla birlikte basit resesif katılım olayı hiç bulunmazken, birbirine bağımlı düzensiz dominant katılım olayının çok sayıda belirgin faktörlerinden birisi mevcuttur. Bilinen sebeplere bağlı diabetli hasta sayısının dünyada yaklaşık %3, taşıma eğilimlerinin ise %10-25 arasında olduğu sanılmaktadır⁵².

Diabetes mellitus genellikle ikiye ayrılır :

1. Juvenil diabet (tip-I) : Genellikle erken yaşta ve birdenbire başlar ve
 - a. β -hücrelerine karşı antikor gelişimi ve böylece hücrelerin otoimmün mekanizma ile harap olunmasına
 - b. β -hücrelerin virus hastalığı ile tahribine
 - c. Bu hücrelerin basit dejenerasyonuna karşı kalıtsal yatkınlık vardır.
2. Erişkin diabeti (tip-II) : Genellikle hayatın daha geç dönemlerinde ve şişman kişilerde görülür. Hastalığa yatkın kişilerde hızlı yaşlanmaya bağlı olarak β -hücrelerinin süpresyonu veya dejenerasyonu söz konusudur. Bu tip diabetle şişmanlık iki sebeple bir eğilim nedenidir :
 - a. Sebebi bilinmemekle beraber şişmanlıkta langerhans adacıklarının β - hücrelerinin kan glukozunun yükselmesine karşı cevapları azalır. Bu nedenle bir yemekten sonra insulin sekresyonundaki artış daha az belirgindir.
 - b. Şişmanlık bütün vücutta insulin hedef hücrelerindeki reseptörlerin sayısının azalmasına yol açar. Bu nedenle şişman kimselerde aynı metabolik etkilerin ortaya çıkması için şişman olmayanlara göre daha

fazla miktarda insulin gereklidir. Bu sebeple bu tip diabet şişmanlığın kontrol altına alınmasıyla tedavi edilebilir.

Her iki tip diabetinde gelişmesinde katılım önemli bir rol oynar. Diabetes mellitus çoğunlukla, insulin yetersizliğinin aşağıda belirtilen üç belirtisinden biri veya birkaçının varlığı ile tanımlanır:

1. Glukozun vücut hücreleri tarafından kullanılamaması sonucu kan glukoz seviyesinin 80-90 mg/100 ml'den 300-1200 mg/100 ml ye yükselmesi
2. Yağ dokularından yağ mobilizasyonunun belirgin bir şekilde artması ve buna bağlı olarak damar çeperlerinde lipid depolanması ile arteroskleroz oluşumu.
3. Vücut dokularında protein azalması.

Aşağıdaki tabloda diabetes mellitusta görülen metabolizma bozuklukları özetlenmiştir (Tablo 1.3).

1.6.1. Diabetli Hastalarda Nötrofil Fagositozu ve Enfeksiyon

Diabetli hastalar, enfeksiyonlara yatkındırlar ve bu hastalarda savunma mekanizmaları oldukça zayıflamıştır^{53,54}. Bu zayıflıktan hümmoral mı yoksa sellüler mi bir defektin sorumlu olduğu bilinmemektedir^{53,54}. Lökositler bakteriyel enfeksiyonlara karşı vücudun ilk savunma hattını oluştururlar ve çok önemli bir rol oynarlar^{42,44}. Mikroorganizmanın giriş yerinde birikerek etkili bir fagositik aktivite gösterirler ve enfeksiyonun ilerlemesini önlerler. Etkisiz bir fagositik aktivite kontrol edilemeyen bir bakteriyel çoğalmaya ve ağır enfeksiyonların oluşmasına yol açar⁵⁵. Bu yüzden lökosit sayısında muhtemel bir azalma ile nötrofil fonksiyonlarında oluşabilecek bozukluklar enfeksiyonlara zemin hazırlarlar⁴². Diabetli hasta lökositlerinin yetersiz kemotaktik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir^{56,57}. Bu defekt plazma insulini, glukoz, karbondioksit ve kan hücre seviyeleri ile ilgili olmamasına rağmen in vitro insulin ilavesi kemataksisi düzeltmiştir^{36,43,58}. Ayrıca tip-I diabetli hastaların serumları kemotaktik maddeler yönünden yetersiz bulunmuştur^{57,58}. Kemotaktik aktivitenin diabetes mellituslu hasta lökositlerinde bozulması yine bir anormal membran protein glikasyonu sebebiyle olabilir.

giderilmesinden sonra aktivitenin düzeldiğini belirtmişlerdir. Diabetli hastalarda nötrofil fagositoz bozukluğunu hiperglisemiye bağlayan araştırmacılar da vardır^{64,65}. Yüksek kan glukoz konsantrasyonunun lökositlerin fagositoz aktivitelerini inhibe ettiğini bazı araştırmacılar rapor etmişlerdir^{66,67}.

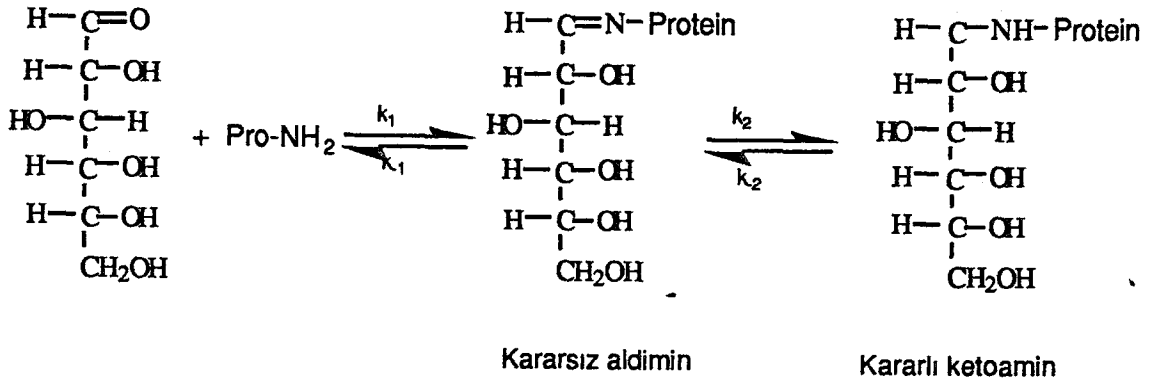
Diabette deri, idrar yolları ve solunum sistemi enfeksiyonlarına sıklıkla rastlanır^{53,68}. Ayrıca bu vakalar da mantar enfeksiyonları da sık olarak görülür⁶⁹. Diabetliler de nefrit sık olarak görülür ve pyelonefrite yol açar^{70,71}. Uyluk ve kollarındaki cilt altı apseleri, olguların % 5'in de görülür ve özellikle alt ekstremitelerdeki enfeksiyonlar büyük ölçüde periferik damar yetersizliğinden dolayı ortaya çıkar^{53,71}. Cilt lezyonuna sebep olan pyojenik bakterilerin en önemlileri stafilokok ve beta hemolitik streptokoklardır^{53,72}. Aktif akciğer tüberkülozu da diabetlilerde sık görülür ve ağır seyreder^{53,72}.

Diabetlilerde enfeksiyonlar tipik bir başlangıç ve gidiş gösterirler. Ağrı, ateş ve lökositoz gibi reaksiyonlar çoğu kez hafiftir ve bazan hiç bulunmayabilir. Başlangıçta önemsenmeyen hafif enfeksiyonlar kısa zamanda ilerleyerek sepsise yol açabilir⁶⁷.

Diabetliler de insulin ihtiyacı enfeksiyonlarda daha da artar ve insuline direnç meydana gelir⁷⁰. Enfeksiyona bağlı olarak genellikle glikozüri ve bazan da asetonüri görülür. Bu yüzden insulin kullananlarda zamanla dozu arttırmak veya kan şekeri insulinsiz olarak ayarlanmış hastalar da insulin kullanmak gerekebilir. Enfeksiyon sırasında insuline ihtiyacın artmasına bir takım sebepler gösterilebilir⁶⁸ : antiinsuliner hormonların etkisi (glikokortikoidler, glukagon, ketolaminler gibi), hücre yüzeyindeki reseptörlerin azalması (yine bu duruma sebep olarak anormal protein glikasyonu gösterilebilir). Diabetli hastalarda ölümlerin % 6'sı enfeksiyonlar sebebiyle olmaktadır⁷⁰.

1.7. Proteinlerin Glikasyonu

Proteinlerin glikasyonu heksozların proteinlerin amino gruplarına non-enzimatik olarak bağlanması olayıdır. Reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



Fizyolojik şartlarda bu reaksiyonu katalizleyen enzim yoktur. Bu sebeple bu reaksiyonun olabilmesi için, şeker ve proteinin uzun süre birbirleri ile temas halinde olmaları gerekir.

İnsanın periferik dolaşımında sürekli olarak 80-90 mg/100 ml oranında glukoz bulunduğu için proteinlerin glikasyona uğramaları normaldir, fakat diabetli hastalarda kan şeker seviyesi sürekli daha yüksek olduğu için bu hastalar da proteinlerin glikasyona uğrama ihtimalleri normal kişilere göre daha fazladır. Yarılanma ömrü uzun olan doku proteinlerin de normalden fazla glikasyon görülmektedir.

Glikasyon ilk defa 1955 yılında Kunkel ve Wallenis tarafından hemoglobin de gözlenmiştir⁷³. Bu araştırmacılar elektroforetik mobilitesi yüksek olan küçük bir hemoglobin fraksiyonunu tesbit ettiler. Daha sonra bu konuda yoğunlaşan çalışmalar bu hızlı hemoglobin fraksiyonunu izah edemedi^{74,75}. Ancak 1968 yılında Rahbar diabetli hastaların hemoglobin elektroforezlerinde daha belirgin olan bu hızlı fraksiyonun glike hemoglobin olduğunu belirledi⁷⁶. Daha sonra yapılan çalışmalar diabetlilerde ki glike hemoglobin miktarının kontrol grubuna göre iki kat daha fazla olduğunu gösterdi⁷⁷.

Hemoglobinden başka proteinlerin de glikasyona uğradığı daha sonra gösterildi^{78,79}. Ancak bunun için uzun süreli bir hipergliseminin olması şartı. Bu glikasyon glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olup özellikle yapısal proteinlerde daha fazla görülmektedir. Bu tip proteinler arasında : Bazal membranlar⁸⁰, kollagen^{81,82}, hücre membranları^{83,84}, albumin^{85,86,87} ve kan dolaşımında ki diğer proteinler^{88,89} sayılabilir.

Plazma proteinleri hemoglobinden daha kısa yarılanma ömürlerine sahip oldukları için hipergliseminin geçmişi hakkında daha az bilgi verirler⁹⁰. Bu sebeple vücuttaki uzun ömürlü proteinler diabetik hipergliseminin geçmişteki bir indexi olarak kabul edilmiştir⁹⁰.

Proteinlerin non-enzimatik glikasyonunun keşfinden beri diabetin komplikasyonlarında bu anormal glikasyonun muhtemel rolü ile ilgili geniş araştırmalar yapılmıştır^{79,91,92}. Hemoglobinin glikasyonu bu molekülün oksijene olan afinitesinde azalma meydana getirebilir, fakat bu azalma biyolojik anlamda önemsiz kalmaktadır. Diğer taraftan yenilenme hızları yavaş olan lens ve kollagen gibi proteinler diabetin komplikasyonlarında hazırlayıcı rol oynayabilirler⁹⁰.

Ayrıca diabetli hastalar da gözlenen membran değişikliklerinde esas sebep non-enzimatik protein glikasyonu olabilir⁹³.

Uzun ömürlü proteinlerin glikasyonu meyvelerde esmerleşme diye bilinen Maillard reaksiyonu ile aynıdır⁹⁴. Lens kristallerinin in vitro glikasyonu diabetin veya galaktozaminin meydana getirdiği "şeker" kataraktına benzer bir opasifikasyona yol açmaktadır⁹¹. Bu opasifitenin sebebi nisbeten yüksek molekül ağırlıklı protein agregatlarıdır. Agregasyonun sebebi ise normalde birbirlerine ulaşmaları mümkün olmayan sülfhidril grupların, lizin amino asitlerinin glikasyonu sebebi ile birbirlerine yaklaşıp çapraz bağlar oluşturmalarıdır⁹⁰.

Lizin amino asitleri bakımından zengin olan kollagenin glikasyonu da geniş olarak araştırılmıştır⁹⁵. Bu glikasyon diabetli hastalarda normal kişilere göre daha erken yaşlarda maksimum bir değere ulaşmaktadır. Bu da glikasyonun yaşlanma ile ilgisini ve diabetli hastalarda erken yaşlanma teorisini desteklemektedir. Diabetli hastalarda bazal membranın kalınlaşması yine anormal glikasyonla açıklanmaktadır. Aynı düşünce ile renal glomeruler bazal membranların glikasyonu gösterilmiş ise de membran kalınlaşması ile ilgi kurulamamıştır⁹⁰.

Diabetli hastalarda düşük dansiteli lipoproteinlerde glikasyon lizin amino asitlerin de olmakta ve bu durum lipoproteinlerin katabolizmasını güçleştirmektedir^{96,97}. Ayrıca bu hastalar da hiperglisemiye bağlı olarak

fibrinin glikasyonunun bu molekülün plazmin tarafından parçalanmasını azalttığı tesbit edilmiştir⁹⁸.

Vücutta yarılanma ömrü uzun olan keratinin diabetlilerde hiperglisemiye bağlı olarak aşırı glukoz bağlayacağı düşünülerek bu hastalarda saç ve tırnak proteinlerin de kontrol grubuna kıyasla iki katı kadar yüksek glikasyon tesbit edilmiştir^{99,100}.

Bu hastaların hemoglobinde olduğu gibi eritrosit membran proteinlerinin de anormal glikasyona maruz kaldıkları ve hücreyi anormal fonksiyon görmeye yönelttikleri bildirilmiştir¹⁰¹.

1.8. Çalışmanın Amacı

Bir endokrin ve metabolizma hastalığı olan diabetes mellitus mutlak veya fonksiyonel insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Bu hastalığın çeşitli komplikasyonları arasında enfeksiyon da yer alır ve insülin ihtiyacını artırır. Bu durum da diabetin kontrolünü güçleştirir.

Diabetli hastalarda görülen enfeksiyona yatkınlık ile lökosit fagositozu arasında bir ilişki kurulabilir. Glikasyon oranı arttıkça fagositik indexte düşme görülmektedir¹⁰².

Periferik ve integral proteinlerin glikasyonu sonucu hücrenin kemotaktik cevabı gecikebilir veya tamamen yok olabilir yani hücre yabancı partikülü tanımayabilir. Hücre içine glukoz (enerji) girmesini sağlayan insülin reseptör proteine tutunamayabilir.

Aynı şekilde integral membran proteinlerinin glikasyonu sonucu hücrenin dış ortamla olan madde alışverişi bozulabilir. Fagositoz olayındaki yutma basamağı zorlaşır veya tamamen imkansızlaşır.

Yutma olayı gerçekleşse de dışarıdan hücre içine glukoz transferi olmadığı için hücre içi öldürme olayı için gerekli enerji ya sağlanamaz veya gecikmeli olarak sağlanabilir.

Bu olaylar da lökositin yabancı partikülü yok etmesi ya yavaşlar veya da tamamen durur. Her iki halde de enfeksiyona yatkınlık devam eder.

Biz çalışmamızda önce total lökositlerin dış perifer, iç perifer ve integral membran protein miktarlarını, glikasyon miktarı ve mg protein başına mMFruktozamin miktarlarını araştırarak hangi protein grubunun daha fazla glikasyona maruz kaldığını bulmayı amaçladık.

Daha sonra lökositleri "granülositler" ve "monositler" olarak iki gruba ayırıp her iki grup içinde dış ve iç perifer ve integral membran proteinlerin de protein ve glikasyon miktarları ve mg protein başına mMFruktozamin miktarlarını araştırmayı düşündük.



2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup karşılarında yazılı olan firmalardan temin edilmişlerdir.

<u>Maddenin Adı</u>	<u>Markası</u>
Dextran	Eczacıbaşı
Histopaque-1077	Sigma
Histopaque-1119	Sigma
Triton-X 100	Sigma
Standart serum albumin	Sigma
N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED)	Sigma
NaCl	Merck
NaHPO ₄	Merck
Üre	Merck
CCl ₄	Merck
Gliserin	Merck
β -merkapt etanol	Merck
Etil alkol	Merck
Fosforik asit	Merck
N.N'- metilen bisakrilamid	Merck
Coomassie-brillant blue R-250	Merck
Coomassie-brillant blue G-250	Merck
Glikasyon tayin kiti	Biolab inc
Heparin	Roche

2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıda belirtilen alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Masa santrifüj : IEC Clinical Centrifuge USA.

Soğutmalı santrifüj : Heraeus Sepatech

Spektrofotometre : LKB-Biochrom, ULTROSPEC-11 Model, 4050

pH Metre	: Perkin-Elmer, Coleman 28 C Metrion
Elektroforez tankı	: Hoefer, HSI
Karıştırıcı	: Vortex-Genie, Model K-55
Hassas Terazî	: Mettler HSI Gallenkamp
Otomatik pipetler	: Fischer, Oxford
Çalkalayıcı	: GFL
Mağnetik karıştırıcı	: İKA Combimag RCO

2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

I) Üre tamponu : 1 mol KCl, 3 mol üre ve 10 mM Na_2HPO_4 saf suda çözüldü pH:6.8'e ayarlandı ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

II) %0.9'luk NaCl çözeltisi : 9 g NaCl alınıp bir miktar saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

III) % 1.8.'lik NaCl çözeltisi : 18 g NaCl alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

V) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan Coomassie-Birillant Blue G-250 renk reaktifinin hazırlanışı: 100 mg Coomassie-Brillant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 ml %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

VI) Ayırma jelinin hazırlanışı: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH:8,8), 13.2 ml %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid, 0.61 ml %0,1'lik SDS, 0.4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 9.2 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0.8 ml %1,5'luk $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (amonyum per sülfat :PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

VII) Yığıma jelinin hazırlanması: 1M'lik Tris-HCl (pH:6.8) den 1.24 ml, %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamidden 1 ml, %0.1'lik SDS'den 0.1 ml, %5'lik TEMED den 0.1 ml ve sudan 7.36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1.5'luk PER'den 0.2 ml ilave edildi.

VIII) Jel renklendirme çözeltisi: 0.66 g Coomassie-Brillant blue R-250 alındı ve 120 ml metanolde çözüldü daha sonra üzerine 24 ml saf asetik asit ve 120 ml su ilave edildi.

IX) Jel renksizleştirme çözeltisi: %7.5 asetik asit, %5 metanol ve %87.5 ile hazırlandı.

X) SDS-Elektroforezin de kullanılan numune tamponu : 0.65 ml 1 M Tris-HCl (pH:6.8), 3 ml %0.1'lik SDS, 1 ml %100'lük gliserin ve 1 ml %0.1'lik brom timol mavisi karıştırıldı ve toplam hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan hemen önce 1 µl'ne 50 ml olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

XI) SDS- Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ve 7.2 g gliserin 50 ml suda çözüldü. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 5 ml %0.1'lik SDS ilave edildi ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

XII) Jel boyamada kullanılan gümüş çözeltisinin hazırlanışı: 3 ml NH_3 +42 ml 0.1 N NaOH karışımı üzerine 8 ml %20'lik AgNO_3 çözeltisi yavaş yavaş damlatıldı bu esnada alttaki faz kuvvetle karıştırıldı. Çökelek oluşması halinde az miktarda NH_3 ilave edildi ve son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı.

XIII) Gümüş boyamasında kullanılan renk açma çözeltisi: 10 mg sitrik asit 200 ml saf suda çözüldü ve bu çözeltiye kullanılmadan hemen önce 100 µl %37'lik formaldehit katıldı.

XIV) Gümüş boyamasında kullanılan renk durdurma çözeltisi: 100 mg sitrik asit 200 ml saf suda çözüldü ve çözeltiye kullanılmadan hemen önce 100 µl metil amin katıldı.

XV) Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS)'nin hazırlanışı: 150 mmol NaCl ve 150 mmol sodyum fosfat saf suda çözüldü pH:7.2'ye ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

2.4. Yöntemler

2.4.1. Total Lökosit Membran Proteinlerinin Ayrılması

2.4.1.1. Kan Numunelerinin Alınması

Kan numuneleri 14-69 yaş sınırındaki 20 sağlıklı ve 21 diabetli kişiden 12 saatlik bir açlık periyodundan sonra plastik bir enjektörle 5'er ml olarak heparinize tüplere alınmıştır.

2.4.1.2. Dextran Sedimentasyonu Metodu ile Lökositlerin Ayrılması

Lökositler dextran sedimentasyon metodu ile izole edildi¹⁰³. Alınan 5 ml total kan 2.5 ml dextranla (2:1 arasında) karıştırılarak alt üst edildi ve plastik enjektöre çekildi. Enjektör iğne takılacak yeri yukarıya gelecek şekilde dik olarak yerleştirildi. Oda sıcaklığında 30-60 dakika bekletildi. Bu esnada eritrositler enjektörün alt kısmına doğru çökerek, üst kısımda lökositce zengin (az miktarda eritrosit ihtiva eden) kan plazması ve dextrandan ibaret bir muhteva kaldı.

Yeterli çökmenin olduğu görülünce enjektöre çengel haline getirilmiş bir iğne takıldı ve piston alttan itilerek lökositce zengin faz plastik bir tüpe alındı. 160 x g'de 5 dakika santrifüjlenerek lökositleri çöktürüldü (peletlendi). Oluşan bu lökosit peleti 3 ml fizyolojik su (% 0.9 NaCl) ile yıkandı ve 160 x g'de 5 dakika santrifüjlenerek fizyolojik su uzaklaştırıldı. Bu işlem üç defa tekrarlandı.

Lökosit peletinin içinde bulunan eritrositler osmotik şok¹⁰³ uygulanarak uzaklaştırıldı. Bu işlem şu şekilde yapıldı: Lökosit tableti üzerine 2 ml soğuk saf su ilave edildi ve çalkalandı; 20 saniye sonra ortama %1.8'lik NaCl ilave edildi ve karıştırıldı. Santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan lökosit tableti 3 ml fizyolojik su ile süspanse edildi ve ml'deki lökosit sayısı belirlendi. Elde edilen lökosit süspansiyonunda, periferik lökosit sayımına benzer şekilde, lökosit sayımı yapıldı. Bu süspansiyondan yayma yapılarak Wright boyası ile boyandı ve mm³ deki lökosit sayısı bulundu. Kullanılan bu izolasyon metodu ile süspansiyonda % 80-90 oranında polimorf nüveli lökosit elde edilebilmektedir¹⁰⁵.

2.4.1.3. Dış Perifer Membran Proteinlerinin Ayrılması

Lökosit peletinin üzerindeki süpernatant dekante edildi ve pelet üzerine 0.5 ml üre tamponu¹⁰⁶ ilave edildi. Vortex de karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 20 °C da, 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi.

Santrifüjden sonra pelet üzerindeki sıvı kısım bir tüpe dekante edildi ve pelet 0.2 ml üre tamponu ile yıkandı ve yine ilk tüpe dekante edildi. Üre tamponunun hacmi 0.7 ml oldu. Bu tampon üzerine ortamda bulunan lipidleri uzaklaştırmak için 0.2 ml CCl₄ ilave edilerek karıştırıldı, 1500 x g de 5 dakika santrifüj edilerek fazlar ayrıldı ve CCl₄ uzaklaştırıldı. Elde edilen bu çözeltide protein ve glikasyon tayinleri ve elektroforez yapıldı.

Geriye kalan lökosit peleti üç defa üçer ml fizyolojik su ile yıkandı ve üç ml fizyolojik su içine alındı.

2.4.1.4. İç Perifer Membran Proteinlerinin Ayrılması

Dış perifer proteinleri ayrılmış olan lökosit tabletinin üzerindeki fizyolojik su uzaklaştırıldı ve 3 ml saf su ilave edildi ve dondurma-çözme tekniği¹⁰⁷ ile hücreler parçalandı. 20°C da, 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek membran partikülleri çöktürüldü. süpernatant uzaklaştırıldı.

Çökelek üzerine 0.5 ml üre tamponu ilave edildi, vortex de karıştırıldı, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra 20°C da, 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Membran parçaları çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve çökelek 0.2 ml üre tamponu ile yıkandı, tamponlar birleştirildi (toplam hacim 0,7ml). Çözeltinin içindeki lipidleri uzaklaştırmak için ortama 0.2 ml CCl₄ ilave edildi, çalkalandı, 1500 x g de 5 dakika santrifüjlendi ve CCl₄ uzaklaştırıldı. Bu çözelti ile protein tayini, glikasyon tayini ve elektroforez yapıldı.

Membran parçalarından oluşan çökelek üç defa 3'er ml fizyolojik su ile yıkandıktan sonra 1 ml fizyolojik su içinde süspanse edildi.

2.4.1.5. İntegral Membran Proteinlerinin Ayrılması

İç perifer proteinleri ayrıldıktan sonra 1 ml fizyolojik su içinde süspanse edilen membran partikülleri içine %1'lik Triton X-100 çözeltisinden 0.5 ml ilave edildi. Vortexde karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 20°C da, 20.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi ve çökeleğin üzerindeki süpernatant dekanete edildi.

Süpernatant içindeki lipidlerin uzaklaştırılması için 0.5 ml CCl₄ ile muamele edildi. 1500 x g 5 dakika santrifüjlenerek fazlar ayrıldı ve CCl₄ uzaklaştırıldı. Bu çözelti ile protein tayini, glikasyon tayini ve elektroforez işlemleri yapıldı.

Geriye kalan membran çökeleği bir başka çalışmada kullanılmak üzere fizyolojik su içinde süspanse edildi ve buzdolabında muhafaza edildi.

2.4.2. Granülosit ve Monosit Mambran Proteinlerinin Ayrılması

2.4.2.1. Kan Numunelerinin Alınması

Kan numuneleri 17-68 yaş sınırındaki 15 sağlıklı ve 15 diabetli kişiden, on iki saatlik bir açlık peryodundan sonra plastik bir enjektörle 20'şer ml olarak heparinize tüplere alınmıştır.

2.4.2.2. Histopaque-1119 Metodu ile Granülosit ve Monositlerin Ayrılması

Dolaşım kanındaki ve kemik iliğindeki mononükleer hücrelerin izolasyonu için yoğunluk gradientli santrifügasyon metodlarını ilkdefa 1968 yılında Boyum tanımlamıştır¹⁰⁷. Bu maksatla polisukroz ve radiopaque ortamı ihtiva eden çözeltiler kullanılmıştır. Histopaque-1077 bu amaçla kullanılan ve yoğunluğu 1.077'ye ayarlanmış bir çözeltidir. Kan Histopaque-1077 üzerine yerleştirildikten sonra santifugal güçlerin etkisiyle mononükleer hücreler plazma-Histopaque-1077 ara yüzeyine yerleşirken eritrositler ve granülositler ağırlıklarının etkisiyle dibeye çökerler. Myeloid serisi hücrelerinin hepsini bir basamakta ayırmayı mümkün kılacak bir sistem düşünülmüş ve English ve Andersen'in gözlemleri de esas alınarak Histopaque-1119 metodu geliştirilmiştir.

Bu metod da tüpe önce Histopaque-1119 konur ve daha sonra üzerine eşit hacimde Histopaque-1077 dikkatlice yerleştirilir. Bu işlemden sonra kan Histopaque-1077 tabakası üzerine konur ve tüpler 700 x g'de 30 dakika santrifüjlenir. Granülostik serinin hücreleri 1077/1119 ara yüzeyine yerleşirken lenfositler ve diğer mononükleer hücreler ve plateletler plazma/1077 ara yüzeyinde yerleşirler.

Bu metodun uygulanabilmesi için Histopaque-1119, Histopaque-1077 ve fosfatla tamponlanmış tuz (Phosphat Buffered Saline : PBS) çözeltileri gereklidir.

Metod şu şekilde uygulandı :

- a) 15 ml'lik konikal bir santrifüj tüpüne 3 ml Histopaque-1119 çözeltisi konuldu.
- b) Sonra bunun üzerine dikkatli bir şekilde 3 ml Histopaque-1077 çözeltisi ilave edilerek tabaka oluşturuldu.
- c) Histopaque-1077 üzerine dikkatli bir şekilde 6 ml kan yerleştirildi.
- d) Tüpler oda sıcaklığında 700 x g'de 30 dakika santrifüjlendi. Aşağı sıcaklarda verim düşmektedir (santrifüjün hızı rotorun yarıçapına göre değişir).
- e) Santrifüj tüpleri dikkatlice alındı ve iki belirgin opak faz gözlendi.
- f) 0.5 cm kalınlığındaki üstteki ilk opak faz üzeri "mononükleer hücreler" yazılı bir tüpe transfer edildi.
- g) 0.5 cm kalınlığındaki üstten ikinci opak faz da üzeri "granülösitler" yazılı tüpe transfer edildi.
- h) Tüplere 10 ml PBS ilave edilerek hücreler yıkandı ve 20°C'de 200 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dekante edildi.
- ı) Bir pastör pipeti ile yavaşça çekilerek hücreler resüspanse edildi.
- i) h ve ı basamakları iki defa tekrar edildi.

j) Hücreler yaklaşık olarak kendi hacimlerindeki PBS çözeltisinde suspanse edilerek müteakip işlemlerde kullanıldılar.

2.4.2.3. Granülosit ve Monositlerin Membran Proteinlerinin Ayrılması

Granülosit ve monositlerin dış perifer proteinleri 2.4.1.3, iç perifer proteinleri 2.4.1.4 ve integral mambran proteinleri de 2.4.1.5'de total lökositlerin proteinlerinin ayrılması için uygulanan prosedür takip edilerek ayrıldı.

2.4.3. Coomassie-Brillant Blue Metodu ile Protein Tayini

Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanarak renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanarak kompleks oluşturması reaksiyonu çok hızlıdır (yaklaşık 2 dakika). Bu metodun hassasiyeti 1-100 µg arasındadır¹⁰⁹.

Tayin işlemleri şöyle yapıldı: 1 mililitresinde 1 mg protein bulunan standart serum albumin çözeltisinden tüplere sırayla 10, 20, 30,40,50,60,70,80,90,100 ml alındı ve bütün hacimler saf su ile 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her tüpe 5'er ml coomassie reaktifi ilave edildi, wortexde karıştırıldı. Kör olarak 0.1 ml saf su ve 5 ml coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm de köre karşı absorbands değerleri spektrometrede okundu.

Absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde verildi.

Üre tamponu ile elde edilen dış perifer ve iç perifer proteinleri ile %1'lik Triton-X 100 ile elde edilen integral proteinlerden iki ayrı tüpe 100'er µl alındı ve üzerlerine 5 ml coomassie reaktifi ilave edildi. Vortexde karıştırıldı 10 dakika bekletildi ve 595 nm'de absorbands ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbandsına karşılık gelen protein miktarı, standart grafik yardımıyla okundu.

2.4.4. Glikasyon Tayini

Bu metod insan serumu veya plazmasındaki glikasyona uğramış proteinlerin kantitatif ölçümü için kullanılan nonkinetik kolorimetrik bir metoddur. Fruktozaminlerin tayini tıpkı glike hemoglobinlerde olduğu gibi bir glisemik kontrol indeksidir.

Bu yöntem glukozun ketoamin bağıyla bir proteine bağlanarak bir tetrazolium boyasını alkali şartlar altında indirgemesi esasına dayanır.

Metodun uygulanabilmesi için gerekli olan reaktifler aşağıdadır:

Örnek hazırlama reaktifi : pH'ı yaklaşık olarak 13 olan bir tampon çözeltisidir.

Karbonat tamponu : Koruyucu olarak %0.02 oranında cloramfenikol ilave edilmiş karbonat tamponudur. pH'sı 10.35'dir.

Fruktozamin reaktifi : Liyofilize halde 0.57 mM 2-(4-iodofenil)-3- (4-nitrofenil) -5-feniltetrazolium klorit (INT) ihtiva eder. Kullanımdan hemen önce karbonat tamponu ilave edilerek hazırlanır.

Kalibratörler : Lifolize insan serumundan oluşan ve üç ayrı konsantrasyon (normal, intermediate ve elevated) ihtiva eden bir kittir. Kullanımdan hemen önce 0.5 ml steril deiyonize su ile hazırlanır.

Metod şu şekilde uygulandı :

Numune ön hazırlaması :

100 µl numune (veya kalibratör) 10 µl numune hazırlama reaktifi ile karıştırıldı. 20-25°C da 30 dakika bekletildi.

Numune hazırlanması:

50 µl ön muamele görmüş numune (veya kalibratör) 1 ml fruktozamin reaktifi ile karıştırıldı. 20-25°C da 15 dakika inkübe edildi. Tam 15 dakika sonunda 500 nm'de absorbans okundu (spektrofotometre saf suyla sıfırlandı).

Kör hazırlanması :

50 µl ön muamele görmüş numune (veya kalibratör) 1 ml karbonat tamponu ile karıştırıldı. 20-25°C da 15 dakika inkübe edildi ve bu sürenin sonunda 500 nm'de abosorbans okundu.

Her ölçüm bir numune ve bir kör ile yapıldı. Her bir numune ve kör aynı şartlarda ve birbirinin peşi sıra okundu. Kalibratörler ve serum numuneleri aynı şartlar altında ve aynı miktarlarda kullanıldı.

Sonuçları şu şekilde değerlendirildi :

Önce her bir kör absorbansı, karşılık gelen numune absorbansından çıkarıldı.

$$\Delta ABS = ABS_N - ABS_K$$

Daha sonra kalibratörlerin ΔABS 'lerinden faydalanarak lineer bir regresyon formülü bulundu ve bu formülden de faydalanarak serum numunesinin fruktozamin konsantrasyonu hesaplandı. Ölçüm sonuçları mM Fruktozamine eşdeğer olarak verildi.

2.4.5. Membran Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat

Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Laemmeli'nin metoduna uygun olarak %3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) yapıldı¹¹⁰.

Bunun için elektrofrez plakası önce su sonra da alkol ile yıkandı. Plakaları birleştiren mikalar vazelinlendi ve cam plakalar birbirlerine kışkaçlarla tutturularak jel cihazına kondu. Cam plakaların altı kaynama sıcaklığına getirilerek çözülüp daha sonra 40-50°C'ta getirilmiş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0.1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklenildi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0.1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. tarak üzerine dikkatlice yerleştirildi. tırağın da üzerine nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi.

Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı, toplam hacim 100 ml olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anod), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. 80 voltta yarım saat bekletildikten sonra 150 volta çıkarılarak 4-5 saat bekletildi. Bu yürütme tamponu, tekrar kullanılmak üzere özel kabına kondu.

Jel aşağıdaki prosedüre uygun olarak "gümüş boyaması" ile boyandı:

- a) 5/1/5 oranındaki $H_2O/CH_3COOH/CH_3OH$ çözeltisi ile jel 30 dakika çalkalandı.
- b) Jel %15'lik CH_3OH/H_2O çözeltisi ile 15 dakika çalkalandı.
- c) %10'luk glutaraldehit çözeltisi ile 30 dakika çalkalandı.
- d) Jel üç defa hızlıca su ile yıkandı . Daha sonra her 5 dakikada bir suyu değiştirilerek 45 dakika çalkalandı ve bir gece suda bırakıldı (glutaraldehitin kokusu gelmeyinceye kadar).
- e) Ertesi gün jel $AgNO_3$ çözeltisi ile 15 dakika çalkalandı.
- f) Jel bir defa su ile hızlıca yıkandı ve daha sonra üç defa 5'er dakika su ile çalkalandı.
- g) Renk açma çözeltisi ile 2-10 dakika muamele edildi.
- h) Bir defa su ile hızlıca yıkandı.
- i) Renk durdurma çözeltisi ile 15 dakika çalkalanarak renk sabitleştirildi.
- j) Jel su ile yıkandı ve fotoğrafı çekildi.

Jel aşağıdaki prosedüre uygun olarak da Coomassie-Brillant Blue R-250 ile boyandı:

Jel özel kabına alınarak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar dolduruldu. 1,5 saat çalkalayıcı da bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralarla çözelti değiştirildi, jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı.

2.4.6.Kullanılan İstatistiki Metodlar

Bulgular 'İstatistiki olarak kantitatif bulguların incelenmesi" metodu ile değerlendirildi¹¹¹. Bu maksatla bütün parametrelerin ortalama değerleri (X) ve standart sapmaları (SD) bulundu, "t" testleri ve korelasyon sabitleri hesap edildi.

Aritmetik Ortalama

$$X=(\sum X_i / N)$$

formülü kullanıldı.

Standart Sapma

$$SD = [(\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / N) / N-1)]^{1/2}$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

"t" testi:

Bu test grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığını tesbit etmek için yapıldı. Ortalama farklarına ait standart sapmanın hesaplanması için aşağıdaki fomüller kullanıldı.

$$S_{X1}^2 = [(N_1-1)S_1^2 + (N_2-1)S_2^2] / (N_1+N_2-2)$$

$$S_{X1-X2} = [(S_{X1}^2(N_1+N_2) / (N_1*N_2))]$$

Bulunan değerler aşağıdaki formüle konularak "t" hesaplandı.

$$t = ((X_1-X_2) / (S_{X1-X2}))$$

Korelasyon Katsayısının Hesaplanması

Bu hesaplama aynı grubun vasıfları arasındaki ilgiyi araştırmak için yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\Gamma_{(xy)} = [(\sum \sum xy - (\sum x * \sum y) / M) / [(\sum x^2 - ((\sum x)^2 / M)) * (\sum y^2 - ((\sum y)^2 / M))]^{1/2}$$

Bu katsayının önem testini bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$S_r = \pm [(1 - \Gamma^2) / (M - 2)]$$

$$t = \Gamma / S_r$$

veya

$$t = \Gamma / [(1 - \Gamma^2) / (M - 2)]^{1/2}$$

Regresyon Katsayısının Hesaplanması ve Denkleminin Çıkarılması:

Regresyon katsayısı aşağıdaki formülle hesaplandı :

$$r = [(\sum \sum xy - ((\sum x * \sum y) / M)) / [(\sum x^2 - ((\sum x)^2 / M))]$$

regresyon doğrusunun denklemi

$$y = ax + b$$

dir.

Bu denklemlerde geçen terimlerin anlamları şunlardır :

N = analiz sayısı

t = kritik oran

x₁ = her bir gözlem

SD = standart sapma

S_{x1-x2} = ortalamalar arasındaki farkın hatası

n = serbestlik derecesi (N₁ + N₂ - 2)

S_x² = her iki gözlemin ortak varyansı

Γ = korelasyon katsayısı

S_r = korelasyon katsayısının standart hatası

y = bağımlı değişken

x = bağımsız değişken

r = regresyon katsayısı

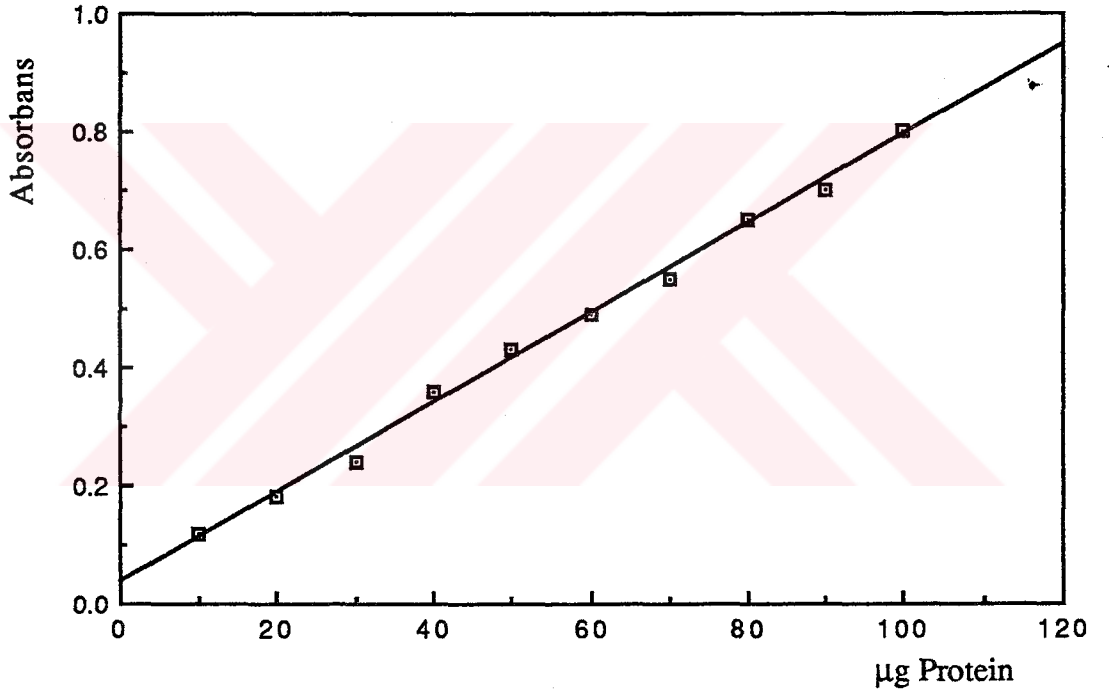
İstatistik hesaplamaların yapılmasında Minitab V.8.02 ve SPSS V.5 (IBM versiyonları) programları kullanılmıştır.



3.DENEY SONUÇLARI

3.1.Coomassie-Brillant Blue Yöntemi İle Yapılan Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini için coomassie-blue kullanıldı. Coomassie-blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. Lökosit hücre membranlarından elde edilen dış periferel, iç periferel ve integral membran proteinlerinin miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltilerdeki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

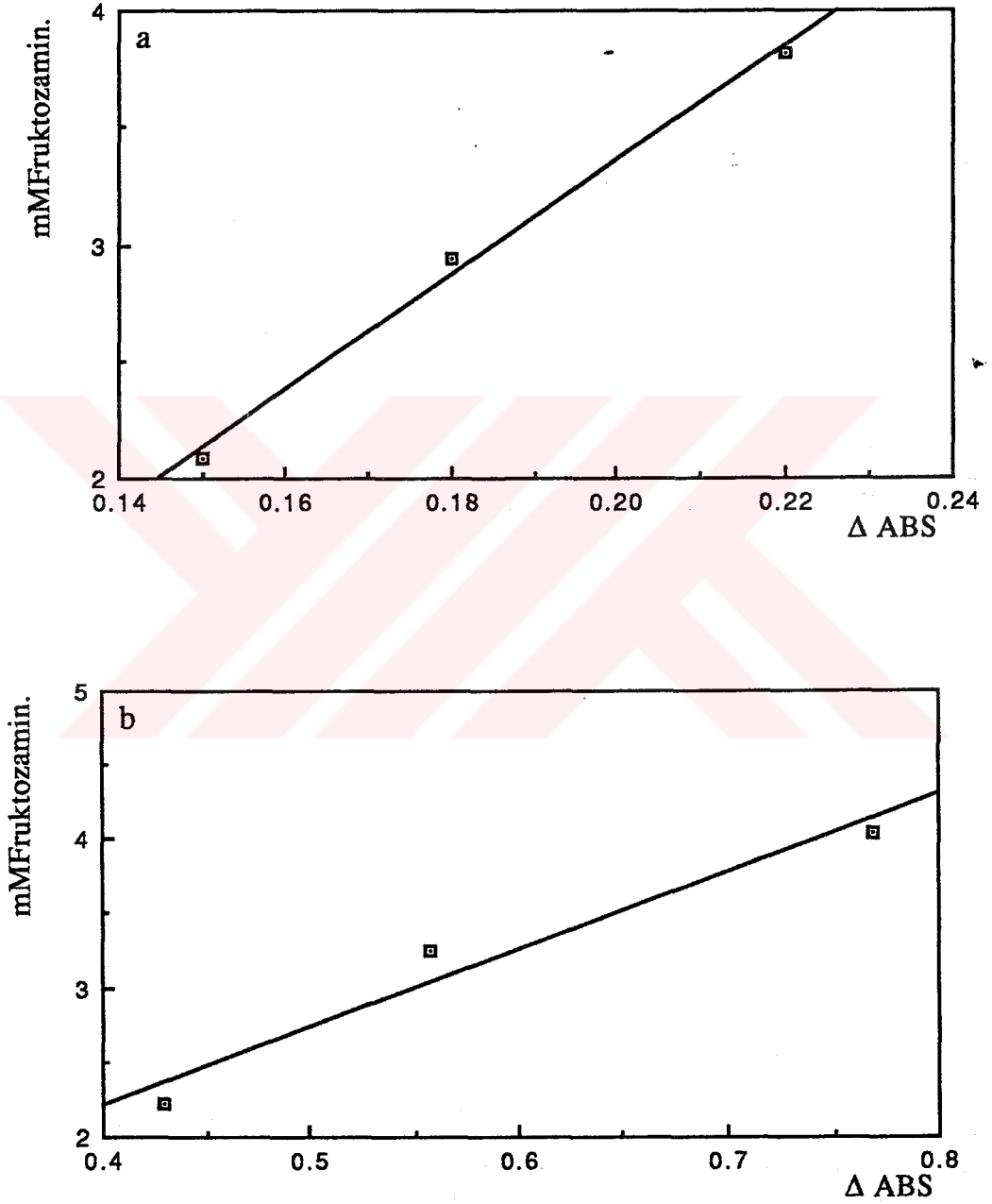


Şekil 3.1.Coomassie-blue yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik.

3.2.Glikasyon Tayini İçin Kullanılan Standart Grafikler

Kantitatif glikasyon tayininde Gliko-Probe GSB glikasyon kiti kullanıldı ve her kit çalışılmadan önce içinde bulunan kalibratörler vasıtasıyla standart glikasyon grafikleri çalışıldı. Lökosit membran proteinlerine (periferaller ve integral) ait glikasyon miktarları bu grafiklerle belirlendi.

Çalışma esnasında kullanılan iki glikasyon kitine ait kalibratörlerin mM Fruktozamin değerlerine karşılık gelen absorbans miktarı aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (şekil 3..a,b).



Şekil 3.2.Gliko-Probe metoduyla glikasyon tayininde kullanılan standart grafikler (a,b).

3.3.Total Lökosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları

20 sağlıklı şahıs ve 21 diabetli hastadan elde edilen total lökositlerden izole edilen dış periferel, iç periferel ve integral proteinler için coomassie-brillant blue metodu ile elde edilen protein, GLiko-Probe GSB metodu ile elde edilen glikasyon ve bu değerler yardımıyla elde edilen mg protein başına mM Fruktozamin değerleri Tablo 3.1, 3.2; 3.3, 3.4; 3.5, 3.6 da verilmiştir.

Tablo 3.1.Kontrol grubu için bulunan total lökosit dış periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mM Fruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	2525,7	19,32	7,650
2	2098,4	17,95	8,550
3	2548,8	17,27	6,780
4	2791,3	16,59	5,940
5	1359,2	15,22	5,323
6	1451,6	16,59	11,43
7	1567,1	20,00	12,76
8	2271,6	20,68	9,100
9	2872,2	19,32	6,730
10	2799,8	18,63	6,700
11	2595,0	20,68	7,970
12	2759,9	26,82	6,570
13	1855,8	21,36	11,51
14	5251,4	19,32	3,680
15	6314,0	15,91	3,240
16	1099,4	11,68	4,660
17	2410,2	18,63	7,730
18	6117,6	21,36	3,490
19	9380,8	26,82	3,701
20	4177,0	17,95	4,300

Tablo 3.2.Diabetli hasta grubu için bulunan total lökosit dış periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein,
1	15867,6	30,94	1,950
2	7972,20	25,48	3,190
3	8125,60	35,28	4,340
4	18121,6	32,06	1,770
5	4701,60	49,70	10,57
6	11506,6	33,04	2,870
7	9113,70	49,77	5,460
8	12153,5	71,64	5,890
9	11358,9	61,44	5,410
10	11377,3	70,18	6,180
11	10989,3	61,44	5,590
12	8152,70	89,14	10,93
13	11783,9	65,81	5,580
14	9963,70	54,15	5,430
15	9575,63	67,27	7,030
16	6378,74	52,52	8,230
17	11229,5	67,27	5,990
18	10111,5	97,89	9,680
19	8845,70	134,3	15,19
20	12892,6	124,1	9,630
21	12670,9	156,2	12,33

Tablo 3.3.Kontrol grubu için bulunan total lökosit iç periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFructozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFructozamin/100 ml	mMFruc./mgprotein
1	573,90	24,09	41,98
2	1070,5	19,32	18,05
3	908,80	18,63	20,50
4	1624,9	17,95	11,05
5	400,60	20,00	49,93
6	238,90	15,91	66,60
7	850,45	14,54	17,10
8	366,00	17,27	47,19
9	3403,5	15,91	4,670
10	539,20	15,91	29,51
11	677,80	19,32	28,50
12	493,00	17,95	36,41
13	1128,2	16,59	14,70
14	285,10	17,95	62,96
15	781,70	30,92	39,55
16	840,13	20,00	23,80
17	963,00	17,27	17,93
18	981,00	47,97	48,89
19	3057,0	23,41	7,660
20	1682,6	24,09	14,32

Tablo 3.4.Diabetli hasta grubu için bulunan total lökosit iç periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	0,000	0,000	0,000
2	1564,9	29,89	19,06
3	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,000	0,000
6	0,000	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,000	0,000
9	151,11	46,03	304,61
10	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,000
12	0,000	0,000	0,000
13	0,000	0,000	0,000
14	0,000	0,000	0,000
15	0,000	0,000	0,000
16	0,000	0,000	0,000
17	0,000	0,000	0,000
18	530,13	31,45	59,33
19	3505,2	31,45	8,970
20	493,15	35,82	72,64
21	483,91	29,26	60,47

Tablo 3.5.Kontrol grubu için bulunan total lökosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFrktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFrktozamin/100 ml	mMFrk./mgprotein
1	239,73	34,13	30,36
2	264,48	34,13	28,11
3	1192,6	35,63	17,71
4	2380,5	38,50	16,09
5	660,46	37,00	56,03
6	969,82	44,25	45,06
7	932,70	35,63	38,20
8	1019,3	41,50	40,23
9	1922,7	38,50	20,02
10	1613,3	35,63	21,91
11	1749,4	50,25	28,72
12	945,07	48,72	50,92
13	1143,1	45,75	39,60
14	127,36	50,25	29,19
15	310,30	17,27	59,71
16	772,27	17,83	14,80
17	772,27	21,48	17,83
18	1007,0	19,65	19,51
19	1959,8	15,91	8,120
20	2649,58	34,84	13,15

Tablo 3.6.Diabetli hasta grubu için bulunan total lökosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein`
1	3927,4	105,4	26,84
2	1163,4	156,0	134,1
3	1611,4	180,4	112,0
4	1754,0	132,0	75,26
5	1939,4	114,3	58,93
6	1431,6	141,6	98,91
7	892,60	78,93	88,43
8	772,30	74,56	96,54
9	832,40	64,26	77,20
10	462,80	70,51	152,4
11	462,80	84,57	182,8
12	1571,5	67,39	42,88
13	1167,6	58,52	50,12
14	770,33	68,73	89,22
15	897,38	58,52	65,21
16	733,37	65,90	85,76
17	918,17	59,98	65,32
18	304,40	148,6	144,3
19	660,80	98,63	149,3
20	650,00	179,9	121,5
21	680,50	100,0	168,9

3.4. Granülosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları

15 sağlam şahıs ve 15 diabetli şahıstan elde edilen granülositlerden izole edilen dış ve iç periferik ve integral proteinler için, coomassie-brillant blue metodu ile elde edilen protein, Gliko-Probe GSB metodu ile elde edilen glikasyon miktarları ve bu değerler yardımıyla elde edilen mg protein başına mMFruktozamin değerleri Tablo 3.7, 3.8; 3.9, 3.10.; 3.11, 3.12 da verilmiştir,

Tablo 3.7.Kontrol grubu için bulunan granülosit dış periferik proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	2068,4	20,1	9,7
2	2362,4	18,9	8,0
3	4176,6	13,9	3,4
4	2008,2	19,0	9,5
5	2537,2	40,7	16,0
6	2668,8	37,6	14,1
7	2560,4	23,0	9,0
8	1767,5	22,2	12,6
9	2708,9	15,0	5,5
10	2022,5	21,4	10,6
11	3333,2	21,9	6,6
12	3860,4	25,0	6,5
13	2414,2	26,5	11,0
14	2923,4	24,7	8,4
15	2518,8	26,5	10,5

Tablo 3.8.Diabetli hasta grubu için bulunan granülosit dış periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	2172,35	26,63	12,26
2	5210,73	26,82	5,15
3	3660,74	29,37	8,02
4	4973,66	13,35	2,68
5	4334,93	14,67	3,38
6	2633,45	12,25	4,65
7	4413,75	18,93	4,29
8	4707,29	15,03	3,19
9	34783,75	11,93	3,43
10	7224,18	12,67	1,75
11	3611,71	22,41	8,58
12	7226,89	19,10	2,64
13	2537,20	20,25	7,98
14	4000,05	18,00	4,50
15	4490,05	19,44	4,33

Tablo 3.9.Kontrol grubu için bulunan granülosit iç periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	752,800	11,35	15,08
2	3051,40	69,73	22,85
3	750,900	5,100	6,790
4	575,200	13,00	22,60
5	2911,60	97,00	33,32
6	884,900	12,20	13,79
7	927,910	22,57	24,32
8	712,350	15,85	22,24
9	935,460	28,50	30,47
10	810,570	17,10	21,10
11	612,350	17,85	29,15
12	747,600	15,10	20,20
13	811,170	16,47	20,30
14	845,430	20,57	24,33
15	647,130	15,83	24,46

Tablo 3.10.Diabetli hasta grubu için bulunan granülosit iç periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	1265,12	0,000	0,000
2	1751,12	0,000	0,000
3	327,940	29,77	90,78
4	1327,40	0,000	0,000
5	1688,84	60,04	35,55
6	3139,00	0,000	0,000
7	279,650	18,34	65,58
8	518,830	0,000	0,000
9	1850,66	23,39	12,64
10	1578,86	0,000	0,000
11	1062,44	0,000	0,000
12	3307,56	0,000	0,000
13	1103,00	0,000	0,000
14	1913,14	32,89	17,19
15	964,800	0,000	0,000

Tablo 3.11.Kontrol grubu için bulunan granülosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFructozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFructozamin/100 ml	mMFruct./mgprotein`
1	1218,91	11,35	9,310
2	1650,37	18,03	10,92
3	1377,60	12,16	8,830
4	1200,50	14,85	12,37
5	1350,50	17,43	12,91
6	1357,75	15,29	11,26
7	1418,15	13,81	9,740
8	1264,74	15,94	12,60
9	1158,67	12,11	10,45
10	1671,12	16,78	10,04
11	1241,24	13,75	11,08
12	1458,10	15,95	10,94
13	1358,67	14,13	10,40
14	1261,63	15,85	12,56
15	1485,85	13,62	9,170

Tablo 3.12.Diabetli hasta grubu için bulunan granülosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	3085,87	94,750	30,70
2	2253,50	87,400	38,78
3	4507,43	102,45	22,73
4	5544,09	67,180	12,12
5	4361,76	51,590	11,83
6	2696,00	51,500	19,10
7	5940,15	100,00	16,84
8	3458,99	66,200	19,14
9	4524,84	89,160	19,70
10	5806,19	104,08	12,92
11	1228,28	54,020	43,98
12	7011,82	134,82	19,22
13	3011,01	58,740	19,51
14	6004,92	77,120	12,84
15	4507,24	60,480	13,42

3.5.Monosit Membran Proteinleri İçin Elde Edilen Kantitatif Protein ve Glikasyon Sonuçları

15 sağlam şahıs ve 15 diabetli şahıstan elde edilen monositlerden izole edilen dış ve iç periferel ve integral membran proteinleri için coomassie-brillant blue metodu ile elde edilen protein, Gliko-Probe GBS metodu ile elde edilen glikasyon ve bu değerler yardımı ile elde edilen mg protein başına mMFructozamin değerleri Tablo 3.13, 3.14; 3.15, 3.16; 3.17, 3.18'da verilmiştir.

Tablo 3.13.Kontrol grubu için bulunan monosit dış periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFructozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFructozamin/100 ml	mMFruc./mgprotein
1	1426,20	42,60	29,90
2	1271,50	39,00	30,70
3	750,900	10,20	13,60
4	575,200	13,00	22,60
5	2911,60	97,00	33,30
6	884,900	12,20	13,80
7	730,900	25,60	35,00
8	1916,00	41,80	21,80
9	2131,80	38,00	17,80
10	812,200	32,00	39,40
11	1672,30	23,40	14,00
12	644,100	29,60	46,00
13	1108,00	31,40	28,30
14	1149,80	36,00	31,30
15	1128,80	33,50	29,70

Tablo 3.14.Diabetli hasta grubu için bulunan monosit dış periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	1467,38	23,72	16,16
2	3519,75	21,53	6,120
3	2472,76	15,70	6,350
4	9798,14	16,44	1,680
5	7640,03	12,03	1,570
6	5231,87	10,69	2,040
7	4729,04	9,550	2,020
8	3753,27	11,82	3,150
9	4163,69	11,69	2,810
10	4576,83	10,00	2,180
11	3370,03	11,44	3,390
12	3927,22	10,67	2,720
13	2911,60	48,50	16,66
14	4185,22	13,54	3,240
15	4670,42	19,34	4,140

Tablo 3.15.Kontrol grubu için bulunan monosit iç periferel proteinlerinin proteinve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFrktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFrktozamin/100 ml	mMFrk./mgprotein
1	2200,7	11,7	5,320
2	2408,3	32,7	13,58
3	4127,6	13,9	3,370
4	2008,2	19,0	9,460
5	2537,2	41,3	16,28
6	529,00	37,6	71,08
7	2842,3	40,1	14,11
8	2703,1	30,3	11,21
9	1805,4	34,9	19,33
10	3117,3	38,7	12,41
11	1988,1	26,3	13,23
12	2914,9	34,9	11,97
13	1503,5	24,2	16,10
14	1712,1	28,8	16,82
15	2478,9	32,7	13,19

Tablo 3.16.Diabetli hasta grubu için bulunan monosit iç periferel proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	672,430	0,000	0,000
2	1476,62	7,500	5,080
3	482,790	15,70	35,52
4	1394,05	0,000	0,000
5	1792,59	0,000	0,000
6	314,980	9,460	30,03
7	475,360	0,000	0,000
8	2299,13	5,390	2,340
9	358,470	7,100	19,81
10	361,190	0,000	0,000
11	293,240	0,000	0,000
12	372,060	0,000	0,000
13	814,650	6,390	7,840
14	902,370	0,000	0,000
15	782,140	0,000	0,000

Tablo 3.17.Kontrol grubu için bulunan monosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFrktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFrktozamin/100 ml	mMFrk./mgprotein
1	562,66	10,62	18,87
2	686,48	11,21	16,33
3	859,82	15,46	17,98
4	543,96	7,620	14,01
5	614,78	7,920	12,88
6	732,90	10,11	13,79
7	612,21	9,820	16,04
8	800,13	7,010	8,760
9	822,68	14,72	17,89
10	770,85	8,120	10,53
11	843,60	9,280	11,00
12	762,05	6,430	8,440
13	721,46	7,510	10,41
14	518,22	6,140	11,85
15	762,22	7,120	9,340

Tablo 3.18.Diabetli hasta grubu için bulunan monosit integral membran proteinlerinin protein ve glikasyon miktarları ile mg proteine karşılık gelen mMFruktozamin oranları.

No	Protein miktarı mgprotein/ 100 ml	Glikasyon miktarı mMFruktozamin/100 ml	mMFruk./mgprotein
1	2426,94	101,23	41,71
2	1970,74	110,67	56,16
3	2892,17	144,14	49,84
4	3363,22	145,42	43,24
5	4174,10	165,96	39,76
6	2511,88	105,95	42,18
7	2512,88	114,69	45,64
8	2272,05	117,64	42,44
9	1677,08	100,00	59,64
10	2247,86	102,35	45,56
11	1831,42	92,930	50,74
12	2501,22	115,16	46,04
13	2555,64	102,69	40,18
14	1870,78	92,540	49,46
15	2131,96	104,85	49,18

3.6. Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Total Lökosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları

Yapılan istatistiki hesaplamalar sonucunda bulunan değerler Tablo 3.19, 3.20 ve 3.21'de korelasyon değerleri ise Tablo 3.22, 3.23 ve 3.24'de verilmiştir,

Tablo 3.19.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	20	3212	2071	9,25	< 0,0001
	Diabet	21	10614	2990		
Glikasyon	Kontrol	20	19,10	351	6,36	< 0,0001
	Diabet	21	68,1	35,1		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	20	6,89	2,78	0,07	> 0,1
	Diabet	21	6,82	3,50		

Tablo 3.20.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	20	0,465	3,228	< 0,005
	Glikasyon	20			
	Protein	20	0,651	5,287	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	20			
	Glikasyon	20	0,064	0,395	> 0,25
	mMFruk./mg prot.	20			
Diabet	Protein	21	0,189	1,186	> 0,1
	Glikasyon	21			
	Protein	21	0,315	2,046	< 0,025
	mMFruk./mg prot.	21			
	Glikasyon	21	0,837	9,429	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	21			

Tablo 3.21.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	20	1043	845	3,00	<0,05
	Diabet	21	327	668		
Glikasyon	Kontrol	20	20,75	7,46	2,85	>0,05
	Diabet	21	9,70	16,00		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	20	30,10	18,20	2,73	<0,01
	Diabet	21	12,20	23,50		

Tablo 3.22.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	20	0,028	0,173	>0,25
	Glikasyon	20			
	Protein	20	0,726	6,508	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	20			
	Glikasyon	20	0,226	1,430	<0,1
	mMFruk./mg prot.	20			
Diabet	Protein	21	0,776	7,584	<0,0005
	Glikasyon	21			
	Protein	21	0,345	2,266	< 0,01
	mMFruk./mg prot.	21			
	Glikasyon	21	0,824	8,965	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	21			

Tablo 3.23. Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	20	1132	712	0,07	>0,1
	Diabet	21	1115	775		
Glikasyon	Kontrol	20	34,8	11,1	7,13	< 0,0001
	Diabet	21	101,3	41,1		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	20	29,8	15,0	7,12	< 0,0001
	Diabet	21	100,1	42,6		

Tablo 3.24.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu total lökosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	20	0,059	0,364	>0,25
	Glikasyon	20			
	Protein	20	0,528	3,833	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	20			
	Glikasyon	20	0,320	2,082	>0,01
	mMFruk./mg prot.	20			
Diabet	Protein	21	0,149	0,929	>0,1
	Glikasyon	21			
	Protein	21	0,615	4,808	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	21			
	Glikasyon	21	0,332	2,170	>0,01
	mMFruk./mg prot.	21			

3.7.Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Granülosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları

Yapılan istatistiki hesaplamalar sonucunda bulunan değerler Tablo 3.25, 3.26, 3.27'de korelasyon hesabı sonuçları ise Tablo 3.28 , 3.29 , 3.30'de verilmiştir,

Tablo 3.25.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml),glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	15	2659	670	3,67	> 0,001
	Diabet	15	4245	1535		
Glikasyon	Kontrol	15	23,76	7,28	2,12	< 0,05
	Diabet	15	18,72	5,62		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	9,43	3,29	3,82	< 0,01
	Diabet	15	5,12	2,86		

Tablo 3.26. Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	15	0,119	0,634	>0,25
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,629	4,281	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,823	7,667	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,228	1,239	>0,1
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,707	5,290	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,736	5,753	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			

Tablo 3.27.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	15	1065	786	1,33	> 0,1
	Diabet	15	1472	882		
Glikasyon	Kontrol	15	25,2	24,7	1,8	> 0,05
	Diabet	15	11,0	18,2		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	22,07	6,67	0,98	> 0,1
	Diabet	15	14,8	28,0		

Tablo 3.28.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	r	t	P
Kontrol	Protein	15	0,952	16,457	<0,0005
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,350	1,977	>0,05
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,574	3,709	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,087	0,462	>0,25
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,468	2,802	< 0,005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,625	4,237	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			

Tablo 3.29.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	15	1365	153	6,88	< 0,0001
	Diabet	15	4263	1624		
Glikasyon	Kontrol	15	14,74	1,99	10,32	<0,0001
	Diabet	15	80,0	24,4		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	10,84	1,32	4,17	< 0,001
	Diabet	15	21,19	9,52		

Tablo 3.30.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu granülosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	15	0,546	3,449	<0,005
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,304	1,689	< 0,05
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,630	4,293	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,593	3,897	<0,0005
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,718	5,458	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,033	0,175	>0,25
	mMFruk./mg prot.	15			

3.8. Diabetli Hasta Grubu ile Sağlam Şahıs Grubu Arasında Monosit Membran Proteinlerinin İstatistiksel Sonuçları

Yapılan istatistiki hesaplamalar sonucunda bulunan değerler Tablo 3.31, 3.32 ve 3.33'de korelasyon hesabı sonuçları ise Tablo 3.34 , 3.35 , 3.36'de verilmiştir,

Tablo 3.31. Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml),glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	15	1274	649	5,73	< 0,0001
	Diabet	15	4428	2029		
Glikasyon	Kontrol	15	33,7	20,4	2,94	> 0,001
	Diabet	15	16,44	9,89		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	27,15	9,72	7,91	< 0,0001
	Diabet	15	4,95	4,87		

Tablo 3.32.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit dış perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	15	0,823	7,667	<0,0005
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,154	0,825	> 0,1
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,370	2,107	>0,01
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,289	1,597	>0,05
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,593	3,897	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,851	8,575	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			

Tablo 3.33.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S.D.	t	P
Protein	Kontrol	15	2325	823	5,55	< 0,0001
	Diabet	15	853	615		
Glikasyon	Kontrol	15	29,81	9,22	9,79	< 0,0001
	Diabet	15	3,44	4,89		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	16,5	15,7	1,93	> 0,05
	Diabet	15	6,7	11,9		

Tablo 3.34.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit iç perifer proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mM Fruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	15	0,137	0,732	>0,1
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,710	5,335	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,412	2,393	>0,01
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,052	0,276	>0,25
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,321	1,793	< 0,05
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,906	11,326	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			

Tablo 3.35.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan istatistik sonuçları.

Grubun adı		N	X	S,D,	t	P
Protein	Kontrol	15	708	112	10,46	< 0,0001
	Diabet	15	2463	640		
Glikasyon	Kontrol	15	9,27	2,82	19,04	< 0,0001
	Diabet	15	114,4	21,2		
mMFruk./mg prot.	Kontrol	15	13,21	3,53	19,22	< 0,0001
	Diabet	15	46,78	5,77		

Tablo 3.36.Kontrol grubu ve diabetli hasta grubu monosit integral membran proteinleri için elde edilen kantitatif protein (mg protein/100 ml), glikasyon (mM Fruktozamin/100 ml) ve mMFruktozamin/mg protein arasında yapılan korelasyon hesabı sonuçları.

Grubun adı		N	Γ	t	P
Kontrol	Protein	15	0,387	2,221	>0,01
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,200	1,080	>0,1
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,818	7,525	<0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
Diabet	Protein	15	0,656	4,599	<0,0005
	Glikasyon	15			
	Protein	15	0,664	4,699	< 0,0005
	mMFruk./mg prot.	15			
	Glikasyon	15	0,111	0,591	>0,25
	mMFruk./mg prot.	15			

3.9.Membran Proteinlerinin Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Total lökosit çalışmalarından elde edilen dış periferel, iç periferel ve integral proteinler Laemli'nin metoduna uygun olarak %3-10 kesikli elektroforeze tabi tutuldu ve jeller yürütme sonunda gümüş ve coomassie-brillant blue ile boyandı.

Gümüş boyamasında protein bandının önünde (normal proteinden daha hızlı) hafif bir kahverengi band oluştu (Şekil 3.9.1).

Coomassie boyamasında ise mavi protein bandının önünde 1,5 saat boyamadan sonra bordo renkli gliko protein bandı oluştu, fakat renk açma basamağında kayboldu.



Şekil 3.3.Total lökosit membran proteinlerinin sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları : (1) dış perifer proteinleri (2) iç perifer proteinleri (3) integral membran proteinleri (sağdan kontrol , diabet sırasıyla).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada diabetes mellituslu hastalardaki uzun süreli hiperglisemiye bağlı olarak anormal lökosit membran proteini glikasyonunun hangi protein grubunda olduğunu araştırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla total lökositler, granülositler ve monositler için ayrı ayrı olmak üzere dış ve iç periferik membran proteinleri ile integral membran proteinlerinin glikasyonu, diabetik hastalar ve sağlıklı şahıslar için belirlenmiştir.

Bu bölümde önce kullanılan metodlar daha sonra da bulgular tartışılacaktır.

Total kandan lökositlerin izolasyonu için antikoagulan olarak heparin kullanılmıştır. Çünkü özellikle EDTA kullanıldığında nötrofil yüzeyindeki Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi divalent katyonları bağlandığından dolayı hücre yapışmasını önlemekte ve hatalı sonuçlara sebep olmaktadır⁴⁸.

İn vitro lökosit fonksiyonlarının incelendiği deneylerde ortam olarak serum kullanılmaktadır^{42,54,55,111}. Otolog veya homolog serum kullanılmasının deney sonuçlarını etkilemediği gösterilmiştir¹¹². Bu bakımdan daha pratik olması sebebiyle deney ortamı olarak homolog serum kullanılmıştır.

Çalışma süresince protein miktarları coomassie-brillant blue G-250 metoduyla belirlenmiştir. Bu yöntem, proteine coomassie-brillant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorptans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (yaklaşık 2 dakika). Protein boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır¹¹³. Biyokimyasal araştırmalarda protein tayini için kullanılan Lowry yöntemine coomassie-brillant blue yöntemini tercih etmemizin sebebi, kullandığımız medonun çok kısa zaman alması ve diğer metodları bozan bir çok faktörden etkilenmemesidir. Biüret yönteminin hassasiyeti azdır (0.25-20 mg), Lowry metodunda ise her tayin öncesinde standart çalışması gerekmektedir^{114,115}.

İlk tesbit edilen gliko protein hemoglobin olduğu için gliko protein tayini metodlarının çoğu hemoglobinin glikasyonuna yönelik olmuştur. Bu metodlar arasında kolon kromatografisi⁷⁴, agarjel elektroforezi¹¹⁶, elektrozoelektrik odaklama¹¹⁷, kolorimetrik metod¹¹⁸, immünoassay metodları¹¹⁹ ve afinite kromatografisi¹²⁰ sayılabilir. Bu metodlardan kolorimetrik metod

hariç diğer metodlar yalnızca hemoglobinin glikasyonuna hastır ve hemoglobinin glike altı birimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kolorimetrik metod ise genel anlamda glikasyona uğramış her tip proteini tayin edebilir. Çünkü bu metod proteinlerdeki bazı amino grupları ile heksozların yapmış olduğu "ketoamin" bağlarına hassastır. Metodun esası şöyledir: glukoz proteine bağlanarak bir ketoamin oluşturur. Oluşan ketoamin alkali şartlar altında bir tetrazolium boyasını indirger, indirgenme sonucunda açığa çıkan renk spektrofotometre de okunur.

Bu amaçla araştırmamızda Glyco-PROBETTM GSP glikasyon tayin kiti kullanılarak glikasyona uğramış proteinler mMFructozamin/100 ml cinsinden tayin edilmiştir. Glike proteinlerin tayininde kullanılan bu metodun kromatografik ve elektroforetik metodlara göre numunelerin uzun süre saklanması halinde sonuçların etkilenmemesi, bütün proteinlerin glikasyonunun tayin edilebilmesi, sonuçların tetrarlanabilmesi, kolay standardize edilebilmesi ve fazla zaman almaması gibi üstünlükleri vardır.

Tez kapsamında lökositler iki farklı şekilde çalışılmıştır. İlk olarak total lökosit çalışması yapılmış daha sonra da total lökositler granülositler ve monositler olarak iki altı gruba ayrılmıştır.

Hem total çalışmada hem de fraksiyonlandırılmış çalışmada hücrelerin dış perifer, iç perifer ve integral membran proteinleri ayrı ayrı izole edilmiş, değerleri okunmuş ve kontrol grubu ile hasta grubu birbirlerine karşı istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

Yaptığımız istatistiki hesaplamalar sonucunda total lökositlerde dış perifer ve iç perifer proteinlerinde mMFructozamin/mg protein oranlarında kontrol ve hasta grupları için istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmazken integral membran proteinlerin de istatistiki olarak çok önemli fark bulunmuştur ($P<0.00001$).

Yine aynı şekilde granülosit ve monositlerin dış perifer proteinlerinin mMFructozamin/mg protein oranlarında granülositlerde önemli ($p<0.01$), monositlerde ise çok önemli ($p<0.001$) fark gözlenirken iç perifer protein oranları mMFructozamin/mg protein önemsiz olarak bulunmuştur. Granülosit ve monositlerin integral membran proteinlerinin

mMFruktozamin/mg protein oranları her iki grupta da istatistiki açıdan çok önemli bulunmuştur (sırasıyla $P<0.00001$ ve $P<0.0001$).

Yapılan korelasyon hesaplamaları sonucunda dış perifer proteinlerinde total lökositlerin kontrol grubunda protein-glikasyon grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerde protein-mMFruktozamin ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerin ise protein-glikasyon grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur. Aynı şekilde dış perifer proteinlerinde total lökositlerde diabet grubunda glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerde protein-mMFruktozamin ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerde ise protein-mMFruktozamin ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur.

İç perifer proteinlerinde total lökositlerde kontrol grubunun protein-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerin protein-glikasyon ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerde ise protein-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur. Aynı şekilde iç perifer proteinlerde total lökositlerin diabet grubunda protein-glikasyon ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerde glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerde ise glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur.

İntegral membran proteinlerinde total lökositlerde kontrol grubunda protein-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerde glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerde ise glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur. Aynı şekilde integral membran proteinlerinde total lökositlerde diabet grubunda protein-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), granüositlerde protein-glikasyon ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), monositlerde ise protein-glikasyon ve glikasyon-mMFruktozamin grupları arasında çok önemli ($P<0.0001$), korelasyon bulunmuştur.

Bu sonuçlar lökosit fonksiyon bozukluğu ve bu bozukluğa bağlı olarak diabetli hastalarda görülen enfeksiyona yatkınlığın integral membran proteinlerinin glikasyonu ile bağıntılı olabileceğini göstermektedir.

Hücreler tanıma ve dış ortamla olan madde ve bilgi alışverişlerini membranlarına bağlı reseptörler vasıtasıyla gerçekleştirirler. Bu reseptörler protein olabileceği gibi (insülin röseptörü) bir lipid de olabilir (kolera toksini reseptörü). Proteinler glikelendiği zaman hücrenin yarıçapı genişler ve membran dış yüzeyinin kompozisyonu değişir.

Integral proteinler glikasyona maruz kaldığı zaman dış perifer proteinlerinin integral proteinlere tutunmak için yeterli uzaklığa gelmeleri engellenir. Aynı şekilde dış uyarıcıların reseptörlerine kavuşmaları ve yeterli uyarıyı oluşturmaları mümkün olmayabilir. Ayrıca glikelenen integral proteinlerin flip-flop hızları ve lateral hızları yavaşlar veya kaybolur bu durumda da membran asimetrikliğini kaybedip statik bir hal alabilir, membran akışkanlığı azalır bazen da tamamen yok olabilir. Bu durumda ise membran fonksiyonlarını kaybeder. Integral proteinler glikasyona maruz kaldığı zaman membranın transport fonksiyonlarını sağlayan "pomplar" ve "kapılar" da atıl duruma düşerler. Bu durumda ise hücre dışarıdan enerjiyi az aldığı veya hiç alamadığı için fonksiyonlarını kaybederek ölür. Lökositlerde bu fonksiyon kaybı meydana geldiği zaman diabetli hastalarda da enfeksiyona yatkınlık görülebilir.

Genel manada düşünülecek olursa integral proteinlerin glikasyona uğraması onların membran içindeki hareketlerinin yavaşlamasına dolayısı ile membran alışkanlığının azalmasına ve hücrenin fonksiyonlarının kaybolmasına yol açar. Membran fonksiyonları azalmış bir lökosit ise damar porlarından geçerken, yabancı partiküle yapışırken, yutarken ve sindirirken fonksiyon bozuklukları gösterebilir ve sonuçta da enfeksiyonları önlemek ve durdurmak fonksiyonları yavaşlayabilir veya durabilir her iki sonuçta da enfeksiyona yatkınlık meydana gelir.

Yapılan elektroforetik çalışmalarda gümüş boyaması ve coomassie - brillant blue R-250 boyaması teknikleri uygulandı. Gümüş boyamasında elektroforetik mobilitesi normal proteinlerden yüksek olan açık kırmızı kahverengi renkli bir gliko protein bandı gözlemlendi. Bu gözlem hemoglobinde gözlenen

literatür gözlemlerine de uymaktadır⁷³. Coomassie boyamasında ise 1,5 saat boyamadan sonra yine elektroforetik mobilitesi normal proteinlerden yüksek olan bir band gözlemlendi, fakat band jel renginin açılması basamağında kayboldu.

KAYNAKLAR

1. Finean, J.B., Coleman, R., Michell, R.H., 1978, Membranes and their cellular functions., Blackwell Scientific Pub., London, (2 nd ed.) p 42-67.
2. Palade, G.E., Farquhar, M.G., 1981, Cell biology. In pathophysiology: The biological principles of disease., WB Saunders Co, Philadelphia (L.H. Smith, S.O. Their ed.) p 1-56.
3. Hakamori, S., 1981, Glycopshingolipids in cellular interaction, diffenentiation and oncogenesis., Annu. Rev. Biochem., 50, 733-764.
4. Klenk, Z., 1942, *Physiol. Chem.* 235, 24, 1935; *Ibid.* 268, 50, 1941; *Ibid.* 273, 76.
5. Wolff, J., Winand, R.J., Kohn, L.D., 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 71, 3460 .
6. Heyningen, W.E., Carpenter, C.C.J., Pierce, N.F., Greenough, W.B., 1971, *J. Infect. Dis.*, 124, 415 .
7. Brady, R.O. and Kolodny, E.H., 1972, *In Progress In Medical Genetics.*, Grune & Stratton, New York, vol. 8, (A.G. Steinberg and A.G. Bearn, ed.) p 225.
8. Chapman, D., 1975, Lipid dynamics in cell membranes. In cell membranes: biochemistry, cell biology and pathology., Hospital Practise, New York, (G. Weissmann, R. Claiborne ed) p 13-22.
9. Quinn, A.J., Chapman, D., 1980, The dynamics of membrane structure., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 8, 1-117.
10. Kimelberg, H.K., 1977, The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. In dynamics aspects of cell surface organization., *Cell Surface Reviews*, Elsevier, Amsterdam, vol. 3, (G. Poste, G.L. Nicolson, ed.) p 205-293
11. Ansell, G.B., Hawthorne, J.N., Dawson, R.M.C., 1973, Form and function of phospholipids., Elsevier, Amsterdam (2 nd ed.).

12. Bretscher, M.S., Raff, M.C., 1975, Mammalian plasma membranes., *Nature* ,258,43-49.
13. Bangham, A.D., 1975, Models of cell membranes. In *cell membranes : biochemistry, cell biology and pathology.*, Hospital Practice , New York ,(G.Weismann, R.Claiborne, ed.) p 24-34 .
14. Poo, M., Cone, R.A., 1974, Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane., *Nature*, 247, 438-441.
15. Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes., *Science*, 175, 720-731.
16. Helenius, A., Simons, K., 1975, Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* ,415,29-79.
17. James, E., Lenard, R., Lenard, J., 1977, Membrane asymmetry., *Science*, 195, 743-753.
18. Zachowski, A., Dewaux, P.F., *Experientia*, 1990, 46, 644-656.
19. Branton, D., 1966, Fracture faces of frozen membranes., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 55, 1048-1056.
20. Mc Nutt, N.S., 1977, Freeze-Fracture techniques and applications to the structural analysis of the mammalian plasma membrane. In *dynamic aspect of cell surface organization.*, *Cell Surface Reviews*, Elsevier, Amsterdam, vol.3, (G.Poste, G.L.Nicolson, ed.) p 95-126.
21. Allison, A.C., et al., 1978, *Inflammation.*, Springer-Verlag, New York.
22. Askonas, B.A., Bancroft, G.J., 1984, Interaction of African Trypanosomes with the immune system., *Phil. Trans. R. Soc., London, [Biol]*, , 307, 41.
23. Barret, K.E., Metcalfe, D.D., 1984, Mast cell heterogeneity: Evidence and implications., *J. Clin. Immunol.*, 4, 253.

24. Bondue, H., Machin, D., Stryckmans, P. A., 1980, The leukocyte alkaline phosphatase in mature neutrophils of different ages., Scand. J. Hemat., 24, (1) 51-66.
25. Erat, G. L., 1980, "The Neutrophil" Handbook of Inflammation, New York, p 163-187.
26. Inwood, M. J., 1983, "Principles of Hematology" Raphael S. Lynch's Medical Laboratory Technology, WB Saunders Co., (4 th ed.) p 652.
27. Wintrobe, M. M., 1981, Clinical Hematology, Lea and Febiger, Philadelphia, (8 th ed.) p 199-202.
28. Mazur, A., Harrow, B., 1971, Textbook of Biochemistry, WB Saunders Co., Philadelphia, (10 th ed.) p 518.
29. Ünal, M., 1982, İnsan nötrofil granülositlerinden solubil NADH oksidaz enziminin izolasyonu ve bazı özelliklerinin araştırılması. Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
30. Torunoğlu, M., 1981, Dolaşım, solunum ve kan hastalıkları fizyopatolojisi., cilt 1, Ankara, (birinci baskı) s 325-363.
31. Iyen, Y. N., Islam, M. F., Quastel, J. H., 1961, Biochemical aspect of phagocytosis., Nature, 192, 535-541.
32. Guyton, A. C., 1977, "Kan hücreleri, bağışıklık ve kan hastalıkları (çeviren Bilge, M.), Fizyoloji (Textbook of Medical Physiology. 8 th. ed.), cilt 1, Ankara, Güven matbaası, (birinci baskı) s 32, 33, 107, 110.
33. Babior, G. L., et al., 1981, Arrangement of the respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil., J. Clin. Invest., 67, 1724.
34. Amman, A. I., Gudenberg, H. H., 1979, "Phagocytic dysfunction diseases" basic and clinical immunology., Lange Med. Pub., California, p 353-357.
35. Stossel, T. P., 1978, How do phagocyte eat?, Ann. Int. Med., 89, 398-402.

36. Winkelstein, J.A., Drahman, R.H., 1974, Phagocytosis : The normal process and its clinically significant abnormalities., Ped. Clin., Mosthern, 21, 441-565.
37. Tauber, A.T., 1981, Current views of neutrophil dysfunction., Am.J.Med., 70, 1237-1243.
38. Keller, H.U., Hess, M.W., Cottier, H., 1975, Physislogy of chemotaxis and random motility. , Sem. Hematol, 12, 47-57.
39. Smolen, J.E., 1978, "The Granulocyte : metabolic properties and mechanisms of lysosomal enzyme release", neutral of human polimorphonuclear leukocytes., Urban and Schwarzenberg, Baltimore, p 56-76.
40. Roit, I.M., 1980, Essential immunology, Blackwell Scientific Pub., (4 th ed.) p157-167.
41. Drutz, D.J., 1976, "Polimorphonuclear neutrophil leukocyte function", basic and cilinical immunology., Longe Med. Pub., California, p 58-70.
42. Stites, D.P., 1976, "Neutrophil function", basic and clinical immunology., Longe Med. Pub., Los Altos, California, p 58-70.
43. Millen, M.E., 1975, Pathology of chemotaxis and random motility., Sem.Hematol, 12, (1) 59.
44. Ward, P.A., Kreutzer, D.L., Senior, R.M., 1978, "The Modulation of leukotaxis by neutral proteases and other factors from neutrophils", neutral proteases of human PMN, biochemistry, physiology and climical significance., Urban and Schworzenberg., Baltimore, p 276-282.
45. Çetin, E.I., 1973, Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, Sermet Matbaası, İstanbul, (üçüncü baskı) s 183-190.

46. Babacan, M., 1983, İmmünolojiye giriş : Nonspesifik direnç., Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Ders Notları.
47. Özand, P., Laleli, Y., Karan, A., 1974, Lökosit fagositozunun biyokimyası üzerinde tartışma, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 17,(2).
48. Karan, A., 1976, İnsan polimorfnüveli lökositlerinden fagositoz esnasında ortama lizozomal enzimlerin salıverilişinin kinetiği ve oksalamin etkisi, Doçentlik tezi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara.
49. Weissmann, C., et al., 1971, Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles., J. Exp. Med., 134: 149.
50. Klebaraf, S.J., 1975, Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes., Sem. Hematol, 12, 117-142.
51. Erat, G.L., 1980, "The Neutrophil", Handbook of Inflammation, New York, p 163.
52. Banlı, O., Ünal, A., 1988, Dahiliye Ders Notları., Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, (ikinci baskı) s 153.
53. Thornton, G.F., 1971, Infections and diabetes., Med. Clin. North. Am., 55, (4) : 931-938.
54. Bugdad, J.D., Root, R.K., Bulger, R.J., 1974, Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes., Diabetes, 23, 9-15.
55. Nalan, C.M., Beatis, H.N., Bagdade, J.D., 1978, Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes., Diabetes, 27,(9) 889-894.
56. Disorders of neutrophil functions., 1974, Lancet, 7855, 438-440.
57. Mım, H.R., 1974, Impaired leukotactic responsiveness in patients with juvenile diabetes mellitus., Clin. Immunol Immunopathol, 32, 395-403.

58. Miller, M.E., Baker, L., 1972, Leukocyte functions in juvenil diabetes mellitus., J.Pediatr, 81, 979-982.
59. Mowat, A.G., Baum, J., 1971, Chemotaxis of polimorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus., N.Eng. J.Med., 284,621-626.
60. Senn, H.J., Jungi, W.F., 1975, Neutrophil migration in health and diseases., Sem.. Hematol, 12,27-45.
61. Ezer, G., 1981, "Nonspesifik bağışıklık", Immunoloji., İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul.
62. Baybee, J.D., Allison, F., 1964, Phagocytic and bactericidal capacity of polimorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus., J.Lab.Clin. Med., 64,1-13.
63. Crosby, B., Allison, F., 1966, Phagocytic and bactericidal capacity of polimorphonuclear leukocytes recovered from venous blood of human beings., Proc.Soc. Exp. Biol. Med., 123,660-664.
64. Tan, J.S., et al., 1974, Persistent neutrophil dysfunction in an adult., Am. J. Med., 57,251-258.
65. Cornell, R.P., 1981, RES hyperphagocytosis by rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus., Am.J. Physiol, 240,225-231.
66. Bagdade, J.D., Nielson, K.L., Bulger, R.J., 1972, Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients., Am.J. Med. Sci., 263 ,(6) 451-456.
67. Berken, A., Sherman, A., 1974, Reticuloendothelial system phagocytosis in diabetes mellitus., Diabetes ,23 ,(3) 218-220.
68. Koloğlu, S ve Ark., 1983, Temel Tedavi., Semih Matbaası, Ankara, (birinci baskı) s 1-31.
69. Mark, A.S., 1979, Diabetes Mellitus., Ped.Clin. North. Am., 26,149-169.

70. Howard, S.Z., 1971, Management of juvenil diabetes mellitus., CU Masby Co., Saint Louis ,(2 nd ed.) p 1-4.
71. Crowels, H.C., 1971, Diabetes Mellitus in childhood and adolescence., Med.. Clin. North. Am., 55, (4) 985.
72. Paschkis, K.E., Cantarow, A., et al., 1967, Endocrinology, Harper and Row Publisher, New York, (3 rd ed.) p 772-785.
73. Kunkel, H.G., Wallenius, G., 1955, New hemoglobins in normal adult blood, Science, 122, 288.
74. Allen, D.W., Schroeder, W.A., Balog, J., 1958, Observations on the choromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin a study of the effects of crystallization and chromatography in the heterogeneity and isoleucine content., J. Am. Chem. Soc., 80, 1628-1632.
75. Huismen, D.J., Dozy, A.M., 1962, Studies on the heterogeneity of hemoglobin V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathion., J. Lab. Clin. Med., 60, 302-319.
76. Rahbar, S., 1968, An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics., Clin. Chim. Acta., 22, 296-298.
77. Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, H.M., 1969, Studies of anusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus., Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 838-843.
78. Bunn, H.F., 1981, Nonenzymatic glycosylation of proteins: Relevance to diabetes., Am. J. Med., 70:, 325-330.
79. Monnier, V.M., Cerami, A., 1982, Nonenzymatic glycosylation and browning in diabetes and aging: Studies on lens proteins., Diabetes, 31, (3) 57-63.
80. McVery, B.A., Fischer, C., Hopp, A., et al., 1980, Production of pseudo diabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glycosylated proteins., Lancet, 1, 738-740.

81. Robins, S.P., Bailey, A.J., 1978, Age-related changes in collagen : the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 76-84.
82. Schnider, S.L., Kohn, R.R., 1980, Glycosylation of human collagen aging and diabetes mellitus., *J. Clin. Invest.*, 66, 1 179-1181.
83. Bailey, A.J., Robins, S.D., Tanner, M.J.A., 1976, Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane., *Biochem. Biophys. Acta*, 434, 51-57.
84. Miller, J.A., Gravalase, E., Bunn, H.F., 1980, Non-enzymatic glycosylation of red cell membrane proteins: Relevance to diabetes., *J. Clin. Invest.*, 65, 896-901.
85. Dalhofer, R., Wieland, O.H., 1979, Glycosylation of serum albumin: elevated glycosyl-albumin in diabetic patients., *FEBS Lett.*, 103, 282-286.
86. Day, J.F., Thorbe, S.R., Baynes, J.W., 1979, Non-enzymatically glycosylated albumin in vitro preparation and isolation from normal human serum., *J. Biol. Chem.*, 254, 595-597.
87. Shin, Y.S., Stern, C., Rucker, A.V., et al., 1984, Glycated hemoglobin and glycated albumin : evaluation of different methods in diabetic control., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22, (1) 47-51.
88. Yue, D.K., Morris, K., McLennan, S., et al., 1980, Glycosylation of plasma protein and its relation to glycosylated hemoglobin in diabetes., *Diabetes*, 29, 296-300.
89. Mc Farland, K.F., Cataloro, E.V., Day, J.F., et al., 1979, Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus., *Diabetes*, 28, 1011-1024.
90. Ladenson, J.H., Chan, K.M., 1985, Glycated hemoglobin and diabetes: a case and an overview of the subject. *Clin. Chem.*, 31, (6) 1067-1070.

- 91.Stevens,V.J.,Monnier,V.M.,Cerami,A.,1980-1981,Hemoglobin glycosylation as a model for modification of other proteins. *Tex. Rep.Biol.Med.*, 40,387-396.
- 92.Bunn,H.F.,1981,Non-enzymatic glycosylation of protein: a form of molecular aging., *Schweiz Med., Wochenschr* ,111, 1503-1507.
- 93.Bhagavan,M.V.,1978,*Biochemistry*, J.B.Lippicott Co., Philadelphia ,(2 nd ed.) p 324, 340-341.
- 94.Procedings of a conference on non-enzymatic glycosylation and browning reactions: their relevance to diabetes mellitus.,*Diabetes*, 31,(3), 1982.
- 95.Kohn,R.R.,Schnider,S.L.,1982,Glycosylation of human collagen.,*Diabetes*, 31,(3) 47-51.
- 96.Gonen,B.,Baezinger,J.,Schonfeld,G.,et al.,1981,Non-enzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro: Effect of cell-interactive properties., *Diabetes*, 30, 875-878.
- 97.Steinbrecher,U.P.,Witztum,J.L.,1984,Glycosylation of low density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism., *Diabetes*, 33,130-134.
- 98.Brownlee,M.,Vlassara,H.,Cerami,A.,1983,Non-enzymatic glycosylation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin., *Diabetes*, 32, 680-684.
- 99.Paisey,R.B.,Clamp,J.R.,Kent,M.J.C.,et al.,1984,Glycosylation of hair: possible measure of chronic hyperglycemia., *Br.Med.J.*, 288, 669-671.
- 100.Bakan,E.,Bakan,N.,1985,Glycosylation of nail in diabetics: Possible marker of long-term hyperglycemia., *Clin.Chim.Acta*, 147, 1-5.
- 101.Miller,J.A.,Gravallase,E.,Bunn,H.F.,1980,Non-enzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins., *J.Clin. Invest.*, 65,896-901.

- 102.Bakan,E.,1985,Diabetli hasta nötrofillerin de fagositik index ile plasma membran proteinlerinin glikolizlenmesi arasındaki ilişki.,Doktora tezi,Atatürk Üniversitesi,Tıp Fakültesi,Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- 103.Bakan,E.,1983,Erzurum ve çevresindeki sağlam şahıslarda nötrofil alkalen fosfotaz enzim seviyelerinin tesbiti, serum alkalen fosfatazı ile ilgisinin araştırılması ve lökositlerin glukoz tüketiminin tayin edilmesi., İhtisas Tezi, Atatürk Üniversitesi,Tıp Fakültesi,Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- 104.Kelmpner,M.S.,Grallin,J.I.,1978,Seperation and functional characterication of human neutrophil subpopulations., Blood, 51,659-669.
- 105.Fehr,J.,Grossmann,H.C.,1979,Disparity between circulating and marginating neutrophils., Am.J.Hematol., 7,(4) 369-379.
- 106.Borregaard,M.,Heiple,J.M.,Simons,E.R.,Clark,R.A.,1983,Subcellular localization of the cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation., J.Cell. Biol., 97,52.
- 107.Boyum,A.,1968,Seperation of leukocytes from blood and bone marrow.,Scand. J.Clin.Lab.Invest., 21,97,77.
- 108.English,D.,Andersen,B.R.,1974,Single-step seperation of red blood cells. granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficollhypaque.,J.Immunol Methods, 5,249.
- 109.Bradford,M.M.,1976,A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding., Anal. Biochem., 72,248.
- 110.Laemli,D.K.,1970,Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4, Nature ,London, 227.
- 111.Snecador,G.W., Cochran, W.G.,1971, Statistical methods, Iowa,(4 nd ed.) p 102-198.

- 112.Soldberg,C.O.,1972,Neutrophil granulocyte function in bacterial infections., Lancet 7,727.
- 113.Tan,J.S.,Anderson,J.I.,Phair,J.P.,1975, Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus., J.Lab. Clin. Med., 85,(1) 28-35.
- 114.Bradford,M.M.,1976,A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., Anal. Biochem., 72, 248.
- 115.Jaenicke,L.,1984,Proteinbestimmung,Einführung in the Praxis des Biochemikers., Köln, p 27.
- 116.Rendina,G.,Quantitative determination of protein by the biuret reaction., Experimental methods in modern biochemistry. W.B. Saunders Co., London, p 75.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ