

FARKLI DOKU ÖRNEKLERİNİN KOLLAGEN VE ELASTİN ORANLARI

Güldal KIRKALI, Sedef YENİCE, Mahmoud DJAVANI, Gül GÜNER, Hüseyin T.SESSİZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Kollagen ve elastin, bağ dokusunun temel yapısal bileşenleridir. Bu çalışmada, elastin kaynağı olarak, 10 adet sığır ligamentum nuchae'sı, 10 adet sağlıklı sığır aortası, ayrıca otopsi sırasında alınan 15 adet normal ve 11 adet aterosklerotik insan aorta thoracica'sı kullanıldı. Bu dokuların kollagen ve elastin içerikleri saptandı. Kollagen ve elastin, sırası ile Tougaard ve Balo Banga yöntemleri ile izole edildi. Sonuçların değerlendirilmesinde, aterosklerotik aorta'nın elastin içeriğinin esnekliğin azalışına paralel olarak düştüğü, buna karşılık, kollagen düzeyinde artma olduğu saptandı. Doku örneklerinde kollagen ve elastin düzeylerinin belirlenmesinin, bağ dokusundaki sentez/yıkılım dengesinin aydınlatılmasında önemli olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kollagen, elastin, aorta, ligamentum nuchae

SUMMARY

Collagen and elastin, are the key structural components of the connective tissue. In this study 10 bovin, ligamentum nuchae and 10 thoracic aortas, as well as 15 human thoracic normal and 11 atherosclerotic aortas obtained at autopsy, constituted the collagen and elastin sources. Collagen and elastin were isolated by the methods of Tougaard et al. and Balo Banga, respectively. We found that elastin content of the atherosclerotic aorta was decreased, parallel to decreased elasticity; in contrast, collagen content was increased. We believe that determining collagen and elastin contents may give an insight into the understanding of synthesis/degradation balance in connective tissues.

Key words: Collagen, elastin, aorta, ligamentum nuchae

Son yıllarda romatizma, ateroskleroz, yaşa bağlı dejenerasyon ve daha birçok patolojilerin araştırılmasında, olayın moleküler temeline inme zorunluluğu ile karşılaşmış, başta elastin ve kollagen olmak üzere bağ dokusu bileşenlerinin aydınlatılması ön plana çıkmıştır (1). Normal ve

patolojik bağ dokusu içeriğinde elastin ve kollagen düzeylerinin saptanması, bu iki proteine özgü sentez yıkılım dengesi ile dokunun sağlığı ve devamlılığına ilişkin aydınlatıcı bilgiler verilebilmektedir(1,2,3).

Bu çalışmada, değişik canlı türlerinin normal ve patolojik dokularından elde edilen örneklerde saptanan kollagen ve elastin oranları birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Elastin ve kollagen kaynağı olarak 10 adet sığır ligamentum nuchae'sı 10 adet sağlıklı sığır aorta thoracica'sı ile otopsi sırasında alınan 15 adet normal ve 11 adet aterosklerotik insan aorta thoracica'sı kullanıldı. Doku örnekleri makroskopik olarak yağlarından temizlendikten sonra ince doğranarak 3-4 kez kıyma makinasından geçirildi. Böylece elde edilen doku materyali yağsızlandırılma amacı ile aseton ve eter ile çalkalanarak 24 saat bekletildi. Bu şekilde sudan ve yağdan arınmış örnekler vakumlu etüvde 250mmHg altında kurutuldu. Kahve değirmeninde çekilmek suretiyle, yağsız aorta ve ligamentum nuchae tozları elde edilerek, doku pool'leri oluşturuldu.

Kollagen düzeyinin belirlenmesi: Kollagen düzeyi, hidroksiprolin (Hyp) analizi ile belirlendi. Kimyasal olarak kollagen molekülü, bileşiminde bulunan hidroksiprolin ile karakterizedir. Bu amino asidin kollagen'in bileşiminde %13,5 oranında bulunması ve diğer bağ dokusu proteinlerinden yalnız elastinde %1 oranında yer alıp diğerlerinde hiç saptanmaması bu amino asidin kollagen düzeyinin belirlenmesi amacıyla kullanılmasını olası kılmaktadır. Yağsız ve kuru doku örneklerinden alınan 10-30mg'lık örnekler 6N HCl ve 105°C'de 12-20 saat süre ile hidroliz edildi. Hidrolizattaki total kollagen içeriği, hidroksiprolinin Tougaard(4) yöntemine göre spektrofotometrik olarak saptandı. Yöntem, hidroksiprolin pirole okside olup, p dimetilaminobenzaldehid ile kırmızı renkli bir kompleks oluş-

turması ilkesine dayanmaktadır.

Standart eğrinin hazırlanmasında, 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.4mM, 0.6mM ve 0.8mM konsantrasyonlarında hidroksiprolin kullanıldı. Hidroksiprolinden kollagene geçiş, Neuman ve Logan'ın 7.46 faktöründen yararlanılarak sağlandı ve sonuçlar %g kollagen olarak verildi.

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

Elastin düzeyinin belirlenmesi: Dokudan elastin dışındaki bileşenlerin 0.1 N NaOH ile 98°C'de 60 dakika ısıtılarak çözündürülmesi ve çözündürme işlemine dayanıklı olan elastin'in ayrıştırılması esasına dayanan Balo ve Banga (5) yöntemi temel alındı. Kaynatma işlemi sonunda çözelti oda sıcaklığında iki saat kadar bekletildikten sonra, süpernatant atıldı. Çökelti nüçeye alınarak, vakum pompası yardımı ile, alttaki sıvı alkali reaksiyon vermeyinceye kadar distile su, ardından üç kez %96'lık etil alkol geçirilerek yıkandı. Daha sonra, örnekler, vakumlu etüvde, 300 mm Hg basınç altında 48 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda kuruyan örnekler, kahve değirmeninde öğütülerek elastin elde edildi. Sonuçlar % g olarak verildi.

BULGULAR

Dokulardaki total kollagen içeriği, her örnek ikişer kez çalışılıp ortalama değerler alınarak, Tablo I'de; tüm örnek doku tozlarının, 25'er g'lık bölümlerinden alkali ile ısıtma yöntemi uygulanarak elde edilen saf elastinlerin kuru ağırlık ve

yüzde oranları, Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I. Doku örneklerinde total kollagen oranları.

Yağsız kuru doku örneği	Total kollagen (% g)
Sığır aortası	22
Sığır ligamentum nuchae	19
İnsan normal aortası	23
İnsan aterosklerotik aortası	29

Tablo II. Doku örneklerinde total elastin oranları.

Yağsız kuru doku örneği	Total Elastin (% g)
Sığır aortası	51
Sığır Ligamentum nuchae	69
İnsan normal aortası	47
İnsan aterosklerotik aortası	39

TARTIŞMA

Kollagen bağ dokusuna yapısal kuvvet sağlayan, elastin ise esneklik özelliği veren iki skleroproteindir. Çalışmada kantitatif kollagen düzeyi, hidroksprolin analizi ile belirlendi. Hidroksprolinin kollagende %13 oranında bulunması ve

öteki bağ dokusu proteinlerinden yalnız elastinde %1 düzeyinde bulunması bu amino asidin kollagen tayininde kullanılmasına olanak vermektedir (6).

Elastin'in elde edilmesinde ise en büyük zorluk, elastin'in dokuda anatomik ve histolojik açıdan yakın ilişki içinde bulunduğu proteinler, proteoglikanlar ve bağ dokusu elemanlarından ayrılmasıdır(7). Kollagen, düşük sıcaklıkta baz ve seyreltik asitlerin etkilerine karşı dirençli olduğu halde, sıcak seyreltik asid, derişik formik asid veya nötral pH'da tekrarlanan otoklavlanmanın etkisi ile kolayca çözünmektedir. Elastin'in elde edilmesinde kullanılan yöntemlerden(5,8,9,10) bir kısmı, elastin'in yabancı maddelerden arıtılmasında yeterli olmamakta veya yöntem gereği ortama katılan maddenin (Tripsin, kollagenaz gibi) daha sonra uzaklaştırılması gibi verimliliği azaltıcı ikinci bir işlemi gerektirmekte,diğer bir kısmı ise, elastik dokunun temel ünitesi olan elastini de yıkmaktadır(7). Elastin'in bağ dokusundan elde edilmesinde kullanılan standart yöntem, Balo ve Bango (5) tarafından ortaya atılıp, Lansing et al.(8) tarafından geliştirilen, yüksek oranda saf elastin verdiği bir çok araştırmacı tarafından doğrulanan alkali ile ısıtma yöntemidir (8,11,12,13). Çalışmada bu yöntemi seçmekle çeşitli dokulardan elde ettiğimiz elastinlerin yağsız doku tozunun kuru ağırlığının yüzde miktarı olarak %39-69 arasında değiştiğini gözledik (Tablo II). Bu değerler literatürde rastlanılan %35-70 sınırları ile paralellik göstermektedir(14). Bu yöntem ile elde ettiğimiz elastinler üzerinde, saflık kontrolü için yaptığımız çalışmalarda(15) elastin saflığının %99 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda incelediğimiz dokuları bir "pool" oluşturmak suretiyle değerlendirmeye aldık. Bu

yaklaşım, özellikle temel doku çalışmalarında, birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir. Bu şekilde, çalışılan doku kitlesinin ve dolayısıyla elde edilen protein miktarının artırılması gerçekleştirilmekte ve sonuçların doku için daha özgün ve homojen nitelik kazanması sağlanmış olmaktadır. Buna karşın, çalışılan pool'de istatistiksel değerlendirmeye gidilememektedir(16,17). Normal aorta dokusunda kollagen yüzdesi, canlı türleri arasında (insan/sığır) anlamlı değişiklik göstermemekte, buna karşılık elastin yönünden farklılık oluşmaktadır. Sığır aorta elastini'nin kuru dokuya oranı, insan aorta elastininden daha fazladır. Bunun nedeni, bazı araştırmacılar tarafından, yüksek sistolik basınçlı sığırda, aorta'nın bu basıncı karşılayabilmesi için daha esnek bir yapıya, dolayısıyla daha fazla elastin içeren aortaya sahip olması ile açıklanmaktadır(18).

Diğer taraftan, aterosklerotik insan aortası, normale göre, daha yüksek kollagen oranı gösterirken, elastin düzeyinde düşme gözlenmektedir. Esnekliğin azalışının nedeni olan elastin düzeyindeki düşme, kollagen düzeyindeki artma ile karşılanmaktadır. Aterosklerotik aortadan elde edilen elastin'in amino asit bileşiminde, aspartik asid, glutamik asid ve arginin gibi polar amino asitlerin, normal aorta elastini'ne göre yüksek olduğu bildirilmiştir(19,20). Bazı araştırma grupları, amino asit bileşimindeki bu farklılığın, yeni ancak defektli bir elastin'in, bozulmuş elastik dokuda yer almasından oluştuğunu savunmaktadır (21,22).

Sonuç olarak, doku örneklerinde, bağ dokusu skleroproteinleri olan kollagen ve elastin düzeyinin belirlenmesinin, sentez/yıkılım dengesi ile ilgili aydınlatıcı bilgiler verdiği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Armentano RL, Levenson J, Barra JG, et al. Assessment of elastin and collagen contribution to aortic elasticity in conscious dogs. *Am J Physiol* 1991; 260: H 1870-7.
2. Güner G. Sığır aorta elastini'nin etanol-hidroklorik asid ile elde edilen kısa süreli hidroliz ürününün (çözünür elastin türevi- Ç.E.T) antijenik özellikleri. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 1980.
3. Bilgin G. Değişik canlı türlerinin normal, patolojik dokularından elde edilen elastin ve çözünür türevlerinin bazı yapısal özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 1990.
4. Tougaard L. The degree of mineralization in bone tissue. The phosphorus/hydroxyproline ratio determined on small amount of bone tissue. *Scand J Clin Lab Invest* 1973; 32: 351-5.
5. Banga I, Balo J, Harvath M. Nephelometric determination of elastase activity and method for elastoproteolytic measurements. *Biochem J* 1959; 71: 544-51.
6. Djavani M. Alloksan-diyabetli ve sağlıklı tavşanların çeşitli dokularında total, tip I ve tip III kollagenlerin bazı yapısal özelliklerinin karşılıklı incelenmesi. Doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 1991.

7. Gerber GF, Anwar RA. Comparative studies of the cross-linked regions of elastin from ligamentum nuchae and bovine porcine and human aorta. *Biochem J* 1975; 149: 685-95.
8. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex Dempsey EW. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec* 1952; 114: 555-72.
9. Stone PJ, Morris SM, Martin BM. Repair of protease-damaged elastin in neonatal rat aortic smooth muscle cell cultured. *J Clin Invest* 1988; 82: 1644-54.
10. Rasmussen BL, Bruenger E, Sandberg LB. A new method for purification of mature elastin. *Anal Biochem* 1975; 64: 225-9.
11. Robert B, Robert L, Robert AM. Elastin, elastase et arteriosclerose. *Pathol Biol* 1974; 22(8): 661-9.
12. John R, Thomas J. Chemical composition of elastins isolated from aortas and pulmonary tissues of humans of different ages. *Biochem J* 1972; 127: 261-9.
13. Yenice S. Çeşitli türlerde, ligamentum nuchae ve aorta'dan elde edilen çözünür elastin türevleri'nin antijenik özellikleri üzerinde çalışmalar. Doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 1992.
14. Andreotti L, Bussotti M, Cammelli D. Aortic connective tissue in atherosclerotic aorta. A Biochemical study. *Angiology* 1986; 37: 735-43.
15. Kırkalı (Bilgin) G, Güner G, Djavani M. A method of increasing the purity of soluble elastin obtained by partial hydrolysis from aortic tissue of various species. *Marmara Medical Journal* 1992; 5(1): 7-13.
16. Jones PA, DeClerck YA. Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res* 1980; 40: 3222-7.
17. Meehan RP, Lange G. Antibodies to insoluble and solubilized elastin. *Methods Enzymol* 1982; 82: 744-65.
18. Jacob MP, Robert L. Isolation characterization and biochemical properties of elastin. In: Robert L, Homebeck W., ed. *Elastin and Elastases*, Florida; CRC Press 1989; 1: 49-62.
19. Güner G. Molecular and immunological characteristics of normal and atherosclerotic human aorta elastin. *Türk J Med Biol Res* 1992; 3: 127-20.
20. Kırkalı (Bilgin) G, Güner G, Djavani M. Amino acid composition of elastin purified from bovine and human aortas. *Med Sci Res* 1991; 19: 545.
21. Hollander W, Colombo M, Faris B, et al. Changes in the connective tissue proteins, glycosaminoglycans, and calcium in the arteries of the cynomolgus monkey during atherosclerotic induction and regression. *Atherosclerosis* 1984; 51: 89.
22. Podet EJ, Shaffer DR, Gianturco SH, et al. Interaction of low density lipoproteins with human aortic elastin. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991; 11: 116-22.