

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biokimya Anabilim Dalı

**SAĞLIKLI İNSANLARDA ERİTROSİT MEMBRANI  
Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz ve Ca<sup>2+</sup>ATPaz AKTİVİTELERİNE VE  
SİYALİK ASİT DÜZEYLERİNE  
YAŞLANMANIN ETKİSİ**

111747

111747

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof.Dr. Pernur ÖNER

Kim. Hikmet SELHEP

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İstanbul, 1993

## **TEŐEKKÜR**

*Yüksek Lisans eğitimin süresince büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm, tez çalışmalarımın yürütülmesinde ve tamamlanmasında hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan değerli hocam Sayın Prof.Dr. Pernur Öner'e, Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Hikmet Öz'e; her zaman ve her koşulda ilgisini ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Selda Bekpınar'a, bilimsel deneyimleri ve bilgileriyle araştırmamın yürütülmesinde ve yetiştirilmemde daima yol gösterici olan Sayın Doç.Dr. Orhan Turan'a ve Monoblok Acil Laboratuar çalışanlarına; ayrıca bu noktaya erişmemde emeği geçen tüm hocalarıma teőekkür eder, saygılar sunarım.*

**Hikmet SELHEP**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	5
- ERİTROSİT MEMBRANI ve YAPISI	5
- ATPaz'lar ÜZERİNE BİLGİLER	9
- YAŞLANMANIN BİOKİMYASI	16
<b>MATERYEL VE METODLAR</b>	20
A. MATERYEL	20
B. METODLAR	26
<b>BULGULAR</b>	34
<b>TARTIŞMA</b>	46
<b>ÖZET</b>	53
<b>KAYNAKLAR</b>	55

## KISALTMALAR

<b>TBA</b>	Thiobarbitürük asit
<b>VKI</b>	Vücut kitlesi indeksi
<b>EGTA</b>	Etilen glikol tetra asetik asit
<b>TCA</b>	Triklorasetik asit
<b>P<sub>i</sub></b>	İnorganik fosfor
<b>HClO<sub>4</sub></b>	Perklorik asit
<b>TSA</b>	Total sialik asit
<b>Na<sup>+</sup><sub>E</sub></b>	Ekstrasellüler = plazma sodyum
<b>Na<sup>+</sup><sub>i</sub></b>	İntrasellüler = eritrosit sodyum
<b>K<sup>+</sup><sub>E</sub></b>	Ekstrasellüler = plazma potasyum
<b>K<sup>+</sup><sub>i</sub></b>	İntrasellüler = eritrosit potasyum
<b>P-SA</b>	Plazma total sialik asit
<b>EM-SA</b>	Eritrosit membranı total sialik asit



Total hücre sialik asidinin % 70'i hücre membranında bulunur<sup>(16)</sup> ve sialik asit, membranın negatif elektrik yükünden sorumlu olup, katyon bağlanması, transport ve permeabilite olaylarında rol alır<sup>(8)</sup>. Ayrıca sialik asit, insülin, serotonin, opiat ve interferon reseptörlerinin bileşiminde bulunur ve sinir iletilerinin devamı için gereklidir<sup>(116,129)</sup>. Sialik asidin yaşlanmaya paralel olarak hücre membranlarında azaldığı gösterilmiştir<sup>(40,111,113,118)</sup>. Sialik asit kaybının, normal eritrosit yaşlanmasında ve bu yaşlı hücrelerin sonradan uzaklaştırılmasında önemli bir mekanizma olduğu bildirilmiştir<sup>(40,118)</sup>.

Yaşlanma olayı sırasında oluşan fizyolojik ve biokimyasal değişikliklerin belirlenmesinde, çeşitli dokularda spesifik enzim aktivitelerindeki değişikliklerin ölçülmesi önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Organizmanın yaşlanması sırasında bazı enzimlerin aktivitelerinde çoğunlukla azalma şeklinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir<sup>(51)</sup>. Bu bakımdan önemli sorulardan biri, enzimin azalmasına belirli bir zamanda incelenen enzimin miktarı ya da konsantrasyonu mu, yoksa enzimin protein konsantrasyonu sabit kalırken, aktivitesinin azalmasının mı sebep olduğudur. Diğer önemli bir soru da, ısıya-labil enzimlerin varlığıdır. Bu görüşü destekleyen bazı çalışmalara göre; yaşlı organizmalardan izole edilen bazı enzimler, gençlerdeki aynı enzimlere kıyasla ısı denatürasyonuna karşı daha hassastır<sup>(51)</sup>.

Amino asitler, kalsiyum ve sodyum iyonları gibi birçok madde, bazı hücre membranlarından aktif olarak taşınır. Yaşlanmadan ileri gelebilecek membran yapısındaki biokimyasal ve morfolojik değişiklikler, iyonların homeostazisini de bozabilir. Gerçekten insan ve hayvanlarda yapılan tüm vücut elektrolit incelemelerinde hücre içi sodyum konsantrasyonunun ilerleyen yaşla birlikte arttığı<sup>(2,21,77,78)</sup> ve bunun sodyumun pasif difüzyonunda artış ile birlikte aktif transportunda yavaşlamaya bağlı olabileceği bildirilmiştir<sup>(21,77,78)</sup>. Hücre içi elektrolit konsantrasyonunun cinsiyetle de ilişkili olduğu, kadınlar da eritrosit sodyumunun yaşlanma ile anlamlı derecede arttığı halde, erkekler de yaşa bağımlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir<sup>(6,78)</sup>. Yaşlanma olayları, kalsiyum homeostazisi ile de ilişkilidir<sup>(93)</sup>. Gerçekten yüksek sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonunun, oksidatif hasarı hızlandırdığı ve hücre ölümüne yol açan biokimyasal yollarda önemli bir

basamak olduğu gösterilmiştir<sup>(72,94,119)</sup>. Sitozolde kalsiyum birikiminin hücrenel yaşlanma ile ilişkili olayları tetikleyen bir sebep mi, yoksa hücrenin metabolik zafiyetini izleyen benzer olayların sonucu mu olduğu kesin olmakla birlikte, eritrositin aktif kalsiyum pompasının (a) Enzim =  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$ , b) Enzimin protein inhibitörü ve c) Kalsiyum pompasının protein stimulatörü = Kalmodulin) primer rolü olduğu sanılmaktadır<sup>(12)</sup>. Sialik asidin negatif yüklü karboksil gruplarının da hücre membranlarındaki kalsiyum bağlanma yerlerinden biri olduğu bilinmektedir<sup>(8)</sup>. Kas hücresinden sialik asit uzaklaştırılınca bağlanma azalır, kalsiyumun hücreye girişi artar ve membran polaritesi azalır<sup>(8)</sup>.

Membranın yapısal bütünlüğünün korunmasında, öncelikle membranın çift tabakasını oluşturan fosfolipid molekülleri ve membranın integral proteinleri olan membrana-bağlı enzimler önem taşır. Yaşlanmada membran lipidlerindeki başlıca değişiklikler, fosfolipidlerdeki yağ asitlerinin doymamışlığının azalması ve kolesterol artışıdır<sup>(87,125)</sup>. Bu değişiklikler membran akışkanlığını azaltır ve böylelikle membrana-bağlı transport enzimlerin aktiviteleri olumsuz yönde etkilenir<sup>(87,91,109)</sup>.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ , membran bütünlüğünün ve hücredeki iyonik asimetrinin korunmasından sorumlu başlıca membrana-bağlı transport enzimidir. Yaşlanmaya bağlı, insan ve hayvanlarda eritrosit ve diğer dokuların  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitelerinin de çoğunlukla azalma<sup>(2,13,38,39,47,49,83,98,119)</sup> veya artma olduğu<sup>(32)</sup> ya da yaşlanmanın hiçbir etkisinin olmadığı<sup>(15,104,122)</sup> bildirilmiştir. Yaşlanma ile enzim aktivitesi arasındaki bu farklı çalışmalarla birlikte cinsiyet ile enzim aktivitesi arasında da çelişkili bulgular vardır. Bazıları yaşlanma ile eritrosit  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ 'ının yalnızca kadınlarda azaldığını bildirdikleri halde<sup>(52,78,95,104)</sup> bir başka araştırmacı grubu ise<sup>(39)</sup>, yaşlı erkeklerin eritrosit  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ 'ında azalma bulmuşlardır. Bunlara göre yaşlanmanın insanlarda  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  sistemine etkisi konusundaki bilgiler çelişkili olup, yeterince güvenilir değildir.

Diğer taraftan konağın yaşlanması yanında, dolaşımdaki eritrositlerin yaşlanmasının da membrana-bağlı enzim aktiviteleri ile sıkı ilişkili olduğu gösterilmiştir. Eritrositin, yüksek organizmalarda hücre ve organizma yaşlanmasının etkilerinin ve ayrıca sodyum iyon transportunun incelenmesinde uygun model olduğu öne sürülmüştür<sup>(3,14,93,122)</sup>. Bunun nedenlerinden biri, insanlarda 110-120 günlük sabit bir yaşam süreci olan eritrositin nükleus

ve genetik materyali olmadığından protein sentezleyememesi ve bu nedenle de herhangi bir enzim ve yapısal proteininin kendisi kadar yaşlı olmasıdır. Ayrıca hücresel bileşikleri olmadığından, başlıca glikoliz ve pentoz-fosfat yoluna bağlı oldukça basit bir biokimyasal metabolizması vardır. Bir diğer neden, eritrositlerin bulunduğu plazmanın oldukça stabil olmasıdır<sup>(93)</sup>. Normal insan eritrositlerinin dolaşımında yaşlanması sırasında yapısal, kimyasal ve metabolik değişikliklere uğradığı gösterilmiştir. Eritrositlerin dolaşımdaki canlılıklarının başlıca belirleyicisi olarak kabul edilen sialik asidin, yaşlı eritrositlerin membranında gençlere göre azaldığı bildirilmiştir<sup>(40,113)</sup>. Yaşlanma sonucu membrana-bağlı enzimlerin aktivitelerindeki belirgin azalma oldukça ilgi çeken değişikliklerdir<sup>(56)</sup>.

Bütün bu bilgilerin ışığında yapılan bu çalışmada, eritrosit membranının önemli yapısal ve fonksiyonel bileşikleri olan membrana-bağlı transport ATPaz aktiviteleri( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPaz,  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz) ve sialik asit (NANA) düzeylerindeki yaşa bağımlı olabilecek membranöz değişikliklerin incelenerek bu konudaki sınırlı bilgilere katkıda bulunulması, ayrıca bu bileşiklerin memleketimiz insanlarındaki normal değerlerinin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.



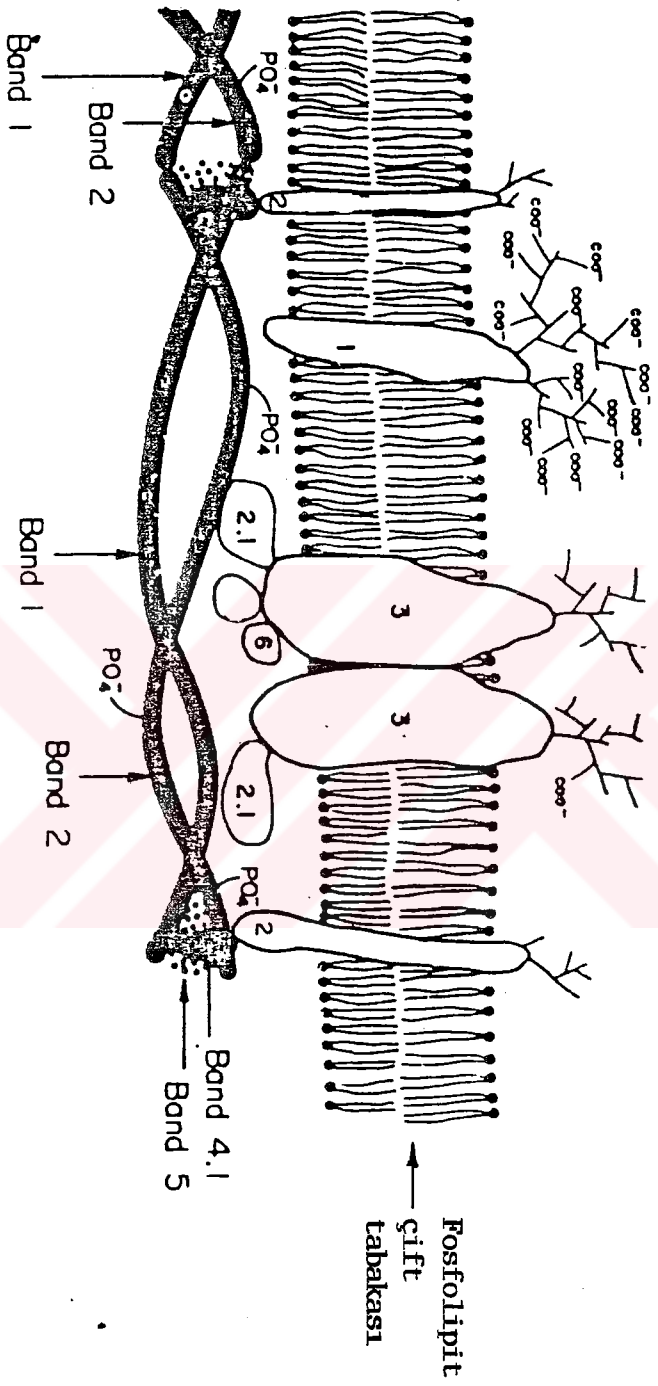
## GENEL BİLGİLER

### ERİTROSİT MEMBRANI VE YAPISI

**Eritrosit Membranının (Ghost) Yapısı:** Eritrosit membranı, eritrositin kuru ağırlığının yaklaşık % 1'i kadardır. Eritrositin bikonkav olan şeklini oluşturarak sınır görevi yapar. Transport görevleri ve katyonlara karşı seçici permeabilitesi nedeniyle, kırmızı hücrenin içeriğini düzenler ve intrasellüler ortamlar arasındaki iyonik gradyanı korur. Böylece membran, eritrositin komşu hücreler ve çevresi ile ilişkilerini düzenler.

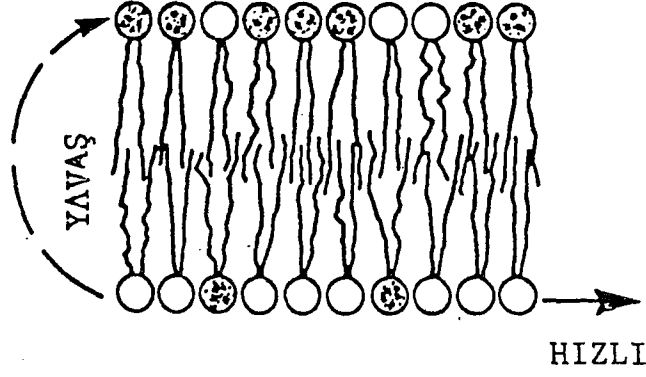
Biokimyasal olarak; eritrosit membranı protein, lipid ve karbonhidratlardan yapılmıştır. Membranın yaklaşık % 48'i protein, % 44'ü lipid ve yalnızca % 8'i karbonhidrat'tır<sup>(5)</sup>.

Tüm ökaryotik hücre membranları gibi eritrosit membranı da 1972'de Singer-Nicolson tarafından ileri sürülen<sup>(105)</sup> bir lipid çift tabakası içine asimetric gömülmüş proteinler olan akışkan bir mozaik görünümündedir<sup>(5)</sup> (Şekil 2). Fosfolipid moleküllerinin hidrofobik nonpolar grupları biri diğere karşı gelecek şekilde dizilirler ve çift tabakanın merkezini oluştururlar. Hidrofilik polar gruplar membranın ekstra ve intrasellüler yüzeylerini oluşturmak üzere dizilmişlerdir. Kolinli fosfolipidler (fosfatidil kolin ve sfingomyelin) başlıca çift tabakanın ekstrasellüler yüzünde, halbuki amino fosfolipidler (fosfatidil etanolamin ve fosfatidilserin) sitoplazmik yarısında yoğunlaşmışlardır (Şekil 3). Kolesterol, fosfolipid moleküllerinin arasına sokulmuştur. Fosfolipidlerin, lipid çift tabakasının lateral düzlemi boyunca hareketi, membranın akışkanlığını sağlar. Difüzyonların olabilmesi için bu özellik gereklidir. Membranının akışkanlığı, fosfolipidlerdeki yağ asidlerinin bileşimi ile kontrol edilir. Kısa zincirli ve doymamışlığı fazla yağ asitleri uzunlardan ve doymuşlardan daha akıcıdır. Ayrıca membran yapısında



**Şekil 2.** İnsan eritrosit membranında yapısal proteinler ve sialik asidin yerleşimi<sup>(19)</sup>. 1- Glükoforin A (major sialoglikoprotein), 2- Band 4.1'e bağlı olduğu sanılan minör sialoglikoprotein, Band 1 ve 2-eritrosit spektrini, Band 2.1- spektrinin membrana bağlanma bölgesi, 3-majör trans-membran proteini ve anyon transport proteini, Band 5-Aktin, 6-Gliseraldehit-3-fosfatdehidrogenaz.

bulunan kolesterolün de zarın akışkanlığını azaltıcı bir etki yaptığı kabul edilmektedir<sup>(27)</sup>. Membranın normal akışkanlığını korumak için optimal bir kolesterol/fosfolipid oranı gereklidir<sup>(5)</sup>.



**Şekil 3.** Eritrosit membranının fosfolipid çift tabakasının şematik gösterilişi.

- ⊙ Kolin fosfolipidleri (dışta çok)
- Amino fosfolipidleri (içte çok)

Eritrositteki lipid çift tabakasının başlıca üç bileşiği; fosfolipidler (% 60), nötral yağlar (başlıca kolesterol, % 30) ve glikosfingolipidler (% 10)'dir. Membranda yer alan fosfolipidler konsantrasyonlarına göre sırasıyla fosfatidil kolin (lesitin), fosfatidil etanolamin (sefalin), sfingomyelin ve fosfatidil serin'dir.

Akışkan mozaik modeli, membran proteinlerinin yüksek miktarlarda L-heliksi olan globüler proteinler olduğunu ve lipid çift tabakası içine değişken ve asimetrik olarak gömülü olduğunu göstermektedir (Şekil 2). Bu bakımdan membran proteinleri integral ve periferik olarak sınıflandırılabilir. Tablo 1 ve 2'de bu proteinlerin sınıflandırılması görülmektedir.

**TABLO 1: Eritrosit Membran Proteinlerinin Yapısal Sınıflandırılması<sup>(5)</sup>.**

- 
- I. İntegral (veya iç) Proteinler
    - A. Anyon transport protein
    - B. Glikoforinler: A, B, C
    - C. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz
    - D. Kan Grubu antijenleri: Rh lipoproteinleri
  
  - II. Periferel (veya dış) Proteinler
    - A. Membranın Sitoplazmik Yüzünün Proteinleri
      1. Spektrin
      2. Spektrin bağlama proteinleri
        - a) Ankirin
        - b) Sindenler
      3. Aktin
      4. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
    - B. Membranın Ekstrasellüler Yüzünün Proteinleri
      1. Asetilkolin esteraz
      2. Kan grubu antijenleri
- 

**TABLO 2: Eritrosit Membranı Proteinlerinin Fonksiyonel Sınıflandırılması<sup>(5)</sup>.**

- 
- I. Yapısal veya Destek Proteinler
    - A. Spektrin
    - B. Ankirin
    - C. Sindenler
    - D. Aktin
  
  - II. Katalitik Proteinler
    - A. Anyon-Transport Proteini
    - B. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz
    - C. Glikoz Transport Proteini
    - D. Diğer Enzimler
  
  - III. Temas veya Reseptör Proteinler
    - A. Glikoforinler: A, B, C
    - B. Kan Grubu Antijenleri
-

Biz burada saydığımız proteinler içinde konumuzla ilgili yalnız  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaz ve  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaz'ın özelliklerini belirteceğiz.

### ATPaz'LAR ÜZERİNE BAZI BİLGİLER

Eritrosit membranında iki-iyi bilinen transport Adenozin trifosfataz'ları vardır. Bunlar  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPaz ve  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz'larıdır. Birincisi  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarını, ikincisi  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunu iletir<sup>(76)</sup>. Her ikisi de ATP hidrolizini katalizler ve hidroliz sırasında açığa çıkan serbest enerjiyi, hücre membranlarından elektrokimyasal gradyene karşı iyonların transportu için kullanır.

#### $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPaz (Enzim Komisyonu No: 3. 6. 1. 3.)\*

İyon transportunda rol alan ATPazlar 3 ana gruba ayrılır. 'P', 'V' ve 'F' tipi ATPazlar. Reaksiyon sikluslarının bir yerinde fosforillenen 'P' tipi ATPazlardan en iyi bilineni, ökaryotik hücrelerin plazma membranları ve eritrosit membranlarının iyon transport ATPazı olan  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaz'dır (Tablo 3).

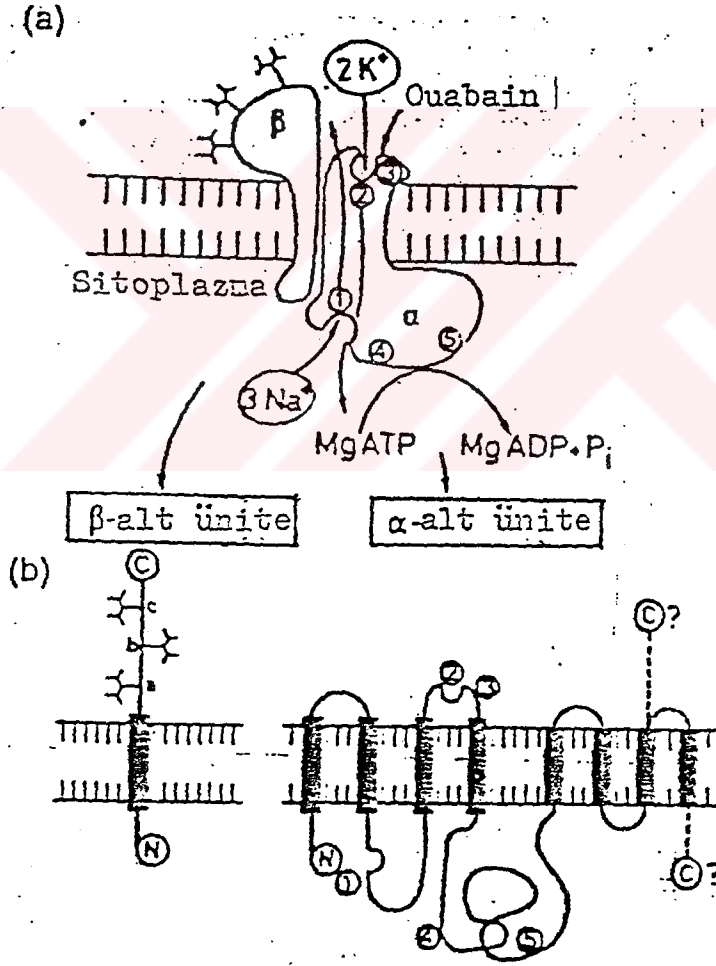
**TABLO 3:** Ökaryotik Hayvansal Hücrelerin Plazma-Membranı, İyon-Transport ATPazları (P sınıfı).

Tipi	Başlıca Fonksiyonları
$\text{H}^+$ -ATPaz	Ekstrasellüler pH düzenlenmesi
$\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaz	Transsellüler pH düzenlenmesi
$\text{Ca}^{2+}$ -ATPaz	İntrasellüler $\text{Ca}^{2+}$ düzenlenmesi
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz	İntra ve ekstrasellüler hücre hacmi Uyarılabilir hücrelerde intrasellüler $\text{Ca}^{2+}$

(\*) Her enzim numarası 4 rakamdan oluşur. İlk rakam; enzimin ait olduğu asıl özel sınıfı gösterir. Hidrolazlar, 6 temel enzim sınıfının 3'ncüsüdür. İkinci rakam; alt sınıfını gösterir. Bu sınıf hidrolazlar için, hidroliz olan bağın tipini gösterir. Bu bağ asid-anhidrid bağıdır, yani 3.6 baş no'lu enzimler asid-anhidridleri hidroliz ederler. Üçüncü rakam; daha alt sınıfı gösterir, bu rakam daha ayrıntılı olarak hidroliz olan bağın tipini gösterir. Bu grup enzimlerde bu bağ, fosforil kapsayan anhidridlerdir. Dördüncü rakam; enzimin daha alt sınıfındaki seri numarasıdır. Bu gruptaki enzimler, nükleotidler üzerine etki ederler.

## Enzimin Yapısı

Eritrosit  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazı}$  integral bir membran proteinidir. Yapısında 112 kDa büyüklüğünde bir polipeptid ( $\alpha$ -katalitik alt birimi) ve 40-60 kDa büyüklükte bir glikoprotein ( $\beta$ -alt birimi) bulunur.  $\alpha$ -alt birimi 4-8 transmembran bölüm ile bunları birleştiren sitoplazmik veya ekstrasellüler taraftaki polipeptid zincirlerinden oluşur. Enzimin bilinen tüm katalitik fonksiyonları  $\alpha$ -alt birimince gerçekleştirilir<sup>(89)</sup>.  $\alpha$ -alt biriminde  $\text{K}^+$  ve ouabain bağlanma bölgeleri ekstrasellüler tarafta,  $\text{Na}^+$ , ATP bağlanma ve fosforilasyon bölgeleri ise sitoplazmik tarafta bulunur (Şekil 4).  $\beta$ -alt birimi membrandan yalnızca bir kez geçer<sup>(90)</sup>.



**Şekil 4.** (a) Plazma membranında  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPazın}$   $\alpha$  ve  $\beta$  alt ünitelerinin yerleşimi. (b) Alt ünitelerdeki bağlanma bölgeleri: 1)  $\text{Na}^+$  bağlanma, 2)  $\text{K}^+$  bağlanma, 3) Ouabain bağlanma yeri, 4) Fosforilasyon bölgesi, 5) ATP bölgesi.

$\alpha$ -alt biriminin<sup>(100)</sup> ve  $\beta$ -alt biriminin<sup>(101)</sup> komplementer DNA'ları karakterize edilmiş ve böylece amino asit dizilişleri belirlenmiştir.

### **Enzimin Fizyolojik Fonksiyonu<sup>(108)</sup>**

#### **a) Membran Potansiyeli**

Membranın  $K^+$ a permeabilitesinin  $Na^+$ 'dan fazla olması, membranın içi ve dışı arasında -içte negatif olmak üzere- bir membran potansiyeli oluşturur.

#### **b) Osmotik Regülasyon**

Membran potansiyeli negatif olduğunda, membrandan geçebilen anyonların konsantrasyonu intrasellüler tarafta düşüktür. Bu durum membrandan geçemeyen anyonların osmotik etkisini kompanse eder.

#### **c) Sekonder Aktif (yokuş yukarı) Transport**

$Na^+$  gradienti, şekerler, amino asitler,  $Cl^-$  veya  $K^+$  artı  $Cl^-$ 'un ko-transportunu veya simportunu ve  $Ca^{2+}$  ve  $H^+$ 'in de antiportunu sağlar.

#### **d) Yüksek İntrasellüler $K^+$ Düzeyi**

Yüksek intrasellüler  $K^+$  düzeyi bazı intrasellüler enzimatik reaksiyonlar için gereklidir.

#### **e) Reabsorbsiyon İşlemleri**

Luminal membranda  $Na^+$  gradienti ile yürüyen sekonder aktif transportun bazolateral membranda aktif  $Na^+$  transportu ile birleştirilmesi, ince barsak ve böbrek hücrelerinde reabsorbsiyon için çok önemlidir.

## Enzimin Özellikleri

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPazı diğer birçok ATPazdan ayıran özelliği, aktivitesi için hem Na<sup>+</sup>, hem K<sup>+</sup>un birlikte varlığını gerektirmesidir. Hem transport hem de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz, membranın iç yüzünde Na<sup>+</sup> iyonları, dış yüzünde de K<sup>+</sup> iyonları ile aktive olur<sup>(11)</sup>. Optimal enzim aktivitesi için Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> oranı 10:1 ile 5:1 arasında, pH ise 7.0-7.5 arasında olmalıdır. Na<sup>+</sup> varlığı şarttır, fakat diğer birçok iyon K<sup>+</sup> yerine geçebilir ve etki gösterebilirler. Etki gücü bakımından, azalan etki gücüne göre sıralama, K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> şeklindedir<sup>(107)</sup>.

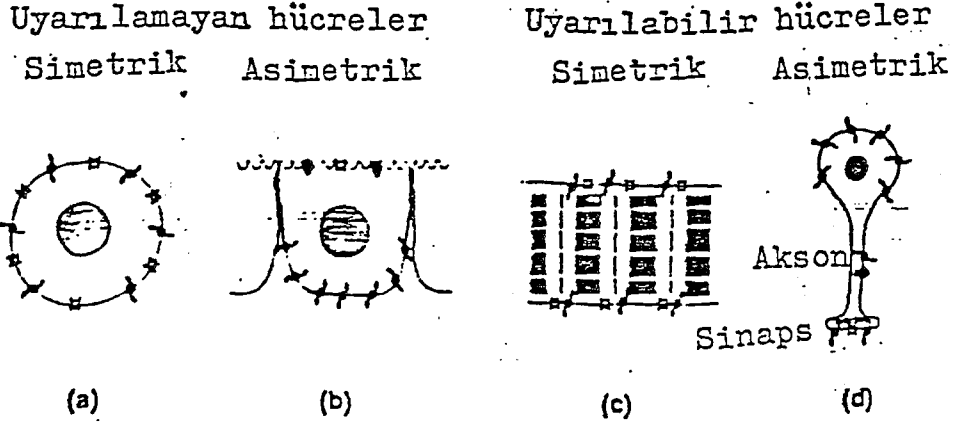
ATP, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPazın başlıca substratıdır ve ATP ile ilişkili birçok reaksiyonlarda olduğu gibi, Mg<sup>2+</sup> için mutlak gereksinimi vardır. Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonu substratın konsantrasyonuna yaklaşık olarak eşit olduğunda optimal enzim aktivitesi elde edilir. Enzimin Mg<sup>2+</sup>-ATP kompleksi üzerine maksimal aktivite göstermesi için Mg<sup>2+</sup> ve ATP konsantrasyonları genellikle ekimolar olmalıdır<sup>(106)</sup>. Mg<sup>2+</sup> veya ATP değerine göre fazla miktarlarda olduğunda inhibisyon görülür<sup>(74)</sup>.

## Enzimin Reaksiyon Mekanizması

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz reaksiyonunun tümü, ATP'nin ADP ve inorganik fosfata (P<sub>i</sub>) hidrolizini ve hidroliz olan her ATP molekülü başına 3 Na<sup>+</sup> iyonunun ekstrasellüler kompartmana transportu ile birlikte, 2 K<sup>+</sup> iyonunun intrasellüler kompartmana transportunu kapsar<sup>(62)</sup>. ATP'nin hidrolizi ve buna paralel olarak iyonların taşınması çok aşamalı bir reaksiyon dizisidir. Bu da, kısaca enzimin Na<sup>+</sup>- bağımlı fosforilasyonu ve fosfoenzimin K<sup>+</sup>- bağımlı hidrolizinden oluşmaktadır<sup>(35)</sup>. Bu enzim ve benzeri 'P' tipi ATPazlarda fosforillenmiş ara ürünlerin oluşması ve hidrolizi çok önemli rol oynar<sup>(89)</sup>.

**Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPazın Hücrelerde Yerleşimi:** Enzim yerleşimi organizmadaki hücre tiplerine göre farklılıklar gösterir (Şekil 5).





Şekil 5.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ 'ın farklı hücrelerde yerleşimi. Uyarılamayan hücreler: (a) Epitelyal olmayanlar (ör. fibroblast, yağ hücresi, lökosit, eritrosit), (b) Epitelyal olanlar (ör. böbrek ve barsak hücreleri). Uyarılabilir hücreler: (c) kas hücresi (d) Sinir hücresi.

### $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ İnhibitörleri<sup>(108)</sup>

1. Kardiak glikozidler
2. Vanadat
3. Oligomisin
4. Düşük dozda kalsiyum<sup>(106)</sup>.

### $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ Regülasyonu<sup>(89)</sup>

#### 1. Direkt Etkili Maddeler:

- a) İntrasellüler  $\text{Na}^+$
- b) Ekstrasellüler  $\text{K}^+$
- c) ATP
- d) Ouabain ve hipotalamik ouabain-benzeri maddeler

#### 2. İndirekt Etkili Maddeler:

##### A) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ Gen Ekspresyonu İndüksiyonu Yapanlar

- Aldosteron

- Kortikosteron
- Kortizol
- Tiroid hormonları

#### B) Var Olan Enzimlerde Post-Translasyonel Modifikasyon Yapanlar

- Progesteron
- İnsülin
- Glukagon
- Vazopressin
- Epidermal Büyüme Faktörü
- Katekolaminler

#### Ca<sup>2+</sup>ATPaz

Hücre membranında bulunan diğer bir sınıf ATPaz, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz'dır, fakat halen fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır<sup>(29)</sup>. Bu ATPaz milimolar konsantrasyonlarda ya Ca<sup>2+</sup> ya da Mg<sup>2+</sup> la aktiflenir ve substrat olarak da ATP'yi kullanır. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz çoğunlukla Ca<sup>2+</sup>ATPaz, Mg<sup>2+</sup>ATPaz, bazal ATPaz, bazik ATPaz veya nonspesifik ATPaz olarak adlandırılır. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz, Ca<sup>2+</sup> ile uyarılan ATPaz'dan farklı olduğu halde farklı tür ve dokuların Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz'larının aynı aileye ait olup olmadığı açık değildir. Ca<sup>2+</sup>ATPaz'ın Ca<sup>2+</sup> varlığında enzim aktivitesini yansıttığı, halbuki Mg<sup>2+</sup>ATPaz'ın Mg<sup>2+</sup> varlığında enzim aktivitesi gösterdiği dikkate alınmalıdır. Bazı araştırmacılar pankreas, vasküler düz kas, iskelet kası, karaciğer, beyin korteksi, meme bezleri ve böbrek korteksi Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz'ları ile yaptıkları çalışmalarda Ca<sup>2+</sup>ATPaz ve Mg<sup>2+</sup>ATPaz aktivitelerinin tek bir enzimi ifade ettiğini ileri sürmüşlerdir<sup>(29)</sup>. Buna karşılık kalp sarkoleması, hepatoma hücreleri ve beyin sinir uçları Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz'ları çalışmalarında, Ca<sup>2+</sup>ATPaz ve Mg<sup>2+</sup>ATPaz'ın iki ayrı enzim olduğu gösterilmiştir. Ca<sup>2+</sup>ATPaz ve Mg<sup>2+</sup>ATPaz'ın ayrı enzimler mi yoksa onların aktiviteleri Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>ATPaz gibi tek bir enzim kompleksinin ifadesi mi olduğu sorusuna yakın literatür incelemelerinde kesin yanıt bulunamamıştır. Eritrosit membranı Ca<sup>2+</sup>ATPaz'ının kalmodulin'le aktiflendiği iyi bilinir<sup>(76)</sup>. Kalmodulin, intrasellüler Ca<sup>2+</sup> reseptörü olan kalsiyum bağlayan bir proteindir ve eritrosit membranı, kalp sarkoplazmik retikulumu dahil çeşitli Ca<sup>2+</sup> transport sistemlerinin kalsiyum pompası

regülatörüdür. İnsan eritrositlerinde  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz'ı uyaran başka faktörlerde bulunur<sup>(76)</sup>. Asidik fosfolipidler (fosfotidilserin, fosfotidilinozitol, fosfotidik asit) eritrosit membranı  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPaz'ını uyarırlar. Diğer taraftan fosfotidilinozitol yıkım ürünleri olan digliserid, siklik inozitol fosfat veya inozitol fosfatlar inhibitör etki ederler<sup>(29,66)</sup>. Eritrosit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPaz'ı, kardiotoksin ile doza ve zamana bağımlı bir şekilde inhibe olur ve bu inhibisyon irreversibldir<sup>(37)</sup>. ATPaz'ın inhibitör proteinleri kalmoduline zıt etki ederler. Eritrosit stoplazmasında protein-bağılı ve serbest inhibitör ve membrana bağılı inhibitör aktiviteleri, yaşlı hücrelere kıyasla genç hücrelerde daha yüksek bulunmuştur. Bu yüzden yaşlı hücrelerde kalmodulin etkisine karşı gelen bir  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  inhibitörünün varlığı düşüncesi geçersizdir<sup>(4)</sup>.

5  $\mu\text{M}$  serbest  $\text{Ca}^{2+}$ , ATPaz aktivitesini yarı maksimal uyarır. ml'de 10 mg kalmodulin varlığında yarı maksimal aktivasyon için gereken serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonu 1,5  $\mu\text{M}$ 'e düşer. 10  $\mu\text{M}$ 'un üstünde serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonları kalmodulin bulunsada bulunmasa da inhibitördür<sup>(26)</sup>.

$\text{Ca}^{2+}$  aktif transportu membranın dışında  $\text{K}^+$ , içinde  $\text{Na}^+$  bulunmasıyla artar<sup>(70)</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$ 'un hücresele metabolik olaylardaki rolü için düşük intrasellüler serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonlarının sürdürülmesi gereklidir. Ekstrasellüler serbest  $\text{Ca}^{2+}$ , intrasellüler serbest  $\text{Ca}^{2+}$ 'undan (yaklaşık 0,1  $\mu\text{M}$ ) yaklaşık  $10^4$  defa daha fazladır (yaklaşık 1,5 mM). Bu farkın nedeni,  $\text{Ca}^{2+}$ 'un iyon gradyeni yönünde sürekli hücrelere sızması ve oradan aktif olarak dışarı atılmasıdır. İntrasellüler  $\text{Ca}^{2+}$  düzenlenmesinden sorumlu başlıca hücre komponenti plazma membranıdır. Bu bakımdan görev yapan iki büyük plazma membranı komponentinden biri  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değış-tokuş sistemi diğeri  $\text{Ca}^{2+}$  pompalayan ATPaz'dır.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değıştiricisi yüksek kapasitelidir fakat serbest  $\text{Ca}^{2+}$ 'a ilgisi düşüktür ve uyarılabilen hücrelerde aktiftir. Plazma membranı  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz'ı serbest  $\text{Ca}^{2+}$ 'a yüksek ilgili olduğu halde, pompalama aktivitesi daha düşüktür. İnsan eritrositlerinin diğeri hücrelerden farklı olarak  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değış-tokuş mekanizması yoktur<sup>(88)</sup>. Bu yüzden eritrosit gibi uyarılamayan hücrelerde aktif olan  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz,  $\text{Ca}^{2+}$ 'u dışarı çıkaran başlıca sistemdir<sup>(18)</sup>.

## YAŞLANMANIN BİOKİMYASI

Yaşlanmanın geniş kapsamlı biyolojik tanımı, yaşamdaki gelişme sürecinin geçişi ile oluşan fonksiyonel ve yapısal değişiklikler ve çevresel uyarılara karşı artan yıpranma nedeniyle de canlılığı sürdürme yeteneğinin azalması ile karakterize olgunluk sonrası dönemi olarak yapılabilir<sup>(71)</sup>.

Yaşlanma olayını açıklamak için birçok varsayım ileri sürülmüştür. Örneğin; yaşlanmanın moleküler çapraz-bağlanma<sup>(10)</sup>, bağışıklık fonksiyonunda değişiklikler<sup>(126)</sup>, serbest kök reaksiyonları hasarı<sup>(45)</sup> ve DNA'daki yaşlı genler<sup>(96)</sup> nedeniyle oluştuğu düşünülmüştür. Genellikle tek bir varsayım kabul edilmemiştir. "Bu olağanüstü olay esrarını korumaktadır"; "Yaşlanmanın tüm mekanizmalarını tek bir varsayımın açıklayabilmesi şüphelidir" denilmektedir<sup>(96,124)</sup>.

## YAŞLI MEMELİ ORGANİZMALARDA GÖRÜLEN BİOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

### Membran Değişiklikleri:

Yaşlanma sırasında membranın yapı ve fonksiyonlarında çeşitli değişiklikler olur:

- Membranların glikolipid ve glikoproteinlerinin karbonhidrat kalıntılarında değişiklikler olur, böylelikle membran fonksiyonları bozulur<sup>(19)</sup>. Bu hücre yüzeyi karbonhidratları arasında membranla ilgili birçok temel işlevdeki rolü açısından en önemlisi sialik asittir<sup>(129)</sup>. Membranın negatif elektrik yükünden sorumlu olan sialik asit, katyon değişim, reseptör fonksiyonu, membran polaritesinin devamı ve hücre içi etkileşimler gibi olaylarda rol alır. Sialik asidin bu biyolojik öneminden dolayı, membrana bağlı karbonhidrat zincirlerinin bileşimindeki küçük bir değişme bile membran fonksiyonunda önemli bozukluklara yol açar.

- Kolesterol yapım yıkımı (turn-over) ve membran fosfolipid sentezinde yaşlanma ile ilişkili azalma olur. Membranın kolesterol ve doymuş fosfolipid içeriği artışı, akışkanlığında azalmaya neden olur<sup>(131)</sup>.

- Genellikle yaşlanma olayının lipid ve protein peroksidasyonuna yol açan, oksijen serbest kök reaksiyonları ile birlikte olduğuna inanılır<sup>(48)</sup>. Bu reaksiyonlar, muhtemelen membranın lipid ve protein kalıntılarında çapraz-bağlanma ilişkilerini hızlandırır ve böylelikle akışkanlığın azalışına yardımcı olur<sup>(48)</sup>. Lipid membranların akışkan durumu diğer birçok faktörle birlikte membran proteinlerinin bileşimi ve fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz'ın fonksiyonu, çevresindeki fosfolipidlerin akışkanlığına ileri derecede bağlıdır ve kolesterol artışı transport aktivitelerini olumsuz yönde etkiler<sup>(87,91,109)</sup>. Membrana-bağlı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz, glikoz-6-fosfataz yaşlanma ile azalır<sup>(51)</sup>. Ayrıca sıçan böbreği fırçamsı kenar membranı alkali fosfataz'ı ve  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz'ının yaşlanma ile azaldığı saptanmıştır<sup>(64)</sup>.

- Birçok hormon, ilaçlar ve nörotransmitterler membran reseptörleri yolu ile bilgi geçirirler. Membran akışkanlığı veya fosfolipid bileşimi, hücre membranlarından reseptörle düzenlenen bilgi transferini etkiler<sup>(41)</sup>. Bu durum, yaşlanma ile çeşitli hormonlara karşı hassasiyetin azalmasına sebep olur. Azalmış membran akışkanlığı yaşlı organizmaların hücrelerinin osmotik direncinde artışa yol açar. Birçok dokuda çeşitli hormonların reseptörlerinin sayısında ve ilgilerinde artma, azalma olur ya da aynı kalır. Örneğin, kalpte  $\beta$ -reseptör sayısında bir azalış olabilir, karaciğerde  $\beta$ -reseptör sayısında azalma olur ve lökositlerde  $\beta$ -reseptörlere ilgi azalır fakat reseptör sayısı değişmez<sup>(33)</sup>. Bugüne kadar yaşlanma ile çeşitli reseptör isotiplerinin oranları değişebilse de reseptörlerin primer yapısında hiç bir değişiklik bildirilmemiştir.

- Yaşlı hayvanlarda, membranlardaki bağışıklık hücrelerindeki değişikliklere bağlı olarak bağışıklık yanıtlarında fonksiyonel azalma görülür<sup>(51)</sup>. Bağışıklık yanıtının yaş ilerledikçe azalmasının, en iyi olmaktan çıkmasının yaşlanmanın önemli nedeni olduğunu belirten araştırmacılar da vardır. Yaş ilerledikçe vücudun kendi antijenlerine karşı ürettiği antikolar artar, buna karşılık çevreden gelen yabancı antijenlere yanıt azalır. Kendi doku

antijenlerine karşı oluşan antikorlar(oto-antikorlar) dokuların yıpranmasına yol açar.

- Normal insan eritrositlerinde yaşlanma olayı ise; bir takım biokimyasal ve biyofiziksel değişikliklerle birlikte olur. Eritrositler yaşlanırken, yaşlı eritrositlerin dolaşımdan fizyolojik uzaklaştırılışında önemli olan yaşlı bir hücre antijeni ortaya çıkar<sup>(57)</sup>. Yaşlı hücre antijeni, eritrositin glikoz taşıyıcı proteini ile fonksiyonel ilişkisi olan band 3 glikoproteininin membrana giren kısmının yıkım ürünüdür. Yaşlı eritrositlerde, anaerobik glikoliz, total lipid, potasyum ve klorür konsantrasyonları, katalaz ve asetilkolinesteraz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitelerinde azalma, daha yüksek özgül ağırlık, sialik asit kaybı ile birlikte hücrede yüzey yükü azalması ve osmotik erimeye karşı hassasiyet artışı olur<sup>(40,53,113)</sup>. Yaşlı hücrenin terminal intravasküler lizisi veya fagositozunda rolü olan bu değişikliklerdeki sıra ve özgün durumun ne olduğu bilinmemektedir. Ancak, eritrosit membranı sialik asidi, eritrositlerin dolaşımdaki yaşam sürelerinin başlıca belirleyicisi olarak bilinir ve sialik asit kaybı, normal eritrosit yaşlanmasında ve yaşlı hücrelerin sonradan ortadan kaldırılışında önemli bir mekanizmadır<sup>(40,118)</sup>. Ayrıca yaşlanma ile ATP, 2,3-difosfogliserat, NADPH ve indirgenmiş glutatyon(GSH) gibi önemli hücre içi metabolitlerinde azalma olur<sup>(53)</sup>.

### **Ekstrasellüler Proteinlerdeki Değişiklikler**

Kollajen veya kristalin gibi yapım-yıkımı(turn-over) yavaş olan ekstrasellüler proteinler fonksiyonlarını etkileyen, yavaş gelişen değişikliğe uğrarlar ve yaşlı fenotipi oluşumuna katkıda bulunurlar. Örneğin, indirgeyici şekerler ile amino asitler, enzime bağımlı olmayan Maillard reaksiyonu ile, kollajen ve diğer makromoleküllerle çapraz-bağlanma yapabilen sabit kahverengi pigmentler oluşturur. Çapraz-bağlanma elastisiteyi ve makromoleküllerin diğer özelliklerini etkiler. Maillard reaksiyonu, tendonlar, lens ve yavaş turn-over proteinleri bulunan diğer dokuların özelliklerindeki değişikliklere yardımcı olur<sup>(59)</sup>. Güncel biyolojik yaşlanma varsayımlarının en gözde olanlarından biri çapraz-bağlanma varsayımdır. Çeşitli kollajenöz dokularda, bir takım çapraz-bağlanma bileşikleri izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir. Bunların çoğu iminyum bileşikleridir. Kollajenin çapraz-bağlanması, kovalent moleküller arası iminyum bağları oluşumu ile fibrillogenezis'in

hemen ardından başlar. Her kollajen molekülü başına 0,1 iminyum çapraz-bağı kalıntısının, çapraz-bağlardan yoksun fibrillere girişi, kollajenzla yıkıma karşı direnci iki-üç kat artırır. Çapraz-bağ oluşumunda zamana bağımlı değişiklikler, yaşlanma olayında temel faktörler olmasa da yaşlanmanın önemli bir yönünü oluşturur<sup>(130)</sup>.

### **Enzimlerde ve Diğer İntrasellüler Proteinlerde Değişiklikler**

Protein sentezi oranı hepsinde olmasa da birçok memeli türü ve dokusunda yaşlanma ile azalır<sup>(59)</sup>. Örneğin, sıçan kalbinde protein sentezinin yaşla etkilenmediği görülmüştür<sup>(9)</sup>. Ayrıca tirozin hidroksilaz gibi spesifik proteinlerin sentezi artabilir, azalır ve sabit kalabilir<sup>(59)</sup>. Çeşitli izoenzimlerin nispi aktivitelerinde gelişimin diğer fazlarında olduğu gibi yaşlanmaya bağlı değişiklikler olabilir. Örneğin, sıçan kasında yaşlanma ile gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz'ın izoenzim şekli değişir<sup>(30)</sup>.

### **DNA İle İlgili Değişiklikler**

DNA'nın primer ve tersiyer yapısına yaşın etkisi geniş çapta araştırılmıştır. Primer yapıda yaşla ilgili değişiklikler, tek kol kırıkları sıklığının artışı, DNA metilasyonu azalışı ve telomerik DNA dizilişlerinin kaybıdır<sup>(44)</sup>. Tersiyer yapıda yaşla ilgili değişiklik; negatif süper halkalaşmanın kaybıdır<sup>(59)</sup>. Bu kayıp DNA reglikasyonu, onarımı ve transkripsiyonu üzerine derin etkilere neden olur<sup>(59)</sup>.

Yaşlanma, bölünen hücrelerde azalmış çoğalma gücü ve DNA replikasyon yeteneğinin azalmasıyla birlikte olur.

Yaşlanma ile DNA onarımı yeteneğinde fizyolojik olarak önemli değişiklikler olup olmadığı açık değildir.



## MATERYEL VE METODLAR

### A. MATERYEL

#### 1. Olguların Seçimi

Yaşları 23-34 ve 51-88 arasında değişen tamamen sağlıklı 14 genç ve 14 yaşlı kadın ve erkeklerden alınan kan örnekleri, çalışmanın materyelini oluşturdu.

Olguların vitamin dahil herhangi bir ilaç kullanmamış olmasına, herhangi besinsel kısıtlamanın, allerji ya da anafilaksi hikayesinin olmamasına, laktasyonda bulunmamlarına, sigara ya da alkol alışkanlıklarının ve şişmanlık durumunun bulunmamasına dikkat edildi.

#### 2. Kimyasal Maddeler

##### 2.1 Eritrosit Membran "Ghost" Süspansiyonunun Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

1. Heparin (Liquemine, Roche)
2. % 0,9 NaCl
3. Hemoliz Eriyiği:  $1 \times 10^{-4}$ M EDTA- $\text{Na}_2$  (Etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu, Merck-Darmstadt) ve  $7.03 \times 10^{-3}$ M Tris (Hidroksimetil amino metan, Sigma-chemical company), 0,0372 g. EDTA- $\text{Na}_2$  ve 0,8516 g. Tris, 1 L.'lik ölçü balonunda bidistile su ile eritildi, pH metrede pH: 7.4'e ayarlandıktan sonra, bidistile su ile 1 L.'ye tamamlandı.



## 2.2. Eritrosit Membran "Ghost" Süspansiyonunda ATPaz Aktivitelerinin İncelenmesinde Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

### 1. Tris Tamponları<sup>(86)</sup>:

a) 0,2 M Tris: 2,43 g. Tris (mol.ağ: 121.14) 100 ml bidistile su içinde eritildi.

b) 0,05 M Tris-HCl: 0,2 M Tris'den 25 ml alındı, 42 ml 0,1 N HCl eklendi ve 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı ve pH metrede ayarlandı. Böylece pH:7.4'lük tampon elde edildi.

### 2. Standart Tampon Karışımları:

I- 25 mM Tris-HCl/2,5 ml pH:7.4

2,5 ml inkubasyon ortamında son konsantrasyonu 25 mM Tris-HCl olması için, 1,8 ml'lik standart karışım içinde 34,73 mM Tris-HCl bulunması gerektiği hesaplandı. 50 mM Tris-HCl'den bu miktarda alınıp, 50 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

II- 25 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>/2,5 ml standart tampon karışımı

2,5 ml'lik ortamda yukardaki son konsantrasyonların elde edilmesi için 1,8 ml'lik standart karışımda 104,2 mM NaCl, 6,95 mM KCl, 1,39 mM MgCl<sub>2</sub> olması gerektiği hesaplandı. Bunun için 100 ml 34,73 mM Tris-HCl içinde 0,609 g. NaCl, 0,0518 g. KCl ve 0,028 g. MgCl<sub>2</sub> eritildi. Buna göre son konsantrasyonlar sırası ile;

$$\begin{aligned} 1,8/2,5 \times 34,73 &= 25 \text{ mM Tris,} \\ 1,8/2,5 \times 104,2 &= 75 \text{ mM NaCl,} \\ 1,8/2,5 \times 6,95 &= 5 \text{ mM KCl,} \\ 1,8/2,5 \times 1,39 &= 1.0 \text{ mM MgCl}_2 \text{ olur.} \end{aligned}$$

### 3. 1 mM ATP.Na<sub>2</sub> Substratı/2,5 ml:

34,73 mM Tris-HCl tamponunun her ml'sinde 0,0137 g. ATP.Na<sub>2</sub> (Sigma Chem. Co.) olan substrat hazırlandı. Böylece, 25 mM konsantrasyonunda ATP substratı elde edildi. Buna göre; 2,5 ml inkubasyon ortamına konulan 0,1 ml 25 mM ATP.Na<sub>2</sub> substratının son konsantrasyonu;

$$0,1/2,5 \times 25 = 1 \text{ mM olur.}$$

### 4. 0,1 mM EGTA (Etilen glikol-bis (β-amino etil eter) N,N,N,N- Tetraasetik asit)/2,5 ml:

34,73 mM Tris-HCl tamponunun her ml'sinde 0,000771 g. EGTA (Sigma Chem. Co.) bulunan eriyik hazırlandı = 2,5 mM EGTA. Böylece 2,5 ml inkubasyon ortamına konulan 0,1 ml 2,5 mM EGTA eriyiğinin son konsantrasyonu;

$$0,1/2,5 \times 2,5 = 0,1 \text{ mM olur.}$$

### 5. 1 mM Ouabain/2,5 ml

34,73 mM Tris-HCl'in her ml.sinde 0,01821 g. Ouabain (Sigma Chem. Co.) bulunan eriyik hazırlandı = 25 mM Ouabain. Böylece 2,5 ml inkubasyon ortamına konulan 0,1 ml 25 mM Ouabain eriyiğinin son konsantrasyonu;

$$0,1/2,5 \times 25 = 1 \text{ mM olur.}$$

### 6. 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>/2,5 ml

34,73 mM Tris-HCl'in her ml'sinde 0,00055 g. CaCl<sub>2</sub> (Merck) bulunan eriyik hazırlandı = 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Böylece 2,5 ml inkubasyon ortamına konulan 0,1 ml 5 mM CaCl<sub>2</sub> eriyiğinin son konsantrasyonu;

$$0,1/2,5 \times 5 = 0,2 \text{ mM olur.}$$

### ATPaz Aktiviteleri İçin Kullanılan İnkubasyon Ortamları:

#### **A İnkubasyon Ortamı:**

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>ATPaz (Total ATPaz) ölçülmesi için; içinde II nolu standart karışımla birlikte 1 mM ATP, Na<sub>2</sub> ve 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> olan toplam 2 ml bir inkubasyon ortamı (A) kullanıldı.

#### **B İnkubasyon Ortamı:**

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPaz ölçülmesi için; içinde II nolu standart karışımla birlikte 1 mM ATP, Na<sub>2</sub> ve 0,1 mM EGTA olan 2 ml'lik bir inkubasyon ortamı (B) kullanıldı.

#### **C İnkubasyon Ortamı:**

Mg<sup>2+</sup>ATPaz ölçülmesi için B inkubasyon ortamına 1M Ouabain eklendi.

7. % 15 Triklor asetik asit eriyiği = TCA (hacim/ağ.) (Merck).

### **2.3. İnorganik Fosfor Miktar Belirtimi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler**

a) % 10'luk Amonyum molibdat (10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de)

b) Renk Ayıracı: 500 mg FeSO<sub>4</sub>, 1 ml % 10 Amonyum molibdat, 9 ml bidistile suda eritildi.

c) İnorganik fosfor standardı: 0,1 mg/ml stok.

d) Sulandırılmış fosfor standardı çalışma eriyiği (0,01 mg/ml).

### **2.4. "Ghost"larda Protein Miktar Belirtimi İçin Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar:**

1) Ayıraç A: 2 g. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 0,05 g. Na-K Tartarat 100 ml'ye 0,1 N NaOH ile tamamlandı.

2) Ayıraç B: % 0,1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3) Ayıraç C Alkalik Bakır eriyiği: 45 ml A ayıracı, 5 ml B ayıracı ile karıştırıldı, günlük hazırlandı.

4) Folin - Ciocalteau fenol ayıracı (1 N): 100 g. sodyum wolframmat, 25 g. sodyum molibdat, 700 ml su, 50 ml % 85'lik fosforik asit ve 100 ml derişik HCl, 1500 ml'lik cam balon içinde, geri soğutucu bağlanarak 10 saat kaynatıldı. Sonra 150 g. Lityum sülfat, 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  ve birkaç damla Brom katıldı. Karışım ağzı açık olarak 15 dakika daha kaynatıldı, su ile 1 L.ye tamamlandı, süzüldü. NaOH'e karşı fenolftalein indikatörü kullanılarak titre edildi. Buna göre Folin ayıracı (aşağı yukarı 2 kere) 1 N olacak şekilde sulandırıldı.

5) Standart sığır serum albumini (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Sigma Chem. Co.

## 2.5. İntraeritrositer ve Plazma Sodyum, Potasyum Ölçümlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

1) Magnezyum klorür (115 mM) 23,380 g.  $\text{MgCl}_2$  suda çözülerek 1 L.ye tamamlandı.

2) 151 mmol/L.  $\text{Na}^+$  ve 4,3 mmol/L.  $\text{K}^+$  içerecek şekilde hazırlanmış referans standart eriyiğine karşı ayarlanmış standart eriyikler.

3) 1/1000 Brij 35 (Polyoxyethylenlaurylether) (Merck) içeren elektrolit seyreltici.

## 2.6. Plazma Sialik Asit Düzeyinin Ölçümlerinde Kullanılan Madde ve Ayıraçlar

a) Perklorik asit ( $\text{HClO}_4$ ), % 5 (hacim/ağ) (Merck)

b) Ehrlich Ayıracı: 0,7 g. p-dimetil amino benzaldehit % 22'lik HCl ile 250 ml'ye tamamlandı, günlük hazırlandı.

c) Standart N-acetylneuraminic acid (NANA) % 60 (hacim/ağ) hazırlandı (Sigma Chem. Co.).

### 2.7. Eritrosit Membranı Sialik Asit Düzeyinin Ölçümlerinde Kullanılan Madde ve Ayıraçlar

a)  $H_2SO_4$  (0,1 M), (Riedel-de Haen)

b) Periodik asit (0,025 M): 0,56 g. periodik asit 0,25 M HCl ile 100 ml'ye tamamlandı.

c) Sodyumtiosülfat ( $Na_2S_2O_3$ ), % 5 (hacim/ağ) (Sigma Chem. Co.)

d) 2-Thiobarbituric acid (TBA) (0,1 M): 0,288 g. TBA, 1 N NaOH ile pH: 5.5 - 7.0'e ayarlandı ve 20 ml'ye bidistile ile tamamlandı, günlük hazırlandı (Sigma Chem. Co.).

e) Asidik butanol (% 5) (hacim/ağ)

f) Standart N-acetylneuraminic acid (NANA) % 10 (hacim/ağ) hazırlandı (Sigma Chem. Co.).

### 3. Aletler

- E.Mettler, hassas terazi
- Heraeus christ, makro santrifüjü
- Cryofuge 6-6S Heraeus christ, soğuk santrifüj
- Bosch Automatic, derin dondurucu
- Vorteks karıştırıcı
- Medisan elektroteknik, elektrikli sabit su banyosu
- Corning pH meter 125
- Elektro-mag magnetik karıştırıcı
- LKB-Novaspec, spektrofotometresi
- Eppendorf flame fotometresi
- ALC Haematocrit centrifuge 4203
- Kapiller tüpler

- Otomatik pipetler ve pasteur pipetleri
- Su trompu
- Elektro-mag, yatay ısıtıcı

## B. METODLAR

### 1. Olguların Biokimyasal İncelenmesi

Tüm olguların boy ve ağırlıkları ölçüldü. Hepsinin vücut kitlesi indeksi (VKI); ağırlıklarının (kg) boy uzunluklarının karesine ( $m^2$ ) bölünmesiyle ( $kg/m^2$ ) hesaplandı. Normal ağırlık üst sınırı olarak 27 VKI değeri, şişmanlık alt sınırı olarak, 32 VKI değeri kabul edildi. Normal ağırlık ve şişmanlık arası ise (VKI 27-32) kilo fazlası olarak değerlendirildi<sup>(73)</sup>.

Tüm olgulardan sabah aç olarak 20-25 ml heparinli venöz kan alındı. Genç kadınlarda, kan alma devresi olarak hormonal aktivitenin en düşük olduğu adet 4.-5. günleri (postmenstrüel devre) seçildi. Kan alınır alınmaz plazma ve şekilli elementler soğukta santrifüjlemeyle ayrıldı. Kanın şekilli elementlerinin bulunduğu kısımdan bir miktarı ile hemen intraeritrositer sodyum ve potasyum ölçümleri yapıldı. Kalan kırmızı hücrelerden Wood ve Beutler metoduna göre<sup>(128)</sup> eritrosit membranı "Ghost" elde edildi ve Rahman ve arkadaşlarının<sup>(85)</sup>, Davis ve Blas<sup>(23)</sup> yöntemleri esas alınarak küçük değişikliklerle  $Na^+-K^+-ATPaz$  ve  $Ca^{2+}ATPaz$  aktiviteleri ölçüldü. Eritrosit membranında ayrıca total sialik asit düzeyi ölçüldü<sup>(28)</sup>. Plazma; sodyum, potasyum ve total sialik asit ölçümleri için kullanıldı.

#### 1.1. Eritrosit Membran "Ghost" Süspansiyonunun Hazırlanması<sup>(128)</sup>

Venadan alınan heparinli kan hemen 950xg (3000 rpm) de 15 dakika santrifüj edilerek plazma ve şekilli elementler ayrıldı. Çöken kırmızı hücreler yaklaşık 5 hacim % 0,9 NaCl ile yıkanıp tekrar aynı şekilde santrifüjlendi. Üst sıvı, su trompu ile dikkatle uzaklaştırıldıktan sonra dipte kümelmiş kırmızı hücrelerin 2 ml'si buz soğukluğunda pH:7,4'lük  $10^{-4}$  M EDTA ve  $7.03 \times 10^{-3}$  M Tris bileşimindeki hemoliz eriyiğinin 30 ml'si ile patlatıldı ve soğuk santrifüjün özel tüplerine konularak 23400xg (5500 rpm)'de  $+2^{\circ}C$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, hemoglobininin ayrılması

olan "Ghost"ları çekmemeye dikkat edilerek su trompu kapilleri ile çekildi. Dipteki "Ghost"lar 30-60 sn vorteksle karıştırıldı. Tüpe yeniden aynı miktar hemoliz eriyiği konuldu ve bu işlem "Ghost"lar tamamen renksiz elde edilinceye kadar, yani 6-7 kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra dipte kalan "Ghost"lar 3 ml hemoliz solüsyonu ile süspansiyonlaştırılarak başka tüpe aktarıldı. Tamamen homojen olması için vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, derin dondurucuya konuldu. Bu şekilde "Ghost"lar üç kere dondurulup eritilerek çatlatıldı. Böylelikle "Ghost"lardan en uygun şartlarda enzimin açığa çıkarılması sağlandı ve bu enzim süspansiyonu en kısa zamanda enzim aktivitelerinin ölçümü için kullanıldı.

## 1.2. Eritrosit Membran "Ghost" Süspansiyonunda ATPaz Aktivitelerinin Ölçülmesi<sup>(23,85)</sup>

Eritrosit membran süspansiyonlarında ATPaz aktivitesi inkubasyon sırasında ortama konulan 1 mM ATP substratından açığa çıkan inorganik fosfatın ( $P_i$ ) ölçülmesi prensibine dayanır.

ATPaz deneyleri 2,5 ml'lik bir inkubasyon ortamında, son konsantrasyonu 25 mM olan pH:7,4'lük Tris-HCl ile tamponlanmış üç standart karışım kullanılarak yapıldı. Bunlardan biri (A)  $Na^+$ - $K^+$ - $Mg^{2+}$ - $Ca^{2+}$ ATPaz (Total ATPaz) için kullanılan karışımdır ve içinde son konsantrasyonları 75 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$  ve 0,2 mM  $CaCl_2$  olan mono ve divalent katyonlarla 1 mM ATP vardır.  $Na^+$ - $K^+$ - $Mg^{2+}$ ATPaz ölçülmesinde kullanılan (B) standart karışımında (A) ortamındaki  $CaCl_2$  yerine 0,1 mM EGTA bulunur.  $Mg^{2+}$ ATPaz ölçülmesi, (B) standart karışımına 1 mM Ouabain eklenmesiyle oluşturulan (C) standart karışımında yapıldı.

II-nolu standart karışımdan  $Mg^{2+}$ ATPaz tüpüne 1,7 ml ve Ayıraç körü tüpüne 2,1 ml, bunların dışında kalan deney körü, Total ATPaz ve  $Na^+$ - $K^+$ - $Mg^{2+}$ ATPaz tüplerine 1,8'er ml konuldu. Bütün tüplere 1 mM ATP çözeltisinden 0,1 ml eklendi. Kör ve Total ATPaz tüpleri dışındaki tüm tüplere 0,1 ml 0,1 mM EGTA ilave edildi.  $Mg^{2+}$ ATPaz ve ayıraç körü tüplerine 0,1'er ml 1 mM Ouabain konuldu. 0,2 mM  $CaCl_2$ ,  $Na^+$ - $K^+$ / $Mg^{2+}$ ATPaz ve  $Mg^{2+}$ ATPaz tüpleri dışındaki tüm tüplere 0,1 ml ilave edildi. Reaksiyon

tüm ortamlara, önceden 5' 37°C de inkube edilmiş 0,5 ml enzim süspan-siyonu eklenmesiyle başlatıldı. Ayrıca, enzimi inaktive etmek için A standart karışımı ve 0,5 ml enzim süspan-siyonu bulunan iki tüpe derhal 0,2 ml % 15 TCA eklenerek deney körü ve bir ayıraç körü tüpü hazırlandı. Tüm ATPaz deneyleri ve deney körleri çift örnek çalışıldı. Buna göre bir seri ATPaz için körleriyle birlikte 9 tüp kullanıldı. Bütün tüpler 90' süre ile 37°C de arasına çalkalanarak inkube edildi. Bu sürenin sonunda, buza konulan bütün tüplere (kör tüpleri hariç) % 15 TCA'dan 0,2'şer ml eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Denatüre olan proteinlerin oluşturduğu bulanıklık, tüplerin 15' 950xg (3000 rpm) de santrifüj edilmesi ile çöktürüldü ve bu tüplerden alınan 1,5'ar ml'lik berrak süpernatantlarda  $P_i$  ölçümü yapıldı.

Total ATPaz tüpünde yani  $Na^+-K^+-Mg^{2+}-Ca^{2+}$ lu ortamda ATP'den çıkan  $P_i$  miktarıyla kör değeri arasındaki fark Total ATPaz aktivitesini verir.  $Na^+-K^+-Mg^{2+}-Ca^{2+}$ ATPaz tüpü ile (A)  $Na^+-K^+-Mg^{2+}$ ATPaz tüpünde (B) ATP'den açığa çıkan  $P_i$  miktarı arasındaki fark  $Ca^{2+}$ ATPaz aktivitesini verir.  $Na^+.K^+.Mg^{2+}$ ATPaz değeri (B) ile  $Mg^{2+}$ ATPaz (C) değeri arasındaki fark  $Na^+.K^+$ ATPaz değerini verir. ATPaz aktiviteleri, 90' da mg protein başına serbestleşen nmol  $P_i$  olarak hesaplandı.

### 1.3. İnorganik Fosfor Ölçümü <sup>(117)</sup>

Enzim süspan-siyonlarının, ATP substratından 90 dakikada açığa çıkardıkları  $P_i$ , Taussky ve Shorr<sup>(117)</sup> yöntemine göre ölçülmüştür. Yöntem, ATP'den ayrılan  $P_i$ 'un molibdatla fosfomolibdik asit kompleksi oluşturmasına ve bu kompleksin zayıf asit bir ortamda, demir sülfatla molibden mavisine indirgenmesi prensibine dayanır. Bütün tüplerden alınan 1,5 ml berrak süpernatantlardaki  $P_i$  standart fosfor tüpü ile kıyaslandı. Standart fosfor hazırlamak için; stok eriyik 10 kez sulandırıldı. Bundan 2,5 ml (inkubasyon ortamı kadar) alınarak üzerine 0,2 ml % 15 TCA eklendi. Bu karışımdan santrifüj edildikten sonra alınan 1,5 ml'lik süpernatanda  $P_i$  miktarı 0,0111 mg'dır. 1,5 ml'lik süpernatantların üzerine 1 ml renk ayırıcının eklenmesinden 20 dakika sonra oluşan mavi renkler 700 nm'de spektrofotometrede ayıraç körüne karşı okundu.



## ATPaz Deney Şeması

	A Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> .Mg <sup>2+</sup> ,Ca <sup>2</sup> (Total) ATPaz (ml)	B Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> ATPaz (ml)	C Mg <sup>2+</sup> ATPaz (ml)	Kör (ml)	Ayırıcı Körü (ml)
Standart Karışım	1.8	1.8	1.7	1.8	2.1
25 mM ATP-Na <sub>2</sub>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2.5 mM EGTA	-	0.1	0.1	-	0.1
25 mM Ouabain	-	-	0.1	-	0.1
5 mM CaCl <sub>2</sub>	0.1	-	-	0.1	0.1
(Ghost) Enzim Süspansiyonu	0.5	0.5	0.5	0.5	-
% 15 TCA	-	-	-	0.2	-
37°C 90' inkubasyon					
% 15 TCA	0.2	0.2	0.2	-	0.2
15' 950 xg'de santrifüjleme 1.5 ml filtrat alınır					
Ferro sülfat - Amonyum molibdat (Renk Ayırıcı)	1	1	1	1	1

Oda sıcaklığında 20' inkubasyondan sonra 700 nm'de okunur.

ATPaz aktivitelerinin tanımlanması

A-Kör = Total ATPaz

A-B = Ca<sup>2+</sup> ATPaz

B-C = Na<sup>+</sup>.K<sup>+</sup>.ATPaz

#### 1.4. Enzim Süspansiyonlarının İçerdiği Protein Düzeylerinin Belirtimi<sup>(68)</sup>

Protein miktar belirtimi Lowry<sup>(68)</sup> yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde, proteine bağlı tirozin ve triptofan, fosfomolibdat - tungstat kompleksini molibden mavisine indirger. Reaksiyon bakırla belirginleştirilir. 0,5 ml enzim süspansiyonu üzerine 5 ml çalışma ayırıcı eklendi. Aynı anda kör ve standart deneyler yapıldı. 15 dakika oda ısısında bekletilen tüplere 0,5 ml seyreltilmiş Folin ayırıcı katıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletil-

dikten sonra absorbanslar 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Standart olarak kullanılan sığır serum albuminine göre protein düzeyleri hesaplandı.

#### Protein Miktar Belirtimi Şeması

	Kör (ml)	Standart (ml)	Deney (ml)
Eritrosit Miktarı			
"Ghost" süspansiyonu	-	-	0.5
Standart (400 µg/ml)	-	0.5	-
Bidistile su	0.5	-	-
Çalışma ayıracı	5	5	5
15' oda ısısında inkubasyon			
Seyreltilmiş Folin Ayıracı	0.5	0.5	0.5

Karıştırılır, 30' oda ısısında inkubasyondan sonra  
köre karşı 750 nm'de okunur.

#### 1.5. İntraeritrositer ve Plazma Sodyum, Potasyum Ölçümleri<sup>(81)</sup>

Olgulardan alınan heparinli kanların yaklaşık 5 ml kadarı ayrılarak plazmayı ayırmak için santrifüjledikten sonra buffy coat denilen lökosit ve trombosit örtüsü su trompuyla aspire edildi. Kalan kırmızı hücreler 3 kez 5 hacim buz soğukluğunda 115 mM isotonic MgCl<sub>2</sub> çözeltisi ile yıkandı ve 15 dakika 5000 rpm (21250xg) de +4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant su trompu ile çekilerek uzaklaştırıldı. Bu yıkamaların amacı eritrositlerin hapsediği plazmadaki sodyum ve potasyumu uzaklaştırmaktır (son yıkamada süpernatandan bir miktar alınarak sodyum, potasyum ölçümü için ayrıldı). Bu işlemin sonunda tüpün dibinde kalan yıkanmış eritrosit kitesinden 1 ml alınarak bidistile suda hemolizlendi. Bu hemolizatların hematokritleri ölçüldü, sonra hemolizatların ve plazmaların sodyum, potasyumları flame fotometri ile ölçüldü. Hemolizat iyon konsantrasyonları, sulandırma oranı ve hematokritleri dikkate alınarak hesaplandı. Hücre içi elektrolitleri hücre litresi başına mmol sodyum ve potasyum olarak ifade edildi.

### 1.6. Plazma Sialik Asit Düzeyinin Ölçülmesi<sup>(114)</sup>

Plazma sialik asit ölçülmesi 1985 de G.Sydow tarafından geliştirilen Ehrlich metodu kullanılarak yapıldı. Bu metod Shamberger tarafından tarif edilen metodun modifiye şeklidir.

Plazmadan 0,4 ml alınarak üzerine 3 ml % 5 perklorik asit ( $\text{HClO}_4$ ) ilave edildi ve  $100^\circ\text{C}$  de 5 dakika standart ve kör tüpleriyle birlikte kaynatıldı. Standart için 0,2 ml sialik asit standart eriyiği, kör için de 0,2 ml bidistile su alınarak üzerlerine 1,5'ar ml % 5  $\text{HClO}_4$  ilave edildi.

Hidrolizden alınan deney tüpleri musluk altında soğutulduktan sonra 2500xg'de santrifüj edildi ve üzerlerinden 1 ml süpernatant alındı. Tüm tüplere 0,2 ml Ehrlich ayıracı konduktan sonra  $100^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika kaynatıldı. İnkubasyon sonunda tüpler soğutulularak 525 nm'de okundu.

Plazma Sialik Asit Deney Şeması

	Kör (ml)	Standart (ml)	Deney (ml)
Plazma	-	-	0.4
Standart (%60)	-	0.2	-
Bidistile su	0.2	-	-
%5 $\text{HClO}_4$	1.5	1.5	3
100 °C'de 5' kaynama ve santrifüjleme			
Süpernatant	1	1	1
Ehrlich ayıracı	0.2	0.2	0.2

100 °C'de 15' kaynatılır soğutulduktan sonra 525 nm'de okunur

### 1.7. Eritrosit Membranı Sialik Asit Düzeyinin Ölçülmesi <sup>(28)</sup>

1983'de Denny ve arkadaşlarının sodyum arsenit kullanmadan uygulamaları şekliyle 2- Tiobarbitürik asit metodu kullanıldı. 2- Tiobarbitürik asit yöntemi ilk defa 1959'da Warren<sup>(127)</sup> tarafından da tarif edilmiştir.

0,25 ml eritrosit membranı süspansiyonu üzerine 0,25 ml 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kondu ve 80°C'de 1 saat hidroliz edildi.

Hidrolizden alınan tüpler oda ısısına getirildikten sonra 27000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve üzerlerinden 0,1 ml süpernatant alındı. Standart için 0,05 ml sialik asit çalışma standardı ve kör için 0,05 ml bidistile su alındı, üzerlerine 0,05 ml 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Daha sonra tüm tüplerle 0,25 ml periodik asit eklenerek 37°C'de 30 dakika inkube edildi. Bu süre sonunda 0,25 ml sodyum tiosülfat eriyiği ilave edilerek fazla periodatın indirgenmesi sağlandı (bu ayıraç ilave edilir edilmez tüpler iyice karıştırıldı). Reaksiyon 1.25 ml TBA solusyonu ilavesiyle tamamlandı ve optimum renk oluşumunu sağlamak için 100°C'de 15 dakika kaynatıldı. 15 dakika sonunda tüpler akar su altında soğutuldu ve 2,5 ml asidik butanol konarak vortekste şiddetle karıştırıldı (kaynar su banyosunda oluşan pembe renkler soğutmakla kaybolur, fakat karıştırma sonunda butanol fazına tekrar pembe renkler geçer). Faz ayrımı için tüpler 400xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan butanol fazları derhal alınarak 549 nm'de okundu.

Plazma sialik asit değerleri mmol sialik asit/L plazma olarak, eritrosit membranı sialik asit düzeyleri, enzim süspansiyonlarının içerdiği protein g'ı başına düşen µmol sialik asit olarak ifade edildi.

## Eritrosit Membranı Sialik Asit Deney Şeması

	Kör (ml)	Standart (ml)	Deney (ml)
Eritrobit membranı			
"Ghost"süspansiyonu	-	-	0.25
Bidistile su	-	-	-
0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	0.25
80 °C' 1 saat inkubasyon, santrifüjleme			
Süpernatant	-	-	0.1
Bidistile Su	0.05	-	-
Sialik asit standardı	-	0.05	-
0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05	0.05	-
0.025 M Periodik asit	0.25	0.25	0.25
37 °C'de 30' inkubasyon			
% 5 Sodyumtiosülfat	0.25	0.25	0.25
0.1 M TBA	1.25	1.25	1.25
100 °C'de 15' kaynatma			
Asidik butanol	2.5	2.5	2.5

Vorteksle karıştırılır, santrifüjlenir, 549 nm'de okunur.

## 2. Bioistatistik Yöntemler

Her iki gruba ait bulguların değerlendirilmesi Student t testine göre yapılmıştır. Farklı varyanslara Mann-Whitney U testi uygulandı.

## BULGULAR

### 3.1 Genç ve Yaşlı Sağlıklı Kişilerdeki Vücut Kütlesi İndeksi (VKI) Bulguları

14 genç olgunun (ort.yaş:  $27.85 \pm 3.08$ ) ortalama VKI'i  $21.88 \pm 2.31$ , 14 yaşlı olgunun (ort. yaş :  $63.85 \pm 9.96$ ) ort. VKI'i  $25.24 \pm 2.43$  bulunmuştur (Tablo 4).

Genç ve yaşlı olguların ort. VKI'leri arasında bioistatistik olarak çok ileri düzeyde anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

### 3.2. Eritrosit Membranı ATPaz Aktiviteleri İle İlgili Bulgular

Genç olgularda (n=10) total ATPaz aktivitesi 451,6 ile 1779, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz aktivitesi 35,5 ile 206, Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivitesi 154,3 ile 1214 nmol P<sub>i</sub>/mg prot/90' arasında bulunmuştur. Yaşlı olgularda (n=12) total ATPaz aktivitesi 378 ile 1710,5, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz 66,3 ile 180,8, Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivitesi 87,4 ile 1120,5 nmol P<sub>i</sub>/mg prot/90' arasındadır (Tablo 5, Şekil 6). Tüm olgulardaki aritmetik ortalamalar aşağıdaki gibidir:

Genç grupta (n=10) ATPaz aktivitelerinin aritmetik ortalamaları (nmol P<sub>i</sub>/mg prot/90') (Tablo 5 ve 8).

Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> (Total) ATPaz	: 1047.0 ± 363.0
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz	: 132.6 ± 55.1
Ca <sup>2+</sup> ATPaz	: 664.3 ± 290.6

Yaşlı grupta (n=12) ATPaz aktivitelerinin aritmetik ortalamaları (nmol P<sub>i</sub>/mg prot/90') (Tablo 5 ve 8)

Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> (Total) ATPaz	: 822.2 ± 462.4
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz	: 109.6 ± 39.9
Ca <sup>2+</sup> ATPaz	: 538.1 ± 358.8

Genç olgularda % Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz 4,20 ile 21,89, % Ca<sup>2+</sup>ATPaz 34,16 ile 78,11 arasında, yaşlı olgularda ise % Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz 6,77 ile 27,5, % Ca<sup>2+</sup>ATPaz 22,5 ile 81,28 arasında değişmektedir (Tablo 5).

Genç grubun Total ATPaz aktivitesine göre % Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz aktivitesi ort. 13,5 ± 6,1, % Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivitesi ort. 61,4 ± 13,6'dır. Yaşlı grubun Total ATPaz aktivitesine göre % Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz aktivitesi ort. 14,4 ± 7,4, % Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivitesi ort. 61,3 ± 16,2'dir (Tablo 5 ve 8). Bu bulgulara göre yaşlı grupta Total ATPaz, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz ve Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivite değerleri gençlere kıyasla azalmış bulunmuştur. Yaşlı grupta saptanan ATPaz aktiviteleri azalmasının % oranları Total ATPaz için 15,8, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz için 17,3 ve Ca<sup>2+</sup>ATPaz için 18,9'dur. Oldukça düşük oranlardaki bu azalmalar istatistiksel olarak da anlamlı değildir (p > 0,05).

Genç ve yaşlı grubun % Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz ve Ca<sup>2+</sup>ATPaz aktivite oranları arasında da yine anlamlı farklılık saptanamamıştır (Tablo 5 ve 8).

### 3.3. Plazma ve İntraeritrositer Sodyum, Potasyum Konsantrasyonları (mmol/L)

Genç olgularda (n=14) Na<sup>+</sup><sub>E</sub> 117 ile 147, K<sup>+</sup><sub>E</sub> 3,2 ile 5,0, Na<sup>+</sup><sub>i</sub> 5,3 ile 9,43, K<sup>+</sup><sub>i</sub> 102,63 ile 124,02 mmol/L arasında bulunmuştur. Yaşlı olgularda (n=14) Na<sup>+</sup><sub>E</sub> 139 ile 152, K<sup>+</sup><sub>E</sub> 3,15 ile 4,55, Na<sup>+</sup><sub>i</sub> 4,76 ile 15,16, K<sup>+</sup><sub>i</sub> 106,90 ile 136,96 mmol/L arasında bulunmuştur (Tablo 6, Şekil 7).

Tüm olguların ortalama değerleri aşağıdaki gibidir:

	Na <sup>+</sup> <sub>E</sub>	Na <sup>+</sup> <sub>i</sub>	K <sup>+</sup> <sub>E</sub>	K <sup>+</sup> <sub>i</sub>
Genç Grup	139,0 ± 9,4	7,2 ± 1,3	3,8 ± 0,4	113,6 ± 8,1
Yaşlı Grup	145,0 ± 3,0	8,1 ± 2,7	4,0 ± 0,4	119,9 ± 8,9

Bu bulgulara göre yaşı grupta gençlere kıyasla plazmada ve eritrositlerde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  konsantrasyonlarında artış bulunmuştur. Bunların içinde yalnız  $\text{Na}^+$  artışı anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) (Tablo 6 ve 8).

### 3.4. Plazma ve Eritrosit Membranı Total Sialik Asit Düzeyleriyle İlgili Bulgular

Genç olgularda ( $n=14$ ) P-SA 1,34 ile 2,42 mmol/L, EM-SA 48 ile 124,5  $\mu\text{mol/g}$  prot arasında bulunmuştur. Yaşlı olgularda ( $n=14$ ) P-SA 1,43 ile 2,9 mmol/L, EM-SA 62 ile 154  $\mu\text{mol/g}$  prot arasında bulunmuştur (Tablo 7, Şekil 8).

Tüm olguların ortalama değerleri ise aşağıdaki gibidir:

	Plazma SA (mmol/L)	Eritrosit Membranı SA ( $\mu\text{mol/g}$ prot)
Genç Grup	1,9 $\pm$ 0,3	100,8 $\pm$ 25,6
Yaşlı Grup	2,1 $\pm$ 0,3	111,0 $\pm$ 28,2

Genç ve yaşlı grubun plazma ve eritrosit membranı total sialik asit düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 7 ve 8).



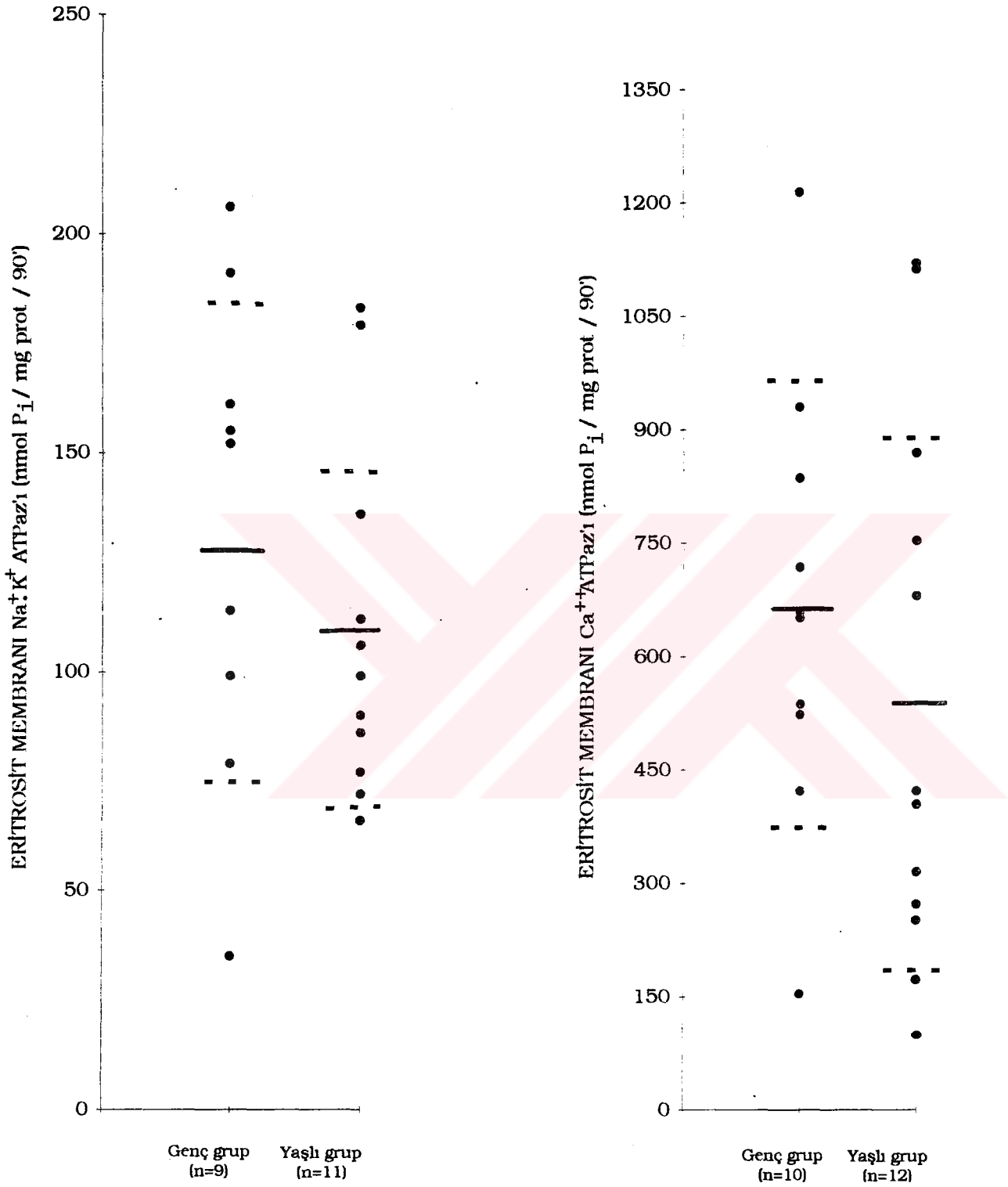
Tablo 4. Genç ve yaşlı olguların vücut kitlesi indeksleri.

Olgu No	Yaş	Cins	VKI kg/m <sup>2</sup>	Olgu No	Yaş	Cins	VKI kg/m <sup>2</sup>
1	23	K	21.25	15	51	E	24.22
2	25	K	20.19	16	53	K	28.68
3	25	K	20.07	17	54	K	25.40
4	25	E	23.12	18	55	K	24.67
5	27	E	25.30	19	59	E	28.73
6	27	E	25.24	20	59	E	23.35
7	27	E	18.71	21	64	E	25.95
8	28	K	20.93	22	64	E	27.18
9	28	K	21.48	23	66	E	24.15
10	28	E	23.82	24	68	K	20.95
11	30	K	17.89	25	68	K	23.53
12	30	E	22.64	26	70	K	25.07
13	33	E	24.28	27	75	K	28.99
14	34	K	21.19	28	88	E	22.58
$\bar{x}$	27.85		21.88	$\bar{x}$	63.85		25.24*
$\pm$ SD	3.08		2.31	$\pm$ SD	9.96		2.43

\* p&lt; 0.001

Tablo 5. Genç ve yaşlı olgularda ATPaz aktiviteleri.

	Olgu No	Cins	Total ATPaz	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz	Ca <sup>2+</sup> ATPaz	% ATPaz	
						(nmol P <sub>i</sub> /mg prot/90 <sup>s</sup> )	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz
GENÇ GRUP	1	K	451.6	98.9	154.3	21.89	34.16
	2	K	843.6	35.5	659.0	4.20	78.11
	3	E	1779.0	114.1	1214.0	6.41	68.24
	4	E	1453.0	206.0	930.0	14.17	64.00
	5	K	993.5	-	650.6	-	65.49
	6	K	846.4	153.0	523.0	18.10	61.79
	7	K	969.3	154.0	537.0	15.88	35.40
	8	E	1209	161.5	836.0	13.36	69.14
	9	E	963.0	79.0	718.0	8.20	74.55
	10	K	962.5	191.4	421.7	19.88	43.79
	$\bar{x}$		1047.0	132.6	664.3	13.50	61.40
	$\pm$ SD		363.0	55.1	290.6	6.10	13.60
YAŞLI GRUP	11	E	656.6	180.8	421.8	27.50	64.24
	12	K	553.5	88.3	404.0	15.95	72.99
	13	K	394.1	-	271.6	-	68.91
	14	K	378.0	72.2	171.7	19.10	45.26
	15	E	1710.5	179.5	1120.5	10.49	65.50
	16	E	933.0	66.3	753.0	7.10	81.28
	17	E	388.3	89.6	87.4	23.07	22.50
	18	K	973.5	112.0	680.5	11.50	69.90
	19	K	1219.0	135.6	869.0	11.12	71.28
	20	K	537.4	76.8	250.6	14.30	46.60
	21	K	558.5	98.8	315.4	17.70	56.47
	22	E	1565.0	106.0	1112.0	6.77	71.05
	$\bar{x}$		882.2	109.6	538.1	14.40	61.30
	$\pm$ SD		462.4	39.9	358.8	7.40	16.20



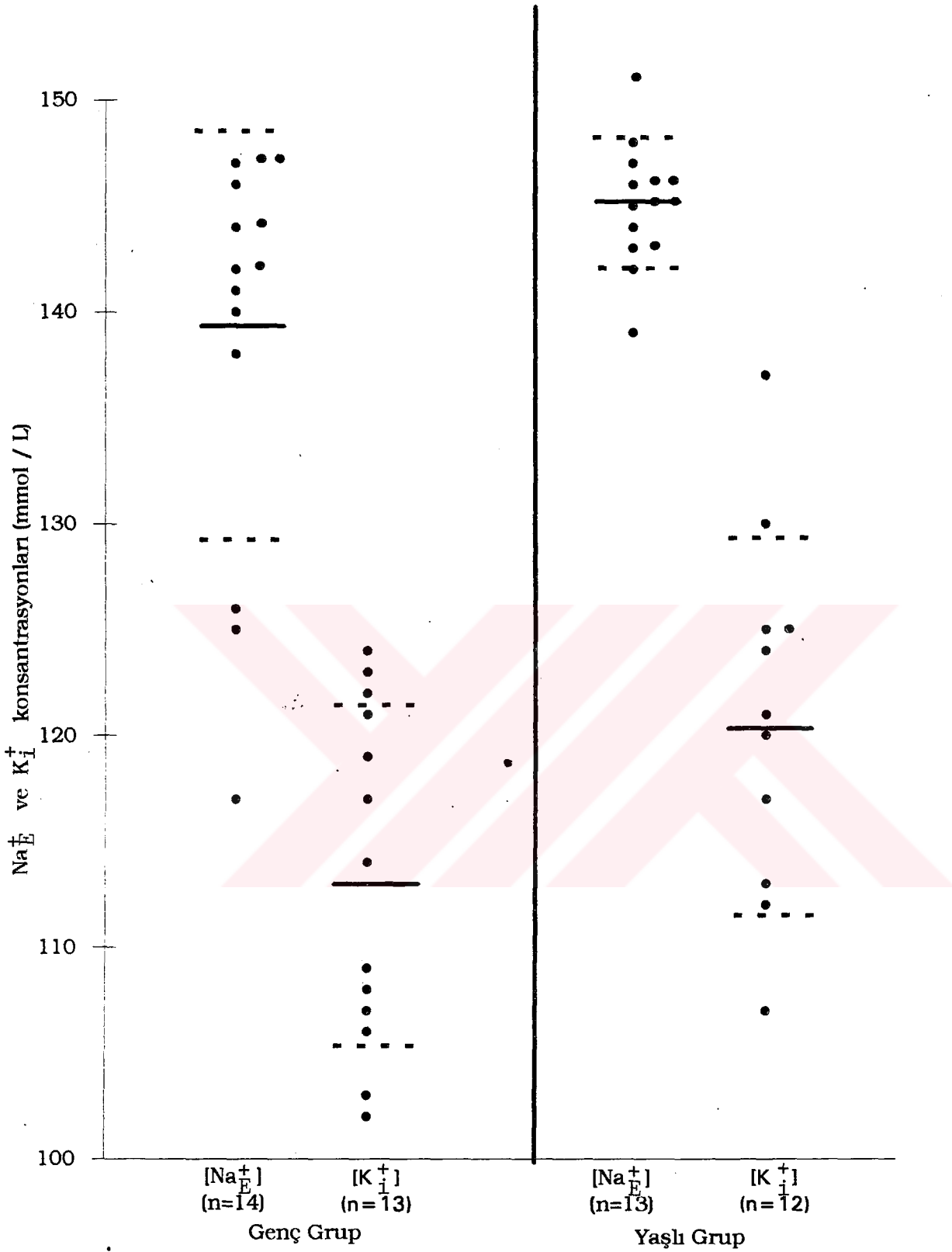
Şekil 6. Genç ve yaşlı olgularda Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ve Ca<sup>++</sup>ATPaz aktivitelerinin dağılışı

— Ortalama değer      - - - - SD

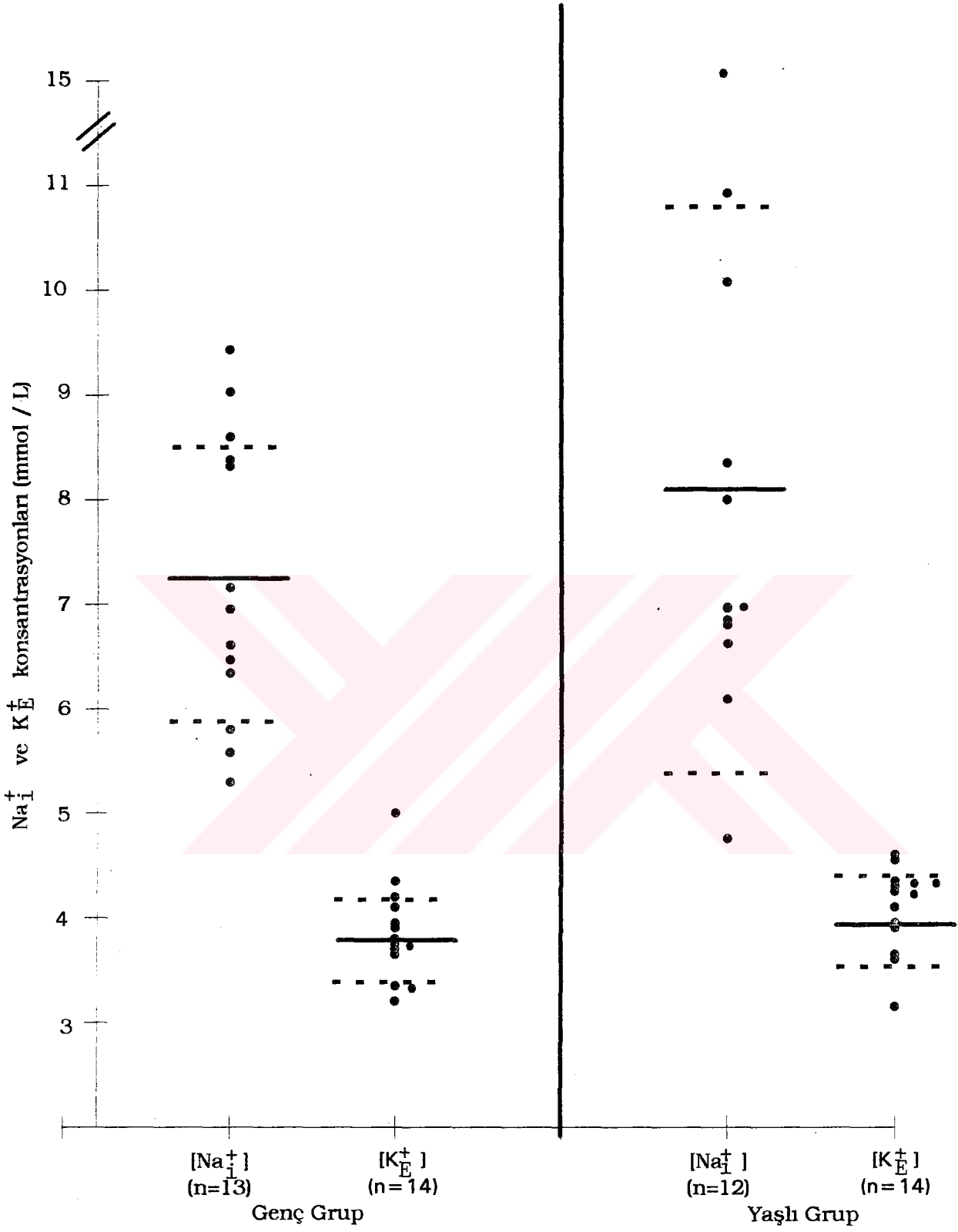
Tablo 6. Genç ve yaşlı olguların Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> konsantrasyonları (mmol/L)\*

	Olgu No	Cins	PLAZMA		ERİTROSİT	
			Na <sup>+</sup> (mmol / L)	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> (mmol / L)	K <sup>+</sup>
GENÇ GRUP	1	K	147	5.00	6.34	105.90
	2	K	125	3.35	8.38	102.63
	3	K	141	4.10	7.16	124.02
	4	E	142	3.75	8.32	102.86
	5	E	126	3.20	9.43	121.30
	6	E	138	3.65	9.03	122.35
	7	E	146	4.35	5.30	124.00
	8	K	117	3.95	8.60	116.99
	9	K	144	3.90	-	-
	10	E	147	3.35	6.81	114.40
	11	K	142	3.75	5.58	108.52
	12	E	147	4.20	6.95	119.54
	13	E	144	3.70	5.80	107.54
	14	E	140	3.80	6.47	108.00
	$\bar{x}$		139	3.80	7.20	113.60
	$\pm$ SD		9.4	0.40	1.30	8.10
YAŞLI GRUP	15	E	142	4.30	-	-
	16	K	146	3.95	10.93	111.88
	17	K	143	4.35	6.62	112.88
	18	K	144	4.25	8.35	136.96
	19	E	139	3.60	6.80	125.32
	20	E	148	4.60	15.16	125.33
	21	E	145	3.65	-	-
	22	E	146	3.90	10.08	117.39
	23	E	143	4.55	6.85	119.61
	24	K	145	3.15	6.09	106.90
	25	K	145	4.25	6.96	129.63
	26	K	146	4.35	4.76	123.68
	27	K	152	4.35	6.97	112.00
	28	E	147	4.10	8.00	121.44
	$\bar{x}$		145	4.00	8.10	119.90
	$\pm$ SD		3.0	0.40	2.70	8.90

\* p &lt; 0.05



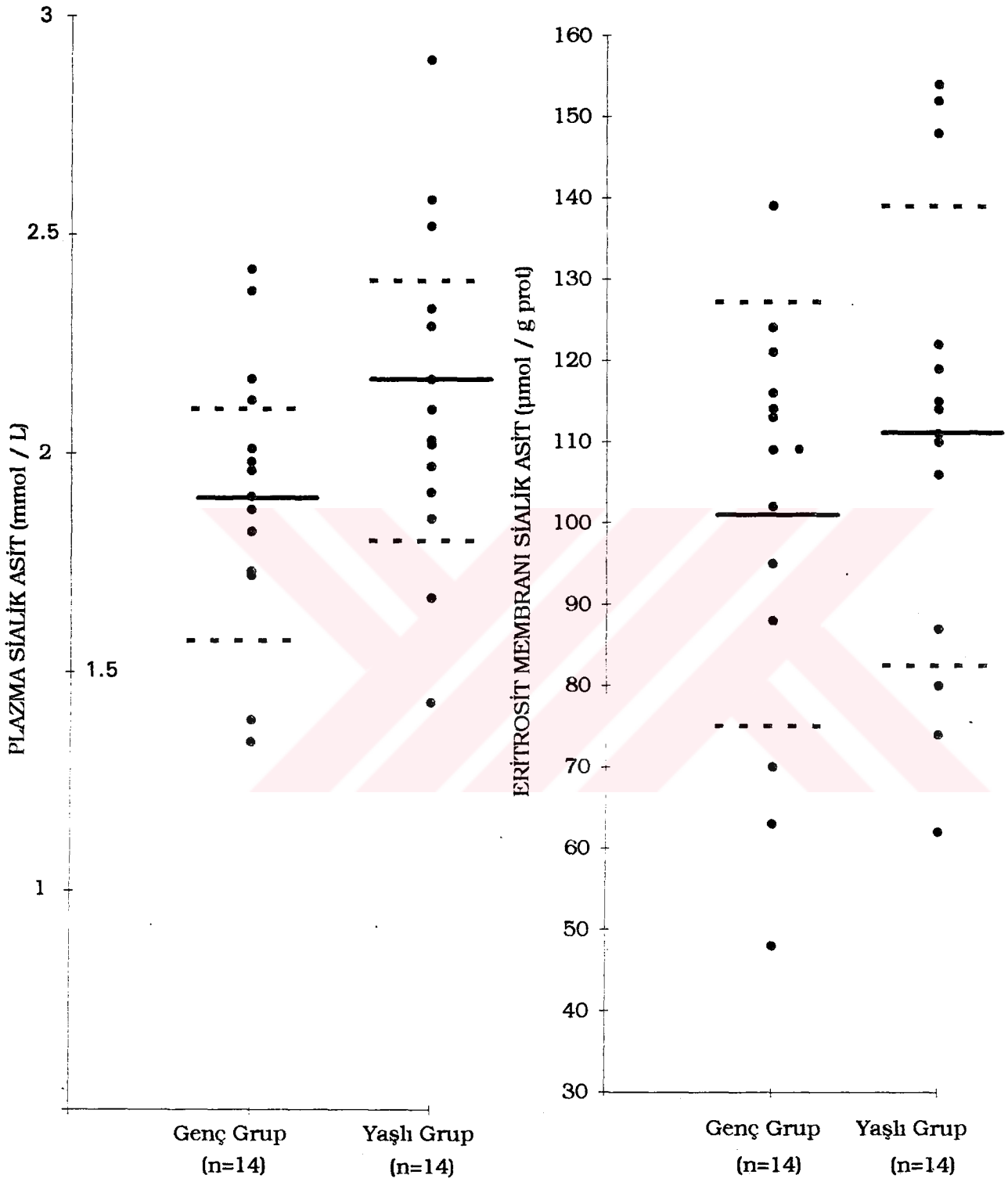
Şekil 7a. Genç ve Yaşlı olgularda sodyum ve potasyum konsantrasyonlarının dağılışı



Şekil 7b. Genç ve Yaşlı olgularda sodyum ve potasyum konsantrasyonlarının dağılışı

**Tablo 7.** Genç ve yaşlı olgularda plazma ve eritrosit membranında sialik asit düzeyleri.

	Olgu No	Cins	PLAZMA	ERİTROSİT MEMBRANI
			(mmol/L)	( $\mu$ mol/g.prot.)
GENÇ GRUP	1	K	1.82	48.00
	2	K	1.72	120.80
	3	K	2.12	109.00
	4	E	1.39	63.00
	5	E	1.98	139.00
	6	E	2.42	95.00
	7	E	1.87	113.60
	8	K	1.90	124.50
	9	K	1.34	114.00
	10	E	2.01	69.50
	11	K	2.37	109.00
	12	E	1.73	88.00
	13	E	2.17	116.50
	14	E	1.96	101.60
	$\bar{x}$		1.90	100.80
	$\pm$ SD		0.30	25.60
YAŞLI GRUP	15	E	2.02	74.50
	16	K	1.85	113.70
	17	K	2.52	148.00
	18	K	2.17	106.50
	19	E	2.10	121.60
	20	E	1.67	79.80
	21	E	1.43	119.00
	22	E	2.58	111.00
	23	E	2.03	62.00
	24	K	2.90	115.10
	25	K	1.91	110.70
	26	K	2.33	87.00
	27	K	2.29	151.70
	28	E	1.97	154.00
	$\bar{x}$		2.10	111.00
	$\pm$ SD		0.30	28.20



Şekil 8. Genç ve yaşlı olgularda plazma ve eritrosit membranı sialik asit düzeyleri

— Ortalama değer

--- SD



**Tablo 8.** Genç ve yaşlı olgularda ATPaz aktiviteleri, plazma ve eritrosit Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> konsantrasyonları ve sialik asit düzeyleri (ort. ± SD)

	Genç Grup		Yaşlı Grup	
Total ATPaz (nmol P <sub>i</sub> /mg prot./90')	1047.0	± 363.0	822.2	± 462.4
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz (nmol P <sub>i</sub> /mg prot./90')	132.6	± 55.1	109.6	± 39.9
Ca <sup>2+</sup> ATPaz (nmol P <sub>i</sub> /mg prot./90')	664.3	± 290.6	538.1	± 358.8
% Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPaz	13.5	± 6.1	14.4	± 7.4
% Ca <sup>2+</sup> ATPaz	61.4	± 13.6	61.3	± 16.2
Na <sup>+</sup> <sub>E</sub> (mmol/L)	139.0	± 9.4	145.0	± 3.0*
K <sup>+</sup> <sub>E</sub> (mmol/L)	3.8	± 0.4	4.0	± 0.4
Na <sup>+</sup> <sub>i</sub> (mmol/L)	7.2	± 1.3	8.1	± 2.7
K <sup>+</sup> <sub>i</sub> (mmol/L)	113.6	± 8.1	119.9	± 8.9
P-SA (mmol/L)	1.9	± 0.3	2.1	± 0.3
EM-SA (µmol/g prot.)	100.8	± 25.6	111.0	± 28.2

\* p < 0.05

## TARTIŞMA

Yaşlanma olayları, ya tüm organizmanın (konağın) yaşlanması ya da dolaşımdaki hücrelerin yaşlanması ile ilgili biokimyasal ve morfolojik çalışmaları içine alır. Eritrositler yaşlanma ile ilgili biokimyasal araştırmalarda, hem hücresel ve hem de organizma yaşlanmasının izlenmesi açısından özellikle uygun model olarak kabul edilmektedir <sup>(3)</sup>. Organizma yaşlanmasının, çeşitli eritrosit enzimlerinin aktivitesi ile ilişkili olduğunu kanıtlayan çalışmalar <sup>(83)</sup>, enzim aktivitesinin yalnızca yaşlanan hücrenin bir fonksiyonu değil, fakat tüm organizmanın yaşına da bağlı olduğunu göstermiştir. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz üzerine yaşlanmanın etkileri ile ilgili, kesin kanıtlar elde edilememiş, çok nadir ve çelişkili çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda çoğunlukla eritrositler, beyin ve karaciğer enzim aktiviteleri araştırılmıştır <sup>(2,17,38,48,52,54,56,58,63,78,80,83)</sup>.

Çalışmamız organizma (konak) yaşlanmasının membranın transport fonksiyonu ve önemli yapısal bileşeni olan sialik asit üzerine etkilerinin incelenmesi ile ilgili, yurdumuzda yapılan ilk araştırmadır. Yaşlanma etkileri, yaş ortalamaları 27,85 ± 3,0 ve 63,85 ± 9,9 olan sağlıklı kadın ve erkeklerde incelenmiştir. İnsan eritrosit membranı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz aktivitesinin sağlıklı kişilerde beslenme alışkanlıkları ve açlık-tokluk durumu <sup>(104)</sup>, dinlenmede metabolik aktivite oranı <sup>(84)</sup>, vücut ağırlığı <sup>(73)</sup>, ırk <sup>(65,109)</sup>, ilaç ve vitamin tüketimi, kan basıncı, sigara ve alkol alışkanlıkları gibi çeşitli faktörlerle az da olsa etkilenebileceği bilinmektedir. Bu nedenle genç ve yaşlı olguların bu kişisel özellikleri dikkate alınarak yapılan seçimleri ile grup içi ve arası azami homojenizasyon sağlanmıştır. Bu amaçla, olguların beslenme durumu bakımından (etobur veya vejetaryen) gibi farklı olmamasına dikkat edildiği gibi, tüm olgulardan 12 saatlik açlık durumunda kan alındı. Ayrıca vücut yağ dağılımının normal standartların dışına çıkmaması için; boy ve kiloları ölçüldü ve vücut ağırlığının, boy uzunluğunun

karesine bölünmesiyle ( $\text{kg/m}^2$ ) VKI'leri hesaplandı. Seçilen genç ve yaşlı olgular, ortalama olarak normal ağırlığın üst sınırı kabul edilen 27'nin altında (genç VKI:  $21,88 \pm 2,31$ , yaşlı VKI  $25,24 \pm 2,43$ ) idi. Bireysel olarak 14 yaşlıdan yalnız üçü kilo fazlası idi. Bu üç yaşlı olgudan yalnız birinin  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  ve  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktiviteleri tüm yaşlı olguların ortalama değerinin ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  için,  $109,6 \pm 39,9$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  için  $538 \pm 358$ ) üzerinde idi. Diğer ikisinin enzim aktiviteleri ortalamanın altında idi. Genç grupta, ortalamanın üzerinde  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesi ( $132,6 \pm 55,1$ ) olan 5 kişinin VKI'leri 17-22 arasında değişmekte idi, yani bir hayli zayıf idiler. Bu bulgulara göre,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesinin, VKI'ne göre normal ağırlıktaki kişilerde ve hafif kilo fazlası olan kişilerde olumlu ya da olumsuz etkilenmediği anlaşılmaktadır. Bu düşüncemiz, VKI ile eritrosit  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$ 'ı arasında bir ilişki olmadığını bildiren araştırmacılarla aynı doğrultudadır (7,25,69,103). Ancak, VKI 40'ın üzerinde olan ciddi şişman kişilerde enzim aktivitesinde anlamlı bir azalmanın olabileceği bildirilmiştir (60). Diğer taraftan, yaşlı olgularımızın hiç birinin VKI, şişmanlığın alt sınırı olan 32'ye ulaşmadığı halde yaşlıların ortalama VKI, gençlere göre ileri derecede anlamlı artmış bulundu. Buna göre yaşlanma, VKI'inde artmaya eğilim oluşturmaktadır. Bu bulgumuz da, yaşlanma ile VKI'nde artış bulan araştırmacıların bulguları ile uyum göstermektedir (46,67).

Olgularımızı bireysel olarak incelediğimizde genç grupta  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktiviteleri 35,5 ile 206  $\text{nmol P}_i/\text{mg prot./90'}$ , yaşlılarda 66,3 ile 180,8  $\text{nmol P}_i/\text{mg prot./90'}$  arasında değişmektedir.  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitesi ise; genç grupta 154,3 ile 1214, yaşlılarda 87,4 ile 1120,5  $\text{nmol P}_i/\text{mg prot./90'}$  değerleri arasında değişmektedir. Bunlara göre; sağlıklı bireylerin her iki enzim aktivite değerlerinde geniş saçılmalar olduğu görülmektedir. Gerçekten, literatürde bu tür geniş birey içi ve arası dağılımları oluşunun, eritrosit enzim aktivite tekniklerinin uygulanışından doğan önemli bir sorun olduğu bildirilmiştir (34). Eritrosit membranı transport ATPazlarının ölçülmesi için çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemler arasında geniş dağılımlar vardır. Standart bir işlemin olmaması ve enzim aktivitesini ifade etmek için farklı birimlerin kullanılması, farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki kıyaslamayı çok güçleştirmektedir. Ayrıca; geniş saçılmalı bu normal enzim aktivite değerlerinin işlem farklılıkları dışında, fizyolojik parametrelerdeki değişkenlikler sonucu olduğu ileri sürülmüştür (34).

Genç grupta ortalama  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesi  $132,6 \pm 55,1$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitesi  $664 \pm 290$  nmol  $\text{P}_i$ /mg prot./90' olarak bulunmuştur. Yaşlı grupta her iki ATPaz aktivitesinde anlamlı olmayan azalma saptanmıştır. Yaşlılarda ortalama  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesi gençlere göre % 17,3 azalarak  $109,6 \pm 39,9$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitesi ise % 18,9 azalma ile  $538,1 \pm 358,8$  (nmol  $\text{P}_i$ /mg prot./90') olarak bulunmuştur. Bireysel olarak yalnızca 3 genç olgunun (1/3) her birinin  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktiviteleri değerleri, tüm yaşlı olguların ortalama enzim aktivitesinin ( $109,6 \pm 39,9$  nmol  $\text{P}_i$ /mg Prot./90') altında idi. Yaşlıların ise 8'inin (2/3)  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesi tüm yaşlı grubun ortalama değerinin altında bulundu. Yine 3 genç olgunun (1/3) her birinin  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivite değeri tüm yaşlı olguların ortalama  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitesi değerinin ( $538,1 \pm 358$  nmol  $\text{P}_i$ /mg prot./90') altında idi. Özetle; 1/3 genç olgunun  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  ve  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktiviteleri düşük, 1/3 yaşlı olgunun bu enzim aktiviteleri istisna olarak yüksek bulunmuştur. Bu istisnalar, her iki grup arasındaki farkların anlamlılık sınırları içine girmesini engellemektedir. Ancak burada önemle üzerinde durulması gereken bulgu, iki yaş grubumuzun (23-34 ve 51-88 yaşlar) ATPaz aktiviteleri arasında farklılık bulunamamasıdır. Çok yakın bir zamanda bir araştırmacı grubu da <sup>(13)</sup> genç (17-40) ve orta yaş (41-60) arasındaki kişilerde bu bulgumuza benzer sonuçlar elde ettiklerini ve 60'lı yaşlardan önce  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitelerinde hiç bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda yaş ortalaması 65 civarında olan yaşlılarda azalmaya eğilim gösteren fakat anlamlılık vermeyen ATPaz aktivitelerinin 70 ve 80 yaş üzeri sağlıklı yaşlılarda anlamlı sonuçlar verip vermeyeceği belirsizdir. Bu nedenle, çoğunlukla genç insanlar topluluğundan oluşan yurdumuzda 70 yaş üzeri sağlıklı insan bulmak çok güç olmasına rağmen, 70-90 yaş arası yeterli sayıda sağlıklı kişideki enzim aktivitelerinin araştırılması uygun olacaktır.

ATPaz yöntemlerini modifiye ederek uyguladığımız Rahman ve ark. <sup>(85)</sup> 25 sağlıklı kişide  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesini saatte mg. prot. başına  $140,2 \pm 11$  nmol  $\text{P}_i$  olarak bulmuş, Davis ve ark. <sup>(24)</sup> ise; 11 genç kişide  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesini 90' de, mg. prot. başına  $144 \pm 8$  nmol  $\text{P}_i$ , 15 yaşlıda  $136 \pm 6$  nmol  $\text{P}_i$ ,  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitesini gençlerde  $434 \pm 28$ , yaşlılarda  $378 \pm 24$  nmol  $\text{P}_i$  olarak bildirmişlerdir. Bir başka araştırmacı grubu da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  aktivitesini erkeklerde  $145,7 \pm 3,7$ , kadınlarda  $164,7$

$\pm 5,5$ , siyah ırkta  $140,3 \pm 4,2$  (nmol  $P_i$ /mg prot./saat) olarak vermişlerdir <sup>(92)</sup>. Buna göre bizim olgularımızın  $Na^+-K^+ATPaz$  değerleri bu araştırmacıların bildirdikleri değerler ile uyum göstermektedir. Bizim olgularımızda,  $Ca^{2+}ATPaz$  değerleri Davis ve ark. <sup>(24)</sup> göre biraz daha yüksektir. Eritrosit membranı  $Ca^{2+}ATPaz$  aktiviteleri ile ilgili diğer bazı çalışmalarda yine, normal enzim aktivitesi değerlerinde bir hayli farklı sonuçlar bildirilmiştir <sup>(34, 36,43,123)</sup>. Örneğin; 25 normal genç kişide eritrosit membranı  $Ca^{2+}ATPaz$  aktivitesi  $573 \pm 127$  (nmol  $P_i$ /mg prot./saat) <sup>(34)</sup>, 5 normal erişkinde  $1530 \pm 250$  (nmol  $P_i$ /mg prot./saat) <sup>(123)</sup>, 12 normal genç ve yaşlı kişide  $1030 \pm 80$  (nmol  $P_i$ /mg prot./saat) <sup>(43)</sup> ve 19 normal genç ve yaşlıda  $366 \pm 32$  (nmol  $P_i$ /mg. prot./saat) <sup>(102)</sup> olarak saptanmıştır. Bunlara göre normal eritrosit membranı  $Ca^{2+}ATPaz$ 'ı saatte mg prot.başına 300-1600 nmol  $P_i$  arasında değişmektedir. Bizim olgularımızın değerleri, bu değerler arasında olduğundan yine literatüre uygunluk göstermektedir. Ancak gerek  $Na^+-K^+ATPaz$  ve gerekse  $Ca^{2+}ATPaz$  aktivitelerinde yaşlanma ile anlamlılık sınırları içinde olmayan azalma saptamamız, her iki enzimin konağın yaşı ile etkilendiğini düşündürmektedir. Bu bakımdan bulgumuz Davis ve ark. <sup>(24)</sup> bulgularıyla uyum göstermektedir. Bu yönden çalışmamız bulguları, genç ve yaşlılarda  $Na^+-K^+ATPaz$  aktivitesinde herhangi bir farklılık bulmayan diğer birçok araştırmacıyla da aynı doğrultudadır <sup>(22,55,58,63,97,104,122)</sup>. Buna karşılık, yaşlanmanın insan ve hayvan eritrositlerinde,  $Na^+-K^+ATPaz$  ve  $Ca^{2+}ATPaz$  aktivitesinde azalmaya <sup>(2,6,39,78,83,99)</sup> ya da artmaya <sup>(32)</sup> yol açtığını bildiren araştırmacılar ile zıt yöndedir.

Bu farklılıklar yöntem farkları, araştırılan olgu ya da deneklerin tür, cins ya da ırk farklılıkları, kişisel özellikleri bakımından heterojen oluşu ve araştırılan örnek sayısının yetersiz oluşu ile açıklanabilir. Küçük örnek sayısı, geniş birey içi farklılıklar oluştuğunda hatalı hükümlere yol açabilir. Diğer yönden aynı kişi ya da hayvanda örneğin eritrosit  $Na^+-K^+ATPaz$ 'ının yaşa bağlı azalması, başka bir doku incelendiğinde (örneğin beyin, kalp vb.) artma ya da hiç bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkabilir, yani yaşa bağlı enzim aktivitesi değişikliği dokuya özgü olabilir.

Çalışmamızda genç ve yaşlı kişilerde eritrosit membranı  $Na^+-K^+ATPaz$  ve  $Ca^{2+}ATPaz$  aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulamamız sonucu şu yargılara varılabilir;

a) Öncelikle yaşlanmaya bağlı olarak eritrosit membranı fonksiyonel ATPaz birimleri sayısında bir kayıp olmadığı düşünülür. Çünkü, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz baskılanmasında primer olay, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz birimleri sayısında azalmadır (13). Diğer olasılıklar b) membran viskozitesinde değişiklik olmadığı c) ve/veya yaşlanma sonucu dolaşımda Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz inhibitörü (ya da inhibitörlerinin) artmamış olduğudur.

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz enziminin, düzenlenmesinden sorumlu olduğu hücre içi ve dışı monovalan iyon konsantrasyonları da ölçülmüştür. Genç grupta ortalama plazma Na<sup>+</sup>u 139±9,4, plazma K<sup>+</sup>u 3,8 ± 0,4 mmol/L, eritrosit Na<sup>+</sup>u 7,2 ± 1,3, K<sub>i</sub><sup>+</sup> değeri ise 113,6 ± 8,1 mmol/L bulunmuştur. Yaşlılarda hem ekstrasellüler hem de intrasellüler Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> konsantrasyonlarında hafif artma olmuştur. Ancak yaşlılarda 145 ± 3,0 mmol/L bulunan ortalama Na<sub>E</sub><sup>+</sup> değeri gençlere göre anlamlı artış göstermiştir. Genç ve yaşlılar eritrosit membranı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPazında anlamlı bir fark bulunamadığından, yaşlılarda anlamlı olmayan hafif eritrosit Na<sup>+</sup> konsantrasyonu artışının, artmış ekstrasellüler Na<sup>+</sup> konsantrasyonu sonucu sodyumun pasif transportunun uyarılmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, başka araştırmacılar da yaşlılarda gençlere göre eritrosit Na<sup>+</sup> unda anlamlı olmayan artış bulmuşlardır (21,75). Bir başka çalışmada, genç ve yaşlıların hücre içi Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> konsantrasyonlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (84). Bazıları ise, yalnızca yaşlı kadın grubunda Na<sub>i</sub><sup>+</sup> konsantrasyonunda anlamlı artış bildirmiştir (77,95).

Literatürde Na<sub>i</sub><sup>+</sup> konsantrasyonları genellikle 5,0 ile 10,9 mmol/L arasında (20,21,34,42,50,61,75,77,79,81,82,92,95,102,103,121), K<sub>i</sub><sup>+</sup> konsantrasyonu 80 ile 139,9 mmol/L arasında (20,42,50,61,75,79,81,82,84,92,102,103,121) bulunmuştur. Na<sub>E</sub><sup>+</sup> konsantrasyonu 138-144 mmol/L (42,50,61,79,84,92,121), K<sub>E</sub><sup>+</sup> konsantrasyonu 3,8-4,2 mmol/L (42,50,61,79,84,92,121) arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda genç ve yaşlı grup için bulduğumuz plazma ve intraeritrositer Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> değerleri, bu konsantrasyonlar içinde olup, literatür bulgularına tamamiyle uygunluk göstermektedir.

Organizma yaşlanmasının eritrosit membranının glikoprotein yapılı transport proteinleri olan Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaz ve Ca<sup>2+</sup>ATPaza etkilerinin yanı sıra, membrandaki gliko-bileşiklerinin önemli yapısal elemanı olan to-



tal sialik asit düzeylerine etkileri de incelenmiştir. Gençlerde ortalama P-SA düzeyi,  $1,9 \pm 0,3$ , yaşlılarda  $2,1 \pm 0,3$  mmol/L bulundu. Literatürde, P-SA düzeyi bizim kullandığımız yöntemle 1,7 ile 2,3 mmol/L arasında bildirilmiştir <sup>(114)</sup>. Çalışmamızda elde edilen değerler de bu sınırlar içindedir ve literatür değerlerine tamamiyle uygundur. EM-SA düzeyinin gençlerde ortalama  $100,8 \pm 25,6$  ( $\mu\text{mol/g prot.}$ ) iken, yaşlılarda  $111,0 \pm 28,2$  ( $\mu\text{mol/g prot.}$ )'a yükseldiği saptandı. EM-SA düzeyleri ile ilgili ve 6 ile 18 kişilik oldukça küçük gruplarda yapılan nadir birkaç çalışmada g protein başına  $96,40 \pm 2,06$  <sup>(113)</sup>,  $104,9 \pm 2$  <sup>(115)</sup> ve  $124 \pm 22$  <sup>(123)</sup>  $\mu\text{mol SA}$  değerleri bildirilmiştir. Bizim genç ve yaşlı olgularımızın EM-SA ortalama değerleri, bu değerler arasındadır ve literatür bulgularına tamamiyle uyum göstermektedir.

Genç ve yaşlı olgularda, gerek plazma gerekse eritrosit membranı SA düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmasa da, yaşlılarda total SA düzeyinin artmaya eğilimli olduğu anlaşılmaktadır. Yaşlanma ve sialik asit düzeyleri ile ilgili literatürdeki nadir çalışmalardan birinde, sağlıklı kadın ve erkeklerde sialik asidin ilerleyen yaşla hafifce arttığı bildirilmiştir <sup>(110)</sup>. Yaşlanmanın lenfosit sialik asit düzeylerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada <sup>(1)</sup> sialik asit 20-80 yaş arası erkeklerde 10'ar yaş aralığı incelendiğinde anlamlı farklılık göstermemiştir. Bizim incelediğimiz yaş grupları olan 20-30 yaşın sialik asit düzeyleri, 51-60 yaş grubuna göre belirgin daha az, 61-70 yaş grubu ile hemen hemen aynı düzeyde, fakat anlamlı bulunmamıştır <sup>(1)</sup>. Bizim olgularımızda yaşlılarda artmaya eğilimli fakat anlamlı bulunmayan P- ve EM-SA düzeyleri ile ilgili bulgularımız, bu literatür bulgularına yine uyum göstermektedir.

Özetle, genç ve yaşlı kişilerde eritrosit membranı  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPaz ve  $\text{Ca}^{2+}$ ATPaz aktivitelerine paralel olarak, hücre içi ve dışı  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  konsantrasyonlarında anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Bu durumda, her iki enzimin ilerleyen yaş ile etkilenmediği ve buna bağlı olarak da hücre hacmi ve homeostazisi ile ilgili önemli mekanizmalarda organizma aleyhine olabilecek değişikliklerin oluşmayacağı düşünülebilir. Sonuç olarak yaşlanma olayının, membranın yapısal bileşenlerinde (sialik asit) bir kayba yol açmadığı gibi, membranöz aktivite ve hücrel homeostazisinin normal işlevinin sürdürülmesine engel bir ortam oluşturmadığı kanısına varılmıştır. Bununla beraber,

olabildiğince daha yaşlı ve daha geniş olgu sayısı ile çalışılarak, bulgularımızın desteklenmesi ve bu konuda hiç bulunmayan referans değerlerimizin literatüre kazandırılması uygun olacaktır.





## ÖZET

Yaşlanma olaylarının membran yapısı ve fonksiyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklerin spesifik enzim aktivitelerinin ölçülmesi yolu ile belirlenmesi de, önemli bir yaklaşımdır. Moleküler mekanizmaları bugüne kadar tamamiyle anlaşılamamış olan yaşlanma olaylarının, membrana-bağlı enzim aktiviteleri ile ilişkileri de son yılların ilgi çeken konularıdır. Ancak, yaşlanmanın insanlardaki  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  enzimine etkisi konusunda bir hayli kısıtlı ve çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Bu nedenle eritrosit membranının iki önemli transport proteini olan  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  ve  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktiviteleri ile, önemli bir yapısal bileşiği olan sialik asit düzeylerindeki yaşa-bağımlı olabilecek değişiklikleri araştırmayı ve bu konudaki sınırlı bilgilere katkıda bulunmayı amaçladık.

Yaşları 23-34 ve 51-88 arasında değişen 14 genç ve 14 yaşlı kadın ve erkeklerden alınan kan örneklerinde çalışıldı. Genç ve yaşlı tüm olgular, ortalama VKI'ne göre normal ağırlığın üst sınırı olan 27'nin altında bulunduğu standart normal ağırlıkta idiler. Diğer birçok kişisel özellikleri açısından da benzer olanları seçildiğinden tümünün olabildiğince homojen olması sağlandı.

Sabah aç olarak alınan kan örneklerinden plazma ve eritrosit membranı elde edildi. Eritrosit membranında  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  ve  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktiviteleri ve total sialik asit düzeyleri ölçüldü. Plazma ve eritrosit içi  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  konsantrasyonları flame fotometrik ölçüldü. Ayrıca plazmada total sialik asit düzeyleri araştırıldı.

Yaşlı olgularda  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPaz}$  ve  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPaz}$  aktivitelerinde gençlere göre azalmaya eğilim olmasına rağmen, bu azalmalar anlamlı bulunmadı. Bu nedenle her iki enzimin aktivitelerinin konağın yaşı ile etkilenmediği

düşünüldü. Plazma ve intraeritrositer  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  konsantrasyonlarının yaşlılarda artmaya eğilimli olduğu saptandı. Ancak, yalnız plazma  $\text{Na}^+$  artışı anlamlı bulundu. Plazma ve eritrosit membranı SA düzeyleri de yaşlılarda hafif artmış bulunmakla birlikte, anlamlı değildi.

Sonuç olarak yaşlanma olayının, hücre hacmi ve homeostazisi ile ilgili yaşamsal fonksiyonlarda ve membran yapısında organizma aleyhine değişikliklere yol açmadığı ve membranöz aktivitenin sürdürülmesine engel bir ortam yaratmadığı kanısına varılmıştır.



## KAYNAKLAR

1- Allalouf, D., Komlos, L., Notman, J., Halbrecht, I., Levinsky, H.: Sialic acid content and sialyltransferase activity in human lymphocytes with advancing age. *Mech Ageing Dev.* 44:45-50, (1988).

2- Amano, M., Imataka, K., Suzuki, K., Nakaoka, H., Fuji, J.: Age-related reduction in the number of rabbit erythrocyte Na, K-ATPase. *Tohoku J. Exp. Med.* 159:131-137, (1989).

3- Aminoff, D., Rolfes-Curl, A., Supina, E.: Molecular biomarkers of aging. The red cell as a model. *Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.* 3:7-16, (1992).

4- Au, K.S., Chan, K.C.: Variations in (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase, its inhibitor protein and calmodulin of density (age) separated rabbit erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 761:291-295, (1983).

5- Ballas, S.K., Krasnow, S.H.: Structure of erythrocyte membrane and its transport functions. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 10(3): 209-219, (1980).

6- Beilin, L.J., Knight, G.J., Munro-Faure, A.D., Anderson, J.: The sodium, potassium and water contents of red blood cells of healthy human adults. *J.Clin. Invest.* 45:1817-1825, (1966).

7- Beutler, K., W., Sacks, P.: Sodium-Potassium ATPase activity is influenced by ethnic origin and not by obesity. *N. Engl. J. Med.* 309:756-760, (1983).

8- Bhattacharyya, M.L., Nathan, R.D., Shelton, V.L.: Release of sialic

---

acid alters the stability of the membrane potential in cardiac muscle. *Life Sci.* 29:1071-1078, (1981).

9- Biggs, R.B., Booth, F.W.: Protein synthesis rate is not suppressed in red heart during senescence. *Am. J. Physiol.* 258: H207-211, (1990).

10- Bjorksten, J.: The crosslinkage theory of aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 16:408-427, (1968).

11- Bonting, S.L., De Pont, J.J.H.H.M.: *Mammalian Cell Membranes*, Vol.4, Ed. G.A. Jamieson, D.M. Robinson, s.145, Butterworth, London, (1977).

12- Borle, A.B.: Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 90:14-122, (1981).

13- Bozzo, C., Gorla, M., Marengo, C., Marenga, S., Velgia, F., Pagano, G.: Lymphocyte Na-K-ATPase is reduced in aged people. *Metabolism* 8:808-814, (1990).

14- Brosche, T., Platt, D.: Decrease of cholesterol concentration in human erythrocyte ghost in old age. *Exp. Gerontol.* 25: 23-28, (1990).

15- Burich, R.L.: Effects of age on renal function and enzyme activity in male C 57 BL/6 mice. *J. Gerontol.* 30:539-545, (1975).

16- Butterfield, D.A., Farmer, B.T., Feix, J.B.: Induced alterations in the physical state of sialic acid and membrane proteins in human erythrocyte ghosts: Implications for the topology of the major sialoglycoprotein. *Ann. New York Acad. Sci.* 414:169-179, (1983).

17- Calderini, G., Bonetti, A.C., Battistella, A., Crews, F.T., Toffano, G.: Biochemical changes of rat brain membranes with aging. *Neurochem Res.* 8:483-492, (1983).

18- Carafoli, E.: Calmodulin-sensitive calcium pumping ATPase of

---

plasma membranes: isolation, reconstitution, and regulation. *Fed. Proc.* 43:3005-3010, (1984).

**19-** Chen, K.Y., Chang, Z.F.: A marked increase of fucosylation of glycoproteins in IMR-90 human diploid fibroblasts during senescence in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142:767-774, (1987).

**20-** Cheng, J-T., Kahn, T., Kaji, D.M.: Mechanism of alteration of sodium potassium pump of erythrocytes from patients with chronic renal failure. *J.Clin. Invest.* 74: 1811-1820, (1984).

**21-** Cumberbatch, M., Morgan, D.B.: Relations between sodium transport and sodium concentration in human erythrocytes in health and disease. *Clin. Sci.* 60: 555-564, (1981).

**22-** Davis, F.B., Deziel, M.R., Van Liew, J.B., Davis, P.J., Bernardis, L.L., Blas, S.D.: Effect of caloric restriction and aging on erythrocyte membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity in specific pathogen-free Fischer 344 rats. *Metabolism* 40:819-824, (1991).

**23-** Davis, P.J., Blas, S.D.: In vitro stimulation of human red blood cell  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase by thyroid hormone. *Biochem and Biophys. Res Commun* 99:1073-1080, (1981).

**24-** Davis, P.J., Davis, F.B., Blas, S.D., Schoenl, M., Edwards, L.: Donor age-dependent decline in response of human red cell  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity to thyroid hormone in vitro. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 64:921-925, (1987).

**25-** De Luise, M., Izumo, H., Grace, E.E., Flier, J.S.: Effect of diet upon the erythrocyte Na, K, pump. *J.Clin. Endocrinol Metab.* 56:739-743, (1983).

**26-** De Smedt, H., Parys, J.B., Borghgraef, R., Wuytack, F.: Calmodulin stimulation of renal ( $\text{Ca}^{2+}$  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase *FEBBS LETT.* 131:60-72, (1981).

---

**27-** Demel, R.A., De Kruyff, B.: The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457:109-132, (1976).

**28-** Denyy, P.C., Denny, P.A., Allerton, S.E.: Determination of sialic acid using 2-thiobarbituric acid in the absence of hazardous sodium arsenite. *Clin. Chim. Acta* 131: 333-336, (1983).

**29-** Dhalla, N.S., Zhao, D.: Cell membrane  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 52:1-37, (1988).

**30-** Dulic, V., Gafni, A.: Mechanism of aging of rat muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase studied by selective enzyme oxidation. *Mech Ageing Dev.* 40:289-306, (1987).

**31-** Epstein, F.H., Whittam, R.: Mode of inhibition by calcium of cell membrane adenosine triphosphatase activity. *Biochem. J.* 99:232-238, (1966).

**32-** Est, M., Erjavec, E., Krzan, M.: Age-related changes of erythrocyte  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase activity. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 25:35-36, (1989).

**33-** Feldman, R.D., Linnbird, L.E., Nadeau, J., Robertson, D., Wood, A.J.J.: Alterations in leukocyte beta-receptor affinity with ageing. A potential explanation for altered beta-adrenergic sensitivity in the elderly. *New Engl. J. Med.* 310:815-819, (1984).

**34-** Finotti, P., Verbaro, R.: Sex differences in erythrocyte membrane ATPase activities evidenced by exposing the cells to different hemolytic solutions. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 11:263-267, (1989).

**35-** Firth, J.A., Stranks, G.J.: localization of recently characterized membrane transport adenosine triphosphatases. *Histochem. J.* 13: 517-24, (1981).

**36-** Flecha, F.L.G., Bermudez, M., Cedola, N.V., Gagliardino, J.J.,

---

Rossi, J.P.F.C.: Decreased  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity after glycosylation of erythrocyte membranes in vivo and in vitro. *Diabetes* 39:707-711, (1990).

**37-** Fourie, A.M., Meltzer, S., Berman, M.C., Louw, A.I.: The effect of cardiotoxin on  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ ATPase of the erythrocyte and sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Intern.* 6:581-591, (1983).

**38-** Gambert, S.R., Ingbar, S.H., Hagen, T.C.: Interaction of age and thyroid hormone status on  $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase in rat renal cortex and liver. *Endocrinology* 108:27-30, (1981).

**39-** Gambert, S.R., Duthie, E.H.: Effect of age on red cell membrane, sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase ( $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase) activity in healthy men. *J. Gerontol.* 38:23-25, (1983).

**40-** Gattegno, L., Fabia, F., Bladier, D., Cornillot, P.: Physiological ageing of red blood cells and changes in membrane carbohydrates. *Bio-medicine* 30: 194-199, (1979).

**41-** Ginsberg, B.H., Jabour, J., Spector, A.A.: Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells. *Biochim. Biophys. Acta* 690:157-164, (1982).

**42-** Gless, -K-H., Sütterlin, U., Schaz, K., Schütz, V., Hunstein, W.: Intracellular sodium concentration and transport in red cells in essential hypertension, hyperthyroidism, pregnancy and hypokalemia. *Clin. Physiol. Biochem.* 4:199-209, (1986).

**43-** Gronda, C., Rossi, J.P.F.C., Cedola, N.V., Gagliardino, J.J.: Decreased  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity in erythrocyte membranes from diabetic patients. *IRCS Med. Sci.* 14:476, (1986).

**44-** Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W.: Telomeras shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460, (1990).

**45-** Harman, D.: Free radical theory of aging *Mutation. Res.* 275:257-266, (1992).

**46-** Hassager, C., Gotfredsea, J. J., Christiansen, C.: Prediction of body composition by age, height, weight and skinfold thickness in normal adults. *Metabolism* 35:1081-1084, (1986).

**47-** Hegner, D., Platt, D., Heckers, H., Schloeder, U., Breuninger, V.: Age-dependent physiochemical and biochemical studies of human red cell membranes. *Mech. Ageing. Dev.* 10:117-130, (1979).

**48-** Hegner, D.: Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. *Mech. Ageing Dev.* 14:101-118, (1980).

**49-** Hennesy, J.F.: Vascular Tissue Na, K-ATPase activity and aging in the F 344 rat. *Mech. Ageing Dev.* 43:153-159, (1988).

**50-** Hespel, P., Lijnen, P., Fiocchi, R., Van Oppens, S., Vanden, Eynde, E., Amery, A.: Erythrocyte cation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump activity in athletes and sedentary subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 55:24-29, (1986).

**51-** Hocman, G.: Biochemistry of ageing. *Int. J. Biochem.* 10:867-876, (1979).

**52-** Hokin-Neaverson, M., Spiegel, D.A., Burckhardt, W.A., Jefferson, J.W.: Age and sex differences of erythrocyte sodium pump activity in normal human subjects. *Clin. Chim. Acta* 76:399-401, (1977).

**53-** Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T., Takino, T.: Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging. *Clin. Chim. Acta* 159:73-76, (1986).

**54-** Jinna, R.R., Uzodinma, J.E., Desaiyah, D.: Age-related changes in rat brain ATPase during treatment with chlordecone. *J. Toxicol Environ Health* 27:199-208, (1989).

**55-** Kadlubowski, M., Agutter, P.S.: Changes in the activities of some membrane-associated enzymes during in vivo ageing of the normal human erythrocyte. *Br.J. Haematol.* 37:111-125, (1977).



**56-** Kamber, E., Poyiagi, A., Deliconstantinos, G.: Modifications in the activities of membrane-bound enzymes during in vivo ageing of human and rabbit erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B:95-99, (1984).

**57-** Kay, M.M.B.: Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature* 289:491-494, (1981).

**58-** Kennedy, R., Akera, T., Katona, Y.: Aging: effects of (Na,K) ATPase activity and ouabain binding sites in rats brain. *J.Gerontol.* 4:401-408, (1985).

**59-** Kirkland, J.L.: The Biochemistry of mammalian senescence. *Clin. Biochem.* 25:61-75, (1992).

**60-** Klimes, I., Nagulesparan, M., Unger, R.H., Aronoff, S.L., Mott, D.M.: Reduced Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity in intact red cells and isolated membranes from obese man. *J.Clin. Endocrinol Metab.* 54:721-724, (1982).

**61-** Kojima, S., Kawano, Y., Abe, H., Sanai, T., Yoshida, K., Imanishi, M., Ashida, T., Kimura, G., Yoshimi, H., Matsuoka, H., Omae, T.: Acute effects of alcohol injection on blood pressure and erythrocyte sodium concentration. *J.Hypertension* 11:185-190, (1993).

**62-** Kyte, J.E.: Physiological consequences of the cellular distribution of sodium-plus-potassium ion dependent adenosine triphosphatase. *Biochim. Soc. Trans.* 6:833-836, (1978).

**63-** La Manna, J.C., Doull, G., Mc Cracken, K., Harik, S.I.: (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) - ATPase activity and ouabain-binding sites in the cerebral cortex of young and aged Fischer 344 rats. *Gerontol* 29: 242-247, (1983).

**64-** Lajeunesse, D., Carriere, B., Giocondi, M.C., Grimellec, L.: Modification of physicochemical properties of rat kidney brush border membrane upon ageing. *Kidney Intern.* 25:306, (1984).

**65-** Lasker, N., Hopp, L., Grossman, S., Bamforth, R., Aviv, A.: Race

---

and sex differences in erythrocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. *J.Clin. Invest.* 75:1813-1820, (1985).

**66-** Lin, S.H., Wallace, M.A., Fain, J.N.: Regulation of Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>ATPase activity in hepatocyte plasma membranes by vasopressin and phenylephrine. *Endocrinology* 113:2268-2275, (1983).

**67-** Lindsay, R., Cosman, F., Herrington, B.S., Himmelstein, S.: Bone mass and body composition in normal women. *J.Bone Miner Res.* 7:55-63, (1992).

**68-** Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193:265-275, (1951).

**69-** Martin, L.F., Dean, W.L., Flint, L.M.Jr., Suarez, C.P., Ratliffe, D.J., Fry, D.E.: Erythrocyte sodium-potassium-stimulated adenosine triphosphatase activity is not related to obesity. *J.Surg Res.* 34:473-478, (1983).

**70-** Mas-Oliva, J.: Regulation of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase activity and calcium transport in reconstituted cardiac sarcolemmal vesicles. Effect of sodium and potassium. *Cell Calcium* 3:113-129, (1982).

**71-** Masoro, E.J.: *Biology of Disease. Biology of Aging. Facts, Thoughts and Experimental Approaches.* *Lab. Invest* 65:500-510, (1991).

**72-** Massie, H.R., Aiello, V.R., De Wolfe, L.K.: Calcium and Calmodulin changes with ageing in C57BL/6J Mice. *Gerontology* 35:100-105, (1989).

**73-** Miilunpalo, S., Saarinen, R., Marniemi, J.: Red cell sodium-potassium pump and sodium-lithium countertransport in human obesity. Reevaluation of the methods and association in a Finnish population. *Intern J.Obesity* 9:313-321, (1985).

**74-** Moake, J.L., Ahmed, K., Bachur, N.R., Gutfreund, D.R.: Mg-dependent,

---

(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) stimulated ATPase of human platelets. *Biochem. Biophys. Acta* 211:337, (1970).

**75-** Nagaki, J., Teraoka, M.: Age and sex differences of sodium and potassium concentration in red blood cells. *Clin. Chim. Acta* 66:453-455, (1976).

**76-** Nassi, P., Nediani, C., Liguri, G., Taddei, N., Ruggiero, M., Ramponi, G.: Effect of acylphosphatase on human erythrocyte membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 168:651-658, (1990).

**77-** Naylor, G.J.: The relationship between age and sodium metabolism in human erythrocytes. *Gerontologia* 16:217-222, (1970).

**78-** Naylor, G.J., Dick, D.A.T., Worrall, E.P., Dick, E.G., Dick, P., Boardman, L.: Changes in the erythrocyte sodium pump with age. *Gerontology* 23:256-261, (1977).

**79-** Nelson, D., Hennington, N.C.: Erythrocyte contents of electrolytes (Na, K, Mg, Zn) in healthy male controls and offspring to established hypertensive patients: a follow-up study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43:317-322, (1983).

**80-** Nokubo, M.: Physical, chemical and biochemical differences in liver plasma membranes in aging F 344 rats. *J. Gerontol* 4:409-414, (1985).

**81-** Paci, A., Cocci, F., Cristofani, R., Balzan, S., Mezzasalma, L., Piras, F., Giachetti, M., Ghione, S.: Comparison of intra erythrocyte and intraleucocyte sodium content and erythrocyte fragility in normotensive subjects. *J. Nuclear Med. and Allied Sci.* 32:101-105, (1988).

**82-** Pasquali, R., Strocchi, E., Malini, P., Casimirri, F., Mechionda, N., Ambrosioni, E., Labo, G.: Heterogeneity of the erythrocyte Na-K-pump status in human obesity. *Metabolism* 34:802-807, (1985).

**83-** Platt, D., Schoch, P.: Effect of age and cardiac glycosides on

---

the activity of adenosine triphosphatase (ATPase) (EC. 3.6.1.3) of red cell ghost membranes. *Mech. Ageing Dev.* 3:245-252, (1974).

**84-** Poehlman, E.T., Toth, M.J., Webb, G.D.: Sodium-potassium pump activity contributes to the age-related decline in resting metabolic rate. *J. Clin. Endocrinal Metab* 76:1054-1057, (1993).

**85-** Rahman, M., Koh, H., Primera, M.I., Del Greco, F., Quintanilla, A.P.: Na-K-Adenosine triphosphatase and cation content in the erythrocyte in essential hypertension. *J.Lab.Clin.Med.* 107:337-341, (1986).

**86-** Rauen, H.M., Kuhn, R.: *Biochemisches Taschenbuch*. Springer Verlag Berlin, Göttingen. Heidelberg 649-654, (1956).

**87-** Ray, J.E., Ray, E.K., Baskin, S.I.: Effects of age on lipids and sensitivity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase to ouabain in rat spinal cord. *Age* 6:58-61, (1983).

**88-** Rega, A.F.: The Ca<sup>2+</sup> homeostasis: In Rega, A.F., Garrahan, P.J. eds. *The Ca<sup>2+</sup> pump of plasma membranes*. Boca Raton CRC Press s.13-20, (1986).

**89-** Rossier, B.C., Geering, K., Kraehenbuhl, J.P.: Regulation of the sodium pump: How and why? *TIBS* 12:483-7, (1987).

**90-** Roth, G.J., Siok, C.J.: Acetylation of the NH<sub>2</sub>-terminal serine of prostaglandin synthetase by the aspirin. *J.Biol.Chem.* 253:3782-3784, (1978).

**91-** Rottem, S., Cirillo, V.P., De Kruff, B., Shinitzky, M., Razin, S.: Cholesterol in mycoplasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 323:509-519, (1973).

**92-** Rygielski, D., Reddi, A., Kuriyama, S., Lasker, N., Aviv, A.: Erythrocyte ghost Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and blood pressure. *Hypertension* 10:259-266, (1987).

---

**93-** Samaja, M., Rubinacci, A., Motterlini, R., De Ponti, A., Portinaro, N.: Red cell aging and active calcium transport. *Exp. Gerontol.* 25:279-286, (1990).

**94-** Schanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L.: Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science* 206: 700-702, (1979).

**95-** Schmalzing, G., Pfaff, E., Breyer-Pfaff, U.: Red cell ouabain binding sites, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and intracellular Na<sup>+</sup> as individual characteristics. *Life Sci.* 29:371-381, (1981).

**96-** Schneider, E.L.: Theories of aging: a perspective in: M.R. Warner, R.N., Butler., R.L., Sprott and E.Schneider (Eds) *Modern Biologic Theories of Aging*, Raven Press, New York N.Y. pp: 1-4, (1987).

**97-** Schroeder, F., Goetz, I., Roberts, E.: Age-related alterations in cultured human fibroblast membrane structure and function. *Mech. Ageing Dev.* 25:365-389, (1984).

**98-** Schulte, B.A., Schmiedt, R.A.: Lateral wall Na-K-ATPase and endocochlear potentials decline with age in quietreared gerbils. *Hearing Res.* 61:35-46, (1992).

**99-** Seidler, N.W., Swislocki, N.I.: Ca<sup>2+</sup> transport activities of inside-out vesicles prepared from density-separated erythrocytes from rat and human. *Molec. Cell Biochem.* 105:159-169, (1991).

**100-** Shull, G.E., Schwartz, A., Lingrell, J.B.: Amino acid sequence of the catalytic subunit of the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* 316:691-695, (1985).

**101-** Shull, G.E., Lane, L.K., Lingrell, J.B.: Amino acid sequence of the beta sub-unit of the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase deduced from a cDNA. *Nature (London)* 321:429-431, (1986).

---

**102-** Siebers, R.W.L., Maling, T.J.B.: Flame photometry: a simple method and reference range for erythrocyte sodium and potassium. *Med. Lab. Sci.* 45:270-272, (1988).

**103-** Simat, B.M., Mayrand, R.R., From, A.H.L., Morley, J.E., Billington, C., Fullerton, D.S., Ahmed, K.: Is the erythrocyte sodium pump altered in human obesity? *J.Clin.Endocrinol. Metab.* 56:925-929, (1983).

**104-** Simat, B.M., Morley, J.E., From, A.H.L., Briggs, J.E., Kaiser, F.E., Levine, A.S., Ahmed, K.: Variables affecting measurement of human red cell  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity: technical factors feeding, aging. *Am.J.Clin. Nutr.* 40:339-345, (1984).

**105-** Singer, S., Nicolson, G.L.: The fluid-mosaic model of structure of cell membranes. *Science* 175:720-731, (1972).

**106-** Skou, J.C.: The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta* 23:394-401, (1957).

**107-** Skou, J.C.: Enzymatic basis of active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45:596-617, (1965).

**108-** Skou, J.C.: Overview. The Na. K-pump. *Methods in Enzymology* Vol.156, s.1-25 Academic Press Inc. (1988).

**109-** Stahl, W.L.: Role of phospholipids in the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -stimulated adenosine triphosphatase system of brain microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 154:56-67, (1973).

**110-** Stefenelli, N., Klotz, H., Engel, A., Bauer, P.: Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections and chronic liver diseases *J.Cancer Res. Clin. Oncol* 109:55-59, (1985).

**111-** Steiner, M., Vancura, S.: Asymmetrical loss of sialic acid from membrane glycoproteins during platelet aging. *Thrombosis Res.* 40:465-471, (1985).

---

**112-** Stekhoven, F.S., Bonting, S.L.: Transport adenosine triphosphotases: properties and functions. *Physiol Rev.*61:1-76, (1981).

**113-** Stibler, H., Sydow, O.: The sialic acid and galactose concentrations in erythrocyte membranes in patients with myotonic dystrophy, limb-girdle and facioscapulohumeral dystrophy. *J.Neurological Sci.* 59: 389-399, (1983).

**114-** Sydow, G.: A simplified quick metod for determination of sialic acid in serum. *Biomed. Biochim. Acta* 44:1721-1723, (1985).

**115-** Sydow, O.: Sialic acid concentration in erythrocyte membrane subfractions in patients with myotonic dystrophy and healthy controls. *Clin. Chim.Acta* 172:57-64, (1988).

**116-** Tauc, L., Hinzen, D.: Neuraminidase-Its Effect on synaptic transmission. *Brain Res.* 80:340-344, (1974).

**117-** Taussky, H.H., Shorr, E.: A micro colorimetric method for determination of inorganic phosphorus *J.Biol.Chem.* 202:675-685, (1953).

**118-** Terayama, K., Muratsugu, M.: Effects of lead on sialic acid content and survival of rat erythrocytes. *Toxicology* 53:269-276, (1988).

**119-** Thor, H., Hartzell, P., Orrenius, S.: Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated calcium. *J.Biol.Chem.* 259:6612-6615, (1984).

**120-** Tosco, M., Orsenigo, M.N., Zoppi, S., Faelli, A.: Aging and ATPase activities in rat jejenum. *Mech.Ageing Dev.*56:265-274, (1990).

**121-** Touyz, R., Milne, F.J., Reinach, S.G.: Platalet and erythrocyte  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  and cell membrane adenosine triphosphatase activity in essential hypertension in blacks *J.Hypertension* 10:571-578, (1992).

**122-** Tozzi-Ciancarelli, M.G., Fedele, F., Tozzi, E., Di Massimo, C.,

---

Oratore, A., De Matteis, G., D'Alfonso, A., Troiani-Sevi, E., Gallo, P., Prencipe, M.: Age-dependent changes in human erythrocyte properties. Clin. Hemorheology 9:999-1007, (1989).

**123-** Tsuchiya, Y., Sugita, H., Kuroiwa, Y.: Myotonic dystrophy: Fragility of Band 3 Membrane Protein upon resealing of erythrocyte ghosts and the normality of ATPase activity, sialic acid content and spectrin extractability of ghosts. Biochem. Med. 30:271-279, (1983).

**124-** Vijg, J.: Searching for the molecular basis of aging; the need for life extension models. Aging 2:227-229, (1990).

**125-** Wahnou, R., Mokady, S., Cogan, U.: Age and membrane fluidity Mech. ageing Dev. 50:249-255, (1989).

**126-** Walford, R.L.: The immunologic theory of aging. Munks gaard, Copenhagen, (1969).

**127-** Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J.Biol.Chem. 234:1971-1975, (1959).

**128-** Wood, L., Beutler, E.: Temperature dependence of sodium potassium activated erythrocyte adenosine triphosphatase. J.Lab.Clin.Med. 70:288-294, (1967).

**129-** Yamakawa, T., Nagai, Y.: Glycolipids at the cell surface and their biological functions. Trends Biochem. Sci. 3:128-131, (1978).

**130-** Yamauchi, M., Woodley, D.T., Mechanie, G.L.: Aging and cross-linking of skin collagen, Biochem. Biophys Res. Commun 152:898-903, (1988).

**131-** Yechiel, E., Barenholz, Y., Henis, Y.O.: Lateral mobility and organization of phospholipids and proteins in rat myocyte membranes: effects of ageing and manuplation of lipid composition. J.Biol.Chem. 260: 9132-9136, (1985).