

20745

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

İNSAN ERİTROSİT GLUKOZ TAŞIYICISINA LİPİTLERİN ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

UGUR ÖNCEL

Danışman

Doç.Dr.NESRİN ÖZER

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İSTANBUL - 1992

T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Doktora tez çalışmalarım sırasında
gösterdiği yakın ilgi ve değerli
katkılarından dolayı danışmanım
Doç. Dr. Nesrin Özer 'e,

Doktora eğitimim sırasındaengin
bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım
ve bizlere böyle güzel ve donanımlı
çalışma ortamını sağlayan değerli hocam,

Ana Bilim Dalı Başkanımız

Prof. Dr. Kaya EMERK

Prof. Dr Yavuz TAGA

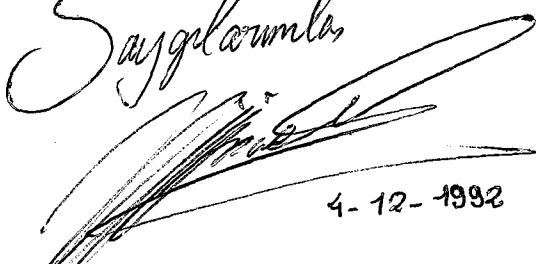
Doç. Dr. Süha YALÇIN 'a

Elektron mikroskop çalışmalarımda değerli
katkı ve yardımları için

Prof Dr. Türkan ERBENGI 'ye

ve sahsında tüm elektron mikroskobisi
ünitesi çalışanlarına,

ve tüm çalışma arkadaşlarıma en içten
teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

4-12-1992

I C I N D E K I L E R

BÖLÜM I.		<u>Sayfa No:</u>
GİRİŞ ve AMAC	1
BÖLÜM II.		
GENEL BİLGİLER		
II. 1. ERİTROSİT ZAR YAPISI	3
II. 2. ERİTROSİT GLUKOZ TAŞINIMI ve TAŞIYICISININ ÖZELLİKLERİ	11
II. 3. ERİTROSİT HÜCRE ZARINA LİPİTLERİN ETKİSİ...	19
BÖLÜM III.		
GEREC ve YÖNTEMLER		
III. 1. MADDELER	23
III. 2. ALETLER	23
III. 3. ÇALIŞMA MATERYALI	24
III. 4. YÖNTEMLER	25
4. 1. Serum lipit değerlerinin ölçülmesi için kullanılan yöntemler.....	25
4. 2. Eritrositlerin deney için hazırlanması.	25
4. 3. Kolesterolce zengin lipit dispersiyonunun hazırlanması ve eritrositlerin inkübe edilmesi.....	25

4. 4. Eritrositlerde glukoz taşınımının ölçülmesi	26
4. 5. Eritrositlerde hemoglobin ölçülmesi..	28
4. 6. Defibrotid uygulaması	28
4. 7. Taramalı elektron mikroskobu ile eritrosit morfolojisinde görülen bozuklukların incelenmesi.....	28
4. 8. İstatistik analizler	30

BÖLÜM IV.

BULGULAR

IV. 1. KOLESTEROLCE ZENGİN LİPİT DISPERSİYONU İLE İLGİLİ SONUÇLAR	31
IV. 2. KONTROL ve HASTA GRUPLARININ ERİTROSİT GLUKOZ TAŞIYICISININ KİNETİK PARAMETRELERİ..	36
IV. 3. KONTROL ve HASTA GRUPLARI ERİTROSİTLERİNİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ	42
IV. 4. ATEROSKLEROTİK HASTALARA DEFİBROTİD UYGULANMASI İLE ERİTROSİT GLUKOZ TAŞINIM KİNETİĞİ	44

BÖLÜM V.

TARTIŞMA	48
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58

BÖLÜM I.

G I R I S ve A M A Ç

Hiperlipidemi, ateroskleroz için önemli risk faktörlerinden biridir. Çünkü ateroskleroz sırasında plazma lipoproteininin, trombositlerin, karaciğer hücreleri ve endotel hücre zarlarının kolesterol / fosfolipit oranları artmaktadır. Kolesterol ve fosfolipitler plazma ve hücreler arasında değiş tokuş edilmektedirler . Eritrositlerin kolesterol ve fosfolipitlerini sentezleyecek organelleri olmadığı için bu durum özellikle eritrositler için çok önemlidir. Bu etkileşim zarın normal yapısını bozmakta, morfolojik, enzimatik ve taşıyıcı özelliklerini etkileyebilmektedir. Hiperlipidemik hastaların serum kolesterol, trigliserit düzeyindeki artışların eritrosit zar yapısını etkileyeceğini düşündüğümüzden bu hastaların eritrositlerini morfolojik olarak incelemeyi ve glukoz taşıyıcısı aktivitesini değerlendirmeyi amaçladık. Bu nedenle araştırmanın birinci bölümünde kolesterolce zengin ortamda inkübe edilen normal eritrositlerin hücre morfolojisinde ve glukoz taşıma aktivitesinde bir değişiklik olup olmadığının araştırılması planlandı.

ikinci bölümde ise hiperlipidemik ve aterosklerotik hastaların eritrosit glukoz taşıyıcısının kinetik parametrelerinin tayin edilmesi, bu grupların eritrositlerinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi ve sonuçların kontroller ile karşılaştırılması düşünüldü.

Defibrotid antitrombotik ve profibrinolitik etkisi olan akut ve letal miyokardiyal iskemide kardiyoprotektif etkisi olan bir ilaştır. Bu ilacın eritrositlerde 2,3 difosfogliserat miktarını arttırdığı ve böylece hemoglobinden oksijen salınımını hızlandırarak doku oksijenizasyonunu kolaylaştırdığı öne sürülmüştür. Bu çalışmada aterosklerotik hastalara defibrotid uygulamasının eritrosit glukoz taşınımına bir etkisi olup olmadığının da incelenmesi planlandı.

B Ö L Ü M II.

GENEL B İ L G İ L E R

II. 1. ERİTROSİT ZAR YAPISI :

Yarı ömürleri yaklaşık 120 gün olan ve bu süre içinde 10 milyon kalp atışı ile dolasıma pompalanan eritrositlerin bikonkav yapısı zar bileşenleri ile korunmaktadır. Eritrosit zar yapısı, diğer hücrelerde olduğu gibi lipit ve proteinlerden oluşan mozaik yapı görünümündedir. % 49 protein, % 43 lipit ve % 8 karbohidrat içermektedir (1).

ERİTROSİT ZARINDA BULUNAN PROTEİNLER :

Proteinler bu yapıda iki şekilde yerleşirler. Integral proteinler tamamen zar içine gömülmüş olanlarıdır. Diğerleri ise zarın iç veya dış yüzüne yerleşmiş olan periferel proteinlerdir. Eritrosit zarında bulunan proteinler Tablo 1'de bazı özellikleri ile verilmiştir. Sekil 2'de bu proteinlerin zar da yerleşimi ve birbirleri ile etkileşimleri gösterilmiştir (2).

Sekil 1'de eritrosit zar proteinlerinden gel elektroforizinde elde edilen bantlar, Sekil 2'de

Tablo 1. İnsan eritrosit zar proteinleri (Kaynak 3'den alınmıştır).

Bant* numarası	Proteinin adı	Molekül ağırlığı	Rolü
A. Periferel proteinler			
1	Alfa-spektrin	260.000	Zar iskeleti
2	Beta-spektrin	225.000	Zar iskeleti
2.1	Ankyrin	215.000	Bant 3 ile zar iskeletine bağlanır.
4.1	-	78.000	Spektrin ile bağ yapar.
4.2	-	72.000	?
4.9	-	45.000	?
5	Aktin	43.000	Spektrin ile bağ yapar.
	Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz	35.000	Glikolitik enzim
7	-	29.000	?
8	-	23.000	?
B. Integral proteinler			
3	-	89.000	Anyon kanalı
4.5	-	55.000	Glukoz taşıyıcı
	Glikoforin A	31.000	Hücre tanınması
	B	23.000	
	C	29.000	

* Eritrosit zar proteinlerinden jel elektroforezinde elde edilen bantlar.

Periferal proteinler :

Spektrin

Zarın protein ağırlığının % 30'unu oluşturan ve hücrenin bikonkav yapısının korunmasını sağlayan en önemli proteindir. 260.000 ve 225.000 dalton molekül ağırlıklarında alfa ve beta altbirimlerinden oluşmuş fibröz bir proteindir (2,4). Hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzünde bulunan bu protein bant 4.1 proteini aracılığı ile diğer bir periferal protein olan aktin'e bağlanır . Bu üçlü yapıya diğer bazı eritrosit proteinlerinin de bağlandığı görülmüştür. Tropomiyosin, bant 4.9 proteini, kalmodulin ve addüsin ile oluşturduğu kompleksin eritrositlerin normal bikonkav ve diskoit yapısını düzenlediği öne sürülmüştür (5-7).

Ankyrin :

215.000 dalton molekül ağırlığında monomer yapıda bir fosfoproteindir. Fosforile kısım spektrin ile bağlanmanın olduğu bölgeye çok yakındır. Ankyrin, spektrin'in bant 3 proteine bağlanmasını sağlar (8,9).

Aktin :

43.000 dalton molekül ağırlığında 12-17 üniteden oluşmuş oligomerik bir yapıya sahip periferai proteindir. Hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzünde bulunan bu protein elektroforezde bant 5 olarak görülmektedir. Spektrin ile birlikte oluşturduğu yapı hücreye esneklik ve deforme olabilme özelliğini kazandır (4,10).

Bant 4.1 Proteini :

78.000 ve 80.000 dalton molekül ağırlığında iki polipeptitten oluşmuştur. Solüsyonda monomer halinde bulunur. Bant 4.1 proteini spektrin'e aktin ile aynı yerde tetramerlerin ucuna bağlanır (9,11).

Tropomiyosin :

27.000 ve 29.000 dalton molekül ağırlıklarında iki alt birime sahip dimer halinde bulunur. Bir tropomiyosin dimeri, 6-7 aktin monomerine bağlanır. Eritrosit yapısındaki fonksiyonu, aktin filamentlerini stabilize etmek ve aktinin spektrin'e bağlanmasını regüle etmektir (9,12).

Miyosin :

210.000 dalton molekül ağırlığında ağır zincir, 19.000 ve 25.000 molekül ağırlıklarında iki tane hafif zincirden oluşmuş bir yapıya sahiptir. Kalsiyum tarafından stimüle edilen düz kas miyosin ATPaz aktivitesi gösterir (13).

Integral proteinler :

Bant 3 Proteini :

93.000 dalton molekül ağırlığında olan dimerik bir proteindir. Zarın sitoplazmik yüzünden diğer yüzüne kadar uzanır. Anyon taşıyıcısı olan bu protein ankyrin'e bağlanır. Bu proteinin sitoplazmaya doğru olan uzantısına hemoglobin, bazı glikolitik enzimler, bant 4.1 proteini ve 4.2 proteini bağlanır (3,11).

Glikoforinler :

Glikoforinler 23.000, 29.000 ve 31.000 molekül ağırlıklarına sahip glikoproteinlerdir (Glikoforin A, B ve C). % 60 karbohidrat içerirler. Bunlar serin, treonin ve asparajine bağlanır. Yaklaşık 131 amino asit içeren ve zarın bir yüzünden diğer yüzüne uzanabilen bu proteinlerin 23 amino asitlik kısmı alfa heliks yapı ile zarın içine gömülmüştür. Glikoforinlerin bazı oligosakkaritleri M ve N grubu antijenlerdir (11,12).

Bant 4.5 Proteini :

55.000 dalton molekül ağırlığında ve glukoz taşınımından sorumlu bir proteindir (3,4,10).

ERİTROSİT ZARINDA BULUNAN LİPİTLER :

Eritrosit zarındaki total lipitlerin % 95'ini fosfolipitler ve esterleşmemiş kolesterol oluşturur. Az miktarda glikolipit, gliserit ve serbest yağ asiti bulunmaktadır. Molar olarak düşünüldüğünde fosfolipit ve kolesterol miktarları birbirine yakın değerlerdedir. İnsan eritrosit zarlarında bulunan fosfolipitlerin %30'u fosfatidil kolin, % 20'si fosfatidil etanolamin, % 14'ü fosfatidil serin ve % 25 'i sfingomiyelindir. Geri kalan % 15'ini de fosfatidil inositol ve fosfatidik asit oluşturmaktadır (1,13-15). Lipitlerin zarın iç ve dış yüzlerindeki yerleşimleri simetrik değildir. Fosfatidil kolin ve sfingomiyelin'in büyük bir kısmı plazma'ya bakan zarın dış yüzeyinde bulunurlarken, fosfatidil etanolamin ve fosfatidil serin'lerin büyük miktarı zarın hücre içine bakan yüzünde bulunurlar (1,2,15). Olgun eritrositlerde yağ asiti, kolesterol sentezi yapılamaz. Buna rağmen eritrosit lipitlerini dolasındaki hayatı süresinde devamlı yenileyebilen ve lipit moleküllerinin girişine imkan veren mekanizmalara sahiptir (2,3).

Eritrosit kolesterolu esterlesmemis plazma kolesterolu ile zar fosfolipitlerinin bir kısmı da plazma fosfolipitleri ile değiş tokuş edilirler. Sfingomiyelin zarda çok sıkı bir şekilde bağlanmış durumda olduğu için plazma sfingomiyelini ile çok az bir değişime uğrar (13,15).

II. 2. ERİTROSİT ZARINDAN GLUKOZ TAŞINIMI :

Glukoz, eritrositlerin metabolik enerji için ihtiyaç duydukları en önemli bileşiktir. Bu molekülü yıkıp ATP elde edilmesini sağlayacak enzimler, eritrosit içinde sınırlı miktardadır. Hemapoetik ortamdan, dolaşıma girerken çekirdeğini kaybeden bu hücre aynı zamanda 1,2 gün içinde ribonükleik asitlerini de yitirmekte ve sınırlı bir enzim miktarına sahip olarak 120 günlük hayatını devam ettirmektedir (3,14). Hücre içine giren glukoz molekülleri, anaerobik glukoz ile piruvat ve laktik aside katabolize olmakta ve ATP elde edilmektedir. Hekzoz monofosfat yolu ise glukozun bu hücrelerde bir diğer kullanım şeklidir. Ancak bu yol glukoz metabolizmasının eritrosit için % 10 kadarını oluşturmaktadır (4,16). Bu yol ile eritrositler NADPH elde ederler ve bu molekül glutatyonu redükleyerek hidrojen peroksidin toksik etkisini gidermektedir. Eritrositlerin enerji ihtiyaçları en basta yapısal özelliklerini korumak için gerekmektedir. Fonksiyonel aktiviteleri için enerjiye ihtiyaç duymazlar. Glikoliz sonucunda oluşan ATP molekülleri, eritrositlerde iyonik pompaların kullanılması için gerekmektedir (2,4,16,17).

Üretilen ATP moleküllerinde bir azalma olduğunda, iyon pompaları işleyemeyecek ve bu da potasyumun hücre dışına sızmasına neden olacaktır. Bunun sonucunda, eritrosit yapısında bozulmalar olabilecektir (16-18).

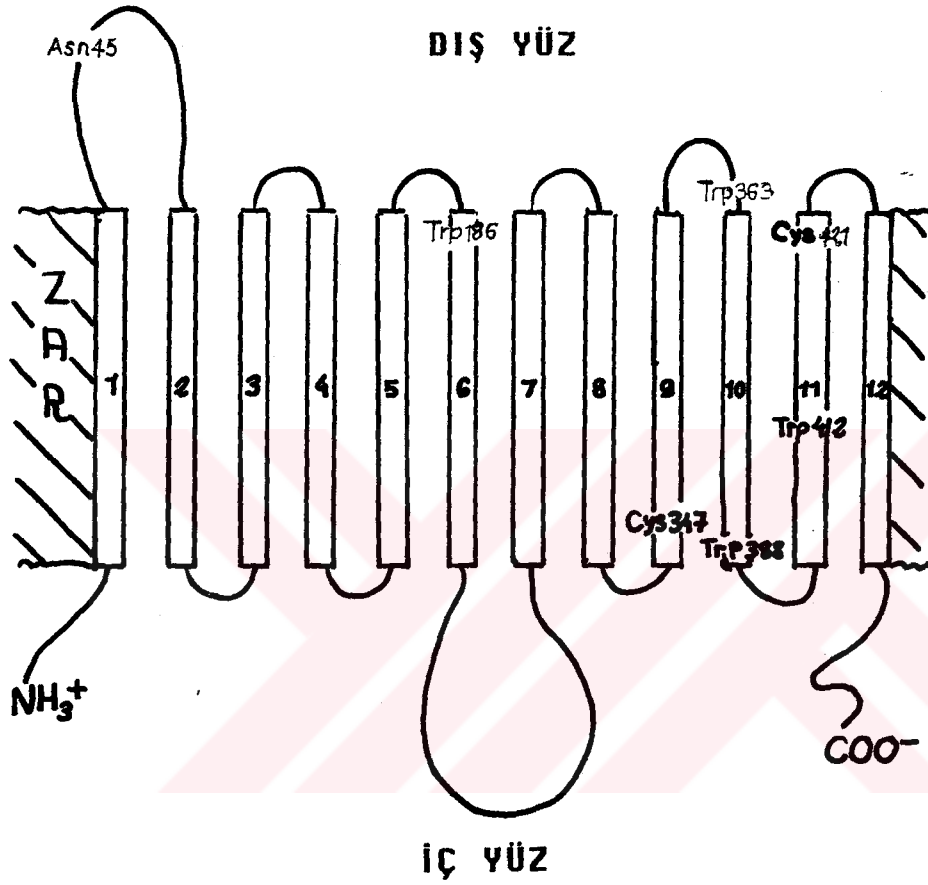
ERİTROSİT GLUKOZ TAŞIYICISI :

Memeli hücrelerinin zarlarında glukozun kolaylaştırılmış diffüzyon sistemi ile taşınımı yapı olarak birbirlerine benzeyen bir protein ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Kısaca GLUT olarak isimlendirilen hidrofilik ve hidrofobik bölgeler içeren bu proteinler buldukları dokulara göre 5 gruba ayrılabilirler (19,20). Tablo 2 'de memeli dokularından izole edilmiş kolaylaştırılmış diffüzyonla glukoz taşıyan proteinler görülmektedir. Eritrositlerden izole edilen glukoz taşıyıcı protein tipi GLUT 1'dir. GLUT 1, insan eritrosit zarlarında bulunur. Zarın bir yüzünden diğer yüzüne uzanan bu protein 492 aminoasit içerir, 55.000 molekül ağırlığına sahiptir ve ve SDS jel elektroforezinde bant 4.5 olarak görülür (19-21). Zar içinde 12 kez uzanan alfa heliks yapılardan oluşmuştur (Şekil 3).

Proteinin amino ve karboksil ucu zarın hücre sitoplazmasına doğru yerleşmiştir. Zar içine yerleşen alfa helikslerden 1. ve 2. si 33 amino asitlik dışa doğru uzanan bir polipeptit ile birbirlerine bağlanmıştır ve bu kısım karbohidrat içerir. 6. ve 7. alfa heliksler ise 65 amino asitlik oldukça hidrofilik bir kısım ile bağlanmıştır (19,20).

Tablo: 2 - Memeli dokularından izole edilen glukoz taşıyıcıları (Kaynak 20'den alınmıştır).

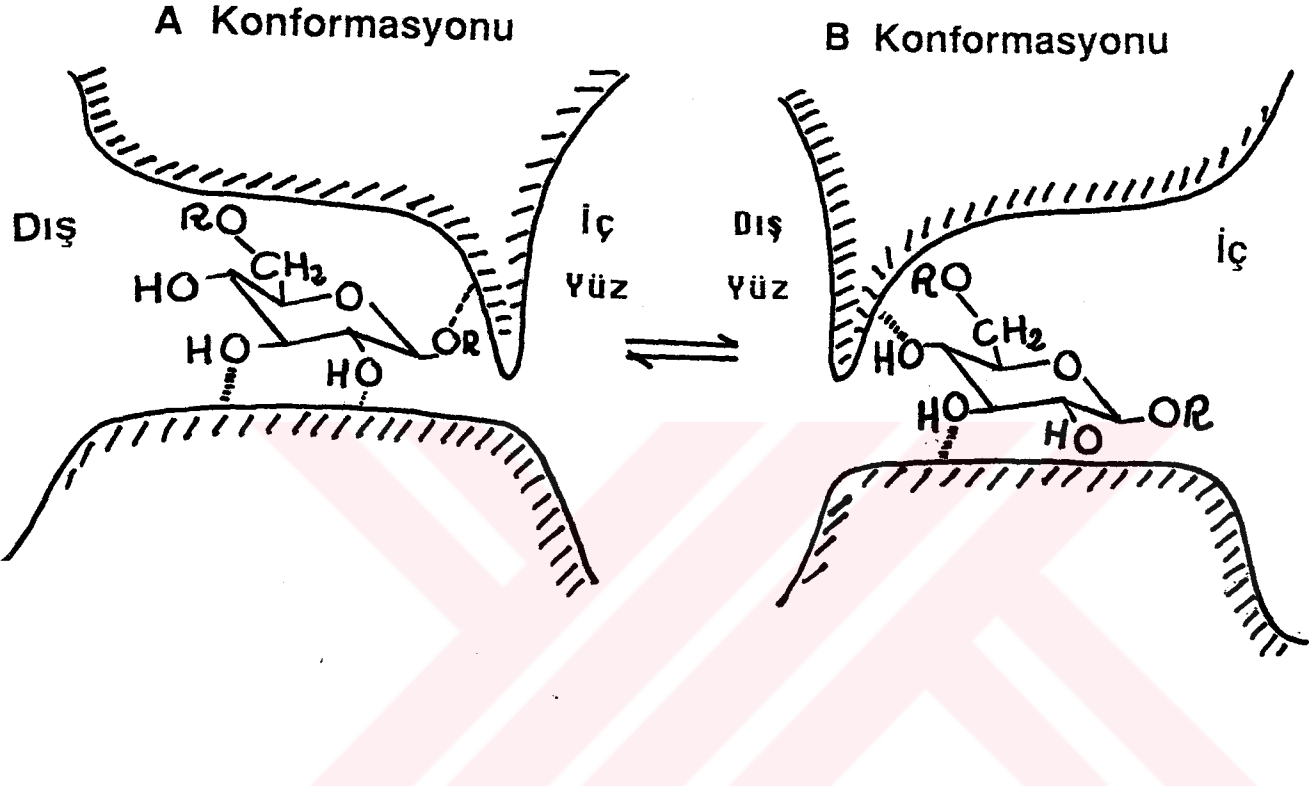
Adlandırma	Buldukları Dokular	Düzenleyici Faktörler
GLUT 1	Eritrosit, kan beyin engeli, plasenta	Açlık, insülin egzersiz.
GLUT 2	Karaciğer, pankreas beta hücreleri, böbrek, barsak.	Açlık.
GLUT 3	Bütün dokularda, beyin böbrek, plasenta.	Kasların gelişme evreleri.
GLUT 4	Yağ hücreleri, kalp kası.	Insülin, açlık, şişmanlık, egzersiz
GLUT 5	İnce barsak.	?



Sekil 3 . Eritrosit glukoz taşıyıcı proteininin zar
yerleşimi.

Eritrosit zarlarından glukoz taşınımı kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizması ile sodyum konsantrasyonundan ve hormon etkisinden bağımsız olarak yapılır. Enerjiye ihtiyaç duymadan yapılan taşıma işlemi, sadece glukozun konsantrasyon gradientine bağlı olarak gerçekleşir. Eritrositlerde glukoz taşıyıcı protein olan GLUT-1'in yapısı incelendiğinde bu taşımanın zarın her iki yönünde simetrik olarak yapılmadığı görülmüştür. Taşıyıcı proteinin alfa heliks yapısına sahip bazı bölümlerinin su ile dolu kanallar oluşturduğu ortaya çıkmıştır (20,22). Şekil 3'de gördüğümüz 7 ve 8 numaralı heliks bölümler oldukça fazla miktarda serin ve glutamin taşıdıkları için glukozla hidrojen bağı yapmaya uygun görünmektedir. Şeker moleküllerinin su ile etkileşimleri düşünüldüğünde iki kararlı sandalye seklinden biri olan 4C_1 formunun diğerine nazaran daha fazla seçimlilik gösterdiği söylenebilir. Bu tercih, sıvı çözeltide şeker molekülünün stabilitesi ve maksimum hidrojen bağı yapabilme kapasitesi ile yapılır. Özetle su molekülleri ile şeker moleküllerinin 4C_1 konformasyonunda maksimum hidrojen bağı yapabildiğini söyleyebiliriz (20,21,23,24)

Manyetik rezonans çalışmaları, şeker molekülündeki her bir hidroksil grubunun su molekülleri ile en az iki hidrojen bağı yaptığını göstermiştir. Su, zar ve şeker etkileşimlerinde hidrojen bağları şeklindeki zayıf bağlar etkili olmaktadır. Şekerin taşıyıcı proteine hidrojen bağları ile bağlanması sonucu proteinin konformasyonunda değişimler olmaktadır. Bu değişimler şeker molekülünü hücre içine girmesi için yönlendirici unsur olmaktadır. Glukozun taşıyıcı proteinine bağlanmasında etkin olan bir hidroksil grubu var mıdır, sorusuna cevap arayan çalışmalar ise bağlanmadan sorumlu bir OH grubunun olmadığı yönünde netice vermiştir. Yapılan çalışmalarda glukoz molekülünün bütün hidroksil gruplarının taşıyıcıya bağlı durumda olduğu gösterilmiştir. Glukoz molekülü, zar da yerleşik konumda bulunan taşıyıcı proteine yaklaştığında konformasyonel değişiklik sonucunda molekülü C1 ucundan alıp C6 ucundaki hidroksil ile bağladıktan sonra taşıyıcı kapanmakta ve glukoz molekülü su ile dolu kanala geçirilmektedir (Şekil 4). (20-23,25).



Sekil 4 . Eritrositlerde glukoz taşınımının modeli

Beta piranoz yapısı bağlanmayı arttırıcı bir özellik göstermektedir. D-glukozun insan eritrosit zarlarından hücre içine veya dışına doğru geçişlerinde anomerik tercih söz konusudur. Beta D-glukoz, Alfa D-glukoz'a oranla 1.5 kere daha hızlı hücre içine girmektedir (26). Oysa bu iki anomerin hücre içinden dışına çıkışında böyle bir seçim söz konusu değildir. Bu da D-glukozun, eritrosit hücre zarından geçişinin asimetric olduğunu gösteren en önemli bulgudur. D-glukoz ile L-glukozun eritrosit hücre zarından geçişleri farklı hızlarda olmaktadır. D- glukozun C1 konformasyonunda hidroksil grupları ekvatoryal şekilde yerleşmiş durumdadırlar (23,24).

Eritrositlerde kolaylaştırılmış diffüzyonla glüköz taşınımı çeşitli inhibitörlerle yarışmalı olarak inhibe edilmektedir. Bunlardan C-6 veya C-1 alkil grupları içeren şekerler zarın dış veya iç yüzünde glüköz bağlanmasını inhibe ederler. Floretin zarın dış yüzünde inhibisyon yapar (21,26). Sitokalsin B glüköz taşıyıcısının hücre sitoplazmasına bakan yüzüne bağlanarak inhibisyon yapar (20,23).

II. 3. ERİTROSİT HÜCRE ZARINA LİPİTLERİN ETKİSİ :

Kolesterol, ökaryotik hücrelerin zarlarının molar olarak % 42'sini oluşturan en önemli lipit bileşenidir. Bu molekül zar yapısına girerek zarlara stabilite kazandırır . Eritrositlerin şekil değiştirebilme kabiliyetleri, hücre zarının ve hücre içinin akışkanlığına, hücre hacminin hücre yüzey alanına oranına ve zarın fiziksel özelliklerine bağlıdır (27). Eritrosit hücre zarında kolesterol miktarının arttırılması hücrenin direkt olarak bu özelliğinin etkilenmesine neden olmaktadır. Kolesterol etkisi ile azalan zar akışkanlığı eritrositin esneklik özelliğini azaltır (27-29). Eritrositlerin ozmotik fragiliteleri, hücrenin stabilitesini ve dolaşımında bu hücrenin hayatiyetini belirleyen bir unsurdur . Kolesterolce zenginleştirilmiş eritrositlerde hücrelerin fragiliteleri azalmaktadır (29). Taşıyıcı protein ile yapılan " reconstitution " çalışmalarında kolesterol miktarındaki artışın eritrosit glukoz taşınımını yavaşlattığı bulunmuştur (30,31). Kolesterolün

zar morfolojisine etkisi en iyi olarak, ciddi karaciğer hastalarında ve özellikle alkolik siroz vakalarında görülmüştür (32). Bu hastalarda bozuk eritrosit yapısının hemolitik oluşumun sebebi olduğu kesindir. Bu yapı yani akantosit yapısı veya spur hücre yapısının kolesterolce zengin eritrosit zarları nedeni ile oluştuğu deneysel olarak gösterilmiştir (33). Kolesterolden zengin lipoproteinlerin plazmada bol miktarda bulunması, bu hastaların eritrosit zarlarında kolesterol birikmesine neden olmaktadır. Bu hücre tiplerinin ozmotik fragiliteleri azalmaktadır. Yüzey alanı artan bu hücrelerde hacim değişimi olmamakta, bunun sonucunda da hücre zarında kıvrılmalar ve çıkıntılar olmaktadır (34). Eritrosit zarında kolesterol birikmesinin lipid çift tabakasının lateral hareketini engellediği gösterilmiştir (27,34). Fosfatidil kolin, lizofosfatidil kolin, doymuş veya doymamış uzun zincirli yağ asitleri (stearik veya oleik) gibi lipid moleküllerinin eritrosit hücre zarlarına fazla miktarda girmesi ile eritrosit zarı glukoz taşınımı inhibe olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (28,30,31,35). Eritrosit zarı lipid

iceriğinin değışmesi ile zar glukoz taşınımının ne şekilde etkilendiğı hakkındaki bilgiler çoğı zaman kuramsal olarak açıklanabilmektedir. Glukoz taşınım aktivitesindeki azalmanın bir nedeninin hücre zarının asimetric olarak genişlemesi olduğı sanılmaktadır. Fosfatidil kolin veya lizofosfatidil kolin ile yüklenen hücre zarlarında, genişleme zarın plazmaya bakan yüzünde olmaktadır. Bu da eritrositin tırtıklı bir yapı almasına neden olmaktadır (28,35). Deneysel olarak bazı amfipatik bileşenlerin eritrosit ortamına katılması ile bu hücrenin morfolojisindeki değışim gözlendiğinde hücrenin normal diskoit şeklinin bozulduğı belirlenmiştir (28,32). Hücrenin dışarıdan ortama katılan fosfolipitlerle aldığı şekil bu maddelerin taşıdıkları net elektrik yükleri ile belirlenmektedir (36). Nötral veya negatif yüklü fosfolipidler zarın dış yüzüne yerleşmeyi tercih etmektedir. Bunun nedeni zarın hücre içine bakan yüzünde genellikle negatif yüklü fosfolipitlerin bulunmasıdır. Hücre hacmini değıştirmeden hücre zarının plazmaya bakan yüzüne fosfolipitlerin ilavesi, zarın kıvrımlar yaparak tırtıklı bir yapı almasına neden olur (29,32,34,37).

Pozitif elektrik yüküne sahip olan fosfolipitler ise zarın hücre sitoplazmasına bakan yüzüne yerleşmeyi tercih etmekte ve bunun sonucunda hücre stomatosit şeklini almaktadır. Fosfatidil kolin ile yapılan çalışmalarda hücrenin ekinosit yapısına dönüşmesi, fosfatidil serin ile yapılan çalışmalarda ise stomatositik bir yapıya dönüşmesi yukarıda belirtilen oluşumları doğrulamıştır (28,34,36).

BÖLÜM III

G E R E C v e Y Ö N T E M L E R

III. 1. MADDELER :

D-(U-¹⁴C) Glukoz Amersham International İngiltere, Floretin ve Fosfatidil kolin Sigma Chemical Co. USA'dan sağlandı.

Deneylerde kullanılan diğer kimyasal maddeler amaca uygun saflıktadır.

III. 2. ALETLER :

Deneylerde Packard Tricarb 1500 modeli sıvı sintillasyon sayacı (USA), Sorvall Dupont marka ultra santrifüj (USA), Bausch Spectronic 601 spektrofotometre (USA), Bio-Rad Critical Point Draying aleti (France), Bio-Rad SEM Coating System aleti (France), Jeol Taramalı Elektron Mikroskobu (Japan) kullanılmıştır.

III. 3. CALIŞMA MATERYALI :

A. Hasta Grubu : Bu grup, Marmara Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Hemostaz Ünitesine başvuran hiperkolesterolemi (n=10), hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi (n=10) ve ateroskleroz (n=15) tanısı konmuş hastalardan oluşmuştur. Hastaların serum kolesterol değeri 300 mg/dl ve trigliserit düzeyi 250 mg/dl 'nin üzerinde olanları bu gruplara dahil edilmiştir. Ayrıca 10 kişilik bir aterosklerotik hasta grubuna İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Homeostaz Ünitesinde 600 mg Defibrotid damardan uygulandı. Bu hastaların ilaç uygulanmadan ve ilaç uygulanmasından 2 saat sonraki kanlarından ayrılan eritrositlerde glukoz taşınım kinetiği ölçülmüştür.

B. Kontrol Grubu : Bu grubu, Marmara Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına başvuran, normal kan lipit profiline sahip ve şeker metabolizması ile ilgili bir hastalığı olmayan 15 sağlıklı kişi oluşturmuştur.

III. 4. YONTEMLER :

III. 4. 1. Serum lipid değerlerinin ölçülmesi için
kullanılan yöntemler :

Serum kolesterol ve trigliserit tayinleri için enzimatik ticari kitler kullanıldı. Kitler Abbott firmasından temin edildi.

III. 4. 2. Eritrositlerin deney için hazırlanması :

12 saat açlık sonrası heparin üzerine alınan kandan eritrositler, 800 xg de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. 4° C`de fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS, 10 mM, pH= 7.4) ile 1:1 oranında karıştırılarak üç kez yıkandı. En son yıkama aşamasından sonra hematokrit değeri % 10 olacak şekilde eritrositler PBS içinde süspande edildi (38,39).

III. 4. 3. Kolesterolce zengin lipid
dispersiyonlarının hazırlanması ve
eritrositlerin inkübe edilmesi :

20 mg kolesterol , 5 mg fosfatidil kolin tartılıp 1.25 ml, 0.155 M NaCl çözeltisi ile karıştırdı. Kolesterolce zengin bu lipid karışımı 50 Watt'da 30 dakika sonike edildikten sonra 0.675 ml'si alınıp daha

önce 57°C'de 30 dakika inkübe edilmiş serumun 0.25 ml'si ile karıştırıldı. Bu karışım 4°C de 24.000 xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 0.5 ml alındı ve serum elde edilen kişiye ait paket eritrositlerin 0.5 ml'si ile karıştırıldı. Karışım 37°C'lik su banyosunda 60 dakika inkübe edildi. Bu deneyin kontrolü aynı kişiye ait eritrositlerin NaCl içinde 37°C'de 60 dakika inkübe edilmesi suretiyle hazırlandı ve sonuçlar karşılaştırıldı (29,40).

III. 4. 4. Eritrositlerde glukoz taşınımının ölçülmesi :

Taşınım çalışması kanların alındığı gün yapıldı. Glukoz taşınımı nihai 1, 5, 10, 20, 30 ve 40 mM glukoz konsantrasyonlarında ölçüldü. Kullandığımız radyoaktif glukozun spesifik aktivitesi 0.08 μ Ci/umol idi. 30 μ l D-glukoz ve 6 μ l C ¹⁴-D-glukoz içeren tüplere 264 μ l % 10'luk eritrosit süspansiyonundan ilave edildi. 25°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilen tüplere 5 ml "stopping" çözeltisi (2 mM HgCl₂, 0.1 mM floretin, 1.25 mM KI, 342 mM NaCl) konarak taşınım durduruldu. Tüpler 800 xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dibe çöken eritrositler 400 μ l

soğuk distile su ilavesi ile parçalandı. (Bu aşamada hemolizattan 20 µl hemoglobin tayini için ayrıldı). Tüpte bulunan hemolizata 400 µl 6N perklorik asit ilavesi ile proteinler çöktürüldü, tüpler sonra 3 dakika 800 xg`de santrifüj edildi. Süpernatandan alınan 100 µl, 3 ml Bray sintillasyon sıvısı (0.6 M naftalin, 18 mM 2.5 difenil okzazol, 0.5 mM dimetilfenil okzazol, 0.4 M metanol, 0.33 mM etilen glikol, 0.8 M 1,4 dioksan) ile karıştırılarak sıvı sintilasyon sayacında 1 dakika süre ile iki kez sayıldı ve ortalama değerleri alındı. 0. dakika ölçümleri için, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan ve D-glukoz ve C¹⁴ glukoz konan tüplere 5 ml "stopping" çözeltisi ilave edildi ve buz içinde tutuldu. % 10'luk eritrosit süspansiyonundan 264 µl konarak vortekslendi. 800 xg'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant aspire edildi. Daha sonra deneye aynen yukarıda anlatıldığı gibi devam edildi. 5. dakika değerlerinden 0. dakika değerleri çıkarılarak eritrositlerdeki glukoz taşınımı nmol glukoz/dakika/mg hemoglobin olarak ifade edildi (29,37).

III. 4. 5. Eritrositlerde hemoglobin tayini :

Deney sırasında alınan 20 µl hemolizata 5 ml Drabkin çözeltisi (0.6 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.76 mM KCN, 0.01 M $KHCO_3$) ilave edildi. Kör ve standart tüpleri ise sırası ile 20 µl distile su ve 20 µl hemoglobin standartı ve üzerlerine 5 ml Drabkin çözeltisi konarak hazırlandı. Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kör'e karşı 540 nm dalga boyunda absorbanları okundu (41).

III. 4. 6. Defibrotid uygulaması :

Aterosklerotik hastalara damardan 600 mg defibrotid uygulandı. Defibrotid uygulamasından önce ve iki saat sonra alınan kanlardan eritrositler ayrıldı. PBS ile yıkanan eritrositlerdeki glukoz taşınımı daha önce anlatılan yöntemle uygun olarak incelendi.

III. 4. 7. Taramalı elektron mikroskobu ile eritrositlerin incelenmesi:

PBS ile yıkanarak hazırlanmış eritrositlerin 10 µl' sine 90 µl % 0,5' lik glutaraldehid çözeltisi (serum fizyolojik içinde) ilave edildi. Bu karışımdan 10 µl

alındı ve lamele yayılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra üzerlerine ozmik asit konu ve 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda PBS içinde hazırlanmış % 30, 50, 70, 96, 100 'lük etanol çözeltileri sırasıyla konarak 15 er dakika bekletildi. 1:3, 1:1 ve 3:1, amil asetat:etanol inkübasyonları ise sırasıyla 15'er dakika uygulandı. Daha sonra preparatlar sadece amil asetat içinde tutularak bekletildi. Örneklerin dehidratasyonu için, amil asetat içinde bekletilen eritrosit yaymaları, Critical Point Drying aleti içine yerleştirildi. Kabin basıncı sıvı CO₂ gazı ile ayarlanarak, vana açılarak gaz haline geçen sıvı gazın amil asetatı kabinden çıkarması beklendi. Bu işlem 2-3 kez sıvı gaz ile kabin doldurarak tekrarlandı. Amilasetat kokusu kalmayınca sıvı gaz kabini 37°C'ye ısıtmak suretiyle buharlaştırılarak uçuruldu. Preparatların üstünü altınlama kaplama işlemi için, Sputter Coater cihazı kullanıldı. 120 saniye, 18 mA akım uygulayarak 0,04 - 0,06 mbar kabin basıncı altında eritrositler altınla kaplandı. Plaka kalınlığı 200-300 Å kalınlığında olması bu şekilde sağlanmış oldu. Altınla kaplanmış eritrosit preparatları, taramalı elektron mikroskopunda incelendi (42).

III. 4. 8. İstatistik analizler :

Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü analizi Student t testi ile yapıldı. Bunun için Machintosh Bilgisayarı ve Statview 512 programı kullanıldı.

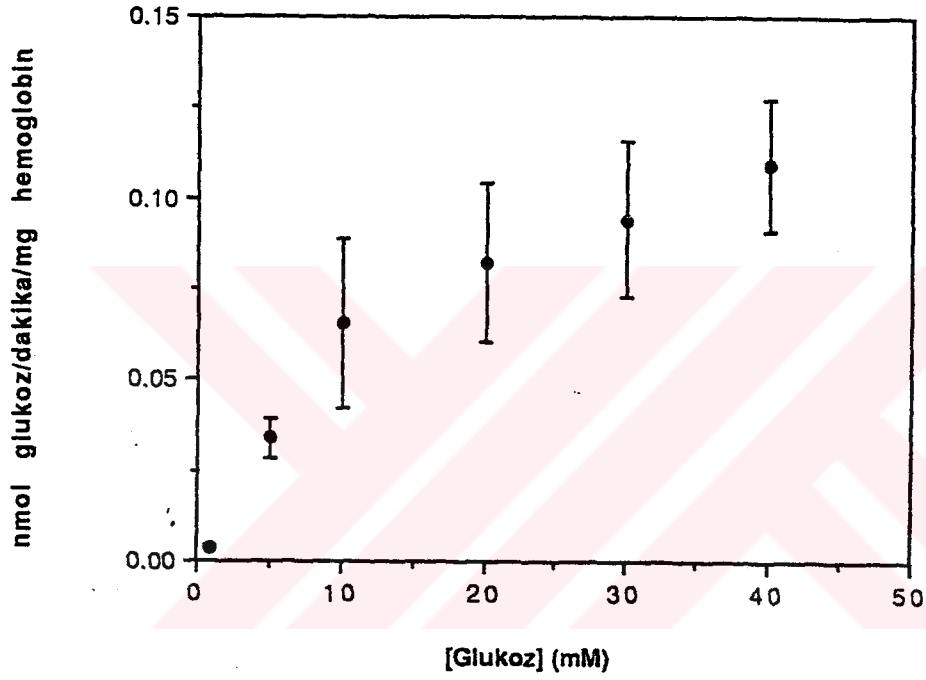


BÖLÜM IV.

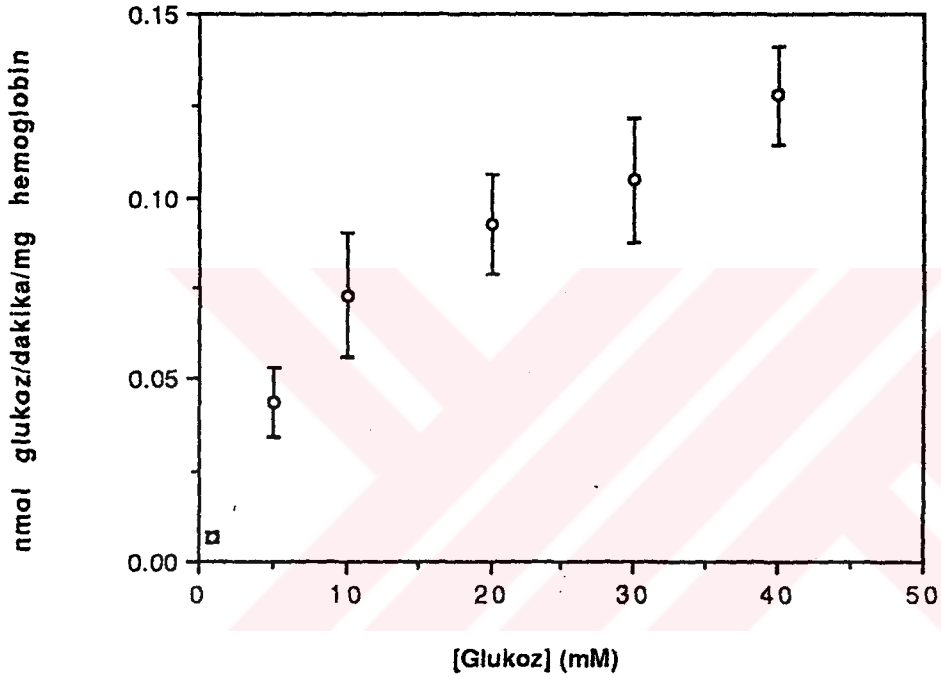
B U L G U L A R

IV. 1. KOLESTEROLCE ZENGİN LİPİT DISPERSİYONU İLE İLGİLİ SONUÇLAR :

Kolesterol içeriği yüksek olan (20 mg kolesterol/ 5 mg fosfatidil kolin) lipit dispersiyonu sağlıklı kişilere ait serumla karıştırıldı. Kolesterolce zengin bu serumda aynı kişiye ait eritrositler 37 °C'de bir saat inkübe edildi. Bu deneyin kontrolü olarak aynı kişinin yıkanmış eritrositleri 0,155 M NaCl içinde 37°C'de bir saat inkübe edildi. Kolesterolce zenginleştirilmiş serumda inkübe edilen eritrositlerdeki glukoz taşınımının Michaelis Menten grafiği şekil 5'de verilmiştir. Şekil 6'da ise NaCl içinde inkübe edilmiş eritrositlerdeki glukoz taşınımına ait grafik verilmiştir. Her konsantrasyon için verilen değer deneylere ait sonuçların ortalamasıdır. Standart sapmaları çizgi halinde gösterilmiştir. Taşınımın kinetik parametreleri, her bir deneyin Lineweaver Burk eğrilerinin çizilmesi ile tek tek hesaplanmış ve deneylere ait ortalama değerler Tablo 3'de sunulmuştur.



Sekil 5 : Kolesterolce zengin lipid dispersiyonunda inkübe edilmiş eritrositlerde glukoz taşınımı.



Şekil 6 : 0.155 M NaCl içinde inkübe edilmiş eritrositlerde (kontrol) glukoz taşınımı.

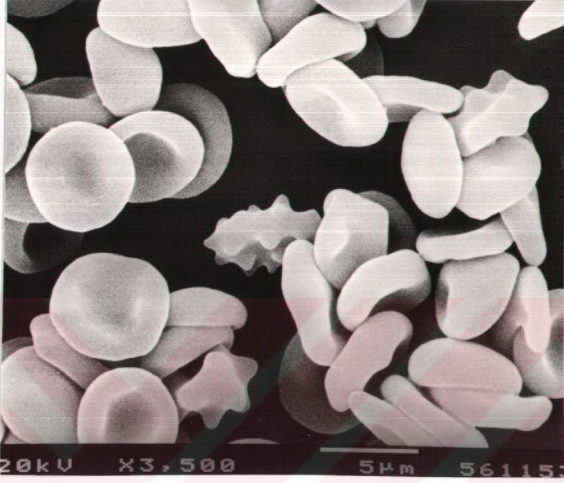
Tablo 3. Kolesterolce zengin lipit dispersiyonu veya NaCl ile inkübe edilen eritrositlerin glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri

GRUP	K_m	V_{max}
	mM	nmol glukoz/dak /mg Hb
Kolesterolce zengin dispersiyon ile inkübe edilen	9.720 ± 1.750	0.099 ± 0.018
0.155 M NaCl ile inkübe edilen	$7.680 \pm 0.536^*$	$0.120 \pm 0.021^*$

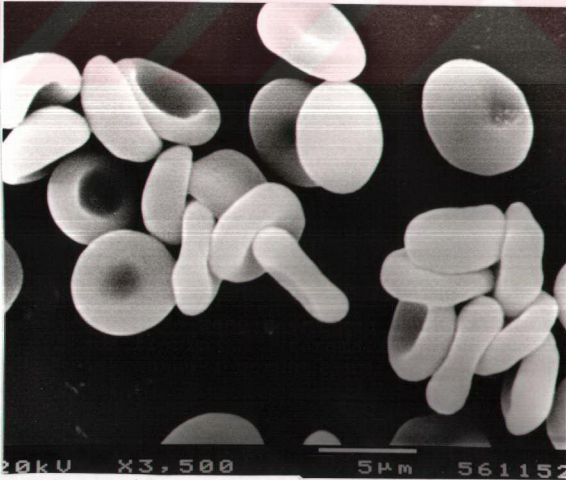
* $P < 0.05$

Kolesterolce zengin ortamda inkübe edilen eritrositler kontrolü ile karşılaştırıldığında taşıyıcısının K_m değerinin arttığı, V_{max} değerinin azaldığı gözlemlendi ($P < 0.05$).

Bu eritrositler taramalı elektron mikroskobu ile de incelendi. Resim 1'de kolesterolce yüksek ortamda inkübe edilen eritrositlerin aldığı ekinosit görünüm, Resim 2'de ise aynı deneyin kontrolü görülmektedir.



Resim 1 . Kolesterolce zengin ortamda inkübe edilen eritrositlerin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüleri.

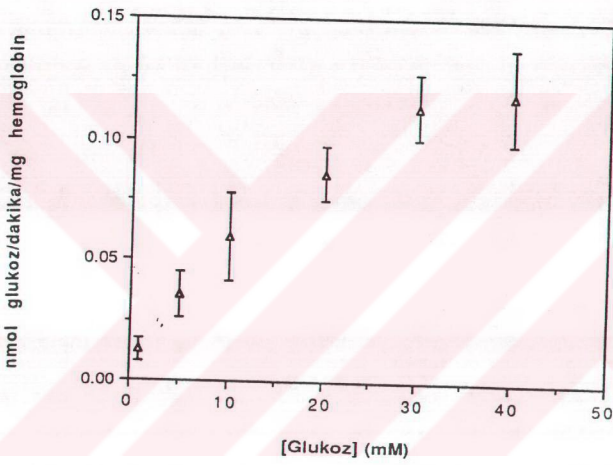


Resim 2 . 0.155 M NaCl içinde inkübe edilmiş eritrositlerin (kontrol) taramalı elektron mikroskopundaki görüntüleri.

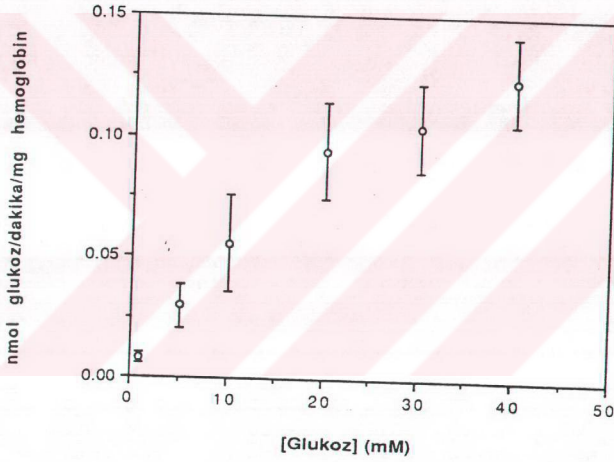
IV. 2. KONTROL ve HASTA GRUPLARININ ERİTROSİT GLUKOZ TASIYICISININ KINETİK PARAMETRELERİ :

Hiperkolesterolemik, hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik ve aterosklerotik hasta gruplarının eritrositlerinde glukoz taşınımı daha önce anlatıldığı şekilde incelenmiş herbir gruba ait taşınım Michaelis Menten grafiği sırası ile Şekil 7, 8, 9 ve 10'da verilmiştir. Her konsantrasyon için verilen değer bu gruba ait sonuçların ortalamasıdır. Standart sapmaları çizgi halinde gösterilmiştir. Glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri, her bir deneyin Lineweaver Burk eğrilerinin çizilmesi ile tek tek hesaplanmış ve hasta grupları ve kontrollere ait ortalama değerler standart sapmaları ile Tablo 4'de sunulmuştur.

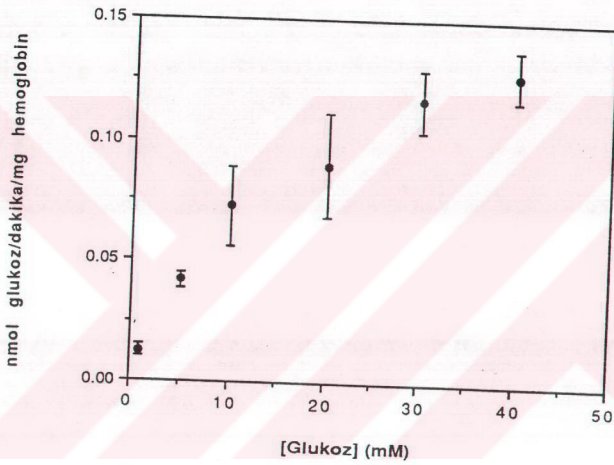
Hiperkolesterolemik, hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik ve aterosklerotik kişilerin eritrosit glukoz taşıyıcısının K_m değerlerinin kontrollerden daha yüksek olduğu saptandı. Bu taşıyıcının V_{max} değeri ise hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik hastalarda kontrolden daha yüksek bulunurken, aterosklerotiklerde kontrol değerinden daha düşük bulundu (Tablo 4).



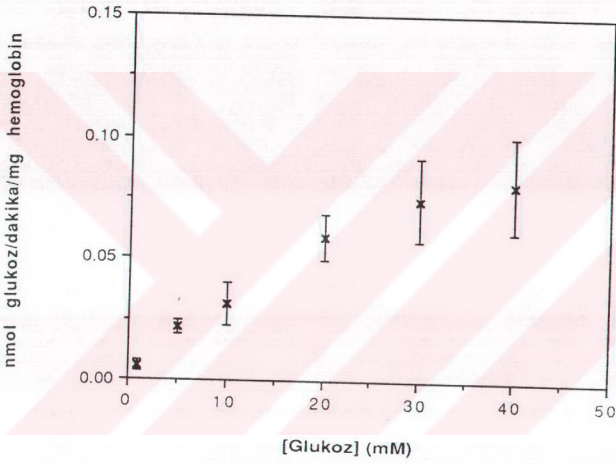
Sekil 7 : Kontrol grubu eritrositlerinde glukoz taşınımını.



Sekil 8 . Hiperkolesterolemisi olan hastaların eritrositlerinde glukoz taşınımını



Sekil 9 . Hiperkolesterolemisi ve hipertrigliseridemisi olan hastaların eritrositlerinde glukoz taşınımı.



Sekil 10. Ateroskleroza olan hastaların eritrositlerinde glukoz taşınımı.

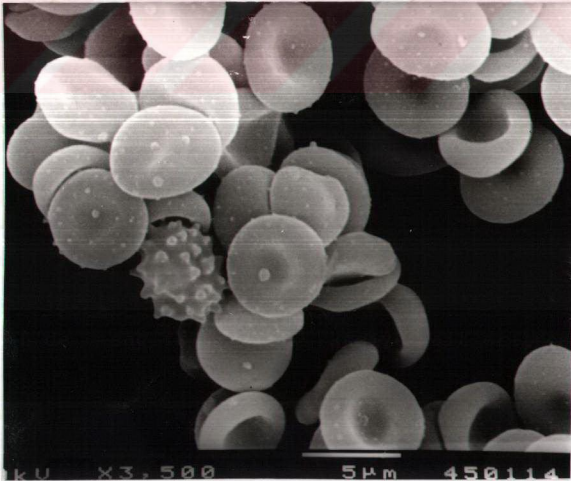
Tablo 4. Kontrol ve hasta gruplarının eritrosit glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri.

GRUP	K _m	V _{max}
	mM	nmol glukoz/dak /mg Hb
Kontrol (n=15)	7.543 ± 1.046	0.104 ± 0.019
Hiperkolesterolemi (n=10)	19.909 ± 4.371*	0.163 ± 0.031*
Hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi (n=10)	11.265 ± 2.300*	0.145 ± 0.021*
Ateroskleroz (n=15)	14.845 ± 3.183*	0.087 ± 0.023*

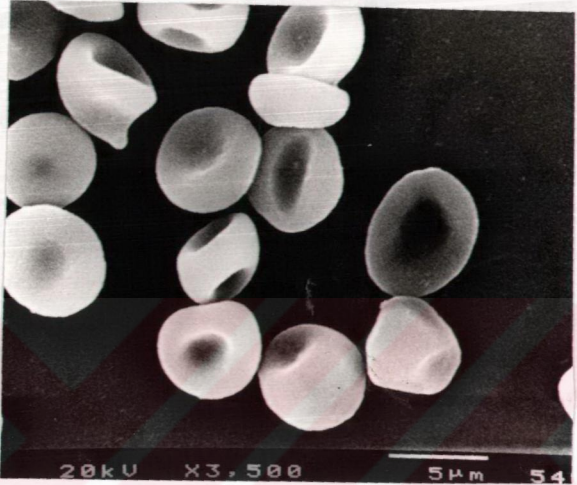
* Kontrol değerlerinden önemli derecede farklı (P < 0.05).

III. 3. KONTROL ve HASTA GRUPLARI ERİTROSİTLERİNİN
TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE
İNCELENMESİ :

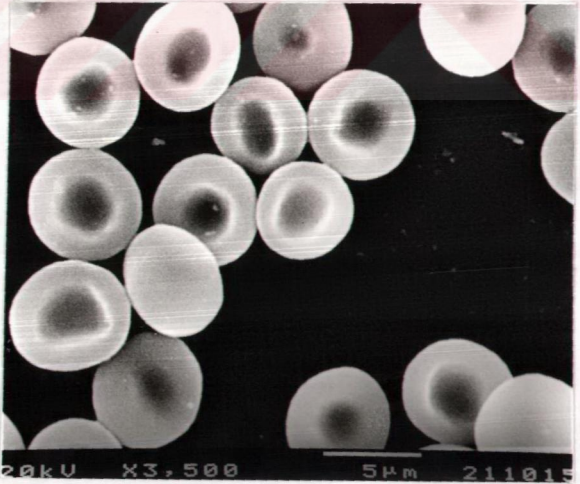
Hiperkolesterolemi, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi'si olan hastaların eritrositleri taramalı elektron mikroskopisi ile incelendi. Hiperkolesterolemiklerde ekinosit (Resim 3), hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemiklerde ise stomatosit (Resim 4) yapısında eritrositler belirlendi. Resim 5'de sağlıklı bir kişiye ait eritrositler görülmektedir.



Resim 3 . Hiperkolesterolemik bir hastanın eritrositlerinin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü.



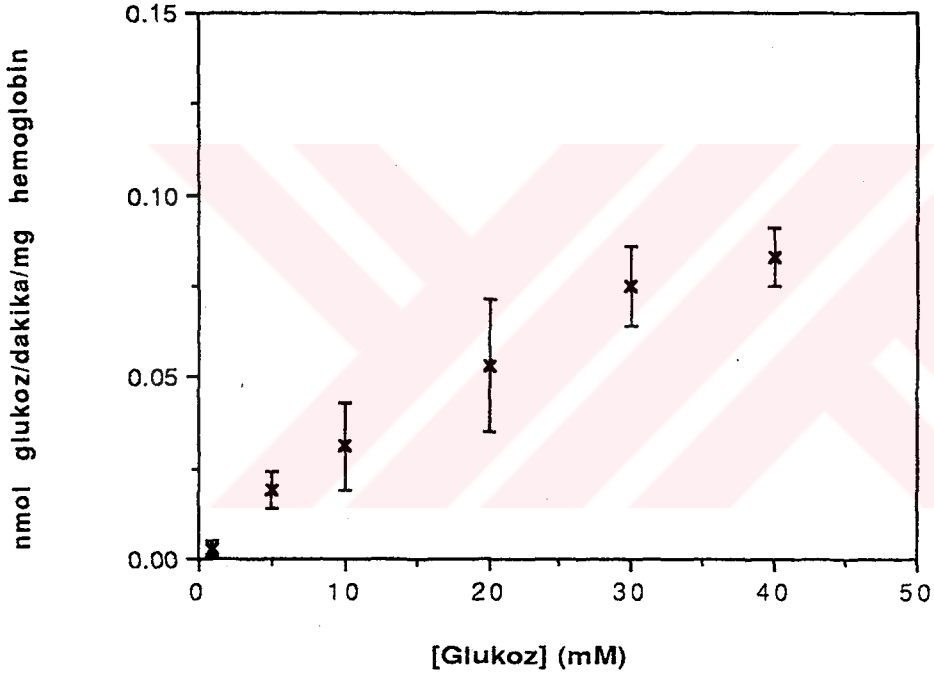
Resim 4 . Hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik bir hastanın eritrositlerinin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü.



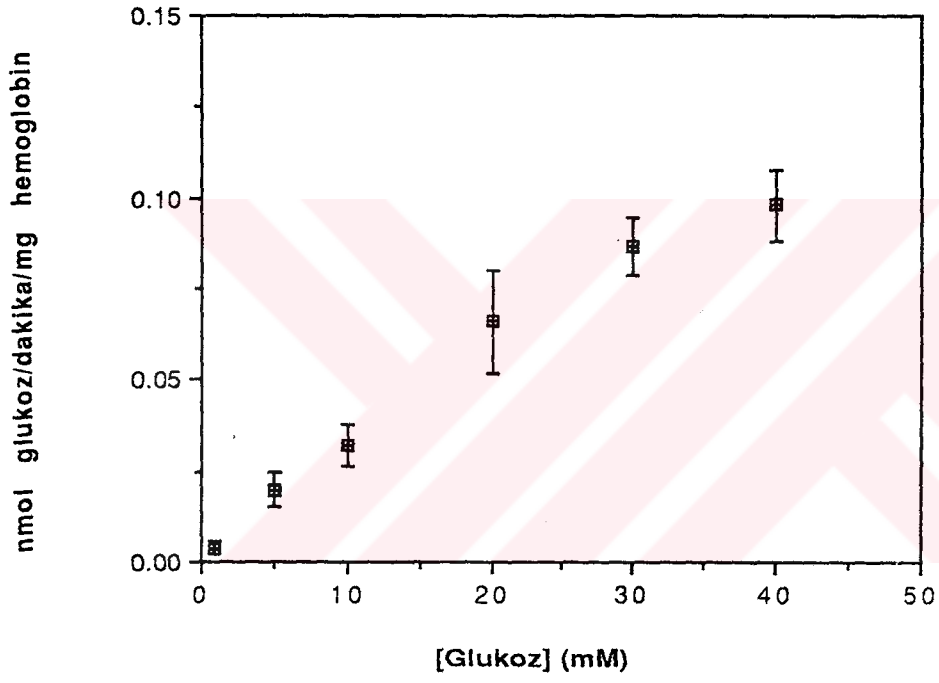
Resim 5 . Sağlıklı bir kişiye ait eritrositlerin taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü.

IV. 4. ATEROSKLEROTİK HASTALARA DEFİBROTİD
UYGULANMASINDAN ÖNCE VE SONRA ERİTROSİT
GLUKOZ TAŞINIM KİNETİĞİ :

Aterosklerotik hastalara Defibrotid uygulanmadan önce ve 2 saat sonra alınan kanlar ile çalışılarak defibrotidin eritrosit glukoz taşınımı üzerine etkisi incelendi. Defibrotid uygulanmasından önce ve sonraki eritrosit glukoz taşınımlarının Michaelis Menten grafikleri Şekil 11 ve 12'de çizilmiştir. Her konsantrasyon için verilen değer deneylere ait sonuçların ortalamasıdır. Standart sapmaları çizgi halinde gösterilmiştir. Glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri, her bir deneyin Lineweaver Burk eğrilerinin çizilmesi ile tek tek hesaplanmış ve deneylere ait ortalama değerler Tablo 5'de sunulmuştur. Defibrotid uygulanmasından sonra taşıyıcısının K_m değerinin azaldığı, V_{max} değerinin ise arttığı bulunmuştur ($P < 0.05$).



Sekil 11 . Aterosklerotik hastalara defibrotid uygulanmadan önceki eritrosit glukoz taşınımı.



Sekil 12 . Aterosklerotik hastalara defibrotid uygulanmasından sonraki eritrosit glukoz taşınımı.

Tablo 5. Aterosklerotik hastaların Defibrotid uygulanmasından önce ve sonraki eritrosit glukoz taşıyıcı kinetik parametreleri.

GRUP	K_m	V_{max}
	mM	nmol glukoz/dak /mg Hb
Defibrotid öncesi (n= 10)	14.549 ± 2.676	0.094 ± 0.022
Defibrotid sonrası (n= 10)	11.436 ± 2.977*	0.119 ± 0.026*

* önceki değerlerden önemli derecede farklı ($P < 0.05$).

BÖLÜM V.

T A R T I Ş M A

Hiperlipidemi ateroskleroz için en önemli risk faktörlerinden biridir ve eritrositler üzerindeki etkileri sonucu kanın normal reolojisinde değişikliklere neden olabilir (27,42,43). Kolesterol ve fosfolipitler plazma ve hücreler arasında değiş tokuş edilmektedir. Kolesterol ve fosfolipit oranlarının değişmesi bu hücrelerin morfolojik enzimatik ve taşıma özelliklerini etkilemektedir. Bu durum özellikle eritrositler için önemlidir, çünkü eritrositlerin kolesterol ve fosfolipitlerini sentezleyecek enzim sistemleri yoktur. Yapılan in vitro çalışmalarda kolesterolce zengin dipalmitoil fosfatidil kolin dispersiyonları ile inkübe edilen eritrositlerin hücre zarlarında aşırı miktarda kolesterol birikmesi olduğu (40), buna karşın kolesterolce fakir dipalmitoil fosfatidil kolin dispersiyonları ile inkübe edilen eritrositlerin hücre zarı kolesterol düzeylerinde ise azalma olduğu bildirilmiştir (44-46).

Dilinoleoil fosfatidil kolin, palmitoil lizofosfatidil kolin, doymuş veya doymamış uzun zincirli yağ asitleri (stearik veya oleik) ile hazırlanan eritrosit süspansiyonlarında dozlara bağımlı olarak bu lipid fraksiyonlarının eritrosit hücre zarlarına girdikleri ve glukoz taşınımını inhibe ettikleri gösterilmiştir (37). Dışarıdan eritrosit zarına katılan fosfolipitlerin hücrenin morfolojisinde değişmelere de neden oldukları bilinmektedir. Dilauril fosfatidil serin, dilauril fosfatidil kolin dispersiyonları ile yapılan çalışmalarda eritrositlerin yapılarının diskoit sekilden ekinositik şekile dönüştüğü gösterilmiştir (42,46.). Kolesterolce zengin dipalmitoil lesitin dispersiyonları içinde inkübe edilen eritrositlerin zar akışkanlıklarının zarda biriken kolesterol moleküllerine bağımlı olarak azaldığı bildirilmiştir (32,44,46,47). Lipoproteinler ile eritrositler arasında kolesterol taşınımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda ise LDL ile inkübe edilen eritrositlerde, hücre içi kolesterol düzeyinin % 12-14 kadar arttığı saptanmıştır. Bunun tam tersi olarak HDL2 ve HDL3 lipoproteinleri ile yapılan

inkübasyonun eritrosit zarlarındaki kolesterol miktarını azalttığı ve buna bağlı olarak zar akışkanlığında bir artışın belirlendiği rapor edilmiştir.(48-51).

Biz de bu çalışmada kolesterolce zengin ortamda inkübe edilen eritrositlerde glukoz taşınımını inceledik. Kolesterolce zengin fosfatidil kolin dispersiyonları ile karıştırılmış serumda inkübe edilen normal eritrositlerin glukoz taşınımı kontrolü ile karşılaştırıldığında, taşıyıcının K_m değerinin yükseldiği, V_{max} değerinin ise azaldığı görüldü. Eritrositlerin inkübasyon sonucunda morfolojileri ile ilgili yaptığımız çalışmada ise taramalı elektron mikroskopunda bu hücrelerde diskoit yapıdan ekinositik yapıya doğru bir geçiş olduğunu gözledik. Bu şekil değişikliğine zarlarda biriken kolesterolün neden olabileceğini düşündük.

Hipobetalipoproteinemi hastalarında akantosit yapısı genel eritrosit popülasyonunun % 10 -15 'ini oluşturmaktadır. Bu oluşum abetalipoproteinemia hastalarında da benzer şekilde görülmektedir. Abetalipoproteinemi hastalarının eritrosit zarlarındaki kolesterol/fosfolipit oranları yüksek bulunmuştur. Bu hastalarda zar akışkanlığı kolesterol birikmesi sonucunda azalmıştır (52,53). Karaciğer hastalıkları

sonucu ortaya çıkan spur hücre anemilerine yol açan önemli bir faktör eritrositlerin kolesterolce zenginleşmeleridir. Bu hastalarda eritrosit zar akışkanlığının azaldığı bildirilmiştir (32,34,44).

Kolesterol zarın akışkanlığını azaltırken fosfolipitler arttırmaktadır. Bunun en çarpıcı örneği primer lipoprotein lipaz (LPL) bozukluğu olan hastalarda görülmektedir. Bu otozomal resesif hastalarda, LPL aktivitesi olmadığından ciddi silomikronemiler ve buna bağlı yüksek plazma trigliserit ve kolesterol düzeyleri görülmektedir. Silomikron molekülleri kolesterolden zengin olmasına rağmen, LDL ve HDL molekülleri kolesterolden fakir kalmaktadırlar. Bu hastaların eritrosit zarlarında kolesterol miktarının azaldığı ve fosfolipit miktarlarının arttığı saptanmıştır. Hücre zarlarında görülen akışkanlık artışının nedeninin artan fosfolipit içeriği olduğu belirtilmiştir (54).

Çift tabakalı eritrosit zarına dışarıdan katılan fosfolipitlerin yerleştikleri bölgeye göre hücre morfolojisinde değişik bozukluklara neden oldukları bilinmektedir. Fosfatidilkolin zarın plazmaya bakan yüzüne yerleştiğinden hücrenin diskoit yapısını ekinosit

yapıya çevirmektedir (36,46). Fosfatidilserin zarın hücre sitoplazmasına bakan yüzüne yerleşmekte ve hücrenin yapısını diskosit şekilden stomatosit şekile çevirmektedir (42,48). Lipit metabolizması ile ilgili hastalıkların eritrositler üzerinde neden oldukları bu değişikliklerden yola çıkarak hiperlipidemik hasta plazmalarındaki yüksek kolesterol veya trigliserit düzeyleri ile ilişkili olarak eritrosit zarlarında bazı değişiklikler olabileceğini düşündük. Hücre zarında yerleşmiş proteinlerin işlevlerini tam olarak yerine getirebilmeleri için buldukları hidrofobik ortamın önemi büyüktür. Eritrosit zarı içine yerleşmiş proteinlerden glukoz taşıyıcısının glukozun bağlanması ile konformasyonel değişime uğradığını biliyoruz. Hücre zarı kolesterol içeriğinin değişmesi zarın akışkanlığını azaltmakta ve daha rijid bir yapı almasına neden olarak lateral hareketleri kısıtlamaktadır. Bu amaçla çalışmamızın ikinci kısmında hiperlipidemik veya aterosklerotik hastaların eritrosit morfolojisini ve glukoz taşınım kinetiğini inceledik. Hiperkolesterolemik, hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik ve aterosklerotik hasta gruplarının eritrosit glukoz taşıyıcısının K_m değerini kontrollere göre daha yüksek bulduk. Taşıyıcının V_{max} değerini

hiperkolesterolemik, hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemiklerde kontrollerden yüksek, aterosklerotiklerde ise kontrollerden düşük olduğunu saptadık.

Eritrositlerin morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi ile incelendiğinde kolesterolü yüksek olan hastalarda ekinositik yapının, kolesterol ve trigliseriti yüksek olan hastalarda ise stomatositik yapının çoğunlukta olduğu görüldü.

Hiperlipidemik ve aterosklerotik hastalarda eritrosit glukoz taşınım kinetiğinin nasıl etkilendiğini şu anda açıklamak mümkün değildir. Ancak hiperlipidemi ve ateroskleroz büyük olasılıkla eritrosit zarı lipid çift tabakasını etkilemekte ve bu da glukoz taşıyıcı proteinin konformasyonunda değişikliğine neden olmakta ve sonuçta taşıyıcının aktivitesini değiştirmektedir.

Defibrotid memeli akciğerinden DNA'nın kontrollü depolimerizasyonu ile elde edilen bir poliribonükleotittir. Bu ilacın profibrinolitik ve antitrombotik etkisi vardır (55,56). Defibrotidin akut ve letal miyokardiyal iskemide kardiyoprotektif olduğu da gösterilmiştir (57,58). Derin ven trombozunda.

periferel obliteratif damar hastalıklarında, Raynauds fenomeninde, tromboembolizmde ve aterosklerozun antitrombotik tedavisinde defibrotidin etkili olduğu bilinmektedir (59-62). Miyokardiyal iskemideki etkisini doku oksijenasyonunu arttırarak gösterdiği öne sürülmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, defibrotidin eritrosit 2,3 difosfogliserat miktarını arttırdığı ve hemoglobinin oksijene olan affinitesini azalttığı gösterilmiştir (63). Çalışmamızda, aterosklerotik hastaların defibrotid uygulanmadan önce ve 2 saat sonra eritrosit glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri ölçüldü. Defibrotidin glukoz taşıyıcısının K_m ini azalttığı, V_{max} ını arttırdığı saptandı. Eritrosit glukoz taşınımının ve dolayısı ile oksijen kullanılabilirliğinin defibrotid ile arttırılması bu ilacın miyokardiyal iskemide hücreleri hasardan koruma etkisini açıklayıcı yöndedir.

Ö Z E T

Hiperlipidemi eritrositler üzerindeki etkileri sonucu kanın normal reolojisinde değişikliklere neden olduğundan ateroskleroz için en önemli risk faktörlerinden biri sayılır. Kolesterol ve fosfolipitler plazma ve hücreler arasında değiş tokuş edilirler. Bu özellikle eritrositler için önemlidir çünkü eritrositlerin kolesterol ve fosfolipitleri sentezleyecek organelleri yoktur. Bu etkileşim hücre zarının morfolojik, enzimatik ve taşıyıcı özelliklerini etkileyebilir.

Bu araştırmanın birinci kısmında eritrositler kolesterolce zengin ortamda inkübe edildi. Bu eritrositlerin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile incelendi ve ekinositik formda eritrositler gözlemlendi. Eritrosit glukoz taşıyıcısının K_m ve V_{max} değerlerinin değiştiği saptandı. Araştırmanın ikinci kısmında ise hiperkolesterolemisi, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemisi, ve aterosklerozu olan kişilerin glukoz taşıyıcı aktivitesi incelendi. Hasta gruplarının glukoz taşıyıcısının kinetik parametreleri kontrollerinkinden farklı bulundu. Hasta ve kontrollerde eritrositlerin morfolojisi de taramalı elektron mikroskopisi ile incelendi. Hiperkolesterolemide ekinosit şeklinde eritrositler gözlenirken, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemide stomatosit şeklinde eritrositlere rastlandı.

Sonuçlarımız hiperlipideminin eritrosit zarı lipit çift tabakasını etkilediğini ve bunun sonucunda eritrosit morfolojisinde ve glukoz taşıyıcı aktivitesinde değişikliğe neden olduğunu düşündürmektedir.

SUMMARY

Hyperlipidemia is one of the major risk factors for atherosclerosis which affects normal rheology of blood through its interaction with erythrocytes. The cholesterol and phospholipids are particularly important for erythrocytes since they do not possess an enzymatic apparatus necessary for cholesterol and phospholipid synthesis. This exchange may affect morphologic, enzymatic and transport properties of membrane.

In the first part of this study normal erythrocytes were incubated in a rich cholesterol medium. Morphology of these erythrocytes were examined by scanning electron microscopy and echinocytic erythrocytes were observed. It was also found that K_m and V_{max} of the erythrocyte glucose transporter were significantly different from controls. In the second part of the study we measured erythrocyte glucose transporter activity in patients with hypercholesterolemia, hypercholesterolemia-hypertriglyceridemia and atherosclerosis. We found a very significant difference in the kinetic parameters of glucose transporter when we compared control group with three patient groups. The morphology at the erythrocyte membranes were examined by scanning electron microscopy in patients and controls. Echinocyte like erythrocytes were observed in hypercholesterolemia, however stomatocytes were found in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia.

Our findings suggest that hyperlipidemia affects erythrocyte cell membrane lipid bilayer and this results in an alteration of the erythrocyte morphology and glucose transporter activity.

K A Y N A K L A R

- 1 - Ways P., and Hanahan D. J., Characterisation and quantification of cell lipids in normal man., J. Lipid. Res. 5:318-324, (1964)
- 2 - Stephen B. Shoet and Ernest Beutler, Hematology, eds. Willams S. J., Beutler E., Erslev A.J., Mc Graw Hill Company, p.368-374, New York (1990)
- 3 - Mathews K. C. and van Holde K. E., Biochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Company, p. 311-315, New York (1990)
- 4 - Jones M. N. and Nickson J. K., Monosaccharide transport proteins of the human erythrocyte membrane., Biochim. Biophys. Acta. 650:1-20, (1981)
- 5 - Elson E. L., Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery, Soc. Gen. Phys. Ser. 40:367-383, (1986)
- 6 - Kevin A. Davies and Samuel E. Lux., Hereditary disorders of the red cell membrane skeleton., Trends Genet. 5:222-227, (1989)
- 7 - Calvert R., Bennet P. and Gratzner W., Properties and structural role of the subunits of spectrin. Eur. J. Biochem. 107:355-362, (1980)

- 8 - Bennet V. and Stenbuck P.J., Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of Band 3 isolated from the human erythrocyte membrane., *J. Biol. Chem.* 255:6424-6429, (1980)
- 9 - Bennet V., The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells., *Ann. Rev. Biochem.* 54:273-278, (1985)
- 10 - Boxer D. H., Jenkins R. E. and Tanner M. J. A., The organization of in the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 137:531-542, (1974)
- 11 - Anderson R. A. and Lovrien R. E., Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton., *Nature.* 307:655-662, (1984)
- 12 - Roses A. D. and Appel S. H., Erythrocyte protein phosphorylation., *J. Biol. Chem.* 248:1408-15, (1973)
- 13 - Bretscher M. S., Raff M. C., Mammalian plasma membranes. *Sci. Amer.* 235:100-112, (1985)
- 14 - Rawn D.J., *Biochemistry*, Carolina Biological Supply Company, North Carolina, p.209-232, (1989)
- 15 - Shoet S. B., Release of phospholipid fatty acid from human erythrocytes, *J. Clin. Invest.* 49:1668-1674, (1970)

- 16 - J.Elbrink, I. Bihler., Membrane transport : Its relation to cellular metabolic rates, *Science*. 188:1177-1193, (1975)
- 17 - Claret M., Gray R., Giraud F., The effect of membrane cholesterol on the sodium pump in red blood cells, *J. Physiol*. 274:247-263, (1978)
- 18 - Rand, R. P., The structure of a model membrane in relation to the viscoelastic properties of the red cell membrane, *J. Gen. Physiol*. 52 Suppl. 1:173-179, (1968)
- 19 - Mueckler M., Caruso C., Baldwin S. A., Panico M., Blench I., Morris H. R., Allard W. J., Lienhard G. E., Lodish H. F., Sequence and structure of a human glucose transporter., *Science*. 229:941-945, (1985)
- 20 - Silverman M., Structure and function of hexose transporters, *Annu. Rev. Biochem*. 60:757 -794, (1991)
- 21 - Gould G. W. and Graeme I. B., Facilitative glucose transporters;an expanding family, *Trends Biochem. Sci*. 15:18-23, (1990)
- 22 - Walmsley A. R., The dynamics of the glucose transporter, *Trends Biochem. Sci*. 13:226-231, (1988)
- 23 - Gasbjerg P. K. and Jesper Brahm., Glucose transport kinetics in human red blood cells., *Biochim. Biophys. Acta*. 1062:83-93, (1991)

- 24 - Miwa I., Fujii H. and Okuda J., Asymmetric transport of D-Glucose anomers across the human erythrocyte membrane, *Biochem. Intern.* 16:111 -117, (1988)
- 25 - Kasahara M., Inui K., Takano M., Hori R., Distinction of three types of D-glucose transport systems in animal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132:490-496, (1985)
- 26 - Fuhrmann G. F., Dervedde S. and Frenking G., Phloretin keto-enol tautomerism and inhibition of glucose transport in human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1110:105-111, (1992)
- 27 - Carruthers A., and Melchior D. L., Effects of lipid environment on membrane transport, *Ann. Rev. Physiol.* 50:257 -271, (1988)
- 28 - Kuypers A., Roelofsen B., Berenosen W., Op Den Kamp J. A. F. and Van Deenen L. L. M., Shape changes in human erythrocytes induced by replacement of the native phosphatidylcholine with species containing various fatty acids, *J. Cell. Biol.* 99:2260-2267, (1984)
- 29 - Cooper R. A., Leslie M. H., Fischkoff S., Shinitzky M., and Shattil S., Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterols per phospholipid., *Cell Membr. Lip. Comp.* 17:327-331, (1978)

- 30 - Telf R. E., Carruthers A., Melchior D. L., Reconstituted human erythrocyte sugar transporter activity is determined by bilayer lipid head group. *Biochem.* 25:3709-3718, (1986)
- 31 - Kasahara, M., Hinkle, P. C., Reconstitution and purification the D-Glucose transporter from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 253:7384 -7390, (1977)
- 32 - Owen J. S., Brown D. J. C., Harry D. S., and McIntyre N., Erythrocyte echinocytosis in liver disease, *J. Clin. Invest.* 76:2275-2285, (1985)
- 33 - Lange Y. and Steck T. L., Mechanism of red blood cell acanthocytosis and echinocytosis in vivo, *J. Membr. Biol* 77:153-159, (1984)
- 34 - Cooper, R. A., Anemia with spur cells, a red cell defect acquired in serum and modified in the circulation, *J. Clin. Invest.* 48:1820:1826, (1969)
- 35 - Widdas W. F., The asymmetry of the hexose transfer system in the human red cell membrane., *Current Topics Membr. Transp.* 14:167-223, (1980)
- 36 - Sheetz, M. P., and S. J. Singer. Biological membranes as bilayer couples ; a mechanism of drug erythrocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:4457-4461, (1974)

- 37 - Fujii, T., Tamura, A., Fujii, H., Miwa, I., Okuda, J.,
Effect of exogenous lipids incorporated into the
membrane of human erythrocytes on its glucose transport
activity, *Biochem. Intern.* 12:873 -879, (1986)
- 38 - Wheeler, T. J., Hinkle, P. C., Kinetic properties of the
reconstituted glucose transporter from human erythrocyte
J. Biol. Chem. 256:8907 -8914, (1981)
- 39 - Wheeler J. T., Kinetics of glucose transport in human
erythrocytes: zero-trans efflux and infinite-trans
efflux at 0°C, *Biochim. Biophys. Acta* 862:387-398,
(1986)
- 40 - Argoblast L. Y., Rothblat G. H., Leslie M. H., Cooper R.
A., Cellular cholesterol ester accumulation induced by
free cholesterol-rich lipid dispersions., *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, 73:3680-3684, (1976)
- 41 - Pembrey M. E., Reliable routine estimation of small
amounts of focal hemoglobin by alkali denaturation, *J.
Clin. Pathol.* 25:738-740.(1972)
- 42 - Daleke, D. L., and W. H. Huestesis. Incorporation and
translocation of aminophospholipids in human erythrocyte
Biochemistry, 24:5406 -5416. (1985)
- 43 - Jay R. H., McCarthy S. N., Rampling M. W., Betteridge D.
J., Blood rheology and fibrinogen in children with
familial hypercholesterolaemia, *Atherosclerosis*. 91:117-
121. (1991)

- 44 - Cooper R. A., Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease, *New. Engl. J. Med.* 297:371-377, (1977)
- 45 - Carruthers, A., Melchior, D. L., Modulation of red blood cell sugar transport by lyso-lipid., *Bio. Biophys. Acta* 985:173 -83, (1989)
- 46 - Tamura, A., Morita, K. and Fujii, T., Quantitative studies on translocation and metabolic conversion of lysofosfolipids incorporated into the membrane of intact human erythrocyte from the medium, *J.Biochem.* 91:73 -78, (1985)
- 47 - Kanakaraj P., Singh M., Influence of hypercholesterolemia on morphological and rheological characteristics of erythrocytes., *Atherosclerosis.* 76:209-218, (1989)
- 48 - Sakagami T., Minari O., and Orii T., Behavior of plasma lipoproteins during exchange of phospholipids between plasma and erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 98:111-118, (1965)
- 49 - Gold J. and Phillips M. C., Effects of membrane lipids and cytoskeletal proteins on the kinetics of cholesterol exchange between high density lipoprotein and human red blood cells, ghosts and microvesicles, *Biochim. Biophys. Acta.* 1111:103-110, (1992)

- 50 - Gottlieb M. H., Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta.* 600:530-541, (1980)
- 51 - Owen J. S., Bruckdorfer K. R., Day R. C. and McIntyre Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease, *J. Lipid. Research.* 23:124-131, (1982)
- 52 - Tamuro A., Kanda K., Fujii T. Abnormalities in the membrane of erythrocytes from two patients homozygous for familial hypobetalipoproteinemia, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 5:103-9, (1988)
- 53 - Cooper A. R., Durocher J. R., and Leslie M. H., Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia, *J. Clin. Invest.* 60:115-121, (1977)
- 54 - Cantin B., Brun L. D., Gagne C., Van Murthy M. R., Lupien P.J., and Julien P., Alterations in erythrocyte membrane lipid composition and fluidity in primary lipoprotein lipase deficiency, *Biochim. Biophys. Acta* 1139:25-31, (1992)
- 55 - Pescador R., Mantovani M., Prino G., Monna M., Pharmacokinetics of defibrotide and of its profibrinolytic activity in the rabbit. *Thromb. Res.* 30:1-11, (1983)

- 56 - Niada R., Mantovani M., Prino G., Pescador R., Berti F., Omini C., Folco G. C., Antithrombotic activity of a polydeoxyribonucleotide substance extracted from mammalian organs: a possible link with prostacyclin, *Thromb. Res.* 23:233-246, (1981)
- 57 - Niada R., Porta R., Pescador R., Mantovani M., Prino G., Berti F., Cardioprotective effects of defibrotide in acute lethal and nonlethal myocardial ischemia in the cat, *Haemostasis* . 16 Suppl.1:18-25, (1986)
- 58 - Thiemermann C., Thomas G. R., Vane J. R., Defibrotide reduce infarct size in a rabbit model of experimental myocardial ischemia and reperfusion, *Brit. J. Pharmacol.* 97:401-408, (1988)
- 59 - Ulutin O. N., Balkuv - Ulutin S., Ugur M. S., Ulutin T., Özsoy Y., Cizmeci G., The pharmacology and a clinical pharmacology of defibrotide: a new profibrinolytic, antithrombotic and anti-platelet substance, *Adv. Exp. Med. Biol.* 281:429-438, (1990)
- 60 - Cimminiello C., Milani M., Pietra A., Rossi F., Aloisio M., Nazzari M., Bonfardeci G., Deficient fibrinolytic response in patients with Raynaud's phenomenon and its correction with defibrotide, *Semin. Thromb. Hemost.* 17 Suppl 1:101-105, (1991)

- 61 - Patrassi G. M., Sartori M. T., Viero M. L., Scapinello M. P., Boeri G., Girolami A., Fibrinolytic effects of defibrotide in atherosclerotic patients, Semin. Thromb. Hemost. 17 Suppl. 1:101-105, (1991)
- 62 - Craveri A., Tornaghi G., Ranieri R., Stanzani M., Landi G., Paganardi L., Passaretti B., Gallo E., Effects of defibrotide after oral and parenteral administration in patients with peripheral obliterative arterial disease, Int. Angiol. 9:274-277, (1990)
- 63 - Ferrero M. E., Marni A., Gaja G., Possible enhancement of endothelial cell function induced by defibrotide, Biochem. Soc. Trans. 16:540-541, (1988)