

38101

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**YAŞLANMA VE DİABET ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ERİTROSİT MEMBRAN DEĞİŞİKLİKLERİ
AÇISINDAN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ahmet ÖZAYDIN

DANIŞMAN: Doç.Dr.Gönül SULTUYBEK

İstanbul - 1994

Tezimin hazırlanması esnasında başından itibaren değerli katkılarıyla, sabırla beni yönlendirip, motive eden, ihtiyaç duyduğum her türlü imkanı temin eden danışmanım Sayın Doç.Dr.Gönül Sultıybek'e;

Bölümümüzün bütün imkanlarından en geniş şekilde faydalandıran ve huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, destek ve teşviğini her zaman gördüğüm muhterem hocam Prof.Dr.Asım Cenani'ye;

Çalışmalarımız için gerekli alet, madde ve vakaların temininde hiçbir yardımı esirgemeyen ve fikirleriyle yol gösteren Sayın Prof.Dr.Vecdet Tezcan'a;

Araştırdığımız diabetik ve yaşlı vakaları sağlayıp kontrollerini yaparak özveride bulunan Endokrinoloji ve Geriatri servislerinin değerli doktor ve hemşirelerine;

Tezimi hazırlarken bana hem çalışma hem de fikirleriyle büyük yardımları olan İlhan Onaran ve Mehmet Güven'in şahsında bütün sevgili vefakar çalışma arkadaşlarıma;

Özellikle bana yardım için kanlarını feda eden bütün cefakar hasta, gönüllü ve arkadaşlarıma en içten duygularla teşekkür etmeyi borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

| | | |
|----------|---|----|
| I. | GİRİŞ | 1 |
| II. | GENEL BİLGİLER | 3 |
| 1. | YAŞLANMA VE YAŞLANMA TEORİLERİ | 3 |
| 1.1. | Somatik Mutasyon Teorisi | 4 |
| 1.2. | Gelişim-Genetik Teorisi | 5 |
| 1.2.A. | Serbest Radikal Teorisi | 6 |
| 2. | ERİTROSİT YAPISI | 7 |
| 2.1. | Eritrositlerde Membran Lipid Dağılımı | 8 |
| 2.2. | Eritrositlerde Lipid Döngüsü | 11 |
| 2.3. | Eritrosit Membran Proteinleri | 11 |
| 2.3.A. | Periferal Membran Proteinleri | 13 |
| 2.3.A.a. | Spektrin (Band 1-2) | 14 |
| 2.3.A.b. | Ankirin | 15 |
| 2.3.A.c. | Protein 4.1 | 15 |
| 2.3.A.d. | Protein 4.2 | 16 |
| 2.3.A.e. | Aktin | 16 |
| 2.3.A.f. | Adducin | 16 |
| 2.3.B. | İntegral Membran Proteinleri | 16 |
| 2.3.B.a. | Protein 3 (Anyon Kanalı) | 17 |
| 2.3.B.b. | Band 4.5 (Glukoz Transporteri) | 17 |
| 2.3.B.c. | Eritrositlerde Glukoz Transportu | 18 |
| 2.3.B.d. | Glikoforinler | 19 |
| 3. | ERİTROSİTLERDE SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ | 19 |
| 4. | PROTEİN OKSİDASYON VE GLİKASYONU | 28 |
| 5. | ERİTROSİT YAŞLANMASI | 29 |
| III. | MATERYAL VE METOD | 32 |
| 1. | MATERYALLER | 32 |
| 1.1. | Çalışmada Kullanılan Denekler | 32 |
| 1.2. | Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler | 33 |
| 1.3. | Çalışmada Kullanılan Çözelti ve Kimyasal Maddeler | 33 |
| 1.3.A. | Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler | 33 |
| 1.3.B. | Çalışmada Kullanılan Çözeltiler | 34 |
| 2. | UYGULANAN METODLAR | 35 |
| 2.1. | Eritrositlerde Lipid Peroksidasyon (% MDA) Tayini | 35 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2. | Eritrosit Glutasyon (GSH) Tayini | 36 |
| 2.3. | Eritrosit Membranlarının (Ghost) Eldesi | 36 |
| 2.4. | Lowry Yöntemi İle Ghost'larda Protein Tayini | 36 |
| 2.5. | (SDS-PAGE) Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez | 37 |
| 2.5.A. | Jelin Hazırlanışı | 37 |
| 2.5.B. | Elektrofrez İşlemi | 38 |
| 2.5.B.a. | Coomassie Blue ile Proteinlerin Boyanması | 39 |
| 2.5.B.b. | Membran Glikoproteinlerinin Boyanması | 39 |
| 2.6. | Eritrositlerde -C ¹⁴ Glukoz Transport Tayini | 40 |
| 2.7. | (TLC) İnce Tabaka Kromatografisi | 40 |
| 2.7.A. | Zar Lipit Ekstresinin Hazırlanması | 40 |
| 2.7.B. | Kromatografi Tanklarının Hazırlanması | 41 |
| IV. | BULGULAR | 42 |
| V. | TARTIŞMA | 53 |
| VI. | ÖZET | 58 |
| | SUMMARY | 60 |
| | KAYNAKLAR | 62 |

I. G İ R İ Ő

Yaşlanma, ilerleyen yaşla birlikte, çeşitli iç ve dış etkilere karşı artan hassasiyet ve bu etkilerin zamanla progressif birikiminin sonucudur(65,75). Bu konuda çok çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle Harman'ın yaşlanmayla serbest radikaller arasındaki ilişkiyi ortaya atan teorisi, hücre ve organizmada radikal birikiminin rol oynadığı hasar üzerine dikkat çekmektedir(52,53). Hem nükleer hem de sitoplazmik komponentlerde progressif bir bozulmaya sebep olan serbest radikal hasarı yaşam boyu meydana gelir ve sonuçta bu hücre hasarı yaşlanmaya neden olur(54,86,111). Yaşlanmada olduğu gibi, diabette de yüksek glikoz düzeyleri nedeniyle benzer etkiler görülmektedir. Zira, hiperglisemi lipid peroksidasyonuna yol açarak, hücrelerde büyük hasarlara ve frajiliteye neden olur(60,61,94).

Eritrosit, bu tür etkilerin araştırılması için en uygun model sistemdir. Eritrosit membranında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve kolay okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal hasarına açıktır. Eritrosit, maruz kaldığı serbest radikal hasarına karşı kendisini müdafaa edecek mekanizmalara sahiptir. Nükleus gibi organellerden mahrum olan, transkripsiyon işlemini gerçekleştiremeyen eritrositlerde protein sentezi yapılamadığı için bu hücreler yaşlanma ve diabet gibi olayların membran yapısı üzerindeki etkilerinin en iyi şekilde incelendiği hücre sistemleridir(2,21,65,94).

Bu tezin amacı; Tip 2 diabet ve yaşlılarda serbest radikal oluşunun membran üzerine etkileri incelemeye yöneliktir. Böylece yaşlanma ve diabet ile oluşan membran değişikliğine biyokimyasal bir açıklama getirilebileceği düşünülmektedir.



II. GENEL BİLGİLER

1. YAŞLANMA VE YAŞLANMA TEORİLERİ

Yaşlanma, ilerleyen yaşla birlikte, çeşitli çevresel değişikliklere karşı artan hassasiyet ve bu etkilerin zamanla progressif birikiminin bir sonucudur(52,81).

Buna göre yaşlanma, damar duvarlarında meydana gelen değişimler sonucu ateroskleroz, kemik metabolizmasında oluşan bozukluklara bağlı osteoporoz, yaşa bağlı olarak görülen endokrin değişiklikler ile bu değişikliklerin yol açtığı patolojik ve fizyolojik sonuçlar olarak tanımlanabilir.

Yaşlanma biyolojisi çalışmalarının 2500 yıl öncesine kadar giden uzun bir geçmişi vardır. Yaşlılık araştırmalarının esas döneminin 20. yüzyıl ile birlikte başladığı kabul edilmelidir. İlk araştırmacılarca yaşlanmanın, barsak bakterilerinden toksinlerin sürekli absorpsiyonunun bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür(31).

Gerontolojinin modern periyodu, yaşlılık fenotipinin fizyoloji, biyokimya ve hücre morfolojisine göre tanımlandığı sistematik çalışmalar 1950 yıllarında başlamıştır(28). Deneysel yaklaşımlardaki bu ilerlemeler birçok hipotezlere yol açmıştır.

Genel teorilerin esasını immun sistem, nöroendokrin sistem, somatik mutasyonlar, DNA tamirinde bozukluklar, protein sentezindeki hatalar, toksik ürünlerin birikimi, serbest radikallerin rastgele hasarı ve diğerlerini kapsar. Sınıflandırılmış bu teoriler tek başlarına yaşlanmanın sebebini ya da mekanizmasını tanımlamakta yetersizdirler.

Yaşlanma tek bir olgu olmayıp, tek bir sebebi de yoktur. Yaşlanma için birçok teoriler ortaya konmuştur.

Yaşlanma bütün türlerde veya aynı türün bütün organizmalarında kesinlikle aynı yoldan meydana gelmez. Bir doku fonksiyonel kapasitesini hızla kaybederken diğerleri daha yavaş şekilde fonksiyonel kapasitelerini kaybeder.

Biyolojik yaşlanmayı tam olarak açıklayan bir teori yoktur. Çeşitli yazarlarca yaşlanma teorileri hakkında farklı sınıflandırma sistemleri kullanılmıştır. Bu teorileri temel kavramlarına göre 2 sınıfta toplamak mümkündür.

1.1. Somatik Mutasyon Teorisi:

İlk sınıf teorilere göre yaşlanma, çevresel etkilerin birikiminin bir sonucudur. Bu zararlı etkiler sonunda yaşamla bağdaşmayan bir duruma neden olur.

Bu sınıf teorilerin en spesifik örneğini "yaşlanmanın somatik mutasyon teorisi" oluşturur(40). Bu teori için temel deneysel kaynak; iyonize edici radyasyona maruz kalmanın ömrü kısalttığı gözlemdir. Kısa ömürlü bölünen bütün hücrelerde daha fazla kromozom aberasyonlarının görülmesi de bunu desteklemektedir(32).

Somatik mutasyon teorisine karşı sayısız itirazlar vardır. Radyasyonla ömrün kısalması, bu kısaltıcı mekanizmanın yaşlanmanın normal mekanizmasıyla ilişkili olup olmadığını kanıtlamaz. Genelde modern mole-

küler genetiğın ışığı altında bu teorinin tekrar araştırılması dikkate değer görünmektedir.

Bu teorilere ikinci örnek hata teorisidir. Protein sentezinde rastgele hatalar meydana gelmektedir; fakat hatalı protein molekölü yıkılacağından yaşam üzerinde olumsuz bir etki oluşturmaz. Eğer hata genetik materyal ile ilgiliyse; hatalı proteinler hızla artıp, hayat ve fonksiyonla bağdaşmayan "hata krizi" ile sonuçlanır.

Bu teorinin diğeri bir bağlantısı, DNA'nın hasar tamir mekanizmasında yaşlanma veya yaşlanma hızıyla ilişkili bir yavaşlama olmasıdır.

1.2. Gelişim - genetik teorisi

Gelişim-genetik teorileri olarak adlandırılan ikinci sınıf teorilerin temeli, yaşlanma sürecinin gelişimin ayrılmaz bir parçası olduğu, genetik olarak kontrol edildiği ve programlandığı düşüncesine dayanmaktadır. Gerontolojistlerin çoğunluğu maksimum ömür ve yaşlanma hızının intrinsik olarak düzenlendiği görüşündedirler. bunun en büyük desteği ise maksimum yaşam süresinin türlere özgü olması ve genetik olarak saptanması gerekliliğidir. Bu teorileri 4 grupta toplayabiliriz.

İlk grup, nöronların fonksiyonel faaliyetleri ve ilişkili hormonlarının yaşlanma sürecini kontrol ettiğini ileri sürer bu sistem üniversal değildir.

İkinci teoriye göre; her tür genetik materyalinin ve onun replikasyonunun doğruluğunu regüle eden spesifik bir genetik yapıya sahip olmalıdır(12).

Üçüncü teori immun sistemin hem fonksiyonel kapasitesinin, hem de doğruluğunun yaşla azaldığı gözlemlerine dayanmaktadır. Hayat süresinin (kısmen) MHC loküsü tarafından regüle edildiği ve bu loküsün superoksit dismutaz (SOD) ve multifonksiyoner oksidaz enzim düzeylerini

de düzenlediği ileri sürülmektedir.

1.2.A. Serbest radikal teorisi:

Gelişim-genetik teorisinin dördüncü örneğini serbest radikal teorisi oluşturur(52,53).

Metabolik hız ve yaşam süresi arasındaki muhtemel bir bağlantı; metabolik yollardan oluşmuş oksijen radikallerinin hücrelere zarar verip, sonunda onları öldürebilmeleridir. Bu düşünce, yaşlanma serbest radikal teorisi temelini oluşturur(54).

Serbest radikaller çiftleşmemiş bir elektrona sahip atom veya moleküllerdir. Bunlar kimyasal olarak metabolizmanın başlıca tek elektron transfer reaksiyonlarında oluşan oldukça reaktif türlerdir(31). Serbest radikaller süperoksit dismutaz (SOD) gibi koruyucu enzim sistemleri tarafından hızla yıkılırlar. Bu teoriye göre, bazı serbest radikaller yıkımdan kaçır ve biyolojik yapılarda birikerek önemli hasarlara neden olurlar. Hasarın birikimi hücre fonksiyonunu bozarak, nihayet ölüme sebep olur. Hücrede en yaygın radikal süperoksittir.

Bu hipotez içinde farklı alt hipotezler öne sürülmektedir:

Hipotez 1: Yaşlanma, tamiri imkansız serbest radikal hasarının birikiminin sonucudur. Bu hasarın birikimi homeostatik cevap mekanizmalarını iyice sınırlar ve çevrelerinin yolaçtığı çeşitli oksidatif stresleri daha fazla kompanse edemeyen bireyler sonunda ölüme kadar gider.

Bir oksidatif stresle mücadele eden organizmalar genellikle, metabolizma hızlarını azaltırlar. Bu ise serbest radikal oluşum hızında düşüşe yol açar.

Hipotez 2: Serbest radikaller genetik kontrollerin bozulmasına ve farklılaşmasının ortadan kalkmasına neden olurlar. Buna göre DNA regülatör mekanizmaları, serbest radikaller gibi çevresel faktörler tarafından

değiştirilir. Bu değişmeler ise, genom üzerindeki hücresel kontrolün kademe-
meli kaybıyla sonuçlanır. Bu sürece disdiferansiyasyon denir(33). Bu deği-
şiklikler mutasyonları içermez.

Hormon reseptörlerinin sayılarının azalması, anormal proteinle-
rin ortaya çıkışı, metaplazi sıklığının artışı farklı lenfosit subpopülasyonla-
rının görülmesi vb. disdiferansiyasyon örnekleridir.

Hipotez 3: Serbest radikaller hücresel yapılarda hasara yol açmak-
sızın yaşlanmaya neden olan gen ekspresyon değişikliklerini uyarırlar.

Serbest radikal generasyon hızındaki ani değişiklikler, gen eks-
presyonundaki değişiklikleri başlatan bir sinyal olabilir. Yaşlanma değişik-
liklerinin çoğu genetik olarak kontrol edilir; fakat bu değişiklikleri yöne-
ten genetik program hücresel oksidasyondaki yavaş yükselişler tarafından
tamamlanır(1,86,104).

Hürceler temel yaşayan birimlerdir. Bu nedenle organizmanın
yaşlanması hücrelerin yaşlanmasıyla yakından ilgili olmalıdır. Bir bireyde
çeşitli iç ve dış faktörlerin etkisiyle meydana gelen değişiklikler, aslında
onun çeşitli hücrelerinde oluşan değişikliklerin bir toplamından ibarettir.
Genç orgnaizmada hücreler homeostazisi koruyup etkin bir savunma ger-
çekleştirebiliyorken; organizmanın yaşlanmasıyla (genelde) etkilerin birik-
mesi sonucu hücrelerin fonksiyonları yavaşlar ve kompensasyonda yetersiz
kalırlar.

2. ERİTROSİT YAPISI

Memeli eritrositi yaşlanma çalışmaları için alışılmadık fakat
ilginç ve değerli bir modeldir(2). Yaşlanma ile birlikte eritrositte bazı
fiziksel ve kimyasal değişiklikler meydana gelir. Eritrosit, protein sentez
kapasitesinden yoksun olduğundan; membran proteinlerinde yaşa bağlı
değişikliklerin araştırılmasında uygun bir sistemdir. Aynı zamanda kolaylıkla
elde edilip, en iyi saflaştırılabilen memeli plazma membranı kaynağıdır.

Eritrositler, insan kanında ilk defa 1874'te Hollandalı Leeuwenhoek tarafından doğru olarak tanımlanmışlardır(71). Fonksiyonel önemleri ise, Hoppe Seyler Hemoglobinin oksijen bağlayıp-bırakma özelliğini gösterince ortaya konulmuştur.

Olgun insan eritrositi en fazla özelleşmiş hücrelerden biridir. Nukleus, mitokondri gibi organellerden mahrum olan bu hücreler, transkripsiyon işlemini gerçekleştiremez ve mitokondiyle ilişkili oksidatif reaksiyonları başaramazlar.

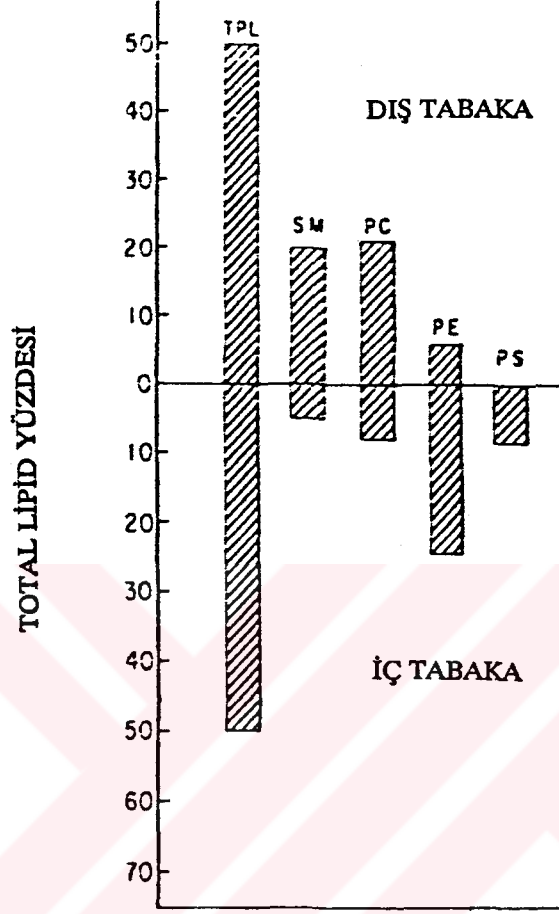
Sitoplazmik proteinin % 95'ten fazlası Hemoglobin (Hb)'dir. Geriye kalanlar, enerji üretimi için gerekli olanlar ile Hb'in fonksiyonel, indirgenmiş durumda kalmasını sağlayan enzimleri içerirler(71).

Eritrosit normal fizyolojik şartlar altında aşırı deformabilite gösterirken, membran integrasyonunu sürdürme kabiliyeti dikkat çekicidir.

Eritrosit membranları hakkında bilinenlerin çoğu hücrenin hemolizden sonra kalan çözünmeyen kısmıyla yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu materyale "stroma" denir. Şayet hemolizden sonra hücre sağlam kalıyorsa; "eritrosit ghostu" olarak adlandırılır ve membran komponentlerinin çoğunu içerir. PH ve ozmolariteyi ayarlamak suretiyle stroma ya da ghostlar hazırlamak mümkündür(37). Böyle preparasyonlar ağırlık olarak % 52 protein, % 40 lipid ve % 8 karbohidrat içerirler. Karbohidratların çoğunluğu glikoproteinlerin oligosakkarid kısmında bulunur, fakat küçük bir bölümü (% 7) glikolipidlerce taşınır(90,107).

2.1. Eritrositlerde Membran Lipid Dağılımı

Olgun eritrositteki lipidin hemen tamamı membranda bulunur(37). Eritrosit membran lipidleri yaklaşık eşit miktarlardaki fosfolipidler ve esterleşmemiş kolesterolden oluşur. Fosfolipidlerden: Fosfatidil kolin (PC) (lesitin), fosfatidil etanolamin (PE), sfingomiyelin (SM), fosfatidil serin (PS) membranının yapısında büyük miktarda bulunurlar (Şekil 1).



Şekil 1 : Eritrosit fosfolipidlerinin iç ve dış tabakaları arasındaki dağılımları. TPL= total fosfolipid, SM= Sfingomiyelin, PC= Fosfatidil kolin, PE, Fosfatidil etanol amin, PS, fosfatidil serin.

Fosfolipidler membranın iki lipid tabakası arasında asimetric dağılmışlardır(11,58,91). Aminofosfatidlerin (fosfatidil etanol amin, fosfatidil serin) ~ % 80'i membranın stoplazmik yüzünü döşerken; kolin içeren lipidler (fosfatidil kolin, sfingomiyelin) dış tabakanın temel bileşenleridir(71,116). Fosfatidil serine dışta hemen hiç rastlanmaz.

PE ve PS'in membranın iç kısmında bulunması biyolojik açıdan önemlidir. PS, kan koagülasyon şelalesinde hız artırıcı bir kofaktör olarak önemli rol oynar(74,118). Bu nedenle prokoagülant fosfolipidin dış tabakada olması, sürekli bir hiperkoagülabilite durumuna yol açabilir.

Dıştaki lipidlerin lateral mobilitesi, iç tabakadakilerden fazladır. Kolesterolün lipid mobilitesini sınırladığı biliniyorsa da(24) dıştaki kolesterol miktarı nisbi olarak fazladır(42).

İç tabakadaki lipidlerin hareketlilikleri fosfolipidlerin hücre iskelet proteinleriyle etkileşimleri nedeniyle sınırlandırılıyor olabilir(49).

Membran fosfolipidlerinde bulunan yağ asitleri de iki tabaka arasında eşit dağılmamışlardır(11,29,105). Poli doymamış yağ asitleri iç tabaka fosfolipidlerinde çoğunlukta; dışta bulunan fosfatidil kolin çoğunlukla kısa zincirli yağ asitlerini bağlar. Sfingomiyelinden zengin membranlar, lesitinli olanlara göre daha az akıcıdır(29).

Nötral eritrosit lipidi hemen tamamen serbest, esterleşmemiş kolesterol içerir(83). Kolesterol fosfolipidlerle etkileşerek "ara jel durumu" oluşturur. Bu nedenle membranlar daha az akıcı (viskoz) olurlar(30).

Bütün bunlar lipid mobilitesi ve membran deformabilitesi üzerine etkilidir. Eritrositlerin deformabilite kabiliyetleri oldukça yüksek olup; sirkülasyon esnasında gerektiğinde şekillerini değiştirebilirler(67). Normal deformabilitenin sürdürülmesi mikrosirkülasyonda eritrositlerin yaşaması için gereklidir(115).

İleri yaşlarda ve diabet hastalarında eritrositin fleksibilitesi ve yaşam süresi azalır(88,99).

Eritrositlerin deformabilitesi hücre membranı ve iç yapısının viskozitesine, hücre yüzey alanının hacme oranına ve membranın fiziksel özelliklerine bağlıdır(19,67,114).

Tam kan viskozitesi; a) Plazmanın içeriğine, b) Eritrositlerin iç viskozite ve de formabilitesine, c) hematokrite, d) hücre agregasyonuna bağlıdır(72,98).

Hücre içi elektrolit konsantrasyonu; özellikle hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu da eritrositlerin deformabilitesini etkiler.

Eritrositlerin osmotik fragilitesi, sirkülasyondaki eritrositlerin stabilite ve ömrünü belirleyen bir faktördür(67).

2.2. Eritrositlerde Lipid Döngüsü

Olgun eritrosit kendiliğinden lipid sentezleyemez. Bu nedenle herhangi bir lipid kaybı plazmayla karşılıklı değiş tokuş yaparak yenilenmek suretiyle kompanse edilmelidir(105). Kantitatif olarak bu yolların en önemlisi plazma lipoproteinlerinden eritrositlere kolesterol ve fosfatidil kolin transferidir(46).

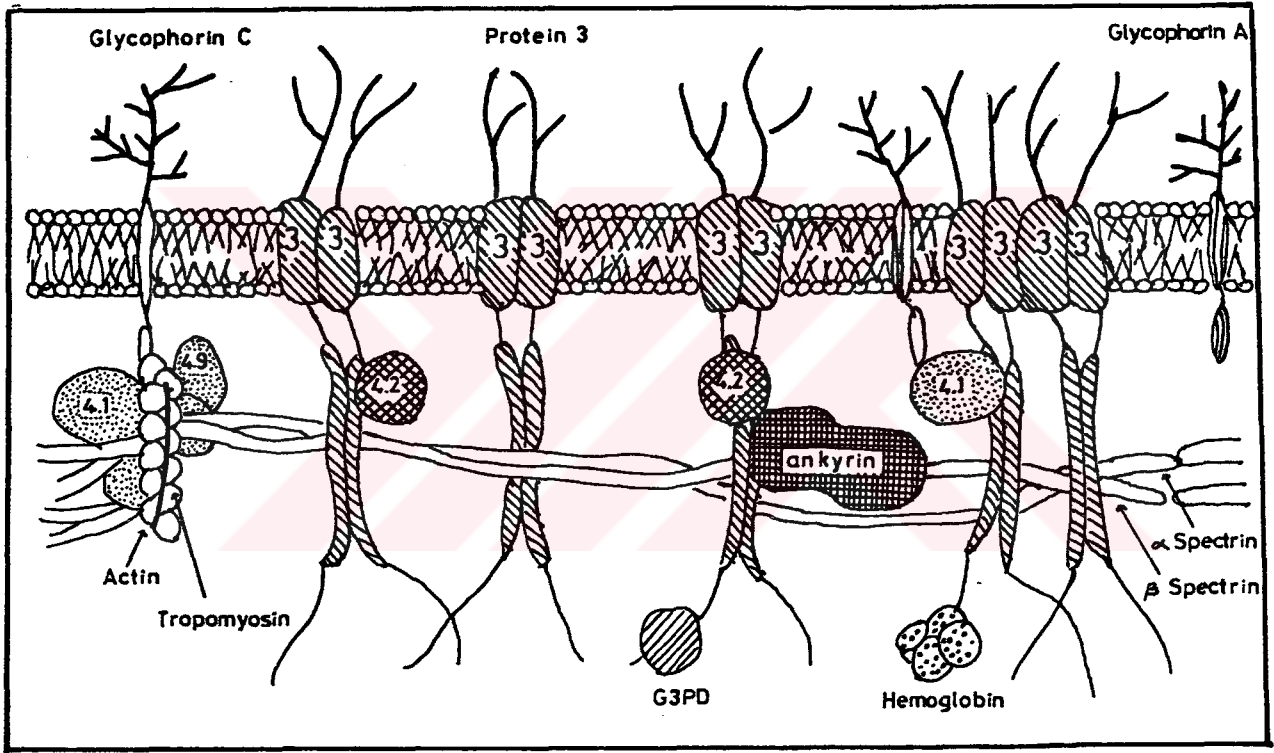
2.3. Eritrosit Membran Proteinleri

Eritrosit, stabil ve ortam şartlarına göre gerekli deformasyonu yapabilen bir membran yapısına ihtiyaç duyar(17,110). Bu ise, zar-iskelet yapısı tarafından sağlanır. Zar-iskelet yapısı, lipid çift tabakasının altında yer alan ve buraya protein-protein ve protein-lipid etkileşimleri ile bağlanan integral proteinlerin bir ağıdır(10,17,25). İntegral proteinlerle sitoplazmik yapısal proteinler arasındaki etkileşimin bazı özellikleri şunlardır.

- Hücrenin bir yüzeye yapışmasında rol oynar.
- Hücre içi organellerin hareketini sağlar.
- hücre yüzeyindeki zar proteinlerinin organizasyonunu belirler ve motiliteyi düzenler(101).

Bu proteinlerin eksikliği veya yapısal anormallığı, zarın gerilme kuvvetinin azalmasına, şeklinin bozulmasına, hücrenin parçalanarak yıkılmasına ve hemolitik anemilere yol açar.

Genel olarak kullanılan sınıflandırma sistemi, membran proteinlerini "integral membran proteinleri" ve "periferal membran proteinleri" kategorilerine ayırır(102).



Şekil 2 : Eritrosit membran proteinlerinin oluşturduğu zar-iskelet yapısı

İntegral membran proteinleri daha çok globular ve amfipatik olup, katlanmış üç boyutlu biçimlerinde bunlar ayrı hidrofilik ve hidrofobik bölgelere sahiptirler. Coomassie boyanabilen temel proteinlerden band 3 (anyon kanalı) ve band 7 integral membran proteinleridir. Bu proteinler bir veya daha fazla membranı geçen bölgeye sahiptirler. Band 3, bazıları oldukça glikozillenmiş olan pek çok ekstrasellüler bölgeye sahiptir. Band

7, küçük bir ekstrasellüler ve nispeten daha uzun bir sitoplazmik bölgeye sahip olup, hakkında fazla şey bilinmemektedir. Bütün diğer Coomassie boyanan bantlar ya hücre iskeletinin bir parçası olarak; ya da seyrek bir tarzda membranın iç yaprağına bağlanmak suretiyle hücre içine yerleşmişlerdir.

Bütün PAS (Periyodik Asit Schiff) boyanan proteinler integral membran proteinleridir (Tablo 1).

| <i>Elektroforetik Düzüm</i> | <i>Moleküler Ağırlık</i> | <i>% Protein</i> | <i>Adı</i> | <i>Membrandaki Durumu</i> |
|-----------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|
| 1 | 240.000 | 15 | Spectrin α | Peripheral |
| 2 | 225.000 | 15 | Spectrin β | Peripheral |
| 2.1 | 206.000 | 5 | Ankyrin | Peripheral |
| 2.2 | 190.000 | | | |
| 3 | 90-105.000 | 24 | Anion Channel | Integral |
| 4.1 | 78.000 | 4.2 | | |
| 4.2 | 72.000 | 5.0 | Protein kinase | |
| 4.5 | 45-75.000 | 5.0 | Glu.transporter | Integral |
| 5 | 43.000 | 4.5 | Actin | Peripheral |
| 6 | 35.000 | 5.5 | G-3PD | Peripheral |
| 7 | 29.000 | 3.4 | | |
| PAS-1 | 39.000 | 6.7 | Glycophorin A | Integral |
| PAS-2 | | | | |

Tablo 1 : Temel Membran Proteinleri

2.3.A. Periferel Membran Proteinleri

Periferel proteinler fosfatidil inozitoller sayesinde dış membran tabakasına tutunurlar. En bol bulunan periferel proteinler "spektrin-aktin-protein 4.1 hücre iskelet kompleksi"ni oluşturarak eritrosit membranının iç yüzeyini döşeyen bir iskelet protein ağını yaparlar. Kompleks, membran proteinlerinin % 35'ini meydana getirir. Bu iskelet ağı spektrin-ankirin etkileşimiyle içten band 3'e bağlanır.

2.3.A.a. Spektrin (band 1-2)

Eritrosit membran iskeletinin temel yapısal elemanı olan Spektrin, 240 kd'luk α zinciri ve 220 kd'luk β zincirinden oluşan, 0,1 μ M uzunluğunda heterodimerik filamentöz bir proteindir(26). SDS-PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) üzerinde Spektrin'in her iki formu birbirinin homoloğu olup, 160'şar A.A. tekrarından oluşmuşlardır. α -spektrin geni 1 krz, β -spektrin geni ise 14.krz. üzerinde bulunur(71).

Her bir spektrin molekülü kendi üzerinde 3 kez katlanır. α ve β zincirleri antiparalel çiftler oluştururlar. Bunlar ise uçlarından birleşerek tetramerleri yaparlar. Tetramerlerin kafes biçimindeki hücre iskeletine katılmaları için başka periferel proteinlerin etkileşimlerine ihtiyaç vardır. Başlıca membran bağlantısı β alt ünitesinin orta bölgesiyle ankirin arasında tetramerin orta bölgesinde gerçekleşir. Ankirin aracılığıyla anyon kanalının sitoplazmik bölgesine bağlanmış olur. Spektrin'in membranla diğer bağlantısı, moleküllerin uçlarında bulunan protein 4.1 aracılığıyla olur(6). Spektrin molekülleri, aktinle birleşerek uçlarında çapraz bağ yaparlar. Bu birleşme yerinde pekçok yardımcı protein bulunur. Protein 4.1 ve 4.9, adducin tropomiyozin, trombomodulin bu proteinlerdendir.

Spektrin ayrıca Ca^{++} 'a bağlı olarak düşük afiniteyle Kalmodulin'le birleşir.

Spektrin β alt ünitesinin karboksi bölgesinde 8 kD. triptik bölgeden fosforillenir. Spektrin kendiliğinden fosforillenebildiği gibi, kazein kinazlar veya cAMP'ye bağlı kinazlarca da fosforillendiği bildiriliyor. Fakat fosforillenmenin fonksiyonel önemi tam anlaşılamamıştır.

Diabetik eritrositlerde spektrin oksidatif hasar görür. Oksidatif hasardan protein glikasyonu sorumlu olabilir(93).

2.3.A.b. Ankirin

Ankirin olarak bilinen protein 2.1, membranın hücre iskeletine bağlanmasında yardımcı bir proteindir. Hücrede ~ 100.000 kopyası olup 206 kD ve 190 kD'luk iki şekli mevcuttur. Küçük formu band 2.2 olarak adlandırılır(71).

Ankirin, spektrin ile anyon kanalının sitoplazmik bölgesi arasında da yüksek afiniteli bir bağlantı sağlar.

Ankirin bağımsız olarak katlanmış 3 bölge içerir. Anyon kanalına bağlanan 89 kD'luk -NH₃ terminal bölge; spektrine bağlanan 42 kD'luk bölge ve bağlanma bölgelerinin aktivitelerini düzenleyen 55 kD'luk -COOH terminal regülatör bölge(6).

Protein 2.1'in -COOH ucundaki bir polipeptid mRNA'nın farklı işlenmesi nedeniyle protein 2.2'de yoktur. Bu nispeten küçük fark, ankirin spektrin ve band 3'e bağlanma afinitesini artırır.

2.3.A.C. Protein 4.1.

Protein 4.1, eritrosit başına ~ 200.000 kopyası bulunan 78 kD'luk bir proteindir. Protein 4.1 eritrosit membran iskeletinde çift fonksiyona sahiptir: Spektrin ve F-aktin arasındaki yüksek afiniteli bir bağlanmayı düzenler, ayrıca glikoforin ve band 3 ile olan ilişkileri sayesinde iskeleti membrana bağlayabilir(17,26). Ca⁺⁺ ve Kalmodulin'in normal membran stabilitesini sağlamalarında protein 4.1'in önemli fonksiyonu vardır(110).

Band 4.1. çeşitli kinazlar tarafından fosforillenir. Fosforilasyon genel olarak proteinin spektrine bağlanmasını ~ % 80, ve spektrin-aktin kompleks oluşumunu ise ~ % 90 azaltır, defosforilasyon ise bunları aksine güçlendirir.

2.3.A.d. Protein 4.2

Band 4.2 eritrosit membranının ana bileşenlerinden biri olup 72 kD ağırlığındadır. Protein kinaz olarak bilinir(71). Band 3'ün stoplazmik bölgesiyle birleşir. Ankirinle de birleşebilir. Band 4.2'nin fonksiyonu tam bilinmiyorsa da, bozukluğu veya eksikliği kalıtsal hemolitik anemilerin şiddetli tipleriyle ilişkilidir.

Band 4.2 normal olarak fosforillenmez(26).

2.3.A.e. Aktin

Band 5 olarak tanımlanan aktin, membran üzerinde çok bol bulunan (~ 1.5 milyon kopya), ~ 45 kD'luk bir proteindir. Eritrosit aktini, kas aktini gibi uzun filamentler şeklinde polimerize olabilir ve miyozin ATPaz aktivitesini uyarabilir(112). Bununla birlikte 12-17 ünitelik kısa oligomerler oluşturması muhtemeldir.

Aktin filamentleri α -zincirinin -COOH ve β -zincirinin -NH₂ uçlarının bulunduğu bölgede spektrin tetramerleriyle birleşirler. Bu birleşme yardımcı proteinlerin yokluğunda zayıf afiniteli bir etkileşimdir.

2.3.A.f. Adducin

Spektrin F-aktinle birleşmesini band 4.1'e benzer tarzda aktive eder(79). Adducin Proteinkinaz A (PKA) için de bir süstrattır. Fosforilasyon adducin4in iskelet komponentleriyle bağını zayıflatır(26).

2.3.B- İntegral membran proteinleri

Band 3 ve glikoforinler eritrosit zarı fosfolipid tabakasını boydan boya geçen, hem hücre dışında, hem de sitoplazmik bölgede uzantıları olan proteinlerdir.

2.3.B.a. Protein 3 (Anyon kanalı)

Band 3 başlıca eritrosit transmembran glikoproteini olup; fonksiyonları ayrı iki farklı bölgeye sahiptir. Band 3 transmembran bölgesi klorid-bikarbonat değiştokuşunu sağlarken; sitoplazmik bölge ankirin, band 4.1, band 4.2 ve bazı glikolitik enzimler G3PD ve Hb için bağlama bölgelelerine sahiptir(71). Band 3, membranı ~ 12-13 defa geğer. Pekçok ekstraselülüler bölgeye sahip olup, biri ağır şekilde glikozillenmiştir ve kan grubu antijenlerini taşır. Bunlar I ve i ile ABO major kan grubu antijenlerini kapsar. Bu proteinin glikozillenme derecesindeki farklılıklar moleköl ağırlığını etkiler(95-105 kD)(7).

Band 3, serin ve treonin kalıntılarına spesifik membrana bağlı ve sitozolik kazein kinazlarca fosforillenir. Fakat bunun etkisi tam bilinmemektedir(26).

Glikoforin A yokluğunda taşıdığı sialik asit artar. Membran içinde çoğunlukla dimer halinde bulunur. dimerler birbirleriyle etkileşerek tetramer ve oligomer oluştururlar.

Band 3 spektrine bağlanan ankirinle etkileşerek zar iskelet yapıyla bütönlük oluşturur(50).

Komple yokluğu tanımlanmamıştır. Anormal formları ve azalmış ekspresyonu anormal eritrosit morfolojisiyle ilişkilidir.

2.3.B.b. Band 4.5 (Glukoz transporteri)

Glukoz eritrosite kolaylaştırılmış difüzyonla girer. Buna glukoz (transporter) taşıyıcısı denilen bir transmembran protein aracılık eder(82). Bu protein eritrosit membran proteinlerinin ~ % 51'ini oluşturur ve SDS jel üzerinde band 4.5'e karşılık gelir .Tek bir protein olmasına rağmen heterojen glikozillenmesi nedeniyle mol ağırlığı 45-75 kD arasında değişir. Glukoz transporterinin membrandan glukoz gečiři üzerine etkisi

asimetriktir: Glukoz girişi, glukoz çıkışından daha düşük K_m ve daha yüksek V_{max} sergiler. Glukozun eritrosite transportu, anaerobik glikoliz için enerji substratı sağlar; bununla birlikte eritrositin enerji ihtiyaı nispeten düşük olup glukoz transportunun etkinliği rölatif olarak yüksektir. Bu nedenle glukoz transportu, glukoz kullanımı için hız sınırlayıcı değildir(39).

2.3.B.c. Eritrositlerde glukoz transportu:

Glukoz eritrositlerin metabolik enerji için ihtiyaç duydukları en önemli bileşiktir. Bu molekl yıkıp ATP elde edilmesini sağlayacak enzimler, eritrosit içinde sınırlı miktardadır. Hücre içine giren glukoz molekülleri, anaerobik glikoz ile pirüvat ve laktik aside katabolize olmakta ve ATP elde edilmektedir. Eritrositlerdeki diğer yol olan HMPS (Hekzoz monofosfat yolu) ise glukoz metabolizmasının % 10'unu sağlamaktadır. Glikolizle sağlanan ATP molekülleri, eritrositlerdeki iyonik pompaları çalıştırmakta kullanılır.

Eritrosit içine yeterli glukoz alınamaz ve gerekli ATP sağlanamazsa iyon pompalarının çalışmaları bozulur; bunun sonucunda eritrosit yapısında da bozulmalar olabilir.

Glukoz eritrosit içine kolaylaştırılmış difüzyonla girer. Bu olay glukoz transporterleri denilen bir transmembran proteini tarafından gerçekleştirilir. Kısaca GLUT olarak adlandırılan bu protein ailesi memeli hücrelerinde bulunup; buldukları dokulara göre 5 gruba ayrılabilirler. Eritrositlerdeki glukoz taşıyıcı protein GLUT 1'dir. Eritrosit membran proteinlerinin ~ % 5'ini oluşturur ve daha önce anlatıldığı gibi band 4.5 olarak adlandırılır. 492 A.A.lik tek bir protein lomasına rağmen GLUT 1 heterojen olarak glikozillendiğinden; molekl ağırlığı 45-75 kD arasında değişir.

2.3.B.d. Glikoforinler

Glikoforin A, eritrosit membranlarının başlıca PAS ile boyanabilen glikoproteinidir. Eritrosit başına $0,5-1 \times 10^6$ kopyası olup; PAS-pozitif proteinlerinin yaklaşık % 85'ini ifade eder. Monomer şeklinde molekül ağırlığı 36-39 kD'dur. Glikozillenmiş durumda yaklaşık ağırlığının % 60'ı karbohidrattır. İki sialik asit kalıntısı eritrosit (-) yükünün ~ % 60'ını sağlar(43).

Glikoforin A kan grubu antijenleri de taşır. Ayrıca H.Influenza ve Pl.falciparum gibi pekçok patojenler için bağlanma yerlerine sahiptir(71).

Glikoforin A'nın 131 aminoasidinden 70'i hücre dışında, 22'si membran içinde, kalanı sitoplazmadadır. Geni 4.krz üzerinde bulunur. Yokluğunda klinik bakımdan önemli hematolojik problemlere yol açmaz.

Glikoforin B eritrosit üzerinde Gl.A sayısının 1/10 ila 1/3'ü kadardır. Geni 4.krz üzerinde olup; her ikisi oldukça homologdurlar.

Glikoforin A ve B genlerinin aynı orijinden kaynaklandığı görülüyor. Glikoforin A'nın -COOH terminal kısmı hücre iskeletine zayıf şekilde tutunur.

Eritrosit üzerinde glikoforinin protein 3 ile etkileştiği sanılmaktadır(70).

3. Eritrositlerde Serbest Radikallerin Etkileri

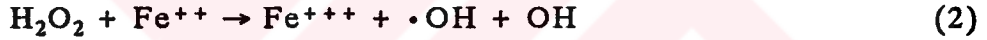
Eritrositler, ligand durumunda yüksek konsantrasyonlarda doymamış yağ asitleri, oksijen ve demir iyonları ihtiva eden yegane biyolojik yapılardır. Bu nedenle oksijen radikallerinin oluşumu gibi aerobik şartların potansiyel hasarına karşı oldukça hassas olmaları beklenir(23). Aerobik organizmalar, normal fonksiyonları için hem oksijene ihtiyaç duyarlar,

hem de oksijen serbest radikallerin başlıca kaynağıdır(15). Oksijen metabolizma ürünleri; serbest radikaller, aldehidler ve çeşitli peroksitleri içerirler. Bunlar oldukça toksik olup, pekçok hücre yapılarında hasar oluşumunu indüklerler.

Fizyolojik oksidan etki hemen her zaman süperoksit ($\cdot O_2$) oluşumuyla başlar. Methemoglobin (MetHb) günlük normal döngüsü ($\cdot O_2^-$)'in sürekli kaynağıdır(14). ($\cdot O_2^-$)'in enzimatik ya da spontan dismutasyonu hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana getirir. Her ikisinin varlığı ise; Hebe Weiss reaksiyonunda klasik olarak gösterildiği gibi Hidroksil radikalının ($\cdot OH$) ortaya çıkma ihtimalini doğurur(55).

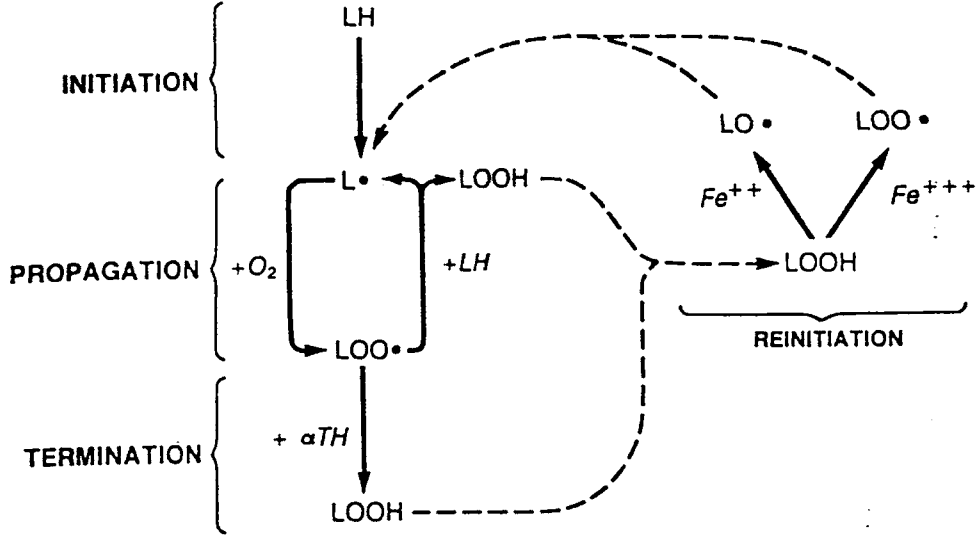


Bu denklem $\cdot OH$ oluşumunun Stoichiometrisini doğru olarak gösteriyorsa da; be aslında iki reaksiyonun özetidir. Bunlar ise iki değerlik durumu arasındaki katalitik transisyon metal iyon sıklüsleridir(51,76).



Bu nedenle H_2O_2 ile ferroz demir arasındaki reaksiyon asıl $\cdot OH$ oluşturan basamaktır. ($\cdot O_2$)'in önemi yalnızca Fe^{+++} tekrar Fe^{++} 'e indirgemesi ve böylece demiri sonraki ($\cdot OH$) oluşum sıklüsü için tekrar hazırlamasından dolayıdır(55). Sonuç olarak; indirgeyici ajanların mevcudiyeti önemlidir. Çünkü onların yokluğu ($\cdot OH$) oluşumunun kendiliğinden sınırlanmasına yol açar. Aslında eritrosit içinde bol miktarda bulunan (Örn. GSH, flavinoidler, askorbat) çeşitli indirgeyici ajanlar, 3. denklemdeki ($\cdot O_2$)'in yerine geçebilirler(51).

Oluşan bu radikaller çeşitli organik moleküllere karşı oldukça reaktiftirler. Bu nedenle onların etkili difüzyon mesafeleri çok kısa olup; ($\cdot OH$)'in konumu son derece önemlidir. Eritrositin metabolik kompozisyonuna göre sitoplazmik ($\cdot OH$) oluşumu nispeten zararsız olabiliyorken; membran içinde veya ona doğrudan bitişik ($\cdot H$) oluşumu ise muhtemelen zararlı olur(23,55).



Şekil 3: Lipid peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlanma aşamalarını içerir. Olaya demir iyonları v.b. karıştığında ise tekrar başlama (reinitiation) adımı meydana gelir.

Membran fosfolipidleri sürekli oksidatif etkiye maruz kalırlar. Lipid peroksidasyon süreci, doymamış bir yağ asidinden bir hidrojen atomunun (karbondan) koparılması sonucu başlayan zincirleme reaksiyonlar dizisidir. Aerobik ortamda, bir lipid peroksi radikali (LOO•) oluşturmak üzere lipid radikalinde (L•) yağ asidine oksijen atomu eklenir(55). Bir kez başladıktan sonra; yakındaki doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu çıkarılmak suretiyle peroksidasyon zincir reaksiyonu yayılmaya devam eder(23) (Şekil 3). Oluşan lipid hidroperoksidi (LOOH) kolaylıkla şu gibi reaktif türlere ayrışabilir: Lipid alkoksi radikalleri (LO•) aldehidler (örn. malonildialdehid), alkanlar, lipid epoksidler ve alkoller.

Hb'e bağlı demir serbest solüsyonlarda hidroksil radikali üretmez, fakat peroksidazlar proteinden demir salınımına yol açabilirler. Salınan bu demirin eritrositlerdeki hidroksil oluşumunun gerçek aktivatörü olması ve Hb içeren sistemlerde peroksidasyona katılması muhtemeldir.

Bu nedenle Hb'in kendisi hidroksil radikal oluşumunu katalizleyebildiği gibi doğrudan eritrosit lipid peroksidasyonunun bir aktivatörü olarak değil; fakat demir sağlayıcı bir ajan olarak faaliyet gösterebilir(23,92).

(Hb Fe⁺⁺⁺) MetHb eritrosit membranını lipid peroksidasyonuna karşı koruyabilir. MetHb, membrandaki yayılan oksijen türlerini temizleme kabiliyetiyle, membranların oksidatif strese olan yatkınlığını azaltan bir role sahiptir(22,23,55).

Hb normalde iki temel faktör tarafından oksidasyondan korunur; eritrosit metabolizmasının indirgeyici gücü ve Hb molekülünün stabil dördüncü yapısı.

Lipid peroksidasyonu hücre membranının yapısal organizasyonunda ve fonksiyonunda önemli değişikliklere yol açar. Membran lipid peroksidasyonu, membran rijiditesinin artışı, hücresel deformabilitenin azalması, eritrosit yaşamı ve lipid akışkanlığının azalması, membrana Hb bağlanmasında artış hiperkoagülabilité gibi pekçok patolojik H₂O₂ doymamış alkil yan zincirleriyle reaksiyona girerek peroksit grupları ortaya çıkarır. Olgun eritrosit hasarlı yapılarını yenileyemediğinden hücrede kalıcı kusurlar birikir ve bu durum yaşlanma, diabet ve hemolitik hastalıkların oluşumuna neden olur(23,48,94).

Eritrositlerdeki H₂O₂ ve (\cdot O₂⁻), Hb'in oksidatif degradasyonu ve (-SH) gruplarının oksidasyonu da ilgilidir(94).

Yaşlı eritrositlerin membranlarında önemli miktarda membrana bağlı Hb (MbHb) bulunmuştur(97). Hb membranda özellikle spektrinle çarpaz bağ yapar. Hb'in spektrinle çarpaz bağlanması eritrosit membran rijiditesiyle ilişkili olup; membran şekil ve deformabilitesinde değişikliklere yol açar. Hb'in oksidatif şartlar altında band 3 ile de çarpaz bağ yaptığı bulunmuştur.

Peroksit radikalleri malonildialdehid (MDA) meydana getirdiklerinden dolayı; bu durum MDA-protein-Hb kompleksleri oluşturabilir(62,97).

Hidroksil radikallerinin diabete aracılık edebilecekleri de gösterilmiştir(65). Ayrıca; diabette görülen eritrosit deformabilite azalması, ozmotik frajilite artışı ve kalsiyum permeabilitesi gibi eritrosit membran değişiklikleri, membran lipidlerinin peroksidasyonu ile ilişkilidir(94).

3.2. Eritrositin Savunma Mekanizmaları

Hücreler oksidatif hasarlara karşı güçlü koruyucu mekanizmalarla donatılmışlardır ve normal eritrositler bu hasarlara karşı oldukça dirençlidirler(23,109).

Eritrositin antioksidan savunma mekanizmaları iki gruba ayrılabilir: Bazı sistemler serbest radikalleri hasara yol açmadan önce detoksifiye ederler; diğerleri ise hasar oluşuktan sonra onun tamirinden sorumludurlar(92). Bu mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir:

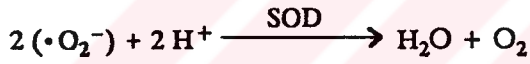
- 1- Düşük molekül ağırlıklı serbest radikal temizleyicileri (Antioksidanlar):
 - a- Lipitde eriyebilenler, lipofilik serbest radikalleri daha az toksik forma indirger. Bu grupta olan E vitamini; süperoksit, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini bu şekilde etkiler. Ayrıca askorbat, beta-karoten de bu gruba girer(100)
 - b- Sitoplazmik temizleyicilerden glutatyon; hidrojen peroksiti, lipid peroksitleri, disülfidleri ve serbest radikalleri indirge(15,75,81).

2- Enzimatik serbest radikal temizleyicileri (antioksidatif enzim-ler):

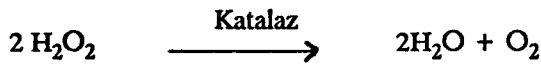
Katalaz ve peroksidazlar, hidrojen peroksiti (H_2O_2) belirli düzeyde tutmaya yardım ederler. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini H_2O_2 'e dönüştüren dismutasyon reaksiyonunda etkili bir enzimdir(36).

Bu koruyucu süreçlerin, organizmaların yaşam sürelerini belirleyici faktörler olabilecekleri görülmektedir.

Yıkıcı ürünlerin uzaklaştırılmasından sorumlu en önemli enzimlerden biri (SOD) süperoksit dismutazdır. Bu enzim ($\cdot O_2^-$) süperoksit radikallerinin kendiliğinden oluşan dismutasyonunu hızlandırır ve serbest radikalleri substrat olarak kullanmasıyla diğer antioksidanlardan ayrılır(13,47,69).

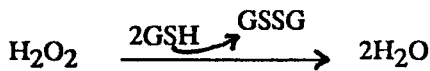


Oluşan H_2O_2 , katalaz ve glutatyon sistemleri tarafından ortadan kaldırılır. Katalaz, H_2O_2 'i suya indirger(71):



Yetişkin ve yaşlılarda katalaz aktivitesinin arttığı gözleniyor.

H_2O_2 , Glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından ortadan kaldırılır.



GSH, eritrositlerdeki temel indirgeyici ajandır ve GSH-Px reaksiyonu için gerekli koenzimdir. İndirgenmiş glutatyon ise γ -Glutamil-Ssiteinil-Glisin'den oluşmuş bir tripeptiddir. Glutatyon sentezi için 2ATP'ye bağımlı enzimatik reaksiyon meydana gelir.

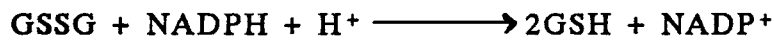
Peroksitlerin indirgenmesi esnasında (Hb'in oksidasyondan korunması dahil) GSH oksitlenerek, oksitlenmiş Glutatyon (GSSG) oluşur. GSSG, disülfid köprüsüyle bağlı iki GSH'dan meydana gelmiştir.

GSH-Px substrat olarak GSH'e özgü olmasına rağmen H_2O_2 'e ilaveten çeşitli peroksitlerin temizlenmesini de katalizler (Örn. Oksijen, karbon, nitrojen ve sülfür kökenli radikaller). Fakat her durumda peroksitler alkollere indirgenir.



GSH-Px bir selenoprotein olup; GSH selenyumunu indirger ve enzimin bu indirgenmiş formu H_2O_2 ile reaksiyona girer(27).

Normal eritrositlerde yüksek bir GSH/GSSG oranı korunur. Bu nedenle GSSG'u tekrar GSH'a indirgeyecek bir mekanizmanın olması gerekmektedir. Bu ise Glutatyon redüktaz (GSH-rx) enzimi tarafından gerçekleştirilir.



Sadece NADPH, GSH-rx için etkili bir sübstrat olup GSH-rx Hb'i oksidasyondan koruyan enzim sistemi için gerekli bir komponenttir(23,75).

Glukoz da Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) enzim aktivitesiyle heksoz monofosfat şantından (HMPS) sürekli NADPH_2 üreterek GSH rejenerasyonuna neden olur.

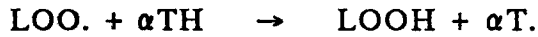
Glutatyonun redoks süreci, demir iyonları, serbest radikaller ve xenobiyotikler gibi oksidanlara karşı bütünlüğünü sürdürmek için gerekli bir reaksiyondur(55).

Eritrositlerde GSSG düzeyleri oldukça düşüktür, çünkü membrandan kolayca geçebilir. Eritrosit oksidatif strese maruz kaldığında plazmaya GSSG salar(15,106). Bu, muhtemelen GSH-Px aktivitesi nedeniyle intrasellüler GSSG miktarının artışının bir sonucudur.

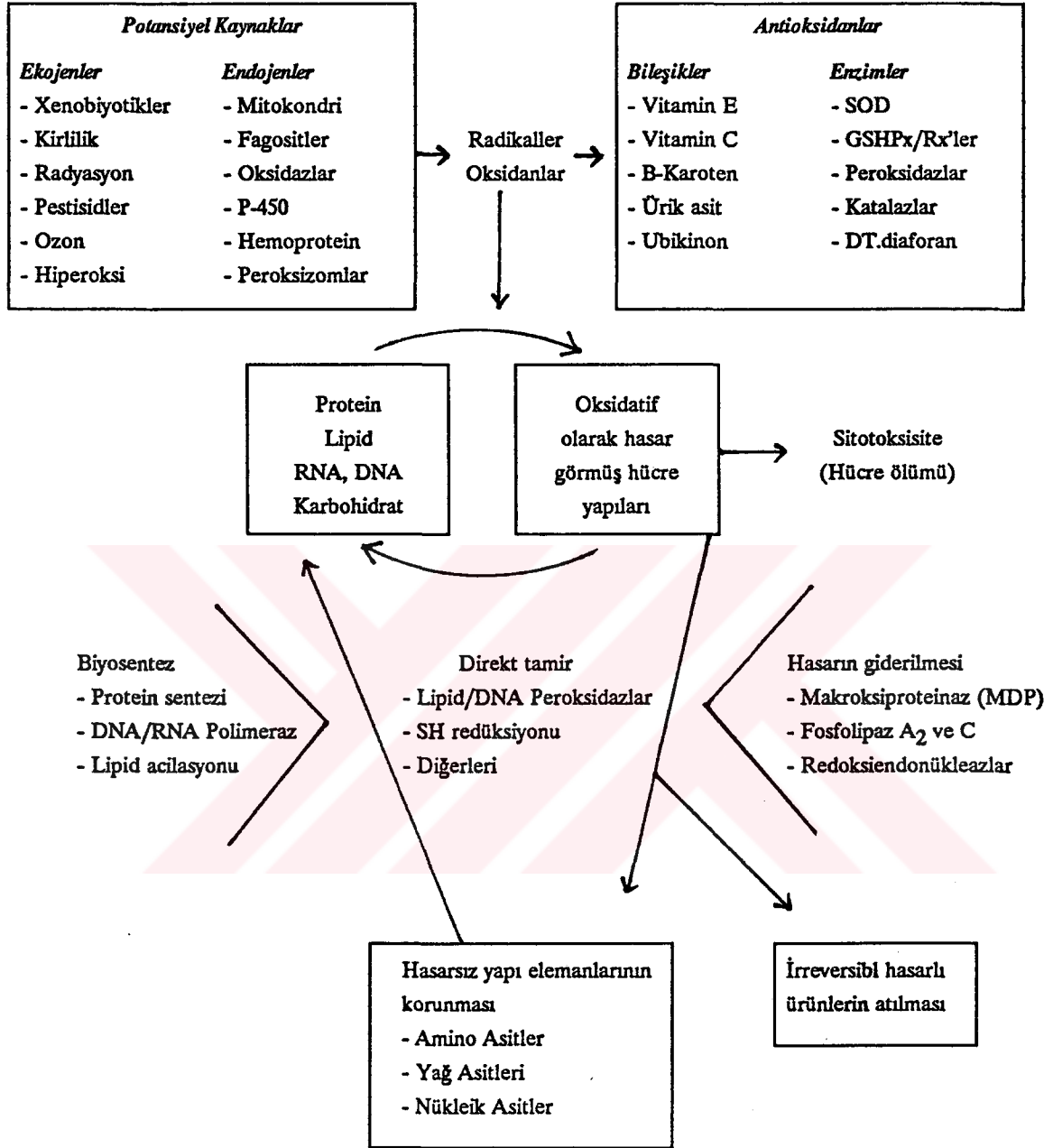
Düşük GSH düzeyleri asidoz, membran yaşlanması, hemoliz ve yaşlanmayla ilişkilidir(75).

Oksidasyona karşı diğer bir savunma hücre membranındaki antioksidanların varlığıdır. En önemlisi ise E vitamini olup; ($\cdot\text{O}_2^-$) ve H_2O_2 'e karşı koruma sağladığı gösterilmiştir.

Vitamin E'nin (α tokoferol = α TH) biyolojik membranlarda serbest radikal temizleyici olarak faaliyet şekli şöyle özetlenebilir:



Vit E hidrojen atomlarını peroksi radikallerine vererek hidroperoksitler oluşturur. Lipid peroksidasyonunun devamına yolaçacak zincir reaksiyonunu önlemek suretiyle membranı koruyan önemli bir antioksidandır(23,100).



Şekil 4 : Oksidatif hasar ve tamir mekanizmaları. Radikal/oksidan üretim için pekçok eksojen ve endojen kaynaklar vardır.

4. Protein Oksidasyon ve Glikasyonu

Hem nükleer, hemde sitoplazmik komponentlerde progressif bir bozulmaya sebep olan serbest radikal hasarı, yaşam boyu meydana gelir. Birikici özellikteki hücre hasarı yaşlanmaya neden olur(54,70,86).

Bu nedenle oksijen serbest radikalleri tarafından protein hasarı, yaşlanmanın serbest radikal teorisinin temelini oluşturur(7,44). radikaller protein yapısının bütün düzeylerini (primer, sekonder, tersiyer) etkilerler(35). Proteinlerin çoğu prooksidanlara oldukça hassas amino asit kalıntılarına sahiptirler. Lizin, histidin, ariginin, prolin ve serin a.a kalıntıları oksidatif hasara özellikle hassas olup; oksijen radikallerine maruz kalınca proteinlerin oksidasyonuna sebep olurlar. Bu kalıntıların oksidasyonu enzimatik aktivitede önemli kayba yol açarak proteoliz olasılığını artırır(44). Oksitlenmiş proteinlerin yaşlanmayla birlikte biriktiği in vivo olarak eritrositlerde gösterilmiştir.

Proteinlerdeki Tiol gruplarının disülfidlere ve metyonininin metyonin sülfoksitlere oksidasyonu reversibldir. Tiol gruplarının reversibl oksidasyon/redüksiyonunu düzenleyen GSH sistemi yaşlanma esnasında azalmaktadır(84).

Triptofan, histidin gibi aminoasitlerdeki oksidasyon halka kırılmasına yolaçarak geriye dönüşümü olmayan hasara yol açar.

Yaşlanmayla birlikte proteinlerde protein-glukoz etkileşiminin tipik ürünleri ortaya çıkar. Gerçekten glukoz, proteinlerin (lizinler ve n-terminal kalıntıları gibi) serbest amino gruplarıyla yavaş olarak etkileşir(16,44). Proteinlerin glikozilasyonu membranlardaki lipid-protein etkileşimini ve lipid akıcılığını değiştirmekten sorumlu olabilir. Glikozillenmiş proteinler oksidasyona ve hızla disülfid köprüleri oluşturmaya daha meyillidirler(8,80).

Diabetik şahıslardaki bazı membran proteinleri, nondiabetik eritrositlerinin proteinlerine göre daha ağır glikozillenirler. Protein glikozilasyon miktarının GHb (glikozillenmiş Hb) düzeyleriyle anlamlı ilişkisi; diabetik eritrositlerin sürekli yüksek plazma glukozuna maruz kalışının membran proteinlerinin glikozilasyonunda artışa yolaçtığını düşündürüyor(80,93).

Diabet; eritrosit membran proteinlerinin glikasyonunun artışında etkili bir faktördür. Eritrosit akıcılığı diabetiklerde de paralel değişikliklere yol açar.

Yüksek glukoz düzeylerinin indüklediği membran lipid peroksidasyonu, diabette görülen lipid peroksidasyon ürünlerinin artışında rol oynar(60).

Protein glikasyonu yaşlanma ve diabet oluşumunda görülen ortak bir özelliktir. Membran proteinlerinin glikasyonu membran akıcılığını değiştirmektedir. Akıcılık ise; permeabilite, aktif transport, ligand afinitesi gibi fonksiyonları kontrol eder(35,80).

Membran protein glikozilasyonunun kapsamı tüm proteinler için aynı değildir. Örneğin spektrin β alt ünitesi, ankirin ve protein 4.2. diğer membran proteinlerine göre daha ağır şekilde glikozillenirler(93).

Spektrin oksidasyonunun glikozillenmiş eritrosit Hb (GHb) ile anlamlı ilişkisi olup spektrin oksidasyonu, protein glikasyonunun bir sonucu olmalıdır(93).

5- Eritrosit Yaşlanması

Memeli eritrositi hücresi gerontoloji için ilginç ve değerli bir materyaldir. Plazma membranı onun tek organeli olduğundan, bu hücre membrandaki yaşa bağlı değişikliklerin araştırılması için elverişlidir(2). Protein sentez kapasitesi olmadığından, yaşla ilgili primer olaylar ve hücre membranındaki yaşa bağlı değişiklikler incelenebilir.

Eritrosit yaşının artışıyla birlikte total lipid kolesterol ve fosfolipidlerde azalma meydana gelir(2,59,65). Fakat genelde çok fazla değişmez(2). Ancak membran PC içeriği biraz artarken, PS+PI içeriğinde azalma olur(2,59). Doymamış yağ asidi oranında da azalma meydana gelmektedir. Bunun nedeni, lipid peroksidasyon sürecinin doymamış yağ asitlerini progressif olarak tüketmesidir.

Membran lipid peroksidasyonu ve Malondialdehid (MDA) birikimi hücre deformabilitesini ve yaşam süresini etkilemektedir. MDA'in yaşlı eritrositlerin membran proteinleriyle çapraz bağ yapıp yapmadığı kesin olarak bilinmemektedir. In vivo yaşlanan eritrositlerde lipid peroksidatif hasar, G6PD ve GSH-Px gibi enzim aktivitelerinin yaşa bağlı azalmalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir(3,20).

Eritrosit membranının protein içeriği, eritrositin yaşlanması esnasında ya sabit kalır veya azalır. Membran protein içeriğindeki küçük azalma, membrandan protein yönünden fakir veziküllerin salınımı veya proteolizle açıklanabilir(2). Yaşlı eritrositlerde Hb'in membrana bağlanmasında artış görülüyor(66).

Protein döngüsü olmaması nedeniyle membran proteinlerinde görülen yaşa bağlı progressif değişimlerden olmak üzere başlıca dört tanesi önemlidir. Kovalent agregasyon, proteolitik degradasyon, glikasyon ve karboksil metilasyon. Bunlardan herbiri yaşlı eritrositlerin selektif tanınmasını sağlayarak ölümüne yol açabilirler.

Yüksek molekül ağırlıklı kovalent protein agregatları yaşlanan eritrositlerde artmaktadır. Fakat bunların içeriği bilinmemektedir.

Yüksek molekül ağırlıklı protein polimerlerinin (HMWP) (~255.000 MW) eritrositin yaşlanmasıyla Spektrin band 1'e bağlanan bir Hb altbirimi (α zinciri) olabileceği bildiriliyor(103).

Yaşlanma esnasında membran proteinlerine oksidatif hasarın birikimi, membran protein -SH gruplarındaki hafif azalma ve metyonin sülfoksit kalıntılarının artışından anlaşılmaktadır. Protein karbonil gruplarının (protein oksidasyonunun bir göstergesi) oksidasyonu yaşlı eritrositlerde artar. Bu sonuçlara göre band 3, spektrin α band 4.1. ve 4.2 proteinlerinin tiol gruplarının oksidasyon ve konformasyonel değişiklikleri yaşla birlikte artış göstermektedir(85,95).

Oksidatif olarak hasara uğrayan proteinler normalde büyük proteolitik kompleksler tarafından degrade edilerek uzaklaştırılırlar. Bu kompleksler 670 kD olup; üç katalitik olarak aktif proteolitik bölgeye sahiptirler. Enzimin ATP'den bağımsız olduğu görülmektedir(87,88). Bu proteinlere MOP (Makroksiproteinaz) denilmesi uygun bulunmaktadır. MOP, normal proteinleri degrade etmez. Radikal/oksidan hasarlı proteinlerin ise katlanmış yapıları açılır; denatüre olurlar ve hidrofobik kalıntıları açığa çıkar. Bu olay MOP degradasyonuna uğramalarına neden olur.

Yaşlanan eritrositlerde özellikle bu sistem (MOP) geçerlidir. Özellikle oksidatif hasara uğrayan band 3 proteinleri MOP tarafından degradasyona uğratılınca, SCA (yaşlılık hürce antijeni) denilen bir antijen protein üzerinde görülmektedir. Band 3 üzerinde bu SCA antijeninin oluşması IgG antikorlarının membrana bağlanmalarına ve eritrositin tanınarak ortadan kaldırılmasına neden olur(2).

III. MATERYAL VE METOD

1. MATERYALLER

1.1. Çalışmada kullanılan denekler,

Yaşlanma ve diabet arasındaki ilişkinin eritrosit membran değişiklikleri açısından incelenmesi maksadıyla geriatrik şahıslar ve Tip II diabetiklerden EDTA ile (1:10) alınan kanlarından elde edilen paket eritrositlerle çalışıldı. Kontrol olarak da genç sağlıklı normallerin eritrositleri kullanıldı.

Bu maksatla; % MDA salınımının tayininde 23 normal (18-30 yaşları arasında), 32 adet yaşlı (60-85 yaşlarında) ve 16 Tip II Diabetli şahıs (35-67) kullanıldı.

Glutasyon tayininde ise bunların arasından 19 normal, 15 yaşlı ve 11 diabetik ile çalışıldı. (Bu seçimler tamamen rastgele ve deney şartlarına göre yapılmıştır).

Elektroforez ve oksidasyon için kullanılan membran proteinleri, değişik zamanlarda yapılıp dondurucuda saklanan ($> -30^{\circ}\text{C}$) eritrosit ghostları ile yapılmıştır.

Glukoz transportu için her gruptan 10'ar adet denek kullanılmıştır.

Deneyleer için kullanılacak kan 6rnekleri diabetik grup için Cer-
rahpaŐa Tıp Fak6ltesi kliniklerinden, yaşlı grup için check-up için baŐvu-
ran ve laboratuvar bulguları normal sınırlar içerisinde yer alan kiŐilerden
temin edilmiştir. Kontrol grubu ise sağlıklı ve genç 6ėrenci ve g6n6ll6ler-
den saėlanmıŐtır.

1.2. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

- Dispozibl enjekt6rler, otomatik ve cam pipetler, santrif6j t6p-
leri, eppendorf t6pleri vb.
- Hettich Universal Santrif6j aleti
- K6ttermann-Laborstechnik alkalayıcılı Ben Mari aleti
- Microprocessor pH 537 PH metre
- Vortex aletleri (Janke and Kunkel, İKA Laborstechnik)
- Perkin Ellmer spektrofotometre
- Ultrasantrif6j (Beckmann model L2)
- Forma-Scientific Bio-Freezer derin dondurucu
- Buzdolapları
- Sintillasyon aleti (Tri Carb 1500 likid sıvı sintilasyon sayıcısı)
- Elektroforez aleti (LKB Bromma 2303 Multidrive XL)

1.3. Çalışmada kullanılan 6zelti ve kimyasal maddeler:

1.3.A. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler:

– Radyoaktif Madde

Glukoz ¹⁴C: (NEN, Dupont Ltd. UK)

Spesifik aktivite: 286 mCi/mM

Radyoaktivite konsantrasyonu: 10 Ci

– Kimyasal Maddeler:

NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaOH, Na-EDTA, TBA, DTNB,
Tris-EDTA, Na₂CO₃, KI, HgCl₂ Cu SO₄ (Merck, Darmstadt), Glycine,
PPO, POPOP, Agar-Agar, Naphthalene, Tris, bis-Akrilamdi, Akrilamid
(Sigma-St.Louis USA).

TCA, H₂O₂, Metanol, Kloroform, Asetik Asit, İzopropanol, dioxan (Merck-Darmstadt)

1.3.B. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

- PBS fosfat-tuz tamponu)
8,1 gr NaCl, 2,302 gr Na₂ HPO₄, 0,194 gr NaH₂PO₄ 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanır. pH= 7,4'e ayarlanır.
- Azidli PBS =
26 mg NaN₃/100 ml PBS
- Solüsyon I =
28 gr (ml) TCA, 1,299 (0,1 mol/L) Na-Arsenit, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Solüsyon II =
0,1 gr (0,05 mol/L) NaOH, 0,5 gr (% 1) TBA 50 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.
- Proteinsizleştirme çözeltisi =
30 gr NaCl, 0,2 gr Na²-EDTA, 1,67 gr Meta-Fosforik asit, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- 0,3 M Na₂HPO₄
- Elmann ayıracı =
% 1 Na-Sitrat hazırlanır. 100 ml için 40 mg DTNB (5,5-dithiobis 2-nitro benzoik asit) eklenir.
- Tris-EDTA tamponu = 7 mM Tris + 0,1 mM Na₂ EDTA pH= 7,4
- yıkama solüsyonu = 154 mM (% 0,9) NaCl çözeltisi
- Fosfat-tuz tamponu =
25 mM Na-Fosfat, % 1 (W/V) NaCl pH=7,4
- Cıvalı stop tamponu = % NaCl, 2 mM Hg Cl₂, 1,25 mM KI
- % 30 TCA (triklor asetik asit)
- Sintillasyon sıvısı = 100 gr Naftalin, 7,5 gr PPO, 0,377 gr POPOP, Dioxan ile 1000 ml'ye tamamlanır.
- 2, 4-dinitrofenilhidrazin boyası = (0,0198 g/10 ml 2NHCl içinde 50°C'de karanlıkta 1 saatte çözünür)

- Lowry solüsyon A = % 2 Na₂ CO₃, 0,1 N NaOH çözeltisinde hazırlanır.
- Solüsyon B = % 0,5 CuSO₄ · 5H₂O, % 1 Na-K tartarat içinde hazırlanır.
- Solüsyon C = 50 birim A, 1 birim B çözeltisi karıştırılır.
- Folin Ciocalteu ayırıcı (kullanılacağı zaman 1:1 sulandırılır)
- Standard % 0,2 BSA (Bovine serum albumini)

2. UYGULANAN METODLAR

2.1. Eritrositlerde Lipid Peroksidasyon (% MDA) Tayini(34)

Deneyin Yapılışı

Çalışılmak üzere (1:10 EDTA'lı) alınan taze kanlar 2000 xg'de 10 dk. santrifüj edilerek plazma uzaklaştırıldı ve her bir örnek iki tüpe ayrıldı (0,22 ml paket eritrosit) 9'ar ml PBS ile süspanse edildikten sonra santrifüjlenerek yıkama işlemleri yapıldı.

Birinci tüpteki yıkanmış eritrositler üzerine 19 hacim PBS ile 2. tüptekiler ise 19 hacim Azidli PBS ile süspanse edildi. Her bir tüpten 1'er ml alındı. Birinci tüplere eşit hacim (1/1) % 3 H₂O₂, ikinci tüplere % 0,75 H₂O₂ ilave edildikten sonra tüpler 37°C'da 1 saat benmari de çalkalanarak 1 saat inkübasyonda tutuldu.

İnkübasyon sonunda her tüpe 1 ml solüsyon 1 eklenerek santrifüj edildi. 2'şer ml süpernatant uzun cam tüplere kondu ve üzerlerine 0,5 ml solüsyon II ilave edildi. Daha sonra tüpler 15 dk. kaynar suda reaksiyona tutuldu. Soğuduktan sonra spektrofotometre ile 532 nm absorbansta okundu.

$$\% \text{ MDA değerleri} = \frac{\text{MDA salınımı (\% 3 H}_2\text{O}_2)}{\text{MDA salınımı (\% 0,75 H}_2\text{O}_2)} \times 100$$

formülüne göre hesaplandı(34).

2.2. Eritrosit Glutatyon (GSH) Tayini(38)

Santrifüjlenip plazması ayrılan antikoagülanlı kanlardan 0,1 ml soğuk (+4°C) dH₂O içinde hemoliz edilir. Biraz beklendikten sonra 1 ml hemolizat 1,5 ml proteinsizleştirme çözeltisinde 5 dk (22°C) inkübe edilir. (0,1 ml ile Hb tayini yapılır). İnkübasyon sonunda 2000 x g'de 10 dk santrifüj edilir. 1 ml süpernatantlar 4 ml 0,3 M Na₂HPO₄ içine konarak 0,5 ml Elman ayırıcı eklenir. Örnekler fazla bekletilmeden sepktofotometrik olarak 412 nm absorbansta okunur.

GSH hesaplanması= Okunan değer ,sabit faktör (1112) ile çarpılır (μmol/dl). Hb değerine (gr/dl) bölünerek sonuç μmol/gr cinsinden bulunur.

2.3. Eritrosit membranlarının (ghost) eldesi(37)

Taze alınmış EDTA'lı kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Pellet tuz çözeltisi ile yıkandı. 0,5 ml paket eritrosit üzerine 15 ml soğuk Tris-EDTA tamponu eklendi. 2-4°C'de 20.000 x g devirle 20 dk süre ile santrifüj edildi. Üst faz atılarak işleme beyaz ghost elde edinceye kadar (3-4 kez) devam edildi.

2.4. Lowry Yöntemi İle Ghost'larda Protein Tayini(73)

Uygulama: Bir deney tüpüne 50 μl örnek konup üzerine 1 mL B solüsyonu eklendi. 15 dakika süre ile oda ısısında bekletildi. 0.1 mL sulandırılmış Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenip 1 saat süre ile oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm'de absorbans okundu.

Hesap: Bovin serum albümin çözeltisi kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Hesaplar grafik kullanarak yapıldı.

2.5. (SDS-PAGE) Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi(107)

2.5.A. Jelin Hazırlanışı:

1. Ayırma Jeli: (% 10'luk)

Protein moleküllerinin, molekül ağırlıklarına göre ayrıldığı jel karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı.

| Jel karışımı = | Hacim | |
|----------------------------------|-------------|-----------|
| Akrilamid/Bisakrilamid (30:0.8) | 10.00 | ml |
| 1.5 M Tris tamponu (pH:8.8) | 7.5 | ml |
| Distile su | 12.1 | ml |
| % 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) | 0.3 | ml |
| % 10 APS (Amonyum persülfat) | 0.1 | ml |
| TEMED | 0,0075 | ml |
| TOPLAM HACİM | 30.0 | ml |

2. Konsantrasyon Jeli (% 4.5'luk)

Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre sıralanmalarına imkan veren jel veya üst jel olarak bilinen bu karışım aşağıdaki şekilde hazırlandı.

| Jel karışımı = | Hacim | |
|---------------------------------|-------------|-----------|
| Akrilamid/Bisakrilamid (30:0.8) | 1.5 | ml |
| 1.0 M Tris tamponu (pH: 6.8) | 1,25 | ml |
| Distile su | 7.5 | ml |
| % 10 SDS | 0.1 | ml |
| % 10 APS | 0.1 | ml |
| TEMED | 0.005 | ml |
| TOPLAM HACİM | 10.0 | ml |

3. Tank Tamponu

Zar proteinlerinin elektroforetik ayrılmasında tris-glisin tamponu kullanıldı.

Tris 3.0 gr
Glisin 11.6 gr
SDS 1.0 gr

Karışım 1.0 litre distile suda çözüldü ve HCl ile pH: 8.5'e ayarlandı

4. Numune hazırlama tamponu (denatürasyon karışımı)

| | | |
|--------------------------|-----|----|
| 1.0 M Tris-HCl, pH: 6.8 | 1.0 | ml |
| Gliserol | 1.6 | ml |
| % 20 SDS | 1.0 | ml |
| % 0.1 Bromfenol mavisi | 0.2 | ml |
| β .Merkapto etanol | 0.2 | ml |
| dH ₂ O | 3,8 | ml |

5. Protein boyası

Protein bandlarını boyanmasında Coomassie Brilliant Blue boyası kullanıldı.

- % 0,2 Coomassie blue
- % 50 Metanol (veya izopropanol)
- % 10 Asetik Asit
- Su ile tamamlanır.

2.5.B. Elektroforez işlemi

17.5x14 cm ebadında cam plakalar, aralarında 1.5 mm ayırıcı (Spacer) yerleştirilerek kaset haline getirildi. Kenarları kapatılarak standı yerleştirildi. Alt jel olarak yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan ayırma jeli cam plakalar arasına döküldü. Üzerine % 0,150 ilave edilecek iki saat polimerleşmeye bırakıldı. Bu süre sonunda üst jel olarak bilinen konsanrasyon jeli hazırlandı. Ayırma jeli polimerleştikten sonra üzerindeki su uzaklaştırıldı ve bu jel karışımı ayırma jeli üzerine döküldü. Protein numunelerinin uygulanması için gerekli olan kuyucukların oluşturulmasında kullanılan jel tarağı kasetler arasında yerleştirilerek tekrar polimerleşmeye bırakıldı. Yaklaşık bir saat sonra tarak çıkarıldı, kuyular su ile durulandı. Cam kaset altı açıldıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Sızıntıları önlemek için kaset aralıkları agar ile kapatıldı. Numune uygulanmadan önce 10 dakika süre ile düşük akımda (10 mA) ön elektroforeze tabi tutuldu. Bu süre içinde numune (2-3 mg protein/ml) eşit hacimde numune hazırlama tamponu

nu olarak bilinen denatürasyon çözeltisi ile karıştırılarak 100°C'de hidroliz edildi. Soğuduktan sonra her kuyuya 0.03 ml uygulandı. Sabit akım altında birinci jel için 120 V ve 30 mA ve ayırma jelinde 200 V ve 50 mA uygulanarak yaklaşık 4 saat elektroforeze tabi tutuldu. Yürüme mesafesi bromfenol mavisi boyası kullanılarak takip edildi.

2.5.B.a. Coomassie Blue ile Proteinlerin Boyanması

Elektroforez sonunda jel cam kasetler arasından çıkarılarak su ile yıkandı ve protein boyası içeren küvete lınarak 40°C'de 30 dk boyandı. Boyama işlemi sonunda destain içine kondu ve 40°C'de 15 dk tutuldu. Sonra % 5 asetik asitte tutularak bandlar incelendi.

2.5.B.b. Membran Glikoproteinlerinin boyanması(41)

Zar glikoproteinleri Periyodik Asit - Schiff bazı (PAS boyası) ile boyandı. Aynı zamanda Schiff reaktifi olarak da bilinen bu glikoprotein boyası aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- 1) 2.5 gr bazik fuksin 500 ml distile suda çözüldü
- 2) 5.0 gr sodyum metabisülfid ve 50 ml 1 N HCl ilave edildi.
- 3) Birkaç saat karıştırıldıktan sonra homojen hale getirildi.
- 4) 2.0 gr aktif kömür eklenerek rengi alındı (Dekolorize edildi).

Zar proteinlerinin ayrılması ve incelenmesi için standardize edilen elektroforez yöntemi glikoproteinlerin ayrılmasında da aynen uygulandı. Elektroforez işlemi sonunda poliakrilamid jeli kasetten çıkarılarak su ile yıkandı ve durulandı. Fiksasyon için jel % 25 izopropil alkol ve % 10 asetik asit karışımında bir gece tutularak glikoproteinler fikse edildi. Bu işlemden sonra jel % 0.5 periyodik asitte iki saat süre ile tutuldu. % 0.1 sodyum arsenit ve % 5 asetik asit karışımına aktarılarak 30 dakika bekletilen jel SDS'den tamamen uzaklaştırıldıktan sonra PAS boyası ihtiva eden boya küvetine kondu ve boyada bir gece bırakıldı. PAS boyasında glikoprotein bandları pembe olarak görünmeye başladıktan sonra jel boyadan çıkarıla-

rak yıkama kabına aktarıldı ve % 0.1 sodyum metabisülfid çözeltisinde 4 saat tutuldu. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra boyama işlemi tamamlandı.

2.6. Eritrositlerde – C¹⁴ glukoz transport tayini(68)

Yaşlı diabetik ve kontrollerden alınan (1,4 mg/ml EDTA ihtiva eden) kanlar 1500 x g'da 15 dk. santrifüj edilerek (+5°C) plazması uzaklaştırıldı. Eritrositler sonra 3'er defa soğuk 154 mM NaCl çözeltisi ile (1:1) süspansiyon yapılarak santrifüj edildi. (1500xg ile 5'er dk. +5°C) Eritrositler 5x10⁹ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

Eritrositler önce 10 dk 15°C'de fosfat tuz tamponu içinde değişik konsantrasyonlarda (50,100,150,200 mM) glukoz ile preinkübasyona tabi tutuldular. Preinkübasyon sonunda örnekler radyoaktif işaretli glukoz (1 µCi/ml) spesifik aktivite 286 mCi/ml) ilave edildi. Total hacim 0,5 ml idi. İnkübasyon 15°C'de 15 sn devam etti ve reaksiyon 0,5 ml soğuk cıvalı stop tamponu ile durduruldu. Bütün örnekler hemen 15°C 5 dk. 2000 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletler tekrar 0,5 ml stop tamponuyla santrifüjlendi.

Daha sonra pelletler 0,25 ml dH₂O ile lize edildi. Örnekler dondurulup tekrar çözündürüldü ve 0,25 ml TCA eklenerek radyoaktivite lizatant ekstrakte edildi. Vortekslendikten sonra 2000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar (0,4 ml) radyoaktivite sayımı için 3 ml'lik sintillasyon sıvısına kondu.

2.7. (TLC) İnce tabaka kromatografisi(119):

2.7.A. Zar lipid ekstresinin hazırlanması

Cam bir tüp içine 1.0 ml ghost numunesi alındı ve üzerine 5 ml metanol ilave edilerek 5 dakika süre ile karıştırıldı. Daha sonra 5 ml kloroform eklendi. 5 dakika daha karıştırıldı ve 3.000 x g'de 10 dakika santri-

füj edildi. Üst faz başka bir tübe alınarak ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandı. Organik faz sıcak su banyosunda ve azot altında uçuruldu. Lipit ekstresi 50 mikrolitre kloroform:metanol (1:1) karışımında çözüldü ve kromatografi için silika jel plakalara uygulanmaya hazır hale getirildi(89).

2.7.B. Kromatografi tanklarının hazırlanması

Lipit fraksiyonlarının iyi ayrılmasını sağlamak ve kromatografi tankının doyunluğa ulaşmasını temin etmek için solventler tanka bir gün önceden kondu.

Birinci boyut için tankta:

Kloroform/Metanol/Amonyak/Su (90/54/5.5/5.5) karışımı kullanıldı. 10 mikrolitre lipit ekstresi silika jel kaplı plakaya sol alt köşede ve 3 cm yukarıda olacak şekilde uygulandı. Plaka 1. kromatografi tankına yerleştirilerek solvent 18 cm yürüyünceye kadar, (yaklaşık 60 dakika) bırakıldı. Daha sonra plaka tanktan çıkarılarak kurumaya bırakıldı. Amonyak kokusu tamamen uçtukten sonra plaka birinci boyuta 90 derece dik olacak şekilde ve numune uygulama noktası sağ alt köşede olmak üzere ikinci boyut solvent sistemi ihtiva eden tanka yerleştirildi ve kromatografiye bırakıldı.

İkinci boyut için kullanılan tankta:

Kloroform/Metanol/Asetik asit/Su (90/40/12/2) solvent sistemi kullanıldı.

Yaklaşık bir saat süren bir kromatografiden ve solvent 18 cm yürüdükten sonra plaka tanktan çıkarılarak kurumaya bırakıldı. Fosfolipit sınıfları, hem iyot buharına tutmak, hem de bakır sülfat püskürtmek suretiyle görünür hale getirildi(64). Fosfolipitlerdeki olefinik bağlara tersinir olarak iyot bağlanması sonucu lipit spotları sarı olarak gözlemlendi.

IV. BULGULAR

4.1.A.-B. Yaptığımız çalışmada, serbest radikallerin eritrosit üzerindeki etkilerini gösterebilmek için önce lipid peroksidasyon değerlerine bakıldı. Bu amaçla 23 genç sağlıklı kontrol grubu (18-30 yaşları arasında); 32 sağlıklı yaşlı (60-85 yaşlarında) ve ayrıca 16 Tip 2 diabetik (35-67 yaşlarında) kullanıldı. Tablo 2’de görüldüğü gibi; kontrollerle kıyaslandığında, yaşlı grubun lipid peroksidasyonu (% MDA) anlamlı olarak yüksektir ($p < 0.05$). Tip 2 diabetli hastaların da lipid peroksidasyon değerleri kontrol grubuna göre yüksektir ($p < 0,05$). Diğer taraftan, yaşlılar ile tip 2 diabetikler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$) (Şekil 5).

Tablo 2 : Normal, yaşlı ve tip II diabette lipid peroksidasyonu

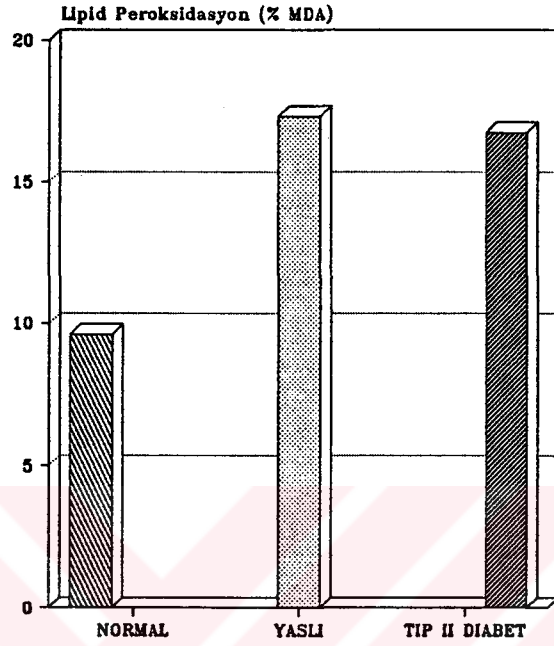
| <i>Grup</i> | <i>Lipid Peroksidasyon (% MDA)</i> |
|---------------------------|--|
| Normal (n=23) | 9.62±1.87 |
| Yaşlı (n=32) | 17.32±6.24* |
| Diabet (Tip II) (n=16) | 16.75±4.60* |

Normalle karşılaştırıldığında

* $p < 0.05$

Yaşlı ile diabet karşılaştırıldığında

$p > 0.05$

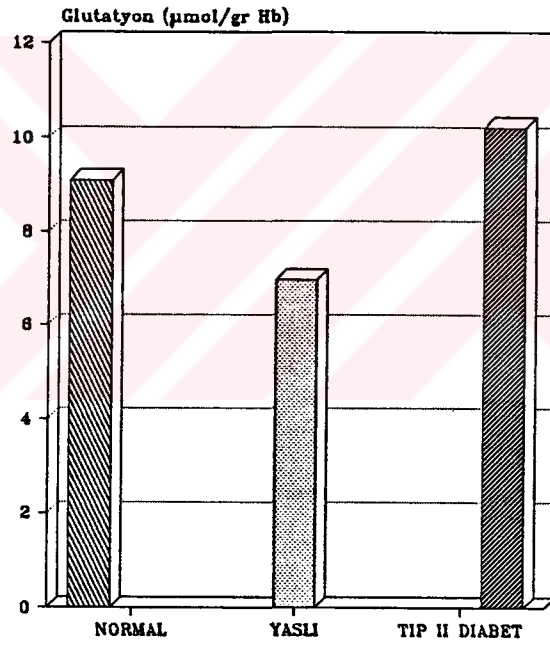


Şekil 5: Normal, yaşlı Tip II diabetli grupların lipid peroksidasyon (% MDA) değerleri

4.2.A.-B. Hücrelerdeki oksidasyona karşı başlıca savunma mekanizmalarından biri olan glutasyon değerlerine bakıldığında; yaşlılardaki glutasyon düzeyleri normal gruba göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). Fakat tip 2 diabette değişmemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 3, Şekil 6). Bununla birlikte; Tip 2 diabetteki glutasyon düzeyleri yaşlı gruba göre anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.05$).

Tablo 3 : Normal, yaşlı ve tip II diabette glutatyon düzeyi

| GRUP | GLUTATYON ($\mu\text{mol}/\text{gr Hb}$) |
|---------------------------|--|
| Normal (n=19) | 9.10 \pm 2.56 |
| Yaşlı (n=15) | 6.97 \pm 3.29* |
| Diabet (Tip II) (n=11) | 10.21 \pm 1.68* |

**Şekil 6: Normal, yaşlı ve Tip II diabetik grupların glutatyon değerleri**

Yaşlanmanın nedeni olan lipid peroksidasyonunun eritrosit membranının temel fonksiyonlarından birini gerçekleştiren glukoz transportunu etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla yaşlı ve genç gruptan elde edilen eritrositlerdeki glukoz transportuna bakıldı. Yaşlı grupların eritrositlerindeki glukoz transportunun kontrol grubuna kıyasla bariz bir şekilde azaldığı tablo 4'de görülmektedir ($p < 0.001$).

Aynı çalışma tip 2 diabetiklerde de tekrarlandı ve bu grup kontrollerle kıyaslandığında glukoz transportunda anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.001$). Yaşlıların glukoz transportundaki azalmanın tip 2 diabetiklere göre daha fazla olduğu bulundu (Tablo 4).

Tablo 4 : Normal, yaşlı ve tip II diabette glukoz transportu

| | <i>Vaka Gruplar Sayısı</i> | <i>Glukoz Transportu (nmol/hücrexdak.)</i> | <i>Standart Sapma</i> |
|-----------------|----------------------------|--|-----------------------|
| Normal | 10 | 1.01 | 0.07 |
| Yaşlı | 10 | 0.35* | 0.03 |
| Diabet (Tip II) | 10 | 0.65* | 0.9 |

Normalle karşılaştırıldığında

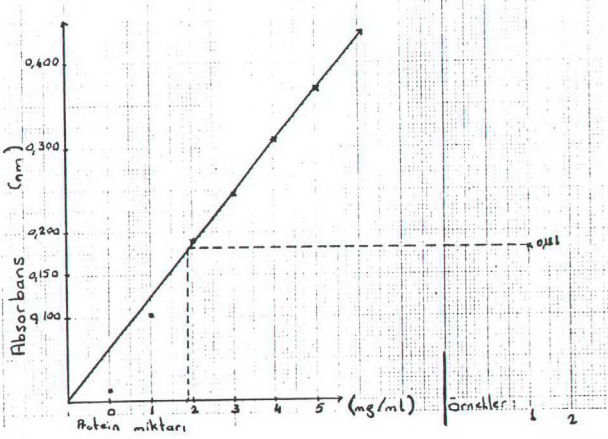
* $p < 0.001$

Yaşlı ile Diabet karşılaştırıldığında

$p < 0.05$

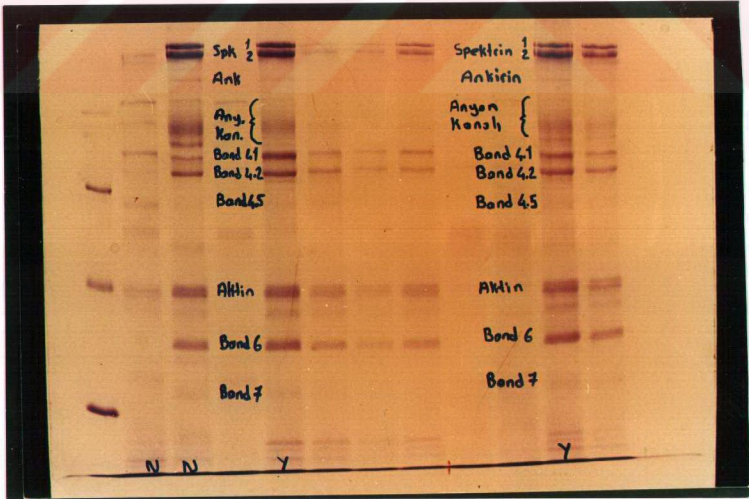
Yüksek lipid peroksidasyon düzeylerinin eritrosit membran proteinleri miktarında değişikliğe neden olup olmadığını göstermek amacıyla; kontrol, yaşlı ve tip 2 diabetik grup eritrositlerinden ghostlar hazırlandı.

4.4. Farklı gruplardan elde edilen eritrosit ghostlarının içerdiği protein miktarları Lowry yöntemiyle tesbit edildi. Bunun için; hazırlanan örneklerin spektrofotometrede okunan absorbans değerleri BSA (Bovin serum albumini) miktarlarına göre çizilen grafikte yerlerine konarak mg/ml cinsinden protein miktarları hesaplandı (Şekil 7).



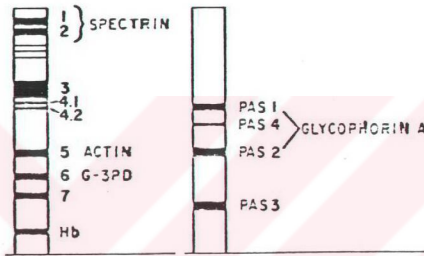
Şekil 7. Lowry yöntemine göre ghost proteinlerinin miktarlarının standard BSA'ya göre çizilen grafik yardımıyla tayin edilmesi.

4.5.A. Sonra her bir numuneden istenilen miktarlarda protein (30-75 μ g) poliakrilamid jele (SDS-PAGE) uygulanarak incelendi. Kontrol grubuna ve yaşlılara ait eritrosit ghost membran proteinlerinin elektrofores profilleri Şekil 8'de görülmektedir.



Şekil 8. Normal (70 μ g) ve değişik miktarlardaki (70 \pm g, 50 \pm g, 30 \pm g) yaşlılara ait eritrosit membran proteinlerinin band profilleri

Temel protein bandları molekül ağırlıklarına göre sırasıyla; spektrin 1 (α) "240 kD", spektrin 2 (β) "225 kD", ankirin (band 2.1) "205 kD", anyon kanalı (band 3) "89 kD", band 4.1 "78 kD", band 4.2 "72 kD", aktin (band 5) "43 kD", (gliseraldehid 3 fosfat dehidrojenaz) G3PD (band 6) "35 kD", band 7 "29 kD" olup (Şekil 9); diğer gruplardaki bandlar ile mukayese edildi (Şekil 8)



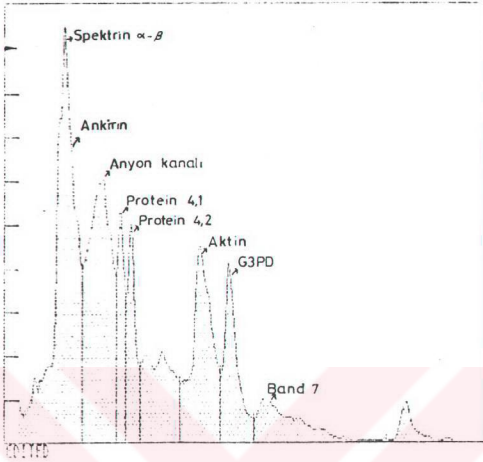
Şekil 9 : Eritrosit membran proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforez profilleri. Jeller Coomassie Brilliant Blue ile (solda) ve PAS boyası ile (sağda) boyandıklarındaki görülen band profillerinin şematik görünümü.

Kontrol grupta tespit edilen bu protein profilleri, yaşlı grupların eritrosit membran profilleriyle kıyaslandığında; bariz bir fark saptanmamasıyla birlikte, band 3'ün yaşlılarda hafifçe azaldığı görüldü.

Elektroforez band profillerinin protein miktarlarını saptayabilmek amacıyla dansitometrik ölçümleri de yapıldı (Şekil 10 ve 11).

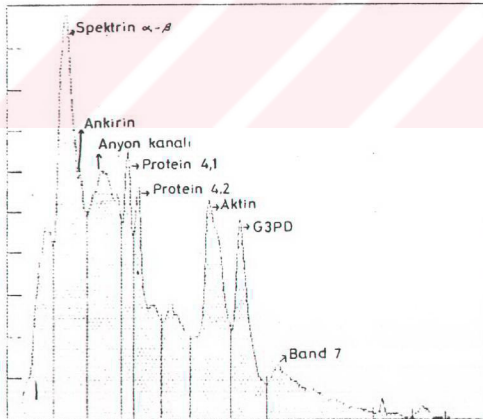
4.5.B. Normal ve yaşlı grupların SDS-PAGE jeli PAS boyasıyla boyanarak eritrosit membranlarındaki glikoproteinler incelendi (PAS 1,4,2,3) (Şekil 12).

Bazı yaşlı eritrosit glikoprotein profillerinde PAS 4 ile 2 bandları arasında yeni bantlar gözlemlendi (Şekil 13).



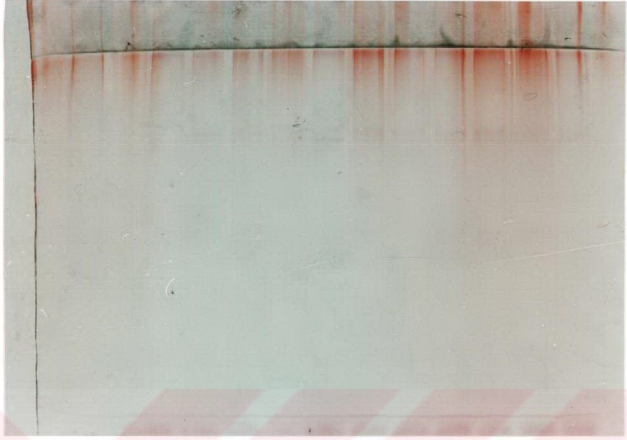
| FRACTION | % |
|--|-------|
| Spektrin α - β ve Ankinin | 30.36 |
| Anyon kanalı | 22.35 |
| Protein 4,1 | 5.35 |
| Protein 4,2 | 6.04 |
| | 9.12 |
| Aktin | 13.28 |
| G3PD | 7.74 |
| | 5.76 |

Şekil 10: SDS-PAGE elektroforezi ile ghostlardan elde edilmiş normal bir şahsa ait eritrosit membran proteinlerinin dansitometrik dağılımları

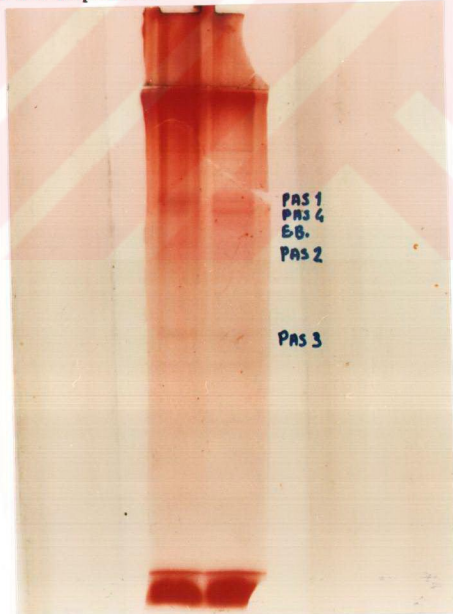


| FRACTION | % |
|---------------------|-------|
| Boya artıfaktı | 9.08 |
| Spektrin ve Ankinin | 23.49 |
| Anyon kanalı | 18.25 |
| Protein 4,1 | 6.51 |
| Protein 4,2 | 8.69 |
| | 6.56 |
| Aktin | 12.71 |
| G3PD | 7.73 |
| | 6.07 |
| | 0.53 |
| | 0.38 |

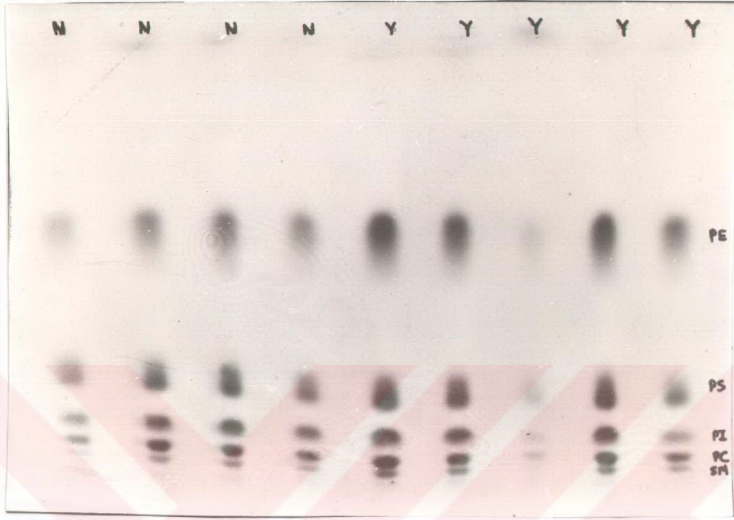
Şekil 11: Bir yaşlının eritrosit membran proteinlerinin dansitometrik dağılımları



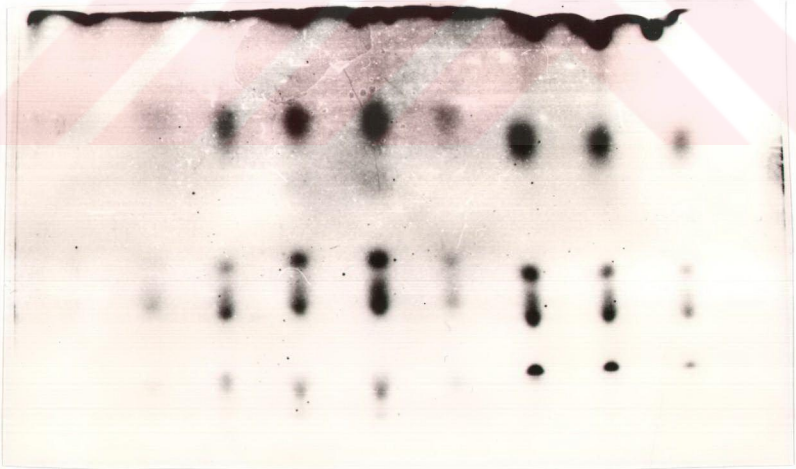
Şekil 12: Normal ve yaşlı grupların SDS-PAGE jellerinin PAS ile boyandıktan sonra görülen glükoprotein band profilleri



Şekil 13: Bazı yaşlılarda görülen ekstra glükoprotein band profilleri



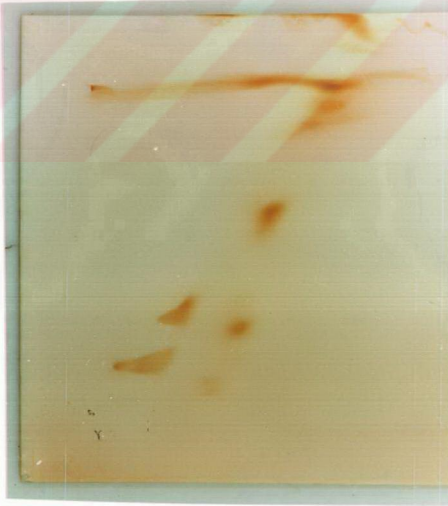
Şekil 14: Normal ve yaşlı gruba ait eritrosit membran lipidlerinin TLC profilleri



Şekil 15: Bazı yaşlılara ait eritrosit lipid TLC'lerinde PE ve PS arasında fosfolipid-MDA adduktu gözlenmektedir.



Şekil 16: Normal şahsa ait çift dimensiyonlu fosfolipid TLC profili



Şekil 17: Bir yaşlıya ait eritrosit membran fosfolipidlerinin çift dimensiyonlu TLC profili

V. TARTIŞMA

Oksijen metabolizma ürünlerini serbest radikaller, aldehitler ve çeşitli peroksitler oluşturur. Bunlar oldukça toksik yapıda olup hücre yapısında hasarlara neden olurlar(1,52,65,86,96).

Yaşlanmayla, serbest radikal oluşumu arasındaki ilişkiyi ileri süren hipotez; bu hasarın hücredeki oluşum sürecinin önemini vurgulamaktadır(7). Yaşam sürecine bağımlı olarak meydana gelen bozuklukların nedeni, hücre fonksiyonunda değişmeye neden olan bu hasarların progresif birikimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir(53,84). Hücrelerde, serbest radikaller ve onların parçalanmaları sonucu ortaya çıkan ürünlerin verecekleri hasarlara karşı, değişik savunma mekanizmaları vardır. Bunlar arasında hücrenin onarım sistemleri ile birlikte spesifik koruyucu enzimler yer almaktadır(86). Bu koruyucu mekanizmalar organizmanın yaşam sürecini belirleyici etkenler olarak kabul edilir. Örneğin süperoksit dismutaz (SOD) oksijen metabolizması sonucu ortaya çıkan zararlı ürünlerin ortadan kaldırılmasından sorumludur(13,77). İnsan eritrositlerinde SOD, kişinin hayatı boyunca yüksek bir aktiviteyle görevini sürdürürken; 65 yaşın üzerinde aktivitesinde hafif bir azalma olduğu tespit edilmiştir(65). Bunun dışında, katalaz ve glutatyon peroksidaz ve H_2O_2 'in hücrede yıkımına yolaçarlar(55). Her iki enzim aktivitelerinin de erişkin ve yaşlı şahısların eritrositlerinde azaldığı tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller ile doymamış yağ asitleri arasındaki etkileşimi yansıtır ve yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkar(59). Lipid peroksidasyonu başladıktan hemen sonra antioksidan sistem devreye girer(55,70,94).

Eritrosit membranları; yüksek miktardaki doymamış yağ asit içerikleriyle karakterize edilirler(71). Tablo 2, Şekil 5 peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan MDA birikiminin eritrositlerde organizmanın yaşlanma sürecine paralel olarak arttığını göstermektedir. Sonuçlarımız, lipid peroksidasyon miktarındaki bu artışın yaşla ilişkili olduğunu vurgulamaktadır.

MDA'nın hücredeki birikiminin yol açtığı sonuçlar şu şekilde özetlenebilir: adenilat siklaz ve protein kinaz aktivitelerinde değişiklikler, membran tabakalarındaki aminofosfolipid organizasyonunun bozulması, Hb'in fonksiyon ve stabilitesinin bozulması(56,57,65).

Yapılan çalışmalar, zar yapısını oluşturan komponentlerin büyük bir bölümünün fosfolipidlerden oluşması nedeniyle lipid peroksidasyonunun en tahripkar etkisinin burada ortaya çıktığını vurgulamaktadır(15,57). MDA oluşumu ile birlikte zar lipid-protein bileşenleri arasında çapraz bağların oluştuğu gösterilmiştir(40,59,95). Fosfolipid-MDA arabileşiminin ortaya çıkışı bunun en belirgin kanıtlarından biridir(63).

Yaşlanma ile serbest radikallerin oluşumunun artışı ve hücredeki birikimlerinin hücrede değişik hasarlara neden olduğu bilinmektedir(56). Membran lipid peroksidasyonunda artış ve MDA birikiminin hücre deformabilitesini ve de yaşamını etkilediği gösterilmiştir(20,59). Membran lipidlerinin peroksidasyonu; membran lipid ve proteinlerinin çapraz bağlanmaları, enzimlerin inaktivasyonu ve hücre ölümüyle sonuçlanabilmektedir(20).

Aynı şekilde, diabetik vakalarda da hiperglisemi nedeniyle yaşlılarda olduğu gibi membran lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir(60). Tip 2 diabetlerdeki % MDA dağılımının sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak ($p < 0,05$) yüksek olduğunu bulduk. Diabetiklerin eritrositlerindeki artmış % maksimal MDA salınımı muhtemelen membranın yükselmiş fosfolipid düzeyleri nedeniyle meydana gelir(94). Diabette sürekli yüksek olan glukozun girdiği reaksiyonlar sonucu membrandaki lipid peroksidasyonunda artış meydana gelmektedir(4).

Gerek yaşlanma, gerekse diabette görülen serbest radikaller ve onların parçalanma ürünlerine karşı hücrenin değişik savunma mekanizmaları mevcuttur. Biz çalışmamızda düşük molekül ağırlıklı sitoplazmik bileşiklerden biri olan (GSH) glutatyonun antioksidan etkisini gösterdik. Glutatyon düzeyinin yaşlıların eritrositlerinde, normal gruba ve diabetiklere göre oldukça düşük bulunduğu tablo 3'te görülmektedir. Diğer taraftan, sağlıklı normallerle Tip 2 diabetikler arasında anlamlı fark bulunmamıştır (tablo 3, şekil 6).

Stohs ve arkadaşları; glutatyon düzeyi, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin yaşlılarda belirgin derecede azaldığını göstermişlerdir(108). Ayrıca, (SOD), katalaz, glutatyon peroksidazın; organizmanın yaşlanmasında ve biyolojik olgunlaşmasındaki rolü açıkça ortaya konmuştur(65,108).

Yaşlılıkta okside edici etkilerin sürekli birikimi ve savunma sistemlerinin aktivitelerindeki azalmaya bağlı olarak; diabette ise kompanse edilmeyen kronik hipergliseminin etkisiyle lipid peroksidasyon düzeyi yükselmektedir.

İnvitroda oksidan ajanlarla gerçekleştirilen çalışmalarda serbest radikal oluşumu ile hücredeki hasarın hücre yaşamı üzerindeki etkisi gösterilmiştir(113,117).

Yapılan son çalışmalarda MDA oluşuktan sonra eritrosit membranlarındaki lipid ve proteinlerle reaksiyona girdiğinden serbest haldeki MDA miktarının azaldığı gösterilmiştir(59). Ayrıca serbest MDA suda çözüldüğünden, difüzyon yoluyla zardan geçip, plazmaya veya ortama çıkabilmekte ve TBA reaksiyonuyla oluşan MDA'in tümü saptanamamaktadır(59). Bu durum dikkate alındığında, peroksidasyon yıkım ürünlerinin etkisinin sadece zar yapısında görülen etkiden ibaret olmadığı anlaşılmaktadır. Akışkanlığında ve hücre yaşamındaki azalma, yaşlanmanın esas parametreleri olarak görmekteyiz. Hem hücre içi, hem de hücre dışı komponentler en az membrandakiler kadar bu durumdan etkilenmektedir. Bu durumu ortaya çıkarmak amacıyla lipid peroksidasyonunun membran proteinleri ve fosfolipid dağılımı üzerindeki etkisine bakıldı. SDS-PAGE ile membran proteinlerinin profillerine baktığımızda; artan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak gruplar arasında belirgin bir fark gözlemlenmemekle birlikte, membran proteinlerinden anyon kanalında kontrole göre azalma tespit edildi. Yaşlanmayla birçok enzim aktivitesinde azalma olduğu Gafni ve arkadaşları gibi çeşitli gruplar tarafından gösterildi(44,45). Yaşlanma ile organizmanın hücrelerindeki proteinlerde oluşan bu yapısal değişiklikler ya amino asit dizisindeki değişikliklerle, ya da post-sentetik hadiselerde açıklanmaktadır(44). Post-sentetik modifikasyonlar olarak; amino asitlerde oluşan deamidasyon, oksidasyon, metilasyon gösterilmiştir. Bu tip değişiklikler enzimlerde konformasyonel değişikliklere yol açar. Böyle enzimlerde aktivite azalması gözlenmiştir. Biz de çalışmamızda membran proteinlerinden biri olan glikoz transporterinde böyle bir değişiklik olup olmadığını hem glikoz transportu yönünden, hem de miktar açısından inceledik. Yaşlı grupta glikoz transport hızında oldukça fazla azalma tespit ettik. SDS-gel elektroforezi ile de miktar dağılımına baktığımızda; kontrollere göre belirgin azalma tespit edemedik. Bu durum bize glukoz transporterinde miktardan ziyade fonksiyonel bir değişikliği sezindirmektedir.

Membranın; tek ve çift dimensiyonlu (TLC) ince tabaka kromatografisi ile fosfolipid dağılımına bakıldığında, yaşlı grupta kontrollere göre miktar açısından bir azalma görülmemektedir.

Yaşlı grupta MDA'in membranın aminofosfolipidleri ile etkileşip yeni bir ürüne sebebiyet verdiği şekil x'te görülmektedir. Bu ürün PS ile PE arasında yer almaktadır. Oluşan bu addukt MDA'in aldehid grupları ile PS ve PE'in amino gruplarının çarpaz bağlantısı sonucu oluşmuştur. Aynı ürünü Tip 2 diabetiklerde de gösterilmiştir(58,59,60).

Tip 2 diabetiklerde de yaşlanmada olduğu gibi eritrosit deformabilitesinde azalma, frajilitede artma tespit edilmiştir(78,94). Glikozun yüksek düzeydeki eritrosit membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olması; diabetiklerde eritrosit dokusunda meydana gelen hücre hasarlarının hiperglisemi ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca glikozun indüklediği membran lipid peroksidasyonu ve ozmotik frajilite arasında pozitif korelasyon diabetiklerde de vurgulanmaktadır(60).

Diabetiklerde gözlenen membran lipidlerindeki peroksidasyonun yol açtığı (membran rijiditesinde artış, hücre deformabilitesi ile lipid akışkanlığında ve hücre yaşamındaki azalma) yaşlanmanın esas parametreleri olarak görmekteyiz.

VI. ÖZET

Son yıllarda biyolojik sistemlerdeki peroksidasyon olayları büyük önem kazanmıştır. Serbest radikaller ile uyarılmış lipid ve proteinlerin peroksidasyonu, hücre membranının yapısal organizasyonu ve fonksiyonunda birçok değişikliklere neden olmaktadır. Membran lipidlerinin peroksidasyonu hücre deformabilitesinin azalması, membran rijiditesinin artması gibi birçok patolojik olgu ile alakalı görülmektedir(21,59,94,113). Hidrojen peroksit, doymamış alkil yan grupları ile reaksiyona girerek peroksi grupları oluşturabilmektedir. Bunun yanısıra hidrosil radikallerinin diabetle ilişkisi olduğu da bilinmektedir. Diabette, eritrosit membran fonksiyonlarında değişimler meydana gelir. Bu durum membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu ortaya çıkabileceğini akla getirmektedir. Çünkü yüksek glikoz düzeylerinde eritrosit membran lipidlerinde de peroksidasyon oluşabilmektedir(60,61,94).

Yaşlanma ile de oksidatif etkilerin birikimi sonucu hasarlı hücresel yapılar artmaktadır(65). Tüm bunlara rağmen, bu hücre hasarına neden olan biyokimyasal mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Fakat membran protein ve lipidlerinin hücrenin normal fonksiyon ve yaşamını sürdürmedeki gerekliliği bilinen bir gerçektir. Oksijen parçalanma ürünlerinin membrandaki lipidler ile proteinler arasında çapraz-bağ oluşumuna ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür(58,86,93,94,95).

Biz çalışmamızda bu etkilerin en açık şekilde görülebildiği eritrosit hücrelerini kullandık. Eritrosit membranları fazla doymamış yağ asidi içerdiklerinden, oksidan etkiye çok maruz kalırlar.

Yaşlı ve Tip 2 diabetiklerin lipid peroksidasyonununun bir göstergesi olan % MDA değerleri normal gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna karşılık, hücrenin savunma sistemlerinin göstergelerinden biri olan glutatyon (GSH) düzeyleri yaşlılarda daha düşük iken ($p < 0,05$); diabetiklerde normallere göre fark bulunamamıştır.

Peroksidasyonun sonucunda ilgili grupların lipid ve proteinlerinde oksidasyona bağlı hasar ve değişiklikler beklenebilir. Gerçekten; (TLC) ile fosfolipidler incelendiğinde, MDA'in PS ve PE ile yaptığı çapraz bağlar sonucunda bir adduktun ortaya çıktığı görülüyor. Elektroforez ile membran proteinlerine baktığımızda ise, yaşlılardaki bazı band profillerinde azalma olabileceğini söylemek mümkündür. Ayrıca; eritrosit membranının en önemli fonksiyonlarından biri olan glikoz transportu da hem yaşlılarda, hem de Tip 2 diabetiklerde çok ileri düzeyde azalmaktadır.

Sonuçlarımız; yaşlanma ve tip 2 diabette, eritrosit membranlarında ortaya çıkan hasarın serbest radikallerle ilişkisini vurgulamaktadır.

S U M M A R Y

Peroxidation of lipids in biological systems is gaining increasing interest in recent years. The occurrence of free radical-induced lipid peroxidation causes considerable changes in the structural organization and the function of the cell membrane. Peroxidation of membrane lipids has been associated with a number of pathological phenomena such as increased membrane rigidity, decreased cellular deformability reduced erythrocyte survival and lipid fluidity. Hydrogen peroxide is capable of introducing peroxide groups by reacting with unsaturated alkyl side chains and it has been shown that hydroxyl radical can mediate diabetes. Some alterations occurs in the functions of erythrocyte membrane in diabetes. These alterations in diabetes may be associated with the peroxidation of membrane lipids. Because lipid peroxidation of erythrocyte membranes increase at the high glucose level.

There is an accumulation in oxidatively damaged cellular components with age. Although, biochemical reactions leading to cell damage are unknown. But it is also known that, lipid and protein components of membranes are necessary for cell survival and function.

In this study, we have used erythrocytes in which the effect of oxidative agents observed most clearly. Since the erythrocyte membranes contain excessive amounts of polyunsaturated fatty acids, they are more

easily exposed to the harmful effects of oxidants.

The MDA % values which are the indicator of lipid peroxidation were found to be significantly higher ($p < 0.05$) in the geriatric and type 2 diabetic groups compared to normal population. Controversially, the glutathion level (GSH), one of the defence mechanism of the cell, was found to be low in the aged group ($p < 0.005$) while no difference was observed in the diabetic group compared to normals.

Peroxidation might have damaged and changed the lipids and proteins of these two groups due to oxidation. Investigation of the phospholipids with TLC indicates an adduct formed by cross-linking of MDA, PC and PE. Elektrophoresis of the membrane proteins of the aged, can be said to show a decrease in some of the band profiles.

Glucose transport, that is one of the most important functions of the erythrocyte membrane, is decreased to very low levely in both the geriatric and the type 2 diabetic groups.

KAYNAKLAR

- 1- Ames B.N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat Res.* 214:211-46; 1989.
- 2- Bartosz G. Erythrocyte Aging: Physical and Chemical Membrane Changes; *Gerontology.* 37:33-67; 1991.
- 3- Bartozs G., Soszynki M. *Mechan Aging Dev.* 19:45-52; 1983.
- 4- Baynes J.W., Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40:405-412; 1991.
- 5- Bell G.I.: Molecular defects in diabetes mellitus. *Diabetes* 40:413-422; 1991.
- 6- Bennet V., Lamberts S. The spektrin skeletoni Form red cells to bra- in *J.Clin. Invest.* 84:1483-1489; 1991.
- 7- Bennet V., Stenbuck P.J. Association between ankyrin and cytoplas- mic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membra- ne. *J.Biol Chem.* 255, 6424-29; 1980.

- 8- Birlouez-Aragon I. et al: Evidence for a relationship between protein glycation and red blood cell membrane fluidity. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 170:1107-1113; 1990.
- 9- Bourre, J.M., Vitamin E protection of membrane polyunsaturated fatty acids against radical peroxidation in the Red Blood Cells *Bull. Acad. Med.* 175(8):1305-1317; 1991.
- 10- Branton D. et al. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*. 24:24-32; 1981.
- 11- Bretscher M.S. Membrane structure: Some general principles. *Science*, 181:623; 1978.
- 12- Burnet H.F., Miller K. *Intrinsic mutagenesis: A genetic approach for aging*. New York; Wiley. 1974.
- 13- Bus J.S., Gibson J.E. Mechanism of superoxide radical mediated toxicity. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 19:689-697; 1983.
- 14- Carrel R.W., "Activated oxygen and haemolysis" *Br.J. Haematol.* 30:259; 1975.
- 15- Castaglio C.: Oxidative state of Glutathione in RBCs and plasma of diabetic patients. In vivo and in vitro study. *Clin. Physiol. Biochem* 8:204-210; 1990.
- 16- Cerami A. et al. Glucose and aging. *Sci Amer*: 256:90-96; 1987.
- 17- Chassis J.A. Erythrocyte membrane deformability and stability: Two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J. Cell Biol.* 103:343-350; 1986.

- 18- Chasis J.A. et al.: signal transduction by glycophorin A: Role of extracellular and cytoplasmic domains in a modulatable process. *J. Cell. Biol.* 107:1351, 1988.
- 19- Chien S. Biophysical behaviour of RBC's in suspensions. In DM Surgenor (Ed) *The Red Blood Cells*, Academic Press, New York, Vol.2:1032; 1975.
- 20- Chio K.S., Tappel A.L. *Biochemistry* 8:2827-2832; 1969.
- 21- Clark M.R. Sohoet SB. *Clin Haematol.* 14:223-257; 1985.
- 22- Clemens MR et al. *Biochem Pharmacol*, 34:1339-1341; 1985.
- 23- Clemens M.R., Waller H.D. "Lipid peroxidation in Erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45:251-268; 1987.
- 24- Cogan U., Schactar D. Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with impermeant fluorophores. *Biochemistry*. 20:6396; 1981.
- 25- Cohen C.M. The molecular organisation of the red cell membrane skeleton. *Semin. Haematol.* 20:141-158; 1983.
- 26- Cohen C.M., Gascard P. Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane skeletal proteins. *Semin. Hematol.* 29:244-292; 1992.
- 27- Cohen G., Hochstein P. Glutathione peroxidase. The primary agent for the elimination of hydrogen Peroxide in erythrocytes: *Biochem.* 2:1420; 1963.
- 28- Comfort a. *The biology of senescence* (3. rd ed.) New York, Elsevier, 1979.

- 29- Cooper R.A. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of diseases. *N.Eng.J.Med.* 297:371; 1977.
- 30- Cooper R.A. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human RBC's" *J. Cell Biochem.* 8:413; 1978.
- 31- Cristofalo V.J. Overview of Biological Mechanism of Aging. *Annu. Rev. Geron. Geri.* 10:1-22; 1990.
- 32- Curtis H., Miller K. Chromosome aberrations in lower cells of guinea pig. *Journal of Gerontology.* 26:292; 1971.
- 33- Cutler R.G.: Antioxidants, Aging and Longevity in W.A Pryor (ed) *Free Radicals in Biology Vol VI*, Academic Press. New York, 371-428; 1984.
- 34- Cynamon H.A., Isenberg J.N., Nguyeon C.H. "Erythrocyte MDA release in vitro a function measure of vitamin E status. *Clin Chem Acta.* 151; 169-176, 1985.
- 35- Davies KJA: Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J.Biol. Chem.* 262:9895-9901; 1987.
- 36- De AK., Darad R. Age-associated changes in antioxidant and antioxidative enzymes in rats. *Mech. Ageing Dev.* 59(1-2):123-128; 1991.
- 37- Dodge J.T. et al: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100:119; 1963.
- 38- Eaton W.J. Philip E., Halloway and Nihol S. Agar. Seventh Ann Arbor Conference, pages. 23-38, Alan R. Liss in.

- 39- Elbrink J., Bihler I. "Membrane transport its relation t cellular meta-
bolik rates. *Science*. 188:1177; 1975.
- 40- Failla G. The aging process anda carcinogenesis. *Annals of the New
York Academy of Sciences*. 71:1124; 1958.
- 41- Fairbanks G., Steck T.L., Wallahc D.F.H. Eelectrophoretic analysis
of major polypeptides of the human erythrocyte membrane *Bioche-
mistry*. 10:2606-2617; 1971.
- 42- Fisher K.A. Analysis of membrane halves: Cholesterol *Proc.Natl.
Acad. Sci. USA*. 73:173; 1976.
- 43- Furthmayr H.: Gylcophorins A,B,C.: A family of sialoglyeoproteins.
İsolation and preliminary charcterization of trypsin-derived peptides:
J.Cell Biochem 9:79; 1978.
- 44- Gafni A. Altered Protein metabolism in aging. *Annu Rev. Geron.
Geri* 10; 117-131; 1990.
- 45- Gafni A. Age-related effects in enzyme metabolism and catalysis.
Rev. Biol. res. Aging. New York. a.R.Liss vol.4:315-336; 1990.
- 46- Glomset J.A. The plasma lecithinr: Cholesterol acyltransferase reacyi-
on. *J.Lipid res.* 9:155, 1968.
- 47- Goldberg B, Stern A: *J.Biol Chem.* 250:2401-2403; 1975.
- 48- Gordon Smith E.C., White J.M. *Br. J. Heamatol.* 26:513-517; 1974.
- 49- Haest C.W.M., Deuticke B. Possible realitonship between membrane
proteins and phospholipid asymmetry in human RBC membrane. *Bioc-
him. Biophys. Acta.* 436:353; 1976.

- 50- Hall T.G., V.Bennett. Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J.Biol Chem.* 262:10537-10545; 1987.
- 51- Halliwell B., Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radiacals, transition metals and disease. *Biochem J:* 219:1; 1984.
- 52- Harman D. Aging: A theory based on free-radical and radiation chemistry. *J. Gerontology;* 11:198-300; 1956.
- 53- Harman D. The aging process. *Proc. Natl. Acad Sci. USA:* 78:7124-7128; 1981.
- 54- Harman D.: free-radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275(3-6):257-266; 1992.
- 55- Hebbel R.P. "Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability" *J. Lab. Clin Med.* 6 may. 401-406; 1986.
- 56- Jain SK. et al. The effect of MDA a product of lipid peroxidation on the deformability and dehydration of erythrocytes. *Br.J. Haematol* 53:247-255; 1983.
- 57- Jain S.K. The accumulation of MD a product of fatty acid peroxidation can disturb Aminophospholipid organisation in the membrane. Bilayer of human erythrocytes *J.Biol Chem* 25:3391-3394, 1984.
- 58- Jain S.K. In vivo externalization o PS and PE in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J.Clin. Invest.* 76:281-286; 1985.
- 59- Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the invivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta.* 937:205-210; 1988.

- 60- Jain S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human RBC's. *J.Biol. Chem.* 264:21340-21345; 1989.
- 61- Jain,S.K. et al.: Elevated lipid peroxidation levels in RBC's of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism.* 39:971-975; 1990.
- 62- Jain SK., Hochstein P. Polymerisation of membrane components in aging RBC's., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92:247-254; 1980.
- 63- Jain S.K., Sohet S.B.: A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: Evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood*; 63:362-367; 1984.
- 64- Jain S.K., Subrahmanyam D.: Two-dimensional thinlayer chromatography of polar lipids. *Ital.J.Biochem.* 27:11-19; 1978.
- 65- Jozwiak Z., Jansnowska B.: "Changes in oxygen-metabolizing enzymes on lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor." *Mech. Ageing and Dev.* 32:77-83; 1985.
- 66- Kadlubowski M: The effect of in vivo aging of the human erythrocyte on the protein of the plasma membrane. A characterisation. *Int J.Biochem.* 9:67-88; 1979.
- 67- Kanakaraj P., Singh M. Influence of hypercholesterolemia on morphological and rheological characteristic of erythrocytes. *Atherosclerosis.* 76:209-218; 1989.
- 68- Kanıgür-Sultuybek G., Tezcan V. et al. There relationship between aging and changes observed in the insulin receptors and glucose transport of human erythrocytes
- 69- Kimmel JR et al. *J. Biol Chem.* 244:4565-4572; 1959.

- 70- Kobyłka D. et al. Proteins and glycoproteins of the erythrocyte membrane. Arch. Biochem. Biophys. 148:475; 1972.
- 71- Lee G.R., Birtchall T.C. et al: Wintrobe's Clinical Hematology. Telen M.J.: The Mature erythrocyte Vol 1:101-132; 1993.
- 72- Leonhardt H., Arntz H. Blutviskosität and Erythrozylenflexibilität bei primären Hyperlipoproteinämien. Klin. Wochenschrift. 56:271; 1978.
- 73- Lowry O. et al.: J. Biol. Chem. 193:265-275; 1951.
- 74- Mannhalter C. et al. Phospholipids accelerate factor IX activation in.. Br. J. Haematol 41:223-224, 1984.
- 75- Matsubara L.s. Machado R.E.A. Age-related changes of glutathione content, Glut. reductase and glut. Peroxidase activity of human erythrocytes: Brazilian J. Med. Biol. Res. 24:449-454; 1991.
- 76- McCord J.M., Day ED Süperoxide dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FBBBS Lett. 86:139; 1978.
- 77- McMahon S., Stern A.: The interrelationship of süperoxide dismutase and peroxidatif enzymes in the red cell. Biochim, Biophys Acta. 526:253-258,; 1979.
- 78- McMillan O.E. Utterback N.G. diabetes. 27:895; 1978.
- 79- Mische S.M. et al. Erythrocyte adducin: Acal modulin-regulated actin binding protein that stumalates spektrin-actin binding. J. Cell. Biochem 105:2837-2845; 1987.
- 80- Miller J.A., Gravellese E., Bunn H.F. Nonenzymatic glycosylation of the erythrocyte membrane proteins: relevancet. diabetes J. Clin. Invest; 65:896-901; 1980.

- 81- Mohammed, Y.H. et al.: Glutathione and lipid peroxidation in the aging rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B:177-180; 1987.
- 82- Mueckler M. et al. "Sequence and structure of a human glucose transporter" *Science*. 229:941; 1985.
- 83- Nelson G.J. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals. *J.Lipid Res.* 8:374; 1967.
- 84- Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br.Med. Bull.* 49:653-667; 1993.
- 85- Oliver C.N. et al. Age related changes in oxidized proteins. *J.Biol. Chem.* 262:5488-5491; 1987.
- 86- Pacifici RE, Davies KJA. Protein, Lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of Aging. *Revited Gerontology* 37:166-180; 1991.
- 87- Pacifici R.E., Salo D.C., Davies K.J.A.: macroxyproteinase (MOP): A 670kDa proteo-complex that degrades oxidatively denatured proteins in RBCs. *Frec Rad. Biol. Med.* 7:521-536; 1989.
- 88- Pescarmora G.P., et al. Shortened red cell life span in diabetes mechanism of hemolysis. *Adv. Red Blood Cell Biol.* 1:391; 1981.
- 89- Rose H.G., Oklander M.: Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocyte. *J.Lipid Res.* 6:528-531, 1968.
- 90- Rosenberg S.A., Guidotti G.: "Fractionation of the protein components of human erythrocyte membranes": *J.Biol Chem.* 244:5118, 1969.

- 91- Rothman J.E., Lenard J. Membrane asymetry. *Science* 195:743; 1977.
- 92- Sayed M.H. et al Hemoglobin a biological fenton reagent. *J.Biol. Chem.* 259:14354-14356; 1984.
- 93- Schwartz R.S. et a. Oxidation of spektrin and deformability defects in diabetic erythrocytes. *Diabetes*: 40:701-708, 1991.
- 94- Selvam R, Anuradha CV. Lipid peroxidation and anti peroxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *Ínt. J. Biochem. Biophys.* 25:268-272; 1988.
- 95- Seppi C. et al. Evidence for membrane protein oxidation during in vivo aging of human erythrocytes. *Mech. Ageing and Dev.* 57:247-258; 1991.
- 96- Sevanian,A., Hochstein,P., Mechanisms and consequences of lipid peroksidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* 5:365-390; 1985.
- 97- Sharma R, Premachandra BR. Membrane bound Hemoglobin as a marker of oxidatif injury in adlut and neonatal RBCS. *Biochem Medand Met.Biol.* 46:33-44; 1991.
- 98- Shiga T. Maeda N. Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions. *Biorheology.* 17:485; 1980.
- 99- Shigeru S. Blood Filterability in cardiovascular disorders with referen- ce mechanism of hemolysis. *Adv. Red Blood Cell Biol.* 1:391; 1981.
- 100- Sies H., Stabl W. Sundquist A.R.: Antioxidant functions of vitamins Vit E. and C, beta-carrotene and other carotensids. *Ann. N.Y. Acad Sci* 2:669; 7-20; 1992.

- 101- Singer S.J. The molecular organisation of biological membranes. Structure and function of biological membranes. L.I. Rothfield editor. Acda. Press N.Y. 145; 1971.
- 102- Singer S.C., Nicholson G.L. The fluid mosaic model of the structure off cell membranes. Sciences. 175:720; 1972.
- 103- Snyder LM et al. Irreversible spectrin. Hb crosslinking in vivo A marker for ered dcell senesecence. Br. j. Haematol 53:379-384; 1983.
- 104- Sohal R.S., Allen R.G. Oxidative ve stress as a causal facor in differentiation and aging: Annufying hypothesis. Exp. Geront. 1990.
- 105- Sohet S.B. Haemolysis and changesin erythrocyte membrane lipids. N.Eng. J. Med. 577:638; 1972.
- 106- Srivastava,S.K., Beutler,E.: The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. J. Biochem. Chem. 244:9-15; 1969.
- 107- Steck T.C. Organisation of proteins in the human RBC membrane. J. Cell Biol. 62:1; 1974.
- 108- Stohs S.J. et al. Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes as a function of age of donor. Age 7:3-7; 1984.
- 109- Stocks J., Dormandy T.L. "Br J. Haematol. 20:95-11; 1971.
- 110- Takakuwa T. et al. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. Biorheology. 27:357-365; 1990.
- 111- Schofield J.D. Davies. Textbook of greiatric medicine and gerontology. Theories of aging. Edit: Brocklehursf J.C. S.Ed. Churchill Livingstone Edinburg 55-57; 1978.

- 112- Tilney L.G., Detmers P. Actinin erythrocyte ghosts and its association with spektrin. *J.Cell Biol.* 66:508; 1975.
- 113- Tozzi-Ciancarelli M.G. et al: Effect of exogenous hydrogen peroxide on human erythrocytes. *Cell Mol. Biol*, 36(1):57-64, 1990.
- 114- Weed R.I.: The importance of erythrocytes deformability. *Am.J.Med.* 49:147; 1970.
- 115- Weinstein R.S. The morphology of adult red cells. In D.M. Surgenor (ed) *The Red Blood Cells*. Academic Press. New York Vol 1:213; 1974.
- 116- VanDeenen LLM. Topology and Dynamics of phospholipids in membranes. *FEBS Lett.* 13:3-15; 1981.
- 117- Van der Zee J. et al: Peroxide induced membrane damage in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta*; 818:38-44; 1985.
- 118- Zwaal RFA Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 515:163-205; 1978.
- 119- Zahler, P.: Membrane Models and the formation. *Biological Membranes*. Bolis, L., Pathica, B.A. Eds. p.181, Amsterdam. North Holland Publishing Co., 1986.