

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı

**ATORVASTATİN TEDAVİSİYLE PLAZMA  
KOLESTEROL KONSANTRASYONUNUN  
DÜŞÜRÜLMESİNİN ERİTROSİT MEKANİĞİNE  
ETKİLERİ**

**Mehmet ÜYÜKLÜ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2006**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**ATORVASTATİN TEDAVİSİYLE PLAZMA  
KOLESTEROL KONSANTRASYONUNUN  
DÜŞÜRÜLMESİNİN ERİTROSİT MEKANİĞİNE  
ETKİLERİ**

**Mehmet ÜYÜKLÜ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2004.02.0122.015)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2006**

## Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 26/06/2006

**Tez danışmanı:** Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Aysel AĞAR  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. V. Nimet UYSAL  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Aytül BELGİ  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı

### ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2006 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

3-Hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri (statinler) yaygın bir şekilde kolesterol düşürücü ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu enzim kolesterol biyosentez yolağının anahtar enzimidir ve HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizler. Bu çalışmanın amacı, normal diyetle beslenen koyalarda atorvastatin uygulamasıyla ortaya çıkan hipokolesteroleminin eritrosit membranının yapısına ve mekaniğine etkisini incelemektir. Atorvastatin izotonik fosfat tamponu içinde gavajla, 20 mg/kg/gün tek doz 21 gün verilmiştir. Kardiyak fonksiyon ile kan örnekleri alındıktan sonra plazma total kolesterol, trigliserit, düşük dansiteli (LDL) ve yüksek dansiteli (HDL) lipoprotein konsantrasyonları, eritrosit deformabilitesi, eritrosit membranı  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz aktivitesi ve lipid kompozisyonu analizleri yapılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre kullanılarak, lazer difraksiyon analizi ile değerlendirilmiştir. Eritrosit membranları elde edildikten sonra  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz aktivitesi, fosfat salınımı metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Eritrosit membranından lipidlerin eldesinden sonra kolesterol ve fosfolipid miktarı enzimatik olarak ölçülmüştür. Üç haftalık atorvastatin uygulamasından sonra plazma kolesterol, LDL ve trigliserit konsantrasyonlarında önemli düşüşler görülmüştür ( $P<0.0001$ ). Eritrosit membranı kolesterol miktarında önemli bir azalma ( $P<0.0001$ ), fosfolipid miktarında ( $P<0.0001$ ) ve  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz aktivitesinde ( $P<0.0009$ ) ise önemli bir artma meydana gelmiştir. Eritrosit deformabilitesinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları HMG-CoA redüktaz inhibitörü atorvastatinin, eritrosit membranı kolesterol-fosfolipid oranında ve  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPaz aktivitesinde önemli değişmelere neden olduğu halde eritrosit deformabilitesini etkilemediğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** kolesterol, atorvastatin, eritrosit membranı, eritrosit deformabilitesi.

## ABSTRACT

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) are the most commonly used cholesterol-lowering drugs. HMG-CoA is a key enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway and catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate. Increased plasma cholesterol concentration leads to significant changes in the structure of membrane lipids and proteins that may impair membrane function. The recent clinical applications defend the concept to lower plasma cholesterol levels as much as possible and a lower limit concept has almost disappeared. It is not clear how very low plasma cholesterol level could affect cell membrane in general and especially the structure and function of red blood cells (RBC). The aim of this study is to investigate the effect of hypocholesterolemia resulting from atorvastatin therapy on RBC membrane structure and mechanical properties in guinea pigs fed on a normal diet. Animals were divided into two groups, as "atorvastatin-treated" (n=12) and control (n=12). Per-oral atorvastatin administration in isotonic phosphate saline buffer at a dose 20 mg/kg/day has been planned once a day for a period of 3 weeks (21 days). The following analyses were performed after blood withdrawal via cardiac puncture: plasma total cholesterol, triglyceride (TG), low-density (LDL) and high-density (HDL) lipoprotein concentrations, erythrocyte deformability, RBC plasma membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity, lipid composition of RBC membranes. The atorvastatin-treated group exhibited lower concentrations of cholesterol (17.42 ±1.70 mg/dL), LDL-cholesterol (5.250 ±2.2 mg/dL) and TG (42.60± 3.7mg/dL) than the control group ( 34.08 ±1.72, 21.17 ±1.4, 60.64 ± 2.4 mg/dL, respectively). The RBC membrane lipids showed significant difference ( $P < 0.0001$ ) between the two groups, however there was not any difference between the groups with respect to the RBC deformability.

**Key words:** cholesterol, atorvastatin, erythrocyte membrane, erythrocyte deformability.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerçekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gösteren sevgili hocam Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT'a, öneri ve eleştirileri için değerli hocalarıma, teknik olanakları ile deneysel çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Merkez Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, tezin yapım sürecindeki desteklerinden dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve sonsuz desteği için sevgili eşim Ayşe Mutlu ÜYÜKLÜ'ye teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xiii
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Lipid Metabolizması	4
2.1.1. Lipidlerin Vücut Sıvılarında Taşınması	4
2.1.1.1. Lipoproteinler	4
2.1.2. Fosfolipidler ve Kolesterol	7
2.1.2.1. Fosfolipidler	7
2.1.2.2. Fosfolipidlerin Fonksiyonları	7
2.1.2.3. Kolesterol	8
2.1.2.4. Kolesterolün Fonksiyonları	8
2.1.2.5. Plazma Kolesterol Konsantrasyonunun Düzenlenmesi	9
2.1.3. Plazma Kolesterol Düzeyi ve Önemi	10
2.1.3.1. Ateroskleroz	12
2.1.4. Plazma Kolesterol Seviyesinin Düşürülmesi	14
2.1.4.1. Redüktaz İnhibitörleri	14
2.2. Kanın Akışkanlık Özellikleri ve Önemi	15
2.2.1. Kitle Halinde Kan Akımı	16
2.2.2. Kapiller Kan Akımı	17
2.3. Eritrositler	17

2.3.1.	Eritrosit Membranı	17
2.3.1.1.	Eritrosit Membran Lipidleri	18
2.3.1.2.	Eritrosit Membran Proteinleri	20
2.3.1.3.	Eritrosit Membran Enzimleri	25
2.3.1.4.	Eritrosit Membran Asimetrisi	29
2.3.1.5.	Membran Akışkanlığı	29
2.3.2.	Eritrosit Sitoplazması	30
2.3.3.	Eritrosit Deformabilitesi	30
2.3.3.1.	Eritrosit Deformabilitesini Belirleyen Faktörler	31
2.3.3.2.	Eritrosit Deformabilitesini Değiştiren Fizyolojik ve Patolojik Etkenler	32
2.4.	Hipotez	34

## **GEREÇ ve YÖNTEMLER**

3.1.	Deney Protokolü	35
3.2.	Hematolojik Parametreler	35
3.3.	Biyokimyasal Parametreler	35
3.3.1.	Eritrosit Membranının Elde Edilmesi	35
3.3.2.	Membran Protein Tayini	35
3.3.3.	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPaz Enzim Aktiviteleri Ölçümü	36
3.3.4.	Eritrosit Membranı Lipid Kompozisyonun Tayini	36
3.3.5.	Plazma Lipid ve Hepatik Enzim Konsantrasyonlarının Ölçümleri	37
3.4.	Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi	37
3.5.	Sonuçların Değerlendirilmesi	37

## **BULGULAR**

4.1.	Hematolojik Parametreler	38
4.2.	Biyokimyasal Parametreler	38
4.2.1.	Eritrosit Membranı Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPaz Aktivitesi Düzeyleri	38
4.2.2.	Eritrosit Membran Lipid Kompozisyonu Değerleri	39
4.2.3.	Plazma Lipid ve Hepatik Enzim Düzeyleri	39



<b>4.3. Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi</b>	<b>39</b>
--	-----------

<b>TARTIŞMA</b>	<b>42</b>
-----------------	-----------

<b>SONUÇLAR</b>	<b>46</b>
-----------------	-----------

<b>KAYNAKLAR</b>	<b>47</b>
------------------	-----------

<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>69</b>
-----------------	-----------

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>2,3-DPG</b>	:	2,3-difosfogliserat
<b>A°</b>	:	Angstrom
<b>ALT</b>	:	Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	:	Aspartat aminotransferaz
<b>ATP</b>	:	Adenozin trifosfat
<b>Ca<sup>++</sup></b>	:	Kalsiyum
<b>Ca<sup>++</sup>-ATPaz</b>	:	Kalsiyum ATPaz
<b>cAMP</b>	:	Siklik adenozin 3',5' monofosfat
<b>CAT</b>	:	Katalaz
<b>CE</b>	:	Kolesterol Ester
<b>CETP</b>	:	Kolesterol ester transfer protein
<b>cGMP</b>	:	Siklik guanozin 3',5' monofosfat
<b>Cl<sup>-</sup></b>	:	Klor
<b>cp</b>	:	Centi poise
<b>Cu<sup>++</sup></b>	:	Bakır
<b>d</b>	:	Dansite
<b>EDTA</b>	:	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EI</b>	:	Elongasyon indeksi
<b>Fe<sup>++</sup></b>	:	Ferröz demir
<b>Fe<sup>+++</sup></b>	:	Ferik demir
<b>fL</b>	:	Femtolitre
<b>GR</b>	:	Glutatyon redüktaz
<b>GSH</b>	:	Redükte glutatyon
<b>GSH-Px</b>	:	Glutatyon peroksidaz
<b>GTP</b>	:	Guanozin 5' trifosfat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Hidrojen peroksit
<b>Hb</b>	:	Hemoglobin
<b>HbS</b>	:	Hemoglobin S
<b>HCl</b>	:	Hidroklorik asit
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	:	Bikarbonat
<b>HDL</b>	:	Yüksek dansiteli lipoprotein

<b>HL</b>	:	Hepatik lipaz
<b>HMG-KoA</b>	:	3-hidroksi-3-metilglutaril KoA
<b>Htc</b>	:	Hematokrit
<b>IDL</b>	:	Orta dansiteli lipoprotein
<b>K<sup>+</sup></b>	:	Potasyum
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	:	Potasyum fosfat
<b>LCAT</b>	:	Lesitin: kolesterol açıltransferaz
<b>LDL</b>	:	Düşük dansiteli lipoprotein
<b>LPL</b>	:	Lipoprotein lipaz
<b>Mg<sup>++</sup></b>	:	Magnezyum
<b>Na<sup>+</sup></b>	:	Sodyum
<b>Na<sub>2</sub>-ATP</b>	:	Adenozin 5'-trifosfat disodyum
<b>NaCl</b>	:	Sodyum klorür
<b>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz</b>	:	Sodyum-potasyum ATPaz
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	:	Süperoksit radikali
<b>OEH</b>	:	Ortalama eritrosit hacmi
<b>OEHK</b>	:	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
<b>Pa</b>	:	Pascal
<b>PAS</b>	:	Periyodik asit-Schiff
<b>PBS</b>	:	İzotonik fosfat tamponu
<b>PO<sub>2</sub></b>	:	Parsiyel oksijen basıncı
<b>PDE</b>	:	Fosfodiesteraz
<b>PVP</b>	:	Polivinil pirrolidon
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>SOD</b>	:	Süperoksit dismutaz
<b>TCA</b>	:	Trikloroasetik asit
<b>TG</b>	:	Trigliserid
<b>VLDL</b>	:	Çok düşük dansiteli lipoprotein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kolesterol biyosentezi	9
2.2. Plazma kolesterol konsantrasyonunun egzojen ve endojen yollarla düzenlenmesi.	11
2.3. Eritrosit membranının şematik yapısı	18
2.4. Plazma membranı lipid komponentleri	19
2.5. İnsan eritrosit membranı proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezinde saptanan bantları.	21
2.6. İnsan eritrositi spektrin molekülünün yapısı.	22
2.7. Eritrosit membranı iskelet protein organizasyonunun şematik yapısı	24
4.1. Kontrol ve atorvastatin gruplarında eritrosit deformabilite değerleri.	41

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Plazma lipoprotein bileşenlerinin konsantrasyon değerleri	5
2.2. İnsan plazmasındaki lipoproteinlerin bileşimi	6
2.3. Koroner kalp hastalığı kanıtı olmayan erişkinlerde plazma total kolesterol, LDL, HDL, ve trigliserid düzeylerinin derecelendirilmesi	13
2.4. Farklı dozlarda statinlerin LDL-kolesterol konsantrasyonunda meydana getirdiği azalmalar	15
2.5. Aynı dozda (20 mg) farklı statinlerin plazma lipid değerlerinde meydana getirdiği değişiklikler	15
4.1. Kontrol ve atorvastatin gruplarına ait hematolojik parametreler.	38
4.2. Atorvastatin ve kontrol gruplarına ait eritrosit membranı toplam enzim aktivitesi ve Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> - ATPaz enzim aktivite düzeyleri	39
4.3. Kontrol ve atorvastatin uygulanan kobaylarda eritrosit membranı lipid içeriği değerleri	40
4.4. Kontrol ve 20 mg/kg/gün atorvastatin uygulanan gruplarda plazma lipid ve karaciğer enzim aktivite değerleri	40

## GİRİŞ

Kan, çok hücreli canlılarda hayatın devamı için yaşamsal öneme sahip olan bir dokudur. Kan, plazma adı verilen sıvı ortam içinde kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) süspansiyon halinde dağıldığı, damar sisteminin içini dolduran ve kalbin pompa gücü sayesinde bu sistem içinde tüm vücudu dolaşan bir dokudur. Kan, interstisyel sıvıya oksijenle birlikte hücrelerin kullanacağı besin maddelerini getiren ve aynı zamanda hücrelerin oluşturduğu metabolizma artıkları ve karbondioksidi buradan götüren bir sistemi oluşturmaktadır. Düzenleyici görevini iç ortamın pH ve sıcaklığını değişmez tutulmasına katkıda bulunarak ve taşıdığı hormonlarla organlar arasındaki karşılıklı haberleşmeyi sağlayacak mesajları ileterek gerçekleştirmektedir. Bununla beraber, kan dokusunun damar sistemi içindeki hareketi her şeyden önce kendi özelliklerine, akışkanlığına bağlıdır (1, 2). Kanın bileşimi ve fiziksel özellikleri iç ortamı ve iç ortamdaki değişiklikleri yansıtır.

Kan dokusu, fiziksel olarak hücresel elemanların plazma içindeki bir süspansiyonundan ibarettir. Kanın hacim olarak %40–50 kadarı, esas olarak ortalama 8 µm çapında bikonkav diskoid hücreler olan eritrositlerden (3, 4), küçük bir bölümü diğer kan hücrelerinden, geri kalan %50–55'lik bölümü ise plazmadan oluşur. Kan dokusunun akışkanlığı da, birinci planda eritrosit kitlesine, plazmanın özelliklerine ve bu iki fazın birbirleriyle ilişkisine bağlı olarak değişir (5–8). Ancak eritrositlerin fiziksel özellikleri bu sistem içinde belirleyici rol oynamaktadır.

Eritrosit membranı hücrenin şekil değiştirme yeteneğinin belirlenmesi ve yapısal bütünlüğünün sağlanarak bikonkav disk yapısındaki hücre şeklinin korunmasında önemli rol oynar. Membran lipidlerinin, eritrosit deformabilitesine doğrudan önemli bir etkisinin bulunmadığı, ancak membran kolesterol/fosfolipid oranındaki değişikliklerin, dolaylı olarak membran fonksiyonlarını değiştirmesinin eritrosit deformabilitesinin belirlenmesinde etkili olduğu hususunda fikir birliği vardır (5–7)

Eritrosit deformabilitesi eritrositin kan akımı sırasında kendine uygulanan kuvvetlere yanıt olarak şekil değiştirmesi şeklinde tanımlanabilir. Eritrosit deformabilitesi, büyük damarlarda kitle halindeki kan akımı üzerindeki belirleyici rolünün yanı sıra, kapiller dolaşımın dokuların gereksinimine en uygun şekilde sürmesine de katkıda bulunur. Dolaşım sisteminin bu düzeyinde eritrositlerin kendi boyutlarından daha küçük kapiller damarlardan geçmeleri gerekir (5). Bu geçiş sırasında eritrositlerin kapiller duvarıyla kurdukları sıkı ilişki solunum gazlarının değişimi için ideal bir ortam oluşturur (4,6). Yaklaşık 8 µm çapa sahip olan hücrelerin 3–5 µm çapındaki kapiller damarlardan geçmesi, ancak bu hücrelerin şekillerini değiştirmeleri halinde mümkün olur. Eritrositlerin mikrodolaşımda fonksiyonlarını yerine getirmeleri de bu yeteneklerine bağlıdır. Gerek büyük damarlardaki kitle halinde kan akımı için, gerekse kapiller damar yatağındaki dolaşım için son derece önemli olan eritrosit deformabilitesi, bütün olarak dolaşım sisteminin reolojik özellikleri üzerinde belirleyici rol oynar.

Eritrosit membranı da diğer hücre membranları gibi özel pompalara, kanallara ve iyon kapılarına sahip seçici geçirgen karakterde bir yapıdır. Yine diğer hücre membranlarına benzer olarak, iki sıralı bir lipid matriks ve bunun içinde veya sitoplazmik yüzünde yer alan çeşitli proteinlerden oluşur (4,7,8). İnsan vücudunda bulunan kolesterolün büyük bir kısmı, hücre membranlarının yapısında bulunur (9). Kolesterolün belki de en önemli görevi bütün hücrelerin, hücre membranının yapısı ve fonksiyonu için çok önemli bir madde olmasıdır. Membranın yapısındaki kolesterol içeriği membrandaki protein taşıyıcılarının ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (10–13).

Bazı patolojik ve fizyolojik süreçler sırasında eritrositler bu yapısal özelliklerinden uzaklaşabilirler (14–21). Bunun sonucu olarak eritrosit deformabilitesi de etkilenir. Ortaya çıkan deformabilite değişikliğinin derecesine bağlı olarak, kapiller dolaşım ve solunum gazlarının alışverişinde ortaya çıkacak değişiklikler ise, eritrosit yapısını etkileyen temel süreçler ile doku düzeyindeki patolojik değişimler arasındaki fizyopatolojik ilişkiyi kurar.

Gelişmiş ya da gelişmekte olan birçok toplumda koroner kalp hastalıklarına yakalanma ve bu hastalıklardan ölüm riski çok yüksektir. Bu hastalıkların ortaya çıkmasındaki en önemli neden ise yüksek plazma kolesterolüdür. Bu nedenle plazma kolesterol düzeyinin düşürülmesi, ateroskleroz ve komplikasyonlarının önlenmesi için klinik çevrelerce kabul edilmiş bir tedavi yoludur (22–25).

Hücre membranı lipid kompozisyonu, yani kolesterol/fosfolipid oranındaki değişikliklerden dolayı membran kolesterol içeriğinin değişmesi çok önemli membran özelliklerini değiştirebilir. Eritrositler endojen olarak lipid sentezi yapamadıkları için membran lipid kompozisyonları, plazma lipid konsantrasyonundan direkt olarak etkilenir. Membran ile plazma arasında kolesterol ve dış tabakada yer alan fosfolipidlerin değiştirilmesi söz konusudur (26–30). Buradan da anlaşılacağı gibi plazma kolesterol seviyesindeki değişiklikler, eritrosit membranının lipid kompozisyonunda değişikliğe yol açar.

Son yıllarda klinik uygulamalarda plazma kolesterol seviyesinin olabildiğince düşürülmesi hedeflenmekte, bir alt sınır kavramı yavaş yavaş kaybolmaktadır (31–33). Literatürde hiperkolesteroleminin membran yapı ve fonksiyonlarına etkileriyle ilgili geniş bir bilgi birikimi bulunmasına rağmen (14,30), çok düşük plazma kolesterol seviyesinin genel olarak hücre zarı, özellikle de eritrosit yapı ve fonksiyonlarını ne şekilde etkileyebileceği konusunda yeterli literatür bilgisi bulunmamaktadır. Çok düşük plazma kolesterol konsantrasyonunda, eritrosit membranının kolesterol/fosfolipid oranındaki azalmanın eritrosit fonksiyonlarına nasıl bir etkide bulunacağı konusu çok açık değildir. Eritrositlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerindeki değişiklikler, kan dokusunun akışkanlığını, özellikle de kanın mikrodolaşımdaki davranışını yakından ilgilendirdiğinden organizmadaki bütün dokular için önemlidir. Bu çok önemli fonksiyon, bir yönden dolaşım sisteminin, diğer taraftan kan dokusunun benzersiz özellikleri sayesinde yerine getirilir.

Buradan yola çıkarak bu çalışmamız, normal dietle beslenen kobaylarda, atorvastatin uygulamasıyla ortaya çıkan hipokolesteroleminin eritrosit membran yapısına ve mekaniğine etkisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lipid Metabolizması

Lipidler, organizmanın başlıca besin kaynağını oluştururlar. Enerji verme ve depolama yönünden karbonhidratlardan daha üstün özelliklere sahiptirler. En temel lipidler arasında trigliseritler, fosfolipidler ve kolesterol bulunur (34). Kimyasal olarak, trigliseritler ve fosfolipidlerin temel lipid yapıları basit olarak uzun-zincirli hidrokarbonlu organik asitler olan yağ asitleridir. Kolesterol yağ asidi içermediği halde, sterol çekirdeği yağ asidi moleküllerinin yıkım ürünlerinden sentezlenir ve bu nedenle diğer lipidlerin birçok fiziksel ve kimyasal özelliklerini taşır. Trigliseritler vucutta başlıca, çeşitli metabolik süreçlere enerji sağlamak için kullanılır. Bununla birlikte, bazı lipidler, özellikle kolesterol, fosfolipidler vucudun tüm hücrelerin membranlarını oluşturmak ve vucudun diğer hücre fonksiyonlarını yerine getirmek amacı ile kullanılırlar (35,36).

#### 2.1.1. Lipidlerin Vucut Sıvılarında Taşınması

Kısa zincirli yağ asitleri dışında, besinlerdeki yağların hemen hepsi, barsaklardan lenfatik dolaşıma absorbe olur. Sindirim sırasında trigliseridlerin çoğu monogliseridler ve yağ asitlerine parçalanır. Daha sonra barsak epitel hücrelerinden geçerken tekrar yeni trigliserid moleküllerine sentezlenirler (37). Yemekten sonra plazmada bulunan ve en büyük lipid taşıyıcısı olan şilomikronların dış yüzeylerine az miktarda apoprotein B adsorbe olur. Bu protein lenfa sıvısı içinde şilomikronların süspansiyon sabitliğini artırır ve lenfatik kanallarının çeperine yapışmaları önler (34,36). Ayrıca gastrointestinal kanaldan absorbe edilen kolesterol ve fosfolipidlerin çoğu da, şilomikronlara katılır. Şilomikronlar daha sonra duktus torasikusa iletilirler ve vena jugularis ile vena subklavyanın birleştiği yerde venöz kana boşalırlar.

Şilomikronların çoğu yağ dokusu ve karaciğerdeki kapillerlerden geçerken kandan uzaklaştırılır. Hem yağ dokusu hem de karaciğer, lipoprotein lipaz adı verilen enzimden çok zengindir (38–40). Bu enzim kapiller endotelinde aktiftir ve endotel çeperine yapışan şilomikronların trigliseridlerini parçalayarak yağ asitlerini ve gliserolü serbestletir. Kandaki bütün şilomikronlar uzaklaştırıldıktan sonra, plazmadaki bütün lipidlerin %95'inden fazlası lipoproteinler halinde bulunur. Bunlar şilomikronlardan çok daha küçük olmakla birlikte, onlara benzer bileşimde bulunurlar. Yani trigliseridler, kolesterol, fosfolipid ve protein içerirler. Plazmadaki total lipoprotein konsantrasyonu yaklaşık 700 mg/dL kadardır ve bileşenleri Çizelge 2.1'deki gibidir (41);

#### 2.1.1.1 Lipoproteinler

Lipidler suda çözünmeyen maddeler olduklarından kanda taşınmaları taşıyıcı proteinler olan lipoproteinlerle olur (38). Lipoproteinler, merkezinde çoğunlukla hidrofobik lipidler (trigliserid ve kolesterol esterleri) içeren, serbest kolesterol ve fosfolipidler taşıyan küresel parçacıklardır. Lipoproteinler hemen tümüyle karaciğerde yapılır. Plazma kolesterolünün çoğu, fosfolipidler ve trigliseridler de

karaciğerde sentez edilir. Lipoproteinlerin başta gelen görevi lipid komponentleri vucudun her tarafına taşımaktır (34, 40,41). Lipoproteinlerin vucutta taşınma, dağılma ve metabolize edilmelerinin düzenlenmesinde kritik bir öneme sahip protein yapılar apoproteinler olarak adlandırılır. Apoproteinlerin bazıları lipoproteinlerde yapısal rol oynarlar, bazıları lipoproteinlerin yıkımı ile ilgili enzimleri aktive ederek lipid metabolizmasında aktif bir rol oynarlar ve diğer bazıları lipoproteinlerin, o lipoproteine özgü hücre membranı reseptörleri ile etkileşmesini sağlarlar (42). A (A-I, A-II ve A-IV), B (B-48, B100), C (C-I, C-II, C-III), ve E olmak üzere dört temel apoprotein grubu tanımlanmıştır (44,45). Plazmada elektriksel yükleri, dansiteleri, molekül büyüklükleri ve kolesterol, trigliserid ve fosfolipid oranları farklı olan başlıca 5 tip lipoprotein partikülü bulunur (34). Bu beş lipoprotein partikülünün bazı özellikleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Plazma lipoprotein bileşenlerinin konsantrasyon değerleri (Kaynak 38' den alınmıştır)

Plazma düzeyleri (mg/dL)	
Kolesterol	180
Fosfolipidler	160
Trigliseridler	160

**Şilomikronlar:** Şilomikronlar dansitesi 0.95 g/ml'den küçük olan, plazma lipoproteinlerinin en büyükleridir (> 1000 Å çapta) ve % 98–99 oranında lipid ve %1–2 proteinden oluşurlar (34). Yemek sonrası plazmada bulunurlar ve plazmada dolaşırken birkaç apolipoprotein (apoB48, apoE, apoC) içerirler (38). ApoB48, apoB'nin barsak tarafından yapılan tek şeklidir (38). İnce barsağın (duodenum ve proksimal jejunum) epitel hücrelerinde sentezlenirler. İntestinal epitel hücreleri tarafından alınan serbest yağ asitleri ve monogliseridler intestinal hücrelerin apikal bölgesindeki düz endoplazmik retikulumda trigliseridlere dönüşür. Trigliseridlerle beraber hem fosfolipidler hem de kolesterol büyük şilomikron partiküllerinin yapımında kullanılırlar. Şilomikronlar bazı lipoproteinlerin son karbonhidrat işleminin yapıldığı golgi organellerinde birikirler ve intestinal hücrelerin lateral kenarı boyunca salınırlar (37). Buradan mezenterik lenfe girerler, duktus torasikusa ilerler ve oradan genel dolaşıma geçerler. Dolaşımdaki şilomikronlar lipoprotein lipaz (LPL) etkisiyle trigliseridten fakir, kolesterolden zengin şilomikron artıklarına dönüşürler (42). Serbest yağ asitleri trigliserid olarak depolanmak, enerji kaynağı olarak oksitlenmek veya yeniden hepatik lipoprotein-trigliserid yapımında kullanılmak üzere çeşitli dokular tarafından alınırlar. Hepatik lipaz (HL) başlıca fosfolipaz gibi ve ikincil olarak da bir gliserid hidrolaz gibi hareket eder, ayrıca şilomikron artıklarının hepatositler tarafından alınmasının son aşamasında da rol oynar (38). Şilomikron artıkları plazmadan kısa sürede karaciğer parankim hücreleri tarafından temizlenir.

**Çizelge.2.2.** İnsan plazmasındaki lipoproteinlerin bileşimi (Kaynak 47'den alınmıştır)

LİPOPROTEİN	Şilomikronlar	VLDL	IDL	LDL	HDL	
BOY (nm)	75–1000	30–80	25–40	20	7.5–10	
DANSİTE ARALIĞI	<0.95	0.95–1.006	1.006–1.019	1.019–1.063	1.063–1.210	
%	PROTEİN	2	8	10	20	50
	SERBEST KOLESTEROL	2	4	5	7	4
	KOLESTEROL ESTER	3	16	25	46	16
	TRİGLİSERİD	90	55	40	6	5
	FOSFOLİPID	3	17	20	21	25
KAYNAĞI	Barsak	Karaciğer ve barak	VLDL	IDL	Karaciğer ve barsak	

**Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL):** Yoğunluğu 1,006 g/ml'den küçük, çapı 300–700 Å arasında olan ve % 85–90 arasında lipid (% 55 trigliserid, % 20 kolesterol, %15 fosfolipid) ve % 10–15 protein içerir (34). Başlıca apoproteini apoB100'dür, apoE ve C de içerir (38). VLDL karaciğerde yapılır ve üretimi hepatositlere yağ asidi sağlanmasıyla uyarılır. Karaciğere artmış yağ asidi girişi yağlı diyetle veya çeşitli metabolik durumlarda (örn. diabet) ya da açlığa ikincil olarak yağ asitlerinin adipoz dokudan salınımına bağlı olarak ortaya çıkar (37). VLDL yapımında kullanılacak trigliserid ve fosfolipidlerin yapımı kaba ve düz endoplazmik retikulumda olur. VLDL kolesterolü de novo sentez edilir ya da lipoprotein yıkımından elde edilir. VLDL trigliseridleri LPL ve daha az oranda HL etkisiyle hidrolize edilirler. VLDL katabolizması ürünleri orta yoğunluktaki lipoproteinler (IDL) ve LDL'dir.

**Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL):** IDL normalde plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunan büyüklük ve içerik açısından VLDL ve LDL arasında yer alan dansitesi 1.006–1.019g/ml arasında olan lipoproteinlerdir (34, 38). Başlıca apoproteinleri apoB100 ve E'dir. VLDL'nin katabolizma ürünü, LDL'nin öncülü olan ve dolaşımdan LDL reseptörleri aracılığı ile uzaklaştırılır (37). IDL'nin aterosjenik olduğuna inanılmaktadır.

**Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL):** LDL çapı yaklaşık 200Å olan, dansitesi 1.019–1.063 g/ml arasında olan, plazmadaki başlıca kolesterol taşıyıcı lipoproteindir; total plazma kolesterolünün yaklaşık % 70'i LDL'dedir (34). LDL yaklaşık % 75 lipid (% 35 kolesterol ester (CE), % 10 serbest kolesterol, % 10

trigliserid ve % 20 fosfolipid) ve % 25 proteinden oluşur (37, 38). Eser miktardaki apoE dışında gerçekte bu partiküllerde bulunan başlıca protein ApoB100'dür (38). LDL'nin aterojenik olduğu bilinmektedir ve birçok hücrede kolesterol kaynağı olarak kullanılır (40, 46, 47). LDL birçok hücreye kolesterol sunumu sağlaması açısından da önem taşır. Karaciğerde başlıca VLDL biyosentezi ve safra asidi sentezinde, adrenal bezler, ovaryum ve testislerde steroid hormonların sentezinde kullanılan kolesterol aynı zamanda diğer birçok dokuda hücre tamiri ve proliferasyonunda kullanılır (40).

**Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL):** HDL 70–120 Å çapında, dansitesi 1.063–1.21 g/ml arasında olan küçük partiküllerdir ve başlıca iki gruba ayrılabilir: HDL–2 (d= 1.063–1.125g/ml) ve HDL–3 (d= 1.125–1.21 g/ml) (34,37). Yaklaşık % 50 lipid (% 25 fosfolipid, % 15 CE, %5 serbest kolesterol, % 5 trigliserid) ve % 50 proteinden oluşur (37,38,42,44). Başlıca apoA-I (% 65), apoA-II (%25) ve az miktarda apoE ve C içerir (42). ApoE HDL alt grubunun (HDL–1) küçük bir komponentidir, fakat plazma apoE'nin yaklaşık % 50'si HDL'de bulunur (34,37). HDL'nin başlıca sınıfları apoE içermez ve böylece LDL reseptörü ile etkileşmez. HDL plazmaya girdiklerinde diğer lipoproteinlere dağıtılmak üzere apoE ve C için bir rezervuar işlevi görür. HDL alt grupları sadece apoAI veya apoAI/II içerebilir (37,38).

Yeni sentezlenmiş veya plazma prekürsör plazma HDL partikülleri apoA-I fosfolipid diskleri halinde bulunur. Diğer lipoproteinlerden veya aşırı kolesterolü olan hücre zarlarından mükemmel serbest kolesterol alıcılarıdır. Bu diskler tarafında sınırlı bir miktar serbest kolesterol tutulabilir. Bununla beraber, kolesterolün uzun bir yağ asidi zinciri ile esterifikasyonu hidrofiliğini önemli ölçüde azaltır ve yeni oluşmuş kolesterol ester disk yüzeyinden uzaklaşarak kolesterol esterden zengin bir çekirdek oluşturur ve diski bir küreye çevirir. Plazma serbest kolesterolü estere dönüştürmekten sorumlu enzim lesitin:kolesterol açıltransferaz (LCAT)'dır (26-29). HDL iki farklı mekanizma ile hücrelerden kolesterol sağlar (42-45): 1) Hücrelerden sulu transfer; serbest kolesterol hücreden HDL partikülüne doğru bir fizikokimyasal konsantrasyon gradyanı izler, bu olaya pasif desorpsiyon denir. 2) Hücre yüzey bağlayıcı protein ile kolaylaştırılmış transport; HDL hücre zarına bağlanır, bu olay özellikle kolesterol içeriği artmış hücreler için geçerlidir. HDL lipidlerin lipoproteinler ve hücreler arasında dağılımını sağlar. HDL hücrelerden kolesterolü alır ve atılım için karaciğere veya kolesterole ihtiyacı olan hücrelere aktarır. Kolesterol ester transfer protein (CETP) VLDL, IDL ve şilomikron artıklarına kolesterol esteri taşır (34,37). Böylece kolesterol VLDL ve şilomikron artıkları yoluyla karaciğere iletilir.

## 2.1.2. Fosfolipidler ve Kolesterol

### 2.1.2.1. Fosfolipidler

Fosfolipidler fosfatidilkolin (lesitin), fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve sifingomiyelin olmak üzere dört gruba ayrılır (34). Fosfolipidler daima bir ya da daha çok yağ asidi molekülü, bir fosfat asidi kökü ile genellikle bir azotlu baz içerirler (40,43,44). Fosfolipidlerin kimyasal yapıları değişmekle birlikte, fiziksel özellikleri birbirine benzer. Çünkü hepsi de lipidlerde erir ve lipoproteinlerle taşınarak hücre membranları ve intraselüler membranların yapısına katılır.

### 2.1.2.2. Fosfolipidlerin Fonksiyonları

Fosfolipidlerin bazı özgül kullanımları şu şekilde sıralanabilir (34,38): 1) Fosfolipidler, kandaki lipoproteinlerin önemli bileşenleridir ve çoğunun oluşumu ve fonksiyonu için gereklidirler. Yokluklarında kolesterol ve diğer lipidlerin taşınmasında ciddi bozukluklar ortaya çıkabilir. 2) Pıhtılaşma olayını başlatan tromboplastin önemli ölçüde sefalinlerden oluşmuştur. 3) Sinir sisteminde büyük miktarlarda sfingomiyelin bulunur. Sinir liflerinin etrafındaki miyelin kılıfında yalıtıcılık görevi yapar. 4) Fosfolipidler, dokulardaki farklı kimyasal reaksiyonlarda gerektiğinde fosfat köklerini verir. 5) Fosfolipidlerin belki de en önemli fonksiyonlarından biri, vucuttaki bütün hücrelerde yapı elemanlarının-başlıca membranların-oluşumuna katkıda bulunmalarıdır.

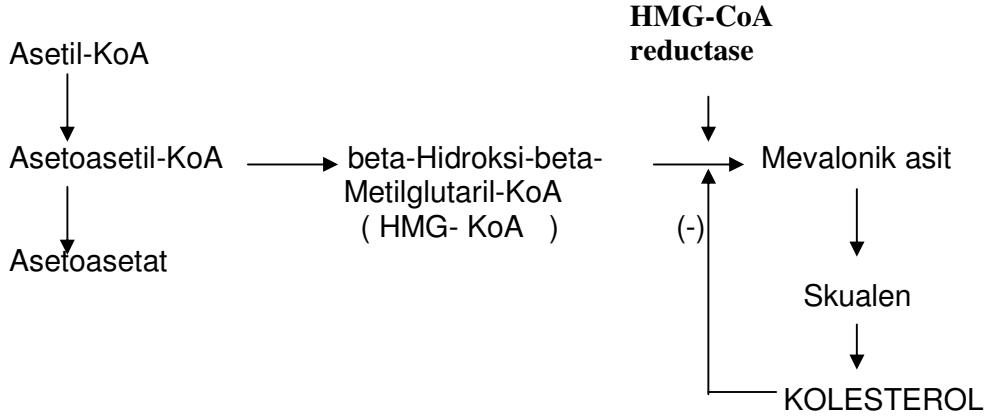
### 2.1.2.3. Kolesterol

Kolesterol yağda yüksek erirlik gösterir ve yağ asitleriyle ester oluşturma yeteneğine sahiptir. Plazma lipoproteinlerinde bulunan kolesterolün yaklaşık %70'i kolesterol esterleri şeklindedir. Vucuttaki total kolesterolün %65'i endojen kaynaklı iken %35'lik kalan kısmı da ekzojen kaynaklıdır (34,40). Endojen kolesterolün hemen tümü karaciğerde yapılırsa da vucuttaki birçok hücrede de bir miktar kolesterol yapılır.

Sadece hayvansal organizmada yer alan kolesterolün esas yapısı asetil-KoA moleküllerinden sentezlenen bir sterol çekirdeğidir (46–48). Kolesterolün çekirdeği siklopentanoperhidrofenantren halkası içerir. Bu halkanın 3. karbon atomuna bir hidroksil (-OH) grubu 5. ve 6. karbon atomları arasında çift bağı, 17. karbon atomuna bağlı 8 karbon içeren bir yan zincir vardır. Bu yan zincirler yardımıyla kolesterol bileşimini oluşturur. Kolesterol sentezi bir feedback mekanizmayla kontrol edilir (Şekil 2.1.) (49). Yükselen kolesterol konsantrasyonu, kolesterolün endojen sentezi için en temel enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril KoA (HMG-KoA) redüktazı inhibe ederek kolesterol konsantrasyonunun aşırı artışı önler (47). HMG-KoA redüktaz, insanda hepatik ve ekstra hepatik kolesterol biyosentezinde hız-kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG-KoA'nın mevalonata dönüşmesi olayını katalize eder.

### 2.1.2.4. Kolesterolün Fonksiyonları

Vucutta kolesterol en çok karaciğerde kolik asit sentezi için kullanılır. Kolik asitte diğer maddelerle birleşerek yağların sindirimi ve absorpsiyonunu hızlandıran safra tuzlarını oluşturur. Kolesterol, böbreküstü bezinde adrenokortikal hormonların, ovaryumlarda progesterone ve östrojen yapımında ve testislerde testosteron yapımında görev alır (34). Büyük miktarlarda kolesterol derinin korneum tabakasında çöker. Böylece öteki lipidlerle birlikte suda eriyen maddelerin absorpsiyonuna ve birçok kimyasal maddenin etkilerine karşı derinin direncini artırır. Ayrıca deriden suyun buharlaşmasını ve ısı kaybını da önler. Kolesterolün belki de en önemli görevi bütün hücrelerin, hücre membranının yapısı ve fonksiyonu için çok önemli bir madde olmasıdır (40). Vucuttaki kolesterolün yaklaşık %93'ünün hücrelerde olup sadece %7'sinin plazmada olması da buna en iyi kanıttır.



**Şekil 2.1.** Kolesterol biyosentezi (Kaynak 47'den alınmıştır)

### 2.1.2.5. Plazma Kolesterol Konsantrasyonunun Düzenlenmesi

Plazma kolesterol konsantrasyonu endojen (biyosentez) ve ekzojen kolesterol metabolizmasının dengesiyle kontrol edilir (38,40). Endojen yolakta kolesterol karaciğer tarafından sentez edilir ve kana verilir. Dolaşım ile ekstrahepatik dokulara taşınır. Ekzojen yolakta ise besinlerle alınan kolesterol ince barsaklardan dolaşıma geçer. Dolayısıyla her iki mekanizmadaki değişiklikler plazma kolesterol konsantrasyonunu etkiler (40). Plazma kolesterol konsantrasyonunun düzenlenmesi ile ilgili yollar Şekil 2.2'de özetlenmiştir.

Ekzojen yolak, besin kaynaklı kolesterol ve trigliseridlerin barsaklardan absorpsiyonu ile başlar. Absorpsiyondan sonra trigliseridler ve esterleşmiş kolesterol barsak mukoza hücrelerinde çeşitli apoproteinler, fosfolipidler ve esterleşmemiş kolesterolle birleşerek şilomikron adı verilen yapıyı oluştururlar. Şilomikronlar lipoprotein lipazla etkileşime girerek trigliseridlere ve serbest yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitleri kapiller endotel hücrelerini geçerek ya adipositlerde depo edilir ya da iskelet kasında oksidasyona uğrar. Geriye kalan şilomikron kalıntıları hepatik hücrelerce alınır. Lizozomlarında katabolize edilir ve sonunda kolesterol açığa çıkar. Bu kolesterol ya safra asitleriyle dönüşüme uğrar ya da VLDL aracılığıyla dolaşıma katılır.

Karaciğer serbest yağ asitlerini ve karbonhidratları kullanarak sürekli trigliserid sentezler. Bu endojen trigliseridler dolaşımdaki VLDL ile birleşir. VLDL, lipoprotein lipaz ile kapiller endotelinde hidroliz edilir ve kolesterol esterlerinden zengin küçük VLDL partikülleri ve serbest yağ asitleri oluşur. VLDL kalıntıları kolesterolden zengin LDL ile birleşir. Bu LDL, reseptör aracılığıyla periferdeki hücreler tarafından alınır. Lizozomlarda parçalanmış LDL'den açığa çıkan kolesterol hücre membranının yapısına katılır ya da çeşitli metabolik olaylar için kullanılır (38,40,42). LDL kolesterol miktarı hücreler tarafından gerçekleştirilen şu mekanizmalarla kontrol edilir (46, 47): 1) LDL kolesterol yükseldiği zaman, hücrelerde HMG-KoA redüktaz

enziminin sentezi azalır. 2) Hücrelerde kolesterol depolanır. 3) Hücrelerde LDL reseptör sentezinde azalma olur.

Hücrelerde trigliseridlerden zengin lipoprotein katabolizmasıyla açığa çıkan kolesterol esterler, karaciğerden sentezlenen ve HDL'nin yüzeyindeki LCAT ile etkileşerek kolesterol esterleri tekrar LDL'lere transfer eder. Bu mekanizmayla periferdeki hücrelerden alınan kolesterol, HDL aracılığı ile tekrar karaciğere gider ve orada depolanır (26, 27, 43).

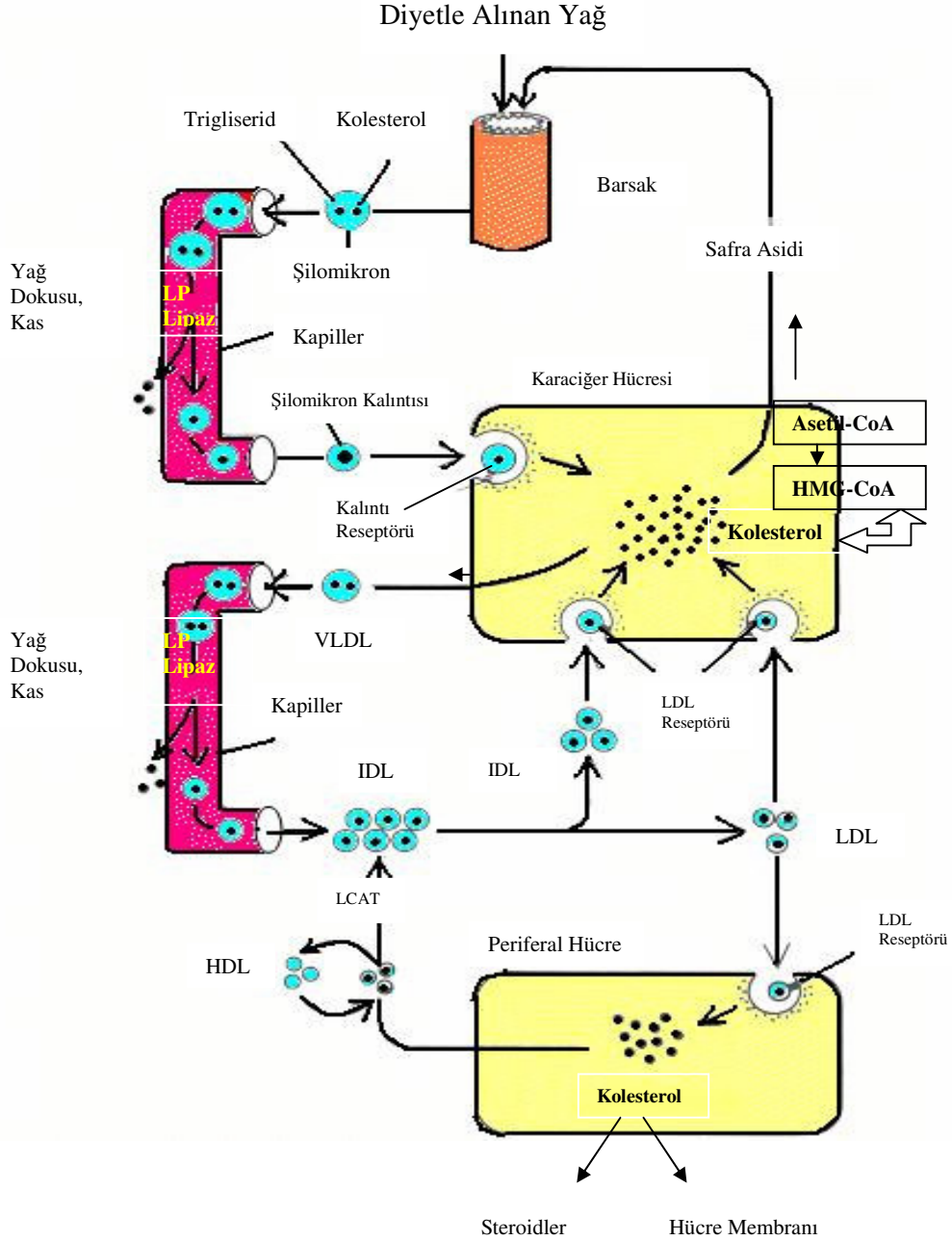
### **2.1.3. Plazma Kolesterol Düzeyi ve Önemi**

Plazma kolesterol seviyesinin yükselmesine hiperkolesterolemi (>200 mg/dL) denir. Primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. Primer hiperkolesterolemi genetik temelli, hatalı apoprotein sentezi, reseptör eksikliği veya reseptör fonksiyonundaki hatalardan kaynaklanır. Örneğin, familial hiperkolesterolemi (tip 2A) LDL reseptör yetersizliği veya bozukluğunda ortaya çıkar (50,51). Sekonder hiperkolesterolemi ise obezite, yüksek kalori alımı, diabetes mellitus, inaktivite ve sigara ile ilişkili görülmekte, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişim göstermektedir (52,53).

Gelişmiş ya da gelişmekte olan birçok toplumda koroner kalp hastalıklarına yakalanma ve bu hastalıklardan ölüm riski çok yüksektir. Ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları yüksek plazma kolesterol seviyesiyle başka bir deyişle plazma LDL seviyesi ile yakından ilişkilidir (22).

Aterosklerozun seyirinde olumlu yönde bir değişiklik yapabilmek için temel ilke lipoprotein profilinin normalleştirilmesi olmalıdır. Bu nedenlerden dolayı günümüzde, koroner kalp hastalığı kanıtlanmış hastalarda sıklıkla LDL-kolesterol değerlerinin mutlaka 100 mg/dl'nin altında tutulması istenmektedir. Bu durum, özellikle HDL-kolesterol düşüklükleri için geçerlidir. Mevcut çalışmaların sonuçlarına göre en fazla yarar, tedavi ile LDL-kolesterol değerleri en fazla düşürülmüş ve HDL-kolesterol değerleri en fazla yükseltilmiş olan kişilerde elde edilmiştir. Son yıllarda bu konuyla ilişkili çok sayıda çalışmanın (LIPID, ASAP,4S) sonuçları yayımlanmıştır (23–25). PROCAM çalışmasında 20.000 olguda HDL kolesterolün erkeklerin %18'inde, kadınların %25'inde düşük olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada total kolesterol/HDL yerine LDL/HDL oranı kullanılmış, bu oranın >5 olması durumunda, <5 olanlara göre koroner kalp hastalığı riskinin 5 misli arttığı bulunmuştur (54).

Bu nedenle plazma kolesterol düzeyinin düşürülmesi, ateroskleroz ve komplikasyonlarının önlenmesi için gereklidir. Hiperkolesterolemiye bağlı olarak meydana gelen ateroskleroz kişileri miyokard enfarktüsü ve ciddi kardiyovasküler hastalıklara açık hale getirir (55). Plazma LDL düzeyi 130 mg/dL (3,4 mmol/L)'nin üstünde, HDL düzeyi 35 mg/dL (0,9 mmol/L)'nin altında olması durumunda koroner kalp hastalıkları ve ateroskleroz gelişimi riski artar (55). LDL/HDL oranı ateroskleroz riskini değerlendirmede kullanılan en önemli biyokimyasal parametredir. Bu oranın (LDL/HDL) ideal değeri 3'ün altında olmasıdır.



**Şekil.2.2.** Plazma kolestrol konsantrasyonunun ekzojen ve endojen yollara düzenlenmesi (Kaynak 47'den modifiye edilmiştir).

Kolesterolün depo edilmesi ya da parçalanacak olmasındaki en belirleyici ilişkinin LDL/HDL kolesterol oranı olduğu kabul edilmektedir. Plazma HDL-kolesterolü düzeyi ile trigliserid düzeyi arasında ters orantı vardır. Şöyle ki trigliserid düzeyi yükselince HDL tigliseridden zenginleşir ve hepatic trigliserid lipaz tarafından yıkımı yani HDL katabolizması artar ve düzeyi azalır. Düşük HDL'nin başlıca sebepleri; trigliserid artışı, kilo artışı ve obezite, fiziksel inaktivite, tip 2 diyabet,



sigara, çok fazla karbonhidrat alımı (>%60 enerji) ve bazı ilaçlar (beta-blokerler, anabolik steroidler)'dir (56). Koroner kalp hastalığı kanıtı olmayan erişkinlerde plazma total kolesterol, LDL, HDL ve trigliserid düzeylerinin derecelendirilmesi Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar HDL seviyesi ile ateroskleroz arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (52,58). Kardiyak risk oranı, total kolesterolün HDL-kolesterole bölümüyle bulunur (40,42). Bölme sonucu çıkan değer >7 ise risk çok büyüktür. Normal değer 4–5 arasındadır. Fakat kardiyak risk açısından en iyi değer 2–3 olduğu söylenmektedir (42,43). LDL-kolesterol seviyesini 80 mg/dL'nin altına indirmenin, daha önceden damar duvarına sıvanmış kolesterolün yerinden sökülüp uzaklaştıracağını ve ateroskleroz ve kalp krizi riskini azaltacağı bildirilmiştir (47). Çünkü HDL plazmadan trigliseridlerin ve kolesterolün temizlenmesinde ve kolesterolün dokulardan karaciğere geri taşınmasında ve metabolizmasında önemli rol oynar. Oysaki LDL, kolesterolü karaciğerden perifere doğru taşır, membranların sentezinde kullanır ve hücrenin kolesterol dengesi ile ilgili olayları etkileyerek hücreye kolesterol alımını, sentezini ve depolanmasını düzenler (59).

Kan kolesterol seviyesinin düşmesine ise hipokolesterolemi denir. 130 mg/dl'den düşük kolesterol düzeyleri ise hipokolesterolemi olarak kabul edilebilir (60). Hipokolesterolemi, kritik durumdaki hastalarda kötü prognoz habercisidir. Yani hastalığın muhtemelen seyrini, süresini ve hastalığın sonu hakkında önceden tahmin etmede büyük katkıları bulunur. Orak hücre anemisi (61,62), kemik mineral dansitite bozuklukları (63), demir eksikliği anemisi (64), aplastik anemi (64), lösemi (65), beta-talesemi (66) ve hemodiyaliz hastalarında (67), ayrıca ciddi cerrahi müdahalelerde ve sonrasında gelişebilen enfeksiyonlarda, ağır travmalardan ve yanıklardan sonra (68) hipokolesterolemi gözlenebilir. Hipokolesterolemi çeşitli morfogenezik, iç organ, iskelet ve deri anormallikleriyle karakterizedir ve özellikle yaşlılarda ve kritik durumdaki hastalarda önemli bir ölüm nedenidir (63,67,68).

### **2.1.3.1. Ateroskleroz**

Lipidler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren intimal plaklara bağlı olarak meydana gelen, ilerleyici arteriyel darlık ve tıkanmalara, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan hastalığa ateroskleroz denir. Başlıca ateroskleroz nedenleri arasında (42,43); 1) İnflamasyon (yangı), 2) enfeksiyon ajanları (Chlamydia pneumonia), 3) hiperlipidemi, 4) hipertansiyon, 5) alkol kullanımı, 6) sigara ve tütün kullanımı, 7) obezite, 8) dengesiz ve yanlış beslenme alışkanlıkları ve aşırı hareketsizlik sayılabilir. Aterosklerozun neden olduğu başlıca klinik durumlar ise, koroner arter hastalığı, periferik damar hastalıkları, inme ve diğer serebrovasküler olaylar ve renal vasküler hipertansiyondur (47,48).

Ateroskleroz ve onun en yaygın ve ölümcül sonucu olan koroner kalp hastalığı ile hiperkolesterolemi arasında çok yakın bir ilişki bulunmaktadır (22). Özellikle LDL ve VLDL bu aterojeniteden sorumludur. Bu hipotezle ilgili olarak (43,47,48); 1) arter duvarında kolesterol birikmesi hem deneysel hem de insanlardaki aterosklerozun en belirgin bulgusudur, 2) çeşitli deney hayvanlarında plazma kolesterolünün yükseltilmesi ile ateroskleroz oluşturulabilir, 3) plazma kolesterolü yüksek kişiler, erken yaşta koroner kalp hastalığına yakalanmakta ve erken yaşta ölmektedir, 4)

LDL reseptör eksikliği olan ailesel hiperkolesterolemili hastalarda, plazma kolesterol düzeyleri yükselmekte ve koroner kalp hastalık sıklığı artmaktadır, 5) plazma kolesterolü diyet ve ilaç tedavisi ile düşürüldüğünde koroner kalp hastalık riski de azalmaktadır. Ateroskleroz, ilerleyici arteriyel darlık ve tıkanmalara, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan, lipitler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren ve intimal plaklara bağlı olarak meydana gelen bir hastalık olarak değerlendirilir. Ateroskleroz tüm arteriyel yapıları etkileyen nedenleri tespit edilip tedavi edilebildiği takdirde durdurulabilen veya geriletebilen multifaktöryel sistemik bir hastalıktır.

**Çizelge.2.3.** Koroner kalp hastalığı kanıtı olmayan erişkinlerde plazma total kolesterol, LDL, HDL ve trigliserid düzeylerinin derecelendirilmesi (Kaynak 57'dan alınmıştır).

Kolesterol tipi veya türü	Düzy
<b><u>Total kolesterol</u></b>	
İstenilen.....	< 200 mg/dL
Sınırdaki yüksek.....	200 mg/dL
Yüksek.....	≥ 240 mg/dL
<b><u>LDL-kolesterol</u></b>	
İstenilen.....	< 100 mg/dL
İstenilene yakın.....	100-129 mg/dL
Sınırdaki yüksek.....	130-159 mg/dL
Yüksek.....	160-189 mg/dL
Çok yüksek.....	≥ 190 mg/dL
<b><u>HDL-kolesterol</u></b>	
Düşük.....	< 40 mg/dL
Yüksek.....	≥ 60 mg/dL
<b><u>Trigliserid</u></b>	
Normal.....	< 150 mg/dL
Sınırdaki yüksek.....	150-199 mg/dL
Yüksek.....	200-499 mg/dL
Çok yüksek.....	≥500 mg/dL

Epidemiyolojik çalışmalar HDL-kolesterolünün 1 mg/dL arttırılmasının koroner kalp hastalıkları riskini %2–4 arasında düşürdüğünü göstermiştir (43). HDL'nin ateroskleroza karşı koruyucu etkilerinin mekanizması ters kolesterol transportu ve antioksidan aktivite ile sağlanır. Ters kolesterol transportu ile (47); 1) Arter

duvarından kolesterolün uzaklaştırılması, 2) Yeni plaklarda büyümenin inhibisyonu, 3) Mevcut plakların stabilitesinde artma, 4) Plak rüptürünün inhibisyonu sağlanırken, antioksidan aktivite ile 1) LDL'nin oksidasyona karşı korunması, 2) Adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda azalma, 3) Vasküler endoteliumun bütünlüğünün korunması sağlanmaktadır.

#### **2.1.4. Plazma Kolesterol Seviyesinin Düşürülmesi**

Plazma lipid konsantrasyonları, diyet gibi çevresel faktörler ya da normal sentez veya yıkımlarındaki genetik defektler nedeniyle yükselebilir. Genel olarak yüksek kolesterol konsantrasyonunun (hiperkolesterolemi) tedavisinde ilaçlar şu amaçlarla kullanılır: 1) dokuların lipoprotein sentezinin azaltılması, 2) plazma lipoprotein katabolizmasının artırılması ya da 3) vücuttan kolesterolün atılımının artırılması (hayvan deneyleri fibratların, karaciğerde kolesterol sentezini azaltarak ve safra ile feçese atılmasını sağlayarak kolesterolün plazma konsantrasyonunu azaltabildiklerini göstermektedir).

Bu tedaviler ateroskleroz gelişimini ve ilerlemesini yavaşlatarak özellikle koroner kalp hastalığı riskini azaltır. Bu nedenle plazma kolesterol düzeyinin düşürülmesi, ateroskleroz ve komplikasyonlarının önlenmesi için gereklidir. HMG-KoA redüktaz inhibitörleri, niasin ve safra asidi bağlayan ilaçlar tedavide birinci sırada yer alan ilaçlardır. Fibrik asit türevleri, probukol ve diğerleri ise ikinci sırada tercih edilen ilaç grubunu oluştururlar. Hiperkolesterolemik hastalarda en yaygın olarak kullanılan ilaç grubu HMG-KoA redüktaz inhibitörleridir (39).

##### **2.1.4.1. Redüktaz İnhibitörleri**

HMG-KoA redüktaz inhibitörleri statinler (atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin ve simvastatin) lipoprotein metabolizma bozukluklarında, ateroskleroz ve komplikasyonlarında kullanılan ilaçlardır. Kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan HMG-KoA'nın mevalonik asite dönüşmesini inhibe ederler (39).

Atorvastatin sentetik bir lipid dışürücü ajandır. Endojen kolesterol metabolizması üzerine etkilidir. İnsanda plazma yarılanma ömrü yaklaşık 14 saattir ve yarı ömrü doza bağlı değildir (39). Homozigot ve heterozigot familial hiperkolesterolemi, hiperkolesteroleminin non-famlyal tipleri ve karma dislipidemisi olan hastalarda atorvastatin total kolesterolü, LDL-kolesterolü doza bağlı olarak çeşitli oranlarda düşürür (69). Atorvastatin HMG-KoA redüktazı inhibe ederek plazma kolesterolü ve lipoprotein düzeylerini diğer statinlere oranla daha fazla düşürür ve karaciğerdeki kolesterol sentezini azaltır. Ayrıca LDL'nin artmış alımı ve katabolizması için hücre yüzeyindeki hepatik LDL reseptörlerinin sayısını artırır (69). Çizelge 2.4'de ve Çizelge 2.5'de farklı dozlarda statinlerin LDL-kolesterol konsantrasyonunda ve aynı dozda farklı statinlerin plazma lipid değerlerinde meydana getirdiği azalmalar yüzde olarak ifade edilmiştir.

Atorvastatinin plazma kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü çeşitli hayvan ve klinik çalışmalarda ortaya konmuştur: Ortalama yaşları 63 olan, normal plazma kolesterol profiline sahip, hipertansiyon hastalarının (n=5000) 1,5 yıl atorvastatin (10 mg/gün) kullanmasıyla LDL-kolesteroleri ortalama 1,3 mmol/L'ye (yaklaşık

olarak 50 mg/dL) düştüğü saptanmıştır (70). Atorvastatin kullanan gruptaki kişilerde ölümcül ya da ölümcül olmayan kalp krizlerinde %36, inmelerde ise %27'lik bir azalma gözlenmiştir (70).

**Çizelge.2.4.** Farklı dozlarda statinlerin LDL-kolesterol konsantrasyonunda meydana getirdiği azalmalar (Kaynak 53 ve 66'den alınmıştır).

Farklı dozdaki statinlerin plazma <b>LDL</b> konsantrasyonunda meydana getirdiği azalmalar				
Statin	Lovastatin	Pravastatin	Simvastatin	Atorvastatin
<b>Doz</b>				
<b>10 mg</b>	---	- % 19	- % 28	- % 38
<b>20 mg</b>	- % 29	- % 24	- % 35	- % 46
<b>40 mg</b>	- % 31	- % 34	- % 40	- % 51
<b>80 mg</b>	- % 48	- % 40	- % 48	- % 54

Atorvastatinin plazma LDL-kolesterol seviyesini kobayda doza bağlı olarak düşürdüğü deneysel olarak gösterilmiştir [1 mg/kg /gün %46 (71), 10 mg/kg/gün %48, 20 mg/kg/gün %61 (72)]. 3 mg/kg/gün atorvastatin uygulamasından sonra kobayda plazma total kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid ve VLDL-kolesterol konsantrasyonları sırasıyla %16, %31, %19 ve %28 oranında düşmüştür (73).

**Çizelge.2.5.** Aynı dozda (20 mg) farklı statinlerin plazma lipid değerlerinde meydana getirdiği değişiklikler (Kaynak 53 ve 66'den alınmıştır).

	Lovastatin	Pravastatin	Simvastatin	Atorvastatin
<b>Total kolesterol</b>	- % 18	- % 17	- % 26	- % 32
<b>LDL-kolesterol</b>	- % 25	- % 25	- % 36	- % 44
<b>HDL-kolesterol</b>	% 4	% 7	% 7	% 4
<b>Trigliserid</b>	- % 11	- % 8	- % 17	- % 25

## 2.2. Kanın Akışkanlık Özellikleri Ve Önemi

Kan dokusu, sıvı mekaniği açısından oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Tanım olarak kan, "*non-Newtonien-shear thinning*" bir sıvıdır (2). Bu tür sıvıların viskoziteleri sabit olmayıp, akım koşullarına göre değişir. Basit (Newtonien) sıvılarda kayma hızı (shear rate) ile kayma kuvveti (shear stress) arasında doğrusal bir ilişki vardır ve bu iki parametreyi birbirine bağlayan sabit, sıvının viskozite

değeridir (74,75). Kan gibi non-Newtonien sıvılarda ise kayma hızı-kayma kuvveti arasındaki ilişki doğrusal olmayıp sıvının viskozitesi kayma hızına bağlı olarak değişir. Kan, viskozitesi kayma hızı arttıkça azaldığı için "*shear thinning*" bir sıvıdır (2).

Kanın bu çok özel reolojik davranışı iki fazlı olan özel yapısından kaynaklanır. Plazmadan oluşan bir sıvı faz ve onun içinde yer alan hücresel elamanlardan oluşan kan dokusunun akışkanlığı fazların reolojik özelliklerine ve bu iki fazın birbirine oranına bağlıdır (2,75). Dolayısıyla hematokrit değeri kan viskozitesinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Hematokrit değeri ile kan viskozitesi arasında üstel bir ilişki vardır. Özellikle %50'nin üzerindeki hematokrit değerlerinde kan viskozitesi önemli ölçüde artar (2,76).

Kanın akışkanlığı hücresel bölümünün %98'ini oluşturan eritrositlerin reolojik özellikleriyle de yakından ilişkilidir. Eritrositlerin şekil değiştirme (deformabilite) yetenekleri sayesinde çok yüksek hematokrit değerlerinde bile kan akışı sağlanabilmektedir (3, 77, 78). Eritrositlerin bir başka önemli özellikleri de agregere olabilmeleridir. Damar yatağında kayma kuvvetleri belli bir kritik değer altına indiğinde eritrositler agregere olarak kanın akışkanlığının azalmasına sebep olabilirler. Kayma kuvvetlerinin arttığı koşullarda ise eritrosit agregatları parçalanır (75). Belirli bir değere ulaşıncaya kadar, kayma hızı artışı kan viskozitesinde azalmaya sebep olur. Kayma hızı büyük arterlerdeki seviyesine ulaştığında ise eritrosit agregatları parçalanır ve bu noktadan sonra, kan viskozitesi kayma hızından bağımsız hale gelir; yani kan Newtonien bir sıvı gibi davranmaya başlar. Böylece eritrosit agregasyonu da kanın non-Newtonien davranışının belirlenmesinde önemli rol oynar (1).

### **2.2.1. Kitle Halinde Kan Akımı**

Kan dokusunun bir bütün olarak davranabilmesine izin verecek ölçüde büyük boyuttaki damarlarda kan, tam olarak iki fazlı bir süspansiyon özelliğindedir (2). Bu koşullarda, damar sisteminin geometrik özelliklerine, kanın fiziksel özelliklerine ve akım hızına bağımlı olarak laminer veya türbülant karakterde akım görülebilir. Laminer akım, sıvı tabakalarının birbiri üzerinde kayması şeklinde gerçekleşen düzenli, hidrolik direncin düşük olduğu bir akım şeklidir (79). Fizyolojik koşullarda damar sisteminin büyük bir bölümünde kan akımı laminer karakterdedir. Damar geometrisindeki yerel değişikliklere, kan akım hızındaki ani artışlara bağlı olarak kan akımı türbülant hale dönüşebilir. Bu koşullarda akım direnci de artar.

Laminer akım koşullarında sıvının akışkanlığı, sıvı tabakaları (laminalar) arasındaki sürtünme kuvvetiyle yakından ilişkilidir. Kan dokusu gibi iki fazlı sıvılarda, birinci faza (plazma) ait laminalar arasındaki sürtünme ikinci fazı oluşturan parçacıkların bu laminaları ne ölçüde distorsiyona uğrattığı ile yakından ilişkilidir (79). Kanın hücresel elemanlarından oluşan ikinci fazdaki parçacıkların kolay şekil değiştirebilen bir özellikte olmaları onların laminer akım çizgilerine oryantasyonunu kolaylaştırarak tabakalar arasındaki sürtünmeyi, dolayısıyla sıvının viskozitesini azaltır (1,2,79). Zıt olarak, eğer laminalar arasında yer alan parçacıkların büyüklüğü artarsa, tabakalar arasındaki sürtünme ve viskozite artar (80, 81).

### 2.2.2. Kapiller Kan Akımı (Mikrodolaşım)

Dolaşım sisteminde kapiller damarlar 3–8 µm çaptadır. Bu koşullarda kanın bütün olarak iki fazlı bir sıvı sistemi gibi düşünülmesi olanaksızdır. Bunun yerine, kanın hücresel elemanlarının ve plazmanın mikrodolaşımdaki davranışları ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Yer yer kan hücrelerinin boyutlarından daha küçük bir çapa sahip olabilen bu damarlardaki akım hızı, büyük ölçüde kan hücrelerinin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilite) ile yakından ilişkilidir (3).

### 2.3. Eritrositler

Eritrositler başlıca görevleri solunum gazlarının taşınması olan ileri derecede özelleşmiş hücrelerdir (4). Ortalama hacmi yaklaşık 90 femtolitre (fL), ortalama yüzey alanı 140 µm<sup>2</sup> olan eritrositler kemik iliğinde üretilirler ve periferik dolaşıma katılmadan önce çekirdeklerini kaybederler (3, 4). Diğer organelleri de dolaşımda birkaç gün içinde kaybolur. Çekirdek, mitokondri, ribozomlar gibi sitoplazmik organellere sahip olmayan eritrositler protein sentezi yapamaz, mitokondri ile ilişkili oksidatif reaksiyonları gerçekleştiremez ve mitozu uğrayamazlar (4). Böylece eritrositler, protein ve elektrolitleri çevreleyen basit bir membrandan ibaret olarak tanımlanabilirler. Sitoplazmik proteinlerin %95'inden fazlasını hemoglobin (Hb) oluşturur. Eritrositlerin sahip olduğu bikonkav disk şekli fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için çok uygundur. Bu özel şekil sayesinde, hücre yüzeyinin hacmine oranı mümkün olan en yüksek değere ulaşmakta ve böylece gaz transferi kolaylaşmaktadır. Ayrıca bikonkav disk yapısının küreye göre şekil değiştirme yeteneğinin daha fazla oluşu eritrositlerin mikrodolaşımda optimal hareketlerinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (4, 6). Küçük damarlarda eritrosit hareketleri gözlemlendiğinde bikonkav diskin akım yönünde oriente olarak, yandan bakıldığında paraşüte benzer bir şekilde ilerlediği görülür. Böylece şekil değiştirebilen eritrositler, maksimum çapı 4 µm olan damarlardan rahatça geçebilmektedirler (4).

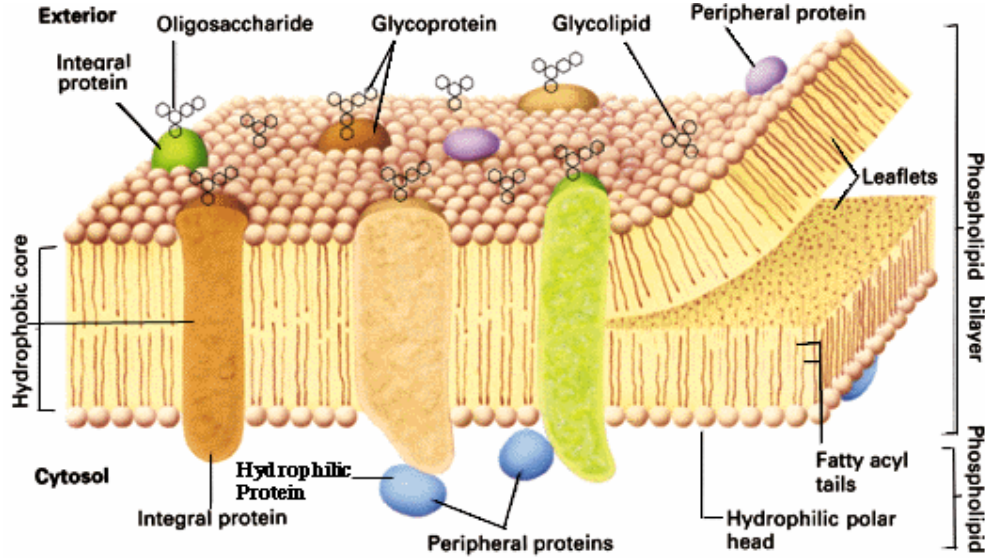
Normal eritrosit bikonkav disk şeklinin sağlanması ve korunmasında rol oynayan faktörler şunlardır: 1) membrandaki elastik güçler 2) yüzey gerilimi 3) membran yüzeyindeki elektriksel potansiyel 4) ozmotik veya hidrostatik basınçlar ve 5) yüzey/alanı hacim ilişkisi. Ayrıca hücre şeklinin korunmasında eritrositlerin içinde buldukları ortamın özellikleri de büyük önem taşımaktadır (4).

#### 2.3.1. Eritrosit membranı

Hücre bütünlüğünün, bikonkav disk yapısının ve eritrositlerin şekil değiştirebilme yeteneğinin sağlanması ve korunmasında eritrosit membranın çok önemli rolü vardır (4,5,82,83). Sıvı-mozaik modele uygunluk gösteren eritrosit membranı çok esnek olup kendisine uygulanan kuvvetlere yapısal bütünlüğü bozulmadan büyük şekil değişiklikleri yapacak şekilde hızlı cevaplar verebilir (4, 5). Membran ağırlığının yaklaşık %52'sini proteinler, %40'ını lipidler, %8'ini ise karbohidratlar oluşturur (Şekil 2.3) (4, 7, 8). Karbohidratların büyük çoğunluğunu glikoproteinler, %7'lik küçük bir kısmını ise glikolipidler oluşturur (4).

Eritrosit membranın ileri derecede esnek lipid tabakası (transmembran proteinlerle beraber) daha çok hücrenin dış ortamdan izolasyonundan sorumluyken,

rijid yapıdaki iskelet protein ağı eritrosit membranının stabilitesini sağlayarak, şekil değiştirme yeteneğine büyük oranda katkıda bulunur (5,83).



Şekil.2.3. Eritrosit membranının şematik yapısı (Kaynak 42'den alınmıştır).

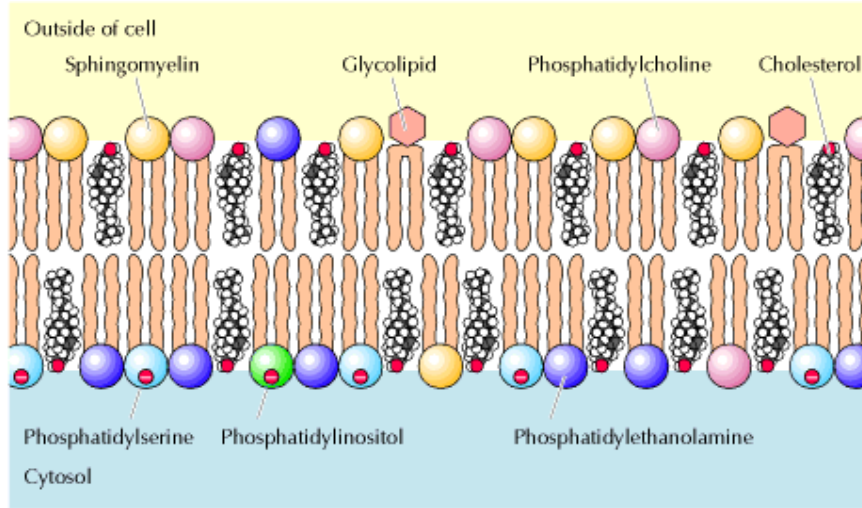
### 2.3.1.1. Eritrosit membran lipidleri

Eritrosit membran lipidlerinin önemli bir bölümünü esterleşmemiş kolesterol (%47.1) ve fosfolipidler (%49.5) oluşturur (4,84). Membran fosfolipid içeriğinin büyük kısmını fosfatidilkolin (%30), sfingomyelin (%25), fosfatidiletanolamin (%28) ve fosfatidilserin (%14) oluştururken, kalan %2-3'lük kısımdan fosfatidik asit, fosfatidilinozitol 4-fosfat ve fosfatidilinozitol 4,5-difosfat sorumludur (Şekil 2.4) (84). Bu fosfolipidler membranın iki lipid tabakasında asimetric olarak yerleşmiş olup, kolin içeren nötral fosfolipidler olan fosfatidilkolin ve sfingomyelinin %75'inden fazlası lipid tabakasının dış katmanında bulunur. Negatif yüklü fosfolipidler olan fosfatidiletanolaminin % 80'i ve fosfatidilserinin tümü ise iç tabakada yerleşmiştir (4, 83, 84). Yağ asitlerinin uzunluğu ve doymuşluk derecesi zar akışkanlığını belirleyen iki önemli faktördür. Membran lipidlerinin ikinci önemli kısmını oluşturan kolesterol, fosfolipidlerle etkileşerek ortak yapının ara jel haline dönüşmesini sağlar (4). Kolesterol, membran akışkanlığını olumsuz yönde etkileyen lipid komponentidir.

**Fosfolipidler:** Üç karbonlu bir alkol olan gliserolden veya daha karmaşık bir alkol olan sfingozinden köken alırlar. Gliserolden türeyen fosfolipidler, fosfogliseridler olarak da adlandırılabilirler. Bir fosfogliserid; iki yağ asidi zinciri ve bir fosforile alkolün ester bağı ile bağlandığı bir gliserol omurgasından oluşur (85,86).

Fosfogliseridlerdeki yağ asidi bileşenleri genellikle çift karbonlu olup, en sık olarak 16 veya 18 karbon içerirler. Yağ asitlerindeki hidrokarbon zinciri dallı değildir

ve yağ asitleri doymuş veya doymamış olabilirler. Fosfolipidlerde gliserolün 1. ve 2. karbonundaki hidroksil grupları, iki yağ asidi zincirinin karboksil grupları ile bağlanmıştır. Oluşan bileşik, en basit fosfolipid olan fosfatidik asit (1,2 diaçilgliserol 3-fosfat)' dir. Fosfatidik asit, membranlarda çok az miktarlarda bulunsa da diğer fosfolipidlerin biyosentezinde anahtar rolü oynamaktadır. Fosfatidik asitin fosfat grubu, çeşitli alkollerin hidroksil grupları ile esterleşebilir. Bu alkoller; serin, etanolamin, kolin, gliserol veya inozitoldür. Oluşan fosfolipidler ise fosfatidil serin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil kolin ve fosfatidil inozitoldür (86).



**Şekil. 2.4.** Plazma membranı lipid komponentleri (Kaynak 42'den alınmıştır)

Membranlarda gliserolden türemeyen tek fosfolipid sfingomyelindir. Sfingomyelinin omurgası olan sfingozin, doymamış uzun bir hidrokarbon zinciri içeren bir amino alkoldür. Sfingomyelinde sfingozinin amino grubu, bir yağ asidine amid bağı ile bağlanmıştır. Sfingozinin primer hidroksil grubu, fosforilkolinle esterleşmiştir (86).

Fosfolipidler membrana üç reaksiyonla eklenebilirler. Bu reaksiyonlar şunlardır: 1) Albümine bağlı lizofosfolipidin membrana transferi ve tam fosfolipid formuna açılması (87), 2) İki lizofosfolipid molekülünün birleşmesiyle plazmaya geri dönebilen bir fosfolipid ve gliserilfosforil kolin oluşması (88), 3) Bir yağ asidinin lesitinden lizofosfatidil etanolamine transaçilasyonu ile fosfatidil etanolaminin oluşması (88).

**Glikolipidler:** Glikolipidler sfingozinden köken alan ve şeker içeren lipidlerdir. Kendisi gibi sfingozinden türeyen sfingomyelinden farkı, sfingozinin primer hidroksil grubuna bağlı bir karbonhidrat ünitesinin olmasıdır. En basit glikolipid olan serebrozid, tek bir heksoz bölümünü (glikoz veya galaktoz) taşır. Gangliyozid gibi daha kompleks glikolipidlerde üç veya daha fazla şeker içeren dallı bir zincir, sfingozinin primer alkol grubuna bağlanmıştır (86).



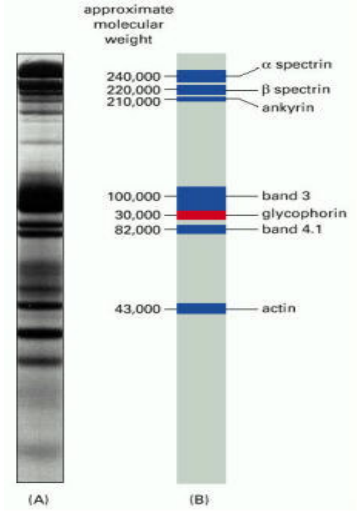
En çok bulunan eritrosit glikolipidi globoziddir. Globozid, 4 heksoz ünitesinden oluşur. İntrasellüler organellerin membranlarında bulunmayıp, sadece eritrosit membranının bir komponentidir. Eritrosit glikolipidlerinin yüzey yapıları antijenik aktivite gösterir ve A, B, H ve Lewis kan grupları ile ilişkilidir (88). Glikolipidlerin kemik iliğinde sentezlendiği ve kırmızı kan hücrelerinin dolaşıma salınmadan önce membranın yapısına girdiği sanılmaktadır (88).

**Kolesterol:** Kolesterol, eritrosit membranında varlığı bilinen en önemli nötral lipiddir. Ökaryotik hücrelerin plazma membranları, genelde kolesterolden zengin iken, organellerinin membranları bu nötral lipidi daha az oranlarda içermektedir (86). Serbest kolesterol eritrosit membranının dış tarafında daha çok bulunur (89). Serbest kolesterol hücre membranı ve plazma fosfolipidleri arasında iki yol ile değişmektedir. Birinci yolda basit denge difüzyonu gerçekleşmektedir. Bir molekül membran kolesterolü plazmaya geçerken, bir molekül plazma kolesterolü membrana geçer (90). Kolesterolün ikinci değiş-tokuş mekanizması, membranlar ve plazma lipoproteinleri arasındaki kolesterol dağılımına bağlıdır. Kolesterol hem lipoproteinlerde hem de membranlarda fosfolipidler gibi polar lipidlerin yardımı ile çözünebilir. Kolesterolün, membran ve plazma fosfolipidleri arasındaki dağılımı, kolesterol/fosfolipid oranı ile tanımlanır (90,91). Kolesterol/fosfolipid oranındaki değişiklikler membran stabilizasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir.

**Kolesterol Düzeyi ve Eritrosit Arasındaki İlişki:** Eritrositler endojen olarak lipid sentezi yapamadıkları için membran lipid kompozisyonları, plazma lipid konsantrasyonundan direkt olarak etkilenir. Eritrosit membranı ile plazma arasında kolesterol ve dış tabakada yer alan fosfolipidlerin değiştirilmesi söz konusudur (26–30). Bu değişim bir plazma enzimi, LCAT tarafından etkilenir. LCAT, lesitinden kolesterole bir yağ asidi transfer ederek kolesterol esteri ve lysolesitin oluşturur. Reaksiyonun iki ürünüde eritrosit membranı tarafından alınamaz (26–30). LCAT aktivitesinin çeşitli nedenlerle azalması halinde eritrosit membranı tarafından alınabilecek serbest kolesterol ve lesitin miktarı artar. Bunun sonucunda ortaya çıkacak membran kolesterol/ fosfolipid oranı değişimi membranın membranın akışkanlığını etkiler. Diğer taraftan membranın sürekli kolesterol ve lesitin kazanması sonucu membran yüzeyi genişler. Tersine LCAT aktivitesi yüksek olursa eritrosit membranından kolesterol kaybedilir ve membran yüzeyi küçüldüğünden hücrelerin normal bikonkav diskoid yapıları bozulur, küresel şekil alırlar (27–29).

### 2.3.1.2. Eritrosit membran proteinleri

Membran proteinleri genellikle eritrosit membranları sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamele edildikten sonra poliakrilamid jel elektroforezi yapılmak suretiyle tanımlanmışlardır. SDS proteinleri denatüre eder ve onları uniform bir şekilde negatif yüklerle kaplar; böylece elektriksel alanda proteinlerin hareketi esas olarak onların molekül boyutlarına bağlıdır. Şekil 2.5’de görüldüğü gibi protein bantları daha yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yer aldığı jelin üst kısmından başlayarak numaralandırılır (4,8).



**Şekil.2.5.** İnsan eritrosit membranı proteinlerinin poliakrilamid jel elekttroforezinde saptanan bantları (Kaynak 42'den alınmıştır).

Eritrosit membran proteinleri zar düzlemine dik olarak lipid tabakanın içine yerleşmiş integral proteinler, membranın iç yüzeyinde paralel olarak uzanan bir ağ oluşturan iskelet proteinleri ve iskelet proteinlerini integral, transmembran proteinlere bağlayan bağlayıcı (linking) proteinlerden oluşur (5, 7, 8).

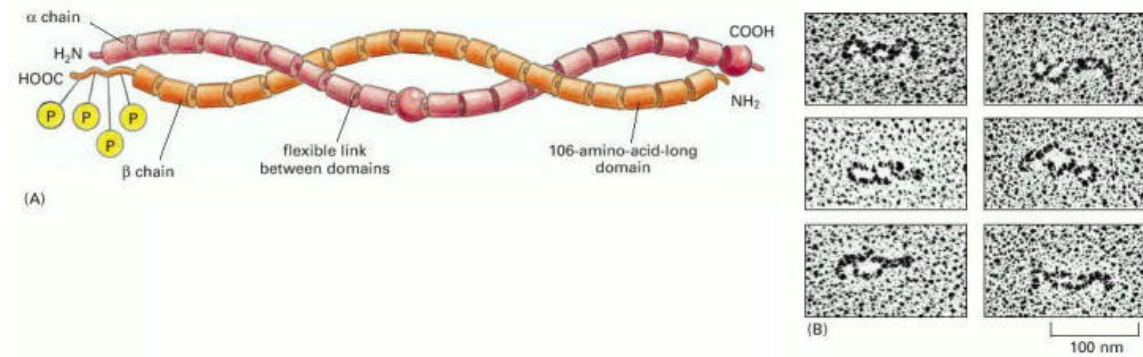
**İskelet Proteinleri:** Membran iç yüzeyinde (sitoplazmik yüzey) yerleşmiş olan ve membran iskelet ağını oluşturan bu proteinlere periferel proteinler adı da verilmektedir. İskelet proteinleri membrandan kolayca ayrıştırılabilirler. Aktin, miyozin, tropomiyozin, spektrin bu gruba girerler (4,5)

**Spektrin:** Spektrin eritrosit membranının major iskelet proteindir. Eritrosit membranının reolojik özelliklerini belirlemede çok önemli rol oynarlar (Şekil 2.6) (78, 79, 92). Spektrin fosforile olup olmaması ve fosforilasyon derecesinin eritrosit membranının mekanik özelliklerinin belirlenmesinde anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir (3, 77, 80, 81).

**Aktin:** Band 5 olarak da tanımlanan aktin uzun filamentler oluşturacak şekilde polimerize olurlar (4,7). Eritrosit aktininin esas görevi üçlü bir kompleks oluşturmak üzere protein 4.1 ve spektrinle etkileşerek spektrin moleküllerinin birbirleriyle ve iskelet ağıyla bağlantısını kurmak ve bu sayede eritrositlerin şekil değiştirmesine katkıda bulunmaktır (8).

**Tropomiyozin:** Kaslardaki aktin ve tropomiyozin proteinleri arasındaki ilişkiye benzer olarak, eritrositte de tropomiyozin molekülü kıvrımlı dimerler oluşturarak aktin polimerizasyonunu indükler (8). Bir tropomiyozin dimeri 7–8 aktin monomerine bağlanır. Aktinle tropomiyozin bağlanması magnezyum ( $Mg^{++}$ ) konsantrasyonuna

duyarlıdır. Eritrosit tropomiyozininin görevi aktin filamentlerini mekanik olarak stabilize etmek ve spektrinle aktin arasındaki ilişkiyi düzenlemektir (7).



**Şekil.2.6.** İnsan eritrositi spektrin molekülünün yapısı (Kaynak 42'den alınmıştır)

**Miyozin:** Eritrositte miktarı azdır ve fonksiyonu tam olarak anlayamamıştır. Bununla beraber eritrositte aktomiyozin kasıcı elemanın da tropomiyozinle beraber fonksiyon gördüğü ve eritrosit şeklindeki adenosin trifosfat (ATP) bağımlı değişikliklerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (8).

**Bağlayıcı Proteinler:** Bunlar membran iç yüzeyine paralel uzanan iskelet proteinleri ile lipid tabaka içinde dik olarak yerleşmiş transmembran integral proteinleri birbirine bağlarlar. Protein bantları 2.1 (ankyrin), 4.1 ve 4.2'yi içeren bu proteinler iskelet proteinleri ve integral proteinlerle etkileşerek üç boyutlu membran protein ağının oluşmasında önemli rol oynarlar (4, 5, 7).

**Protein 4.1:** Spektre bağlanarak aktin ve spektrin birbirlerine bağlanma afinitelerini artırır. Protein 4.1'in bağlayıcı protein olarak önemi spektre ek olarak glikoforin A, glikoforin C ve protein 4.3 gibi transmembran proteinlere de bağlanarak, membran iç yüzeyine paralel olarak uzanan iskelet ağıyla, lipid tabakası içinde dik konumda bulunan integral proteinler arasında ilişki kurması sebebiyle fazladır (4, 7, 8).

**Ankyrin:** Eritrosit ankyrini (protein 2.1) spektrinle protein 3 arasındaki bağlantıyı sağlayan globüler bir proteindir. Protein 3 ve spektre bağlanır (8). Herediter sferositoz ve bazı kalıtsal hemolitik anemi vakalarında ankyrin gen defektleri bildirilmiş ve bu gen defektleri bahsedilen hastalıklarda ortaya çıkan eritrosit şekil bozukluklarının bir kısmından sorumlu tutulmuştur (5,6).

**Protein 4.2:** İnsan eritrosit membran protein kitlesinin yaklaşık %5'ini oluşturan protein 4.2, protein 3'ün stoplazmik parçası ile etkileşerek ankyrin ve protein 4.1'i bağlar. Protein 4,2'nin membran proteinlerine bağlanmak suretiyle onları proteazlarca parçalanmaktan ve başka proteinlerle çapraz köprüler oluşturmaktan

koruduğu, böylece membran iskeletinin stabilizasyonuna katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (4,8).

**Transmembran Proteinleri:** İntegral proteinler adı da verilen transmembran proteinler lipidlerle aralarında bulunan güçlü bağlar aracılığıyla membrana sıkıca bağlıdırlar. Bant 3 ve glikoforinler bu gruba girerler. İntegral proteinler membranı boydan boya kat ederler. Lipid tabakasının içinde ve membranın her iki tarafında birbirinden farklı yapısal ve fonksiyonel kısımlara sahiptirler (5,7).

Protein 3: 100 kD molekül ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir. İki önemli fonksiyonu vardır: 1) 1'e 1 oranında bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ve klor ( $\text{Cl}^-$ ) iyon değişimi yaparak anyon kanalı veya anyon exchange protein olarak görev almak 2) Ankyrin ve ikincil olarak da protein 4.1 veya protein 4.2'yle bağlanarak lipid tabakası ile membran iskeleti arasında ilişki kurmak. Band 3 proteininin sitoplazmik parçasının N-terminali ankyrin, protein 4.1 ve protein 4.2, Hb ve bazı glikolitik enzimlerle bağlanırken, C terminali  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  değişimi için anyon transport kanalı olarak fonksiyon görür (4,8).

Glikoforinler: Reseptör fonksiyonu olan bir hücre dışı segment, lipid tabakayı boydan boya kat eden bir intramembranöz hidrofobik segment ve membran veya hücre proteinleri ile etkileşen bir stoplazmik segmentten oluşan transmembran sialoglikoproteinlerdir. Eritrosit membran proteinlerinin yaklaşık %2'sini oluştururlar. Sialik asit kalıtlarına sahip olmaları eritrosit yüzeyine güçlü negatif yük özelliği kazandırır. Bu yük eritrositlerin birbirleriyle ve damar endotelini de içeren diğer hücrelerle etkileşiminin düzenlenmesinde önemlidir (7).

Periyodik asit-Schiff (PAS) boyamalarıyla glikoforin A, B, C, D olmak üzere 4 glikoforin bandı tespit edilmiştir (4,8). Glikoforin A, PAS-2 veya glikoforin  $\alpha$  olarak da bilinen 36 kD molekül ağırlığındaki banttır. Glikoforinlerin %85'ini oluşturur. MN kan grubu spesifitesini taşır. Protein 4.1 ile glikoforin A arasında fosfotidilinozitol aracılı bir bağlantı vardır ve bu bağlantı iskelet ağının membran lipid tabakasıyla ilişkisinde rol oynar (4, 7, 8).

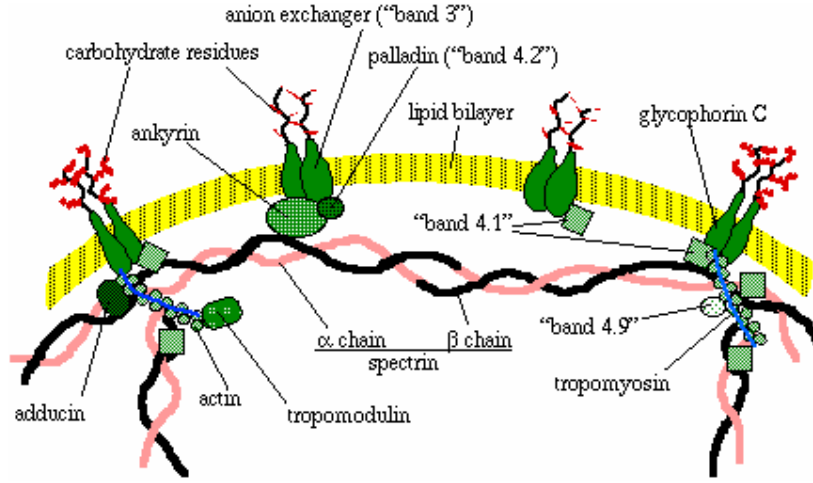
PAS 3 veya glikoforin  $\delta$  olarak da bilinen glikoforin B, 20 kD molekül ağırlığında olup glikoforinlerin %15'ini oluşturur (7,8).

Glikoforin C, PAS-2 veya glikoforin  $\beta$  olarak da bilinir. 32 kD molekül ağırlığında olup glikoforinlerin %4'ünü oluşturur. Protein 4.1 glikoforin C'ye bağlanarak iskelet ağı ile membran lipid tabakası arasındaki etkileşime katkıda bulunur (8).

Glikoforin D, glikoforin  $\gamma$  olarak da bilinir. 23 kD molekül ağırlığında olup glikoforinlerin %1'ini oluşturur (8).

Eritrosit membranı iskelet protein organizasyonunun şematik yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Genel olarak 6 spektrin molekülü bir aktin oligomeri aracılığıyla

birbirine bağlanır. Zayıf karakterde olan spektrin-aktin bağlantıları protein 4.1 aracılığıyla güçlendirir. Adducin, spektrin ve aktin arasındaki bağlantıyı stabilize eden bir diğer proteindir (6). Membran iskeletinin lipid tabakasına bağlantısı iki önemli protein köprüsü aracılığıyla gerçekleştirilir: ilk köprü ankyrin proteini aracılığıyla spektrin ve band 3 arasında kurulur. İkinci köprü ise integral proteinlerden glikoforin C ve bağlayıcı proteinlerden, protein 4.1 arasında kurulur. Bu iki bağlantı aracılığıyla lipid tabaka, membran iskeleti ile mekanik olarak ilişkilendirilmiş olur (5,93).



**Şekil.2.7.** Eritrosit membranı iskelet protein organizasyonunun şematik yapısı (Kaynak 42'den alınmıştır).

Eritrosit membranının reolojik davranışı başta spektrin olmak üzere membran iskelet proteinlerinin mekanik özellikleri ve ağ yapısına katılan diğer proteinler arası ilişkilerce belirlenir (5,8,83,84,93,94). Normal şartlarda spektrin molekülleri yay şeklinde kendi üzerlerinde kıvrılmış durumdadırlar. Eritrosit membranında geri dönüşümlü şekil değişikliği, spektrin molekül kıvrımları açılırken, diğer protein ve bağlantıların sıkışarak katlanması sonucu membran protein ağına bir yeniden yapılanma olmasıyla meydana gelmektedir. Bu sırada eritrosit geometrik yapısının değişmesine rağmen, yüzey alanı sabit tutulmaktadır (95). Şekil değişikliği arttığında, bu artışla orantılı olarak bazı spektrin molekülleri maksimum doğrusal uzama sınırlarına erişirler. Bu nokta geri dönüşümlü şekil değişikliğinin sınırıdır (95). Eritrositte şekil değişikliğine sebep olan kuvvet daha da artırılırsa hücre yüzey alanında bir artış meydana gelir ve protein-protein birleşimlerinde kırılmalar ortaya çıkarak membran parçalanır (5,6).

Membran iskelet proteinlerinin molekül içi veya moleküller arası bağlantılarında bir artış veya integral proteinlerin sitoplazmik kısımlarının iskelet ağıyla bağlantısında bir artış, spektrin moleküllerinin hareketlerini kısıtlayacağı için deformabilitenin azalmasına sebep olacaktır (93,94,96). Bu membran komponentlerine ek olarak sitoplazmik Hb'le membran proteinleri arasında çapraz köprüler meydana gelmesi de eritrosit deformabilitesini etkiler. Denature veya

normal Hb'le membran proteinleri arasındaki artmış bağlantı, spektrin moleküllerinin hareketini kısıtlayarak deformabiliteyi azaltır (4–6).

### 2.3.1.3. Eritrosit membran enzimleri

Yapısal proteinlere ek olarak eritrosit membranında bulunan enzimler de integral veya periferik proteinlerdir. Eritrosit membranı ile ilişkili enzimlerin eritrosit şekil ve deformabilitesinin düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (16,82,83).

**Protein Kinazlar:** Protein kinaz enzimlerinin hücre iskelet proteinlerinin fosforilasyonu yoluyla, eritrosit membran esnekliği ve mekanik stabilitesinin düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (4,16). Protein kinazlar ATP varlığında fosfoserin ve fosfotreonin bağları oluşturarak membran proteinlerini fosforillerler (4).

Eritrosit membranı ile ilişkili 2 farklı protein kinaz enzimi vardır: Bunlardan birincisi siklik adenosin 3',5' monofosfat (cAMP) bağımsız kazein kinaz (spektrin kinaz) olup spektrin ve band 3'ün fosforilasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. İkincisi ise, cAMP-bağımlı histon kinazdır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (16,82).

**Lipid Metabolizması Enzimleri:** Lipid metabolizması enzimleri litik lizofosfatidlerin ve diaçilgliserolün artmasını engelleyerek eritrositin diskositik şeklinin korunmasına katkıda bulunurlar (16).

Olgun eritrosit yağ asitleri ve fosfolipidleri de novo sentezleme yeteneğine sahip değildir. Eritrositte fosfolipidlerin tamiri ve yenilenmesi iki yolla yapılır. Bunlardan ilki lipidlerin karşılıklı değişimi, diğeri ise yağ asidi açılasyonudur (4,16). Yağ asidi açılasyonu aktif bir metabolik yolak olup, ATP'ye gereksinim gösterir. Bu sistem fosfolipidleri yenilemek için, yağ asitleri ve lizofosfatidleri kombine eder.

cAMP ve siklik guanozin 3',5' monofosfat (cGMP) gibi ikinci habercilerin yıkımında görevli enzimler olan fosfodiesterazlar (PDE) lipid metabolizmasında da rol oynayarak eritrosit membranının stabilitesine etki ederler (82). Membrana bağlı enzim olan PDE'lerin aktivitesi normalde az olup, eritrosit içine kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) girişi ile aktive olurlar. Bu enzimler difosfoinozid ve trifosfoinozid ile etkileşerek 1.2-diaçilgliserol ve inozitol fosfatların artışına sebep olurlar (4,16). Eğer ortamda yeterince ATP varsa, 1.2-diaçilgliserolün bir kısmı endojen 1.2-diaçilgliserol kinazla fosfatidlere dönüştürülür. Membranın iç tabasında 1.2-diaçilgliserol toplanması ekinosit oluşumunu ve membranda veziküllerin ortaya çıkmasını indükler. Membran kaybı sonucu meydana gelen sferoekinositlerin deformabilitesi bozuktur (16).

**Asetilkolinesteraz:** Asetilkolinesteraz glikoprotein yapıda bir enzim olup, membranın dış tabakasında yerleşmiştir. Bu enzimin eritrositteki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, eksikliğinde hemoliz ve paroksizmal nokturnal hemoglobinüri tespit edilmiştir (4,82).

**Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Eritrosit Enzimleri:** Süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ) biyolojik oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının ortak ürünleridir. Bunlar süperoksit dismutazla (SOD) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çevrilirler.  $H_2O_2$  membran proteinleri ve enzimlerinin sülfidril gruplarını okside ederken, doymamış yağ asitlerini de peroksit eder. Bu durum membran proteinlerinde çapraz köprüler, hücreden  $K^+$  kaybı ve eritrositte dehidratasyona sebep olarak membran fonksiyonlarında değişikliklere yol açar. Tüm bu değişiklikler sonucunda eritrosit deformabilitesinde azalma meydana gelir (16,95,97). Kısmen membrana bağlı bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), düşük konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Yüksek konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'yi ise katalaz (CAT) enzimi detoksifiye eder. GSH-Px'in aktivitesi için redükte glutatyon (GSH) gereklidir ve eritrositte GSH'un sağlanmasından glutatyon redüktaz (GR) sorumludur (16,95).

**ATPazlar:** Eritrosit membranına sıkıca bağlanmış, fizyolojik olarak önemli iki ATPaz enzimi mevcuttur. Bu enzimler sodyum-potasyum ATPaz ( $Na^+K^+$ -ATPaz) ve kalsiyum ATPaz ( $Ca^{++}$ -ATPaz)'dır. Bu enzimlerin her ikisinde eritrosit katyon ve su içeriğini değiştirerek, hücre içi viskozitesi ve yüzey alanı-hacim oranının kontrolü yoluyla eritrosit deformabilitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (4,16,82).

$Ca^{++}$ -ATPaz: Normal hücre içi  $Ca^{++}$  içeriği yaklaşık  $4.8 \mu\text{mol/l}$ 'dir. Bu miktar  $1-1.5 \text{ mmol/l}$  olan hücre dışı  $Ca^{++}$  konsantrasyonundan çok azdır.  $Ca^{++}$  iyonu hücre dışına oldukça etkin bir pompa olan  $Ca^{++}$ -ATPaz enzimi aracılığıyla taşınır.  $Ca^{++}$ -ATPaz transport sisteminin çalışması için  $Mg^{++}$  iyonları şarttır. Pompa mikromolar düzeydeki hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonları ile aktive olur (4,16,82).

Eritrosit içinde  $Ca^{++}$  konsantrasyonunun çok dar sınırlar içinde sabit tutulması fizyolojik açıdan çok önemlidir. Mikromolar konsantrasyonlarda ( $5-10 \mu\text{mol/l}$ ) hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu artışı eritrosit dışına  $K^+$  sızmasına neden olur (Gardos etkisi). Hücre içinden  $K^+$  ve onunla ilişkili su kaybı, ortalama eritrosit içi hemoglobin konsantrasyonunun (OEHK) ve internal viskozitenin artışı yoluyla eritrosit deformabilitesinde belirgin azalmaya sebep olur. Artmış hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu  $Na^+K^+$ -ATPazı da inhibe ederek iyonik dengeyi iyice bozabilir. Daha yüksek hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonlarında ise ( $25-300 \mu\text{mol/l}$ ) diskositik eritrositler ekinosit veya sferoekinositlere dönüşürler. Bu şekil değişikliği deformabilitede daha fazla azalma ile sonuçlanır. Milimolar düzeydeki eritrosit içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonlarında, membran iskelet proteinlerinde, özellikle spektrin ve band 4.1'de geri dönüşümsüz çapraz köprüler oluşturan sitoplazmik transglutaminaz enzimi aktive olur ve bu çapraz köprüler eritrosit deformabilitesinin daha fazla azalmasına sebep olur (16,17,82).

$Na^+K^+$ -ATPaz: İntegral bir membran proteini olan Sodyum-potasyum ATPaz (ATP fosfohidrolaz EC.3.6.1.3), ATP hidrolizi eşliğinde; sodyum iyonlarını hücre dışına ve potasyum iyonlarını hücre içine pompalayan bir sistemdir (98-100). ATP'nin hidrolizi ile oluşan kimyasal enerji katyonlara ait elektrokimyasal bir gradiyente dönüşmekte ve pozitif yükün membran dışına taşınması ile membran potansiyeli birkaç milivolt artmaktadır. Pompa tarafından oluşturulan sodyum ve potasyum

iyonlarına ait transmembran gradiyenti sinir ve kas hücrelerinin eksitasyonunu gerçekleştirmekte ve birçok hücrede aktif transportu harekete geçirmektedir (101,102). Enzim, hücre içi yüksek sodyum ve düşük potasyum konsantrasyonu ile hücre dışı yüksek potasyum ve düşük sodyum konsantrasyonunda aktif hale geçmektedir (100).

Sodyum potasyum ATPaz sistemi 1957 yılında Skou tarafından keşfedilmiştir (98–100). Bu tarihten sonra enzim, çeşitli saflaştırma yöntemleri ile birçok dokudan izole edilmiş ve yapısında iki polipeptidin tetramer şeklinde bulunduğu anlaşılmıştır (102). Polipeptid zincirleri alfa ve beta olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, hidrofobik karakterde olan (102) ve gama denilen (103) üçüncü bir polipeptid zincirinden de bahsedilmektedir.

Alfa alt birimi, stoplazmada bulunan serbest polizomlarda sentezlenmekte ve plazma membranının yapısına girmektedir (104). ATP'nin bağlandığı bölge bu alt birimde olup (102,103) membranın intrasellüler bölgesinde yer alır (105). Aynı polipeptidin eksternal yüzeyinde, Ouabain bağlanma bölgesi bulunmaktadır (105). Polipeptid zinciri 1016 aminoasitten ve sekiz transmembran segmentinden oluşur (103) ve membranı boydan boya katetmektedir (99).

Daha küçük olan beta alt birimi "periyodik asit-schiff" reaktifi ile boyanabilen bir sialoglikoprotein yapısındadır (106). Beta alt birimi 302 aminoasitten ve bir transmembran segmentten oluşur (103). Bu glikoprotein, hidrofobik aminoasitlerce zengin olup glikozamin, galaktozamin, glikoz, galaktoz, mannoz-fukoz ve sialik asit ihtiva eder (104). Sentezlendikten sonra endoplazmik retikulumda glikozillenir ve molekül ağırlığı 38 000 D'dan 45 000 D'a çıkar. Bu immatur şekil golgiye gelir, burada sekonder glikozilasyon gerçekleşir (104). Yapılan immünolojik çalışmaların sonucunda total ATPaz aktivitesi için beta alt biriminin gerekli olduğu bildirilmiştir (99).

Bir diğer alt birim olan gama zincirinin molekül ağırlığı 10 000 D civarında olup proteolipid karakterindedir. Yapılan çalışmalarda iki alt fraksiyonu ( gama1 ve gama2) olduğu da tespit edilmiştir (104). Bu zincirin diğer iki alt birim ile bağlantısı ve yapı içerisindeki yeri tam olarak anlaşılamamıştır.

Sodyum-Potasyum ATPaz Sisteminin Çalışma Mekanizması: Enzim sisteminin fonksiyonu, sodyum iyonlarını hücre dışına ve potasyum iyonlarını hücre içerisine pompalaması ve buna bağlı olarak ATP'yi hidrolizlemesidir (103). Sodyum-potasyum ATPaz sistemi, sodyum, potasyum ve magnezyum varlığında ATP'nin gama-fosfat grubunun hidrolizini gerçekleştirmekte ve bu hidroliz reaksiyonu ouabain gibi kardiyak glikozidler tarafından inhibe edilebilmektedir (107). Enzim sisteminin primer substratı ATP'dir. Fakat diğer nükleotidler de daha düşük oranda hidroliz edilebilirler (108).

Enzimin en önemli özelliği hem sodyuma hemde potasyuma gereksinim duymasındadır (98). Optimal enzim aktivitesi Na / K oranı 10:1 ve 5:1 olduğu durumlarda elde edilmiştir (109). Enzim aktivasyonu için stoplazmik tarafta



sodyumun bulunması şart olup başka hiçbir iyon sodyumun yerini alamamaktadır (103). Bunun aksine ekstrasellüler tarafta potasyum yerine başka iyonlar bulunabilir (108). Enzimin, sodyuma karşı ilgisi olan  $E_1$  ve potasyuma karşı ilgisi olan  $E_2$  şeklinde tanımlanan iki farklı konformasyonda bulunduğu kabul edilir (103).

Sodyum-potasyum ATPaz enziminin katalizlediği tepkime dört basamak halinde incelenebilir (103). Birincisi enzimin ATP ile fosforlandığı basamaktır. Daha sonra fosforlanmış enzimin konformasyonel değişiklik sonucunda sodyum taşınmasıdır. Üçüncü basamakta enzimin defosforilasyonu ile potasyum taşınması gerçekleşir. Dördüncü, yani son basamakta ise enzimin konformasyonel dönüşümü gerçekleşir. Tüm bu basamakların sonucu olarak, bir ATP molekülü başına 3 mol sodyum dışarı, 2 mol potasyumda içeri taşınır (105).

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz Enzim Sistemine Fosfolipidlerin Etkisi: Yapılan araştırmalar enzim sisteminin aktif olarak çalışması için fosfolipidlere ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (110). Özellikle lipid protein etkileşimleri, proteinin tersiyer ve kuarterner yapısını tayin ederek katalitik aktivitesini kontrol etmekte, ayrıca oluşturdukları nonpolar çevre sayesinde reaksiyonların daha verimli olmasını sağlamaktadırlar (110).

Sodyum-potasyum ATPaz sistemi üzerine çeşitli deterjanların, fosfolipazların ve organik çözücülerin enzim aktivitesini azaltıcı yönde etki ettiği tespit edilmiştir (111-113). Jaernfelt (113) yaptığı çalışmada fosfolipidlerin enzim aktivitesi için şart olduğunu bildirmiştir. Enzim aktivitesini hangi fosfolipidin koruduğunu araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda fosfatidil inozitol (107) ve fosfatidil gliserolün (114) enzim aktivitesini artırıcı yönde etki ettiği bildirilmiştir.

Özellikle fosfatidil serinin enzimin fosforile edilmesinde olduğu kadar defosforile edilmesinde, fosfatidil etanolaminin ise enzimin  $Mg^{2+}$ 'a karşı afinitesini değiştirmesi bakımından gerekli olduğu Goldman ve Albers (112) tarafından ortaya konulmuştur. Wheeler ve Whittam (115) yaptıkları çalışmada fosfatidil serinin enzim sistemi için şart olduğunu ve enzim sisteminin ancak fosfatidil serin ile enzim proteini beraber olduğunda sodyuma ait transport işlevini gördüğünü ileri sürmüşlerdir. Walker ve Wheeler (116) tarafından yapılan çalışmalar, özellikle asidik fosfolipidlerin enzim sisteminin aktif hale getirebildiklerini, ancak aktivasyonun hidrokarbon zincirinin yapısına ve polar grubuna bağlı olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompa aktivitesi ile membran kolesterol konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır (117,118). İn vitro olarak eritrosit membranının da kolesterol artışı, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompa aktivitesinde azalmaya neden olur (117,118). Eritrosit membranının da kolesterol birikimi eritrosit hücre yüzey alanında değişime ve şeklinin bozulmasına neden olur (119). Wiley ve Cooper eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranındaki değişimlerin membran akışkanlığında değişikliklere neden olduğunu ve membran permeabilitesinin ve maddelerin difüzyonunun etkilendiğini bildirmişlerdir (118). Eritrosit membranı kolesterol içeriğinin artması membran akışkanlığını, eritrosit rijiditesini ve mikrovizkositesini artırır ve sodyum-potasyum aktivitesini azaltır. Bunun tam tersine membran kolesterol içeriği azaldığında, fosfolipid içeriği arttığında yani kolesterol/fosfolipid oranı azaldığında membran akışkanlığı ve sodyum-potasyum aktivitesi artar (120–122).

#### 2.3.1.4. Eritrosit Membran Asimetrisi

Membran lipidleri hidrofilik ve hidrofobik bölgeler taşıdıklarından amfipatik moleküllerdir. Amfipatik membran lipidlerinde polar bir baş grubu ve nonpolar zincirler bulunur. Bilinen biyolojik membranların tümünün iç ve dış yüzeyleri farklı yapı ve farklı enzimatik aktivitelere sahiptir (44). Eritrosit membranındaki lipid çift tabakası yapı ve fonksiyonel açıdan asimetriktir. Membranların lipid çift tabakasını ikiye bölen lipid kompozisyonları farklıdır. Membran dış yaprakçığında kolin içeren fosfolipidler yani sfingomiyelin ve fosfatidil kolin dominant olarak bulunurken lipid tabakasının sitoplazmik yarısında amino fosfolipidler; fosfatidil etanolamin ve fosfatidil serin bulunmaktadır. Kolesterol ise daha çok dış yüzeyde bulunur (44).

Bu asimetri membran proteinleri için de geçerlidir. Periferik proteinler membranın iç yüzeyine lokalize olmuş iken integral proteinler enine yerleşmektedirler (123). Membran asimetrisi, membrandaki glikoproteinler ve glikolipidlerde de gözlenir. Glikoproteinlerdeki tüm O- ve N- bağlı oligosakkaridler ve glikolipidlerdeki tüm oligosakkaridler, membranın ekzoplazmik yüzeyindedir. Glikolipidlerin baş gruplarını oluşturan kompleks oligosakkaridlerin yüksek polaritesi, membranın hidrofobik lipid merkezi içine olabilecek bir hareketi engeller (124).

#### 2.3.1.5. Membran Akışkanlığı

Eritrosit membranının iki sıralı lipit tabakası ileri derecede akışkan bir yapıdır (43). Yağ asitlerinin uzunluğu ve doymuşluk derecesi zar akışkanlığını belirleyen iki önemli faktördür. Membran lipidlerinin ikinci önemli kısmını oluşturan kolesterol, fosfolipidlerle etkileşerek ortak yapının ara jel haline dönüşmesini sağlar (4). Eritrosit membranı akışkanlığı temel olarak 1) Fosfolipid zinciri hidrokarbon çiftlerini doymuşluk derecesine ve yağ asidi zincir uzunluğuna 2) fosfolipid polar baş gruplarının çeşidine ve görevine 3) fosfolipid/sterol oranına ve sterolün kimyasal yapısına 4) fosfolipid-protein etkileşimine bağlıdır (125–127).

Eritrosit membranı fosfatidilkolin/sfingomiyelin oranı arttıkça membranın akışkanlığı da artar (28). Eritrosit membran akışkanlığı sıcaklık, basınç, membran potansiyeli, asidite ve kalsiyum gibi bazı faktörlerden de etkilenir (126). Kolesterol, yakındaki fosfolipid yağ açıl zincirlerinin hareketini kısıtlar, membranın dış yüzeyini düzenli olmasını sağlar. Kalıtsal LCAT eksikliği, eritrosit membranında aşırı miktarda kolesterol birikmesine neden olur ve membran rijiditesi ve akışkanlığını olumsuz yönde etkiler (128).

Eğer membran akışkanlığı düşerse en önemli hücresel süreçlerde engellenmeler meydana gelir. Bu süreçler içeriye ve dışarıya çeşitli maddelerin transportunda (su, üre, elektrolitler vs.), ilaçların ve hormonların hücresel cevaplarında, hücrenin fagositoz kapasitelerinde, endo/ekzositozisinde bozulmalara neden olur (129).

Lipit tabakanın akışkanlığının lipit kompozisyonuna bağlı olarak değişebildiği bilinmekle beraber, bu değişkenliğin membranın bütün olarak visko-elastik davranışı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir (130,131).

### 2.3.2. Eritrosit Sitoplazması

Olgun bir eritrositin ağırlık olarak yaklaşık %90'ını oluşturan hemoglobin (Hb) sitoplazmanın en önemli bileşenidir (4,94). Sitoplazma yüksek miktarda  $K^+$  iyonu ve bunun yanında  $Cl^-$  ve  $HCO_3^-$  içerir. Sitoplazmada ayrıca enerji metabolizması ile enzimler, karbonik anhidraz ve Hb'in redükte formda tutulmasını sağlayan enzimler bulunur (132).

Hemoglobin: Hb, globulin ve demir içeren bir porfirin halkası, hemden oluşan konjuge bir proteindir. Her Hb molekülü dört polipeptid zinciri ve dört hem ünitesi içerir;oksi ve deoksi olmak üzere iki formu vardır (4).

Hb eritrosit sitoplazmasında yaklaşık 32 gr/dL kadar bulunur. Bu miktar normal eritrosit deformabilitesinin korunmasında çok önemlidir (3,6,133). Olgun eritrosit içinde Hb sentez ve yıkımı olmadığından tek bir eritrositin kapsadığı Hb miktarı eritrositin yaşam süresi boyunca değişmez.

Tam doyumluğa ulaştığında 1 gram Hb 1.34 mililitre oksijen taşıyabilir (4). Doygunluğun derecesi ortamın parsiyel oksijen basıncına ( $PO_2$ ), pH'ya, iyon kapsamına, ısıya ve 2, 3-difosfogliserat (2,3-DPG) konsantrasyonuna bağlıdır (4,132).

Hb'in oksijen taşıma yeteneğine sahip olan formu ferröz demir ( $Fe^{++}$ ) kapsayan formudur.  $Fe^{++}$ 'nin ferrik ( $Fe^{+++}$ ) hale okside olması Hb'in fonksiyonunu yitirmesine sebep olur.  $Fe^{+++}$  içeren yapı methemoglobin adını alır (4).

### 2.3.3. Eritrosit Deformabilitesi

Deformabilite terimi, genel olarak herhangi bir yapının, bir kuvvetin etkisi altında şekil değiştirmesini ifade eder (3,17). Elastik cisimlerin şekil değiştirmelerine sebep olan kuvvetler ortadan kalktığında, cisimler eski şekillerine geri dönerler, yani olay tersinirdir (134). Şekil değiştirmenin miktarı ve şekli, uygulanan kuvvetin hız, biçim, büyüklük ve yönüne bağlıdır (3).

Şekil değiştirebilme yetenekleri eritrositlerin dolaşımdaki fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için şarttır. Eritrosit deformabilitesi eritrositin kan akımı sırasında kendine uygulanan kuvvetlere yanıt olarak şekil değiştirmesi şeklinde tanımlanabilir (5,94,133,135). Dalak sinüzoidleri ve kapiller dolaşımın büyük bir bölümünde akımın gerçekleştiği damarların boyutları eritrosit boyutlarına yakın veya daha küçüktür. Eritrositlerin kendi çaplarından daha küçük kapillerlerden geçebilmeleri ancak şekil değişikliğine uğramaları ile mümkün olur (4-6,15,133,135). Eritrosit membranı hücrenin şekil değiştirme yeteneğinin belirlenmesi ve yapısal bütünlüğünün sağlanarak bikonkav disk yapısındaki hücre şeklinin korunmasında kritik rol oynar. İskelet proteinleri başta olmak üzere membran proteinlerinin normal eritrosit deformabilitesi ve mekanik stabilitesinin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan membran komponenti olduğu konusunda fikir birliği vardır (5,6,133).

### 2.3.3.1. Eritrosit Deformabilitesini Belirleyen Faktörler

Eritrositin şekil değiştirme yeteneğini düzenleyen üç ana faktör vardır. Bunlar: 1) Eritrosit geometrisi (yüzey alanı – hacim ilişkisi) 2) Sitoplazmik viskozite 3) Eritrosit membranının reolojik (visko-elastik) özellikleri şeklinde sıralanabilir (3,6,14,15,16,133,135).

**Eritrosit Geometrisi (Yüzey alanı-hacim ilişkisi):** Normal eritrositin bikonkav disk şekli, eritrosite yüzey alanını sabit tutarak şekil değiştirebilmesi için avantajlı bir yüzey alanı-hacim ilişkisi sağlar (5,6,15,133). 90 fL kadar bir hacme sahip olan insan eritrositlerinin yüzey alanı yaklaşık  $140 \mu\text{m}^2$ 'dir. Bu rakam aynı hacme sahip kürenin yüzey alanı olan  $97 \mu\text{m}^2$ 'den önemli oranda fazladır (4). Eritrosit yapısının bikonkav disk şeklinde olmasından kaynaklanan yüzey alanındaki bu fazlalık hücrenin yüzey alanında bir değişiklik olmaksızın şekil değiştirebilmesine imkan sağlar (3,4). Bu özellikleri sayesinde eritrositler orijinal boyutlarının %250'si kadar doğrusal uzama gösterebilirler, ancak yüzey alanında %3-4'lük bir artış bile hücrenin parçalanmasına sebep olur (133). Yüzey alanında azalmaya neden olan membran kaybı veya hücre hacminde artışa yol açan eritrosit içi sıvı içeriğinin artması eritrosit şeklinin daha küresel bir hale gelmesini sağlar. Bu küresel yapıda yüzey alanı-hacim oranı azalmıştır. Euclid yasalarına göre, bir kürenin şekil değiştirebilmesi için yüzey alanını arttırması şarttır. Yüzey alanını arttırabilmek için gerekli kuvvet, sabit alanda şekil değiştirebilmek için gerekli kuvvetin dört katı büyüklüğünde olduğundan, küresel bir hücrenin şeklini değiştirmek için bikonkav disk yapıya göre daha fazla kuvvet uygulanması gereklidir (6,15).

**Sitoplazmik Viskozite:** Hücre içi Hb konsantrasyonu ile belirlenen sitoplazmik viskozite eritrosit deformabilitesinin diğer bir belirleyicisidir (3,6,14,7,133). Normal bireylerden elde edilen eritrositlerin Hb konsantrasyonları 27–37 g/dL arasında olup, bu aralıkta sitoplazmik viskozite 5–15 centi poise (cp) kadardır (6,133). Normal hemoglobin konsantrasyonuna sahip hücrelerde sitoplazmik viskozitenin, eritrosit deformabilitesine etkisi ihmal edilebilir düzeydedir ve hücre membranına uygulanan kuvvetlerin visköz dağılımı eritrosit deformabilitesini belirleyen ana faktördür (77–81,92,133). Hücresel dehidratasyona bağlı olarak ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (OEHK)'nin artması sonucu Hb, membran proteinleri arasında çapraz köprüler meydana gelebilir (4–6). Bu durum özellikle spektrin moleküllerinin hareketini kısıtlayarak eritrosit deformabilitesini olumsuz etkiler (4–6).

**Eritrosit Membranının Reolojik Viskoelastik Özellikleri:** Kan akımı sırasında eritrositlerin şekil değiştirmesine neden olan kuvvetler hemen daima hücrenin dışından etki ederler. Eritrositin bu kuvvetlerle doğrudan karşı karşıya kalan bölümü membranıdır. Eritrosit membranı esnek yapısı sayesinde hücre dışından etki eden kuvvetleri sitoplazmaya aktararak, hemen sadece Hb süspansiyonundan oluşmuş eritrosit sitoplazmasının akıma katılmasını sağlar. Membranın bu özelliği sayesinde eritrositler akım koşullarına en iyi şekilde geometrik uyum gösterebilirler (3,4,134).

Herhangi bir stres varlığında eritrosit membranının davranışı oldukça karmaşık olup, kendisine uygulanan kuvvetin sadece büyüklüğüne değil, uygulanış süresine de bağlıdır (6,133). Kısa süreli (<100 sn) ve  $10^{-6}$  dyne'e kadar kuvvetler uygulandığında buna cevap olarak büyük elastik şekil değişiklikleri gösterir, ancak

kuvvetin ortadan kalkmasıyla eski şekline geri döner. Bu kuvvetler daha uzun süreli (5–10 dakika) uygulandığında ise, membran yarı katı gibi davranır ve kuvvet ortadan kalktığında bile hücre tam olarak eski bikonkav disk şekline geri dönemez. Büyük kuvvetler ( $>10^{-6}$  dyne) uygulandığında eritrosit membranı kalıcı bir şekil bozukluğuna uğrar. Böylece aynı membran kendisine uygulanan kuvvetin büyüklüğüne ve uygulanış süresine bağlı olarak üç farklı şekilde yanıt verebilir. Membranın bu özelliği onun elastik yapısına bağlı olup, bu değişik yanıtlardan farklı membran komponentlerinin birbiri arasındaki etkileşimi sorumludur (3,6,133).

Eritrosit membranının iki sıralı lipid tabakası ileri derecede akışkan bir yapıdadır (4,5,133). Lipid tabakanın akışkanlığının lipid kompozisyonuna bağlı olarak değişebildiği bilinmekle birlikte, bu değişikliğin membranın bütün olarak viskoelastik davranışı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir (5,6,133). Buna karşın membran proteinleri özellikle de membran iskeletinin eritrosit membranının viskoelastisitesinin belirlenmesinde esas rol oynadığına ilişkin çok sayıda veri bulunmaktadır (5–8,14,133). Son çalışmalar eritrositlerin kendilerine uygulanan büyük kuvvetlere cevaben geri dönüşümsüz olarak şekil değiştirmelerinde, değişmiş spektrin organizasyonunun rolüne işaret etmektedir (5,6, 93–96).

### **2.3.3.2. Eritrosit Deformabilitesini Değiştiren Fizyolojik Ve Patolojik Etkenler**

Eritrosit deformabilitesi çeşitli faktörlerin etkisiyle deneysel olarak değiştirilebildiği gibi, çeşitli hastalık tablolarında da eritrosit deformabilitesinde normalden sapmalar görülebilmektedir.

Eritrositlerin içinde buldukları ortamın ozmotik basıncındaki artış hem hücre yüzey alanı sabit olmak koşuluyla eritrosit hacminde azalmaya, hem de OEHK'nda artışa sebep olur (16). Yüksek ozmolaritede ayrıca membran komponentleri arasında bir etkileşim meydana gelerek eritrosit deformabilitesi azalabilir. Ozmolaritenin azalması ise, eritrosit hacminde artışa neden olarak deformabiliteyi zıt yönde etkiler (6,77–81,133). Ancak bu etkiler sadece belli bir aralıktaki ozmolarite değişimleri için geçerlidir. Genel olarak, ozmolaritede hem artma hem de azalma yönündeki çok büyük değişiklikler eritrosit deformabilitesini azaltıcı yönde etki eder (3). Ozmolaritedeki bir artış hücrenin hacminde bir azalmaya neden olurken Hb konsantrasyonunda bir artışı beraberinde getirir. Böyle bir eritrosit, normal bir eritrositin çapından dar bir kanaldan daha kolay geçtiği halde kitle halindeki akımda deformabilite yeteneği azalmış bulunur. Tersine hipoozmolar bir ortamda kitle halindeki akım hemoglobinin konsantrasyonunda, dolayısıyla sitoplazmik vizkozitede bir düşme olacağından kolaylaşırken, belli bir yüzey alanında hacim artmış olacağından dar bir kanaldaki akım güçleşir. Ancak bu ikilem sadece belli bir aralıktaki ozmolarite değişimleri için geçerlidir. Ozmolarite değişimi her iki uçta da eritrosit deformabilitesini her koşulda olumsuz yönde etkiler

Hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonundaki artışların eritrosit deformabilitesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (14,15,82).  $Ca^{++}$  iyonoforu A23187 kullanılarak hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu arttırıldığında eritrositte  $Ca^{++}$  bağlayıcı kalmodulin aracılığıyla  $Ca^{++}$ -ATPaz'ın aktivasyonu membran lipidlerinin kompozisyon ve metabolizmalarındaki değişiklikler ve  $K^{+}$  iyonu ve suyun hücre dışına çıkışını (Gardos etkisi) içeren bir seri kompleks biyokimyasal reaksiyon meydana gelir

(16,17). Eritrositlerin yüksek  $K^+$  iyonu içeren bir ortama konmalarıyla  $K^+$  dışarı çıkışının ve buna bağlı dehidratasyonun engellendiği deneylerde, eritrosit deformabilitesinde bir azalma saptanmamıştır. Bu sebeple, eritrositte hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu artışı ile oluşturulan deformabilite azalmasının sebebinin Gardos etkisine bağlı dehidratasyon olduğu ileri sürülmektedir (17). Hücre içi  $Ca^{++}$  konsantrasyonu artışı  $K^+$  iyonlarının hücre dışına çıkışına sebep olmakta, su molekülleri de  $K^+$  iyonlarını izlemekte, hücre içi viskozite ve Hb konsantrasyonu artmaktadır. Bu durum eritrosit deformabilitesinin azalmasıyla sonuçlanır (4,6,16,17).

Eritrosit membranında ATP yoksunluğu özellikle pompa aktiviteleri açısından çok önemlidir. Membrandaki ATPaz enzimleri eritrositin katyon ve su kapsamını regüle ederek hücrenin boyutlarının, şeklinin ve deformabilite yeteneklerinin korunmasına büyük ölçüde katılırlar. Eritrositlerin ATP'den yoksun kaldıklarında ekinosit haline dönüştükleri, ayrıca membranlarında kırılmalar meydana gelerek bir kısım membran materyalinin kaybı ile sonuçlanan şekil bozukluklarının ortaya çıktığı bilinmektedir. Böylece ATP'den yoksunluk eritrosit deformabilitesinin azalması ile sonuçlanır (3,14,15).

Özellikle eritrositlerde şekil bozukluğuyla seyreden hematolojik hastalıklarda eritrosit deformabilitesi genellikle değişmiştir (5,133). Hemoglobin S içeren eritrositlere sahip orak hücre anemili hastalarda esas olarak Hb polimerizasyonu sebebiyle eritrosit deformabilitesi ileri derecede bozuktur. Eritrositlerin iyon transport mekanizmalarının bozuk olduğu herediter kserositoz ve hidrositoz gibi hastalık tablolarında, hücre yüzey-hacim oranında ve sitoplazmik viskozitedeki değişiklikler nedeniyle eritrosit deformabilitesi etkilenir (6,136). Eritrosit membran defektiyle karakterize en sık görülen hemolitik anemilerden biri olan herediter sferositozda da eritrosit şekil değiştirme yeteneği azalmıştır (137).

Hematolojik hastalıklara ek olarak dolaşım sistemini ilgilendiren patolojiler başta olmak üzere, çeşitli klinik tablolarda eritrosit deformabilitesinde değişiklikler saptanmıştır. Akut miyokard infarktüsü geçirmiş hastaların eritrositlerinin şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı ve kan viskozitelerinin arttığı gösterilmiştir (19,20). Diabetes mellitusta da eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı bilinmektedir (21,138). Hipertansiyonda da kan viskozitesinin arttığı ve eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir (139,140). Deneysel sepsis ve iskemi-reperfüzyon hasarı modellerinde eritrosit şekil değiştirme yeteneğinin bozulduğu bilinmektedir (141).

Eritrosit membranındaki yapısal değişikliklerin sonucu olarak membranda kolesterol birikiminde artış olur (patolojik kolesterol/fosfolipid oranı), membran akışkanlığını ve fonksiyonlarını bozar ve eritrosit deformabilitesini sınırlandırır (28). Bu değişiklikler kapiller lümeninin daralmasına, kan akışının engellenmesine ve eritrosit agregasyonunun ve vizkositenin artmasına, kanın akım özelliklerinin etkilenmesine neden olur (142). Bu sonuçlar mikrosirkülasyonun bozulmasına, patolojik süreçlerin başlamasına katkıda bulunur. Özellikle koroner kalp hastalığı, anjina pektoris, retinopati, serebral ve periferik sirkülasyonun bozulmasına neden olur (142).

### 2.3. Hipotez

Son zamanlarda yüksek plazma kolesterol profiline sahip hastalarda ve koroner arter hastalığı bulunan kişilerde plazma kolesterol seviyesinin mümkün olduğu kadar düşürülmesi hedeflenmekte ve bir alt sınır kavramı yavaş yavaş kaybolmaktadır (23,24,25,53,54,57). Yüksek plazma kolesterol seviyesinin neden olduğu hiperkolesteroleminin eritrosit membran yapı ve fonksiyonları üzerine etkileri hakkında geniş bilgi birikimi (14,30,59,71,72) bulunmasına rağmen, hipokolesteroleminin eritrosit membranı yapı ve fonksiyonlarını nasıl etkileyebileceği konusunda fazla literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Eritrositlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerindeki değişiklikler, kan dokusunun akışkanlığını, özellikle de kanın mikrodolaşımdaki davranışını yakından ilgilendirdiğinden organizmadaki bütün dokular için önemlidir. Bu çalışma, hipokolesteroleminin eritrosit plazma membranındaki lipid kompozisyonunda bozulmaya ve deformabilitede değişikliğe neden olur hipotezinin test edilmesi amacıyla planlanmıştır. Bu çalışma hipokolesteroleminin eritrosit mekaniğini etkileyip, etkilemediğinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır

## GEREÇLER ve YÖNTEMLER

### 3.1. Deney Protokolü

Çalışmada, 24 adet 500–600 g ağırlığında genç, erişkin (5-6 aylık), erkek kobay kullanıldı. Kobaylar, kontrol grubu (n=12) ve atorvastatin grubu (n=12) olmak üzere ikiye ayrıldı. Hayvanlar standart kemirgen yemi ve yeşil sebzeyle beslendi. Atorvastatin'i izotonik fosfat tamponu (PBS) içinde çözdükten sonra gavajla, günde tek doz (20 mg/kg/gün) halinde verildi. Kontrol grubu da aynı çevre şartlarında tutuldu, günlük gavaj uygulamaları yapıldı ancak sadece deney grubu ile eşit miktarda PBS verildi. Üç hafta (21 gün), 20 mg/kg/gün atorvastatin uygulamasından sonraki gün kardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alındı. Antikoagulan olarak etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) (15 mg/mL) kullanıldı.

### 3.2. Hematolojik Parametreler

Kan örneklerinde beyaz kan hücresi, kırmızı kan hücresi, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), ortalama eritrosit hacmi (OEH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (OEHK) elektronik bir hematoloji analizörü (Micros, ABX Co. , Fransa) kullanılarak saptandı.

### 3.3. Biyokimyasal Parametreler

#### 3.3.1. Eritrosit Membranının Elde Edilmesi

Eritrosit membranları Carreiras ve arkadaşlarının yöntemine göre elde edildi (148). Kan örnekleri santrifüj edilip (1400 x g, 6 dakika) plazması uzaklaştırıldıktan sonra 150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl (pH: 7.4, 4°C' da) çözeltisi içinde yeniden süspansiyon edildi ve bu çözelti ile iki kez (1400 x g, 6 dakika, 4°C' da) yıkandı. Daha sonra eritrositler 17 mM Tris HCl (pH: 7.4, 4°C' da), 0.1 mM EDTA içeren hipotonik çözelti ile buz içinde 1:9 oranında (v:v) 10 dakika inkübe edilerek hemolize uğramaları sağlandı. İnkübasyon periyodu sonunda süspansiyon 40.000 x g'de 10 dakika, 4°C' da santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı ve membranlar aynı solüsyon ile 4 kere daha aynı hız ve sürede tamamen beyazlaşana kadar yıkandı. Süpernatantta hemoglobin konsantrasyonu modifiye edilmiş siyanomethemoglobin metoduyla ölçüldü (149). Ölçülen hemoglobin konsantrasyonu 0.1 mg/dL'nin altında ölçüldü. Elde edilen membranlar hızla dondurularak kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

#### 3.3.2. Membran Protein Tayini

Elde edilen membranlardaki protein miktarı Lowry yöntemine göre tespit edildi (150). Alkali şartlarda  $Cu^{++}$  iyonu, proteinlerdeki peptit bağları ile  $Cu^{+}$  iyonuna dönüşümünün gerçekleştiği bir kompleks oluşturdu.  $Cu^{+1}$  iyonu ve tirozin, triptofan ve sistein aminoasitlerinin fonksiyonel grupları, sarı renkli Folin Ciocalteu reaktifini molibdenyum ve tungsten mavisine indirgendir. Oluşan mavi rengin absorbansı 750



nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak, kalibrasyon eğrisi üzerinden protein konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.3.3. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Elde edilen eritrosit membranındaki toplam enzim aktivitesi ve ouabainle inhibe edilebilen enzim aktivitesi Hanahan ve Ekholm'den modifiye edilen fosfat salınımı metoduna göre (151) spektrofotometrik olarak tayin edildi. Membranlar 10 mM ouabain varlığında ve yokluğunda, 30 mM Na<sub>2</sub>-ATP ile 37°C' da 30 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda reaksiyon 200 µl soğuk % 30'luk trikloroasetik asit (TCA) eklenmesiyle durduruldu. Membranlar bir saat buzun içinde inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üstteki fazdan 500 µl alınıp temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1.5 ml, 2 µM asit molibdat konuldu ve yavaşça vortekslendi. Daha sonra 250 µl 'reducing agent' konuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı, sonuçlar spesifik aktivite (µmol fosfat/mg protein/dk) olarak değerlendirildi. İnorganik fosfat konsantrasyonu KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> standart grafiğinden hesaplandı. Ouabain varlığında ve yokluğundaki spesifik aktivite aşağıda formülle hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{(A_{720}/30 \text{ dak}) \times (1/\text{standart grafik değeri}) \times 1.25 \times X}{(1/\text{her tüpteki mg protein})}$$

### 3.3.4. Eritrosit Membran Lipid Kompozisyonunun Tayini

Eritrosit membranından lipidlerin elde edilmesi için Rose ve Oklander' ın yöntemi kullanıldı (152). Carreiras ve arkadaşlarının yöntemine göre elde edilen membranlardan 1 ml'sinin üzerine 9 ml ekstraksiyon karışımı (7.11 (v:v) oranında kloroform: izopropanol) eklendi ve vortekslendi. Bu işlemden sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek ve üstteki lipid fazı aspire edilerek başka tüpe aktarılacak ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Ekstrakte edilen materyal N<sub>2</sub> ile tamamen uçuruldu. Daha sonra üzerine 1 ml izopropanol konuldu ve vortekslendi. Böylece elde edilen lipid ekstraktındaki fosfolipid ve kolesterol enzimatik yöntemlerle ölçüldü.

Eritrosit membran ekstraktlarından fosfolipid miktarı tayini için, Baure ve arkadaşlarının yöntemine (153) göre, elde edilen lipidlerin 50 µl'si önce 2 ml ekstraksiyon karışımı (3:1 (v:v) oranında absöü alkol: eter) ile muamele edildi ve karışımı sağlamak için vortekslendi. Tüpler ısıtılarak ekstrakt kurutuldu ve kalsiyum içeren nitrik asit ile organik materyal sindirildi. Nitrik asit tamamen uçurulduktan sonra geride kalan materyal TCA-askorbik asit karışımı ile eritildi. Üzerine 1 ml amonyum molibdat ve 1 ml arsenit-sitrat çözeltileri konuldu. Karışım sağlandıktan sonra 15 dakika beklendi ve 700 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Kolesterol miktarı da Heider ve arkadaşlarının yöntemi (154) ile enzimatik olarak ölçüldü. Lipid ekstraktı (20 µl), kolesterol standartı (20 µl, % 200 mg), ve saf suyun (20 µl), konulduğu tüplere kolesterol enzimatik belirteci [fenol, 4-aminoantipyrine 1: 6 (mmol/L), peroksidaz, kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz 4000:120:150 (ünite/L) ] konuldu ve 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra

her birine 2 ml serum fizyolojik konuldu ve 515 nm dalga boyuda spektrofotometrik olarak absorbansları okundu.

### 3.3.5. Plazma Lipid ve Hepatik Enzim Konsantrasyonu Ölçümleri

Kardiyak ponksiyonla EDTA'lı (15 mg/mL) tüplere alınan kan örnekleri 1400 x g'de 6 dakika santrifüj edildikten sonra plazma ve eritrositler birbirinden ayrıldı. Plazma örnekleri, lipid konsantrasyonu ve hepatic enzim analizi için kullanıldı. Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) standart enzimatik metotla (155,156), total kolesterol, HDL - kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid düzeyleri standart enzimatik Boehringer-Mannheim kiti ile Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında ölçüldü (157)

### 3.4. Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi

Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre (LORRCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi (158). Eritrositler izotonik fosfat tamponu içinde hazırlanmış, PVP-360 (polyvinyl-pyrrolidone, Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisi içinde yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun yaklaşık bir mililitresi aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan iki cam silindirden oluşan bir vizkometre sistemine yerleştirildi. İki cam silindirin arasındaki boşluğa doldurulan süspansiyon, dıştaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından, uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızda döndürülmesiyle, bu kuvvetlerin etkisi altında bırakıldı. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından izotonik fosfat tamponu-PVP çözeltisinin vizkositesi de dikkate alınarak hesaplandı. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşmakta ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni, süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketinin yarattığı akıma oriyantasyonlarını yansıtmaktadır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoid forma dönüşümün derecesi ile eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilitesi) arasında doğru orantı vardır. Elipsoid difraksiyon paterninin uzun (A) ve kısa eksenlerinin (B) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanmasıyla  $EI=A-B/A+B$  şeklinde bir elongasyon indeksi (EI) hesaplandı. Ölçümler 37°C'de yapıldı. EI değerleri dokuz kayma stresi arasında (0.3–30 Pa) ölçüldü. Bu değerler kullanılarak her örnek için maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ( $SS_{1/2}$ ) Lineweaver-Burke analizi uygulanarak hesaplandı (159).

### 3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar " student-t " testi ile değerlendirildi. 0.05 den küçük P değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## BULGULAR

### 4.1. Hematolojik Parametreler

Atorvastatin ve kontrol gruplarına ait hematolojik parametreler çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Atorvastatin uygulamasının sonunda alınan kan örneklerine ait kırmızı kan hücresi, hemoglobin (Hb) ve hematokrit (Htc) değerleri kontrol değerlerine göre önemli bir şekilde artmıştır. Atorvastatin grubunda ortalama eritrosit hacminde (OEH) istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanmasına rağmen beyaz kan hücresi, ortalama eritrosit hemoglobin (OEHK) değerlerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

**Çizelge.4.1.** Kontrol ve atorvastatin gruplarına ait hematolojik parametreler. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. OEH, ortalama eritrosit hacmi; OEHK, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu. (n=12). \*: p<0.05; †: p<0.005, kontrol grubundan fark.

	Kontrol	Atorvastatin
<b>Beyaz Kan Hücresi</b> ( $10^9/l$ )	10.77 $\pm$ 0.67	9.383 $\pm$ 0.48
<b>Kırmızı Kan Hücresi</b> ( $10^{12}/l$ )	5.016 $\pm$ 0.06	5.333 $\pm$ 0.07 <sup>†</sup>
<b>Hemoglobin</b> (g/l)	127.9 $\pm$ 1.9	133.6 $\pm$ 1.3 <sup>*</sup>
<b>Hematokrit</b> (l/l)	0.405 $\pm$ 0.006	0.426 $\pm$ 0.004 <sup>*</sup>
<b>OEH</b> (fl)	81.50 $\pm$ 0.35	80.08 $\pm$ 0.48 <sup>*</sup>
<b>OEHK</b> (g/l)	314.8 $\pm$ 1.5	313.6 $\pm$ 0.67

### 4.2. Biyokimyasal Parametreler

#### 4.2.1. Eritrosit Membranı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz Aktivite Düzeyi

Atorvastatin ve kontrol grubuna ait toplam enzim (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz ve Ca<sup>++</sup>-ATPaz) ve Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz aktivite değerleri çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Atorvastatin tedavisinden sonra alınan kan örnekleriyle hazırlanan eritrosit membran örneklerinde hem toplam enzim aktivitesinde hemde Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesindeki

artışlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir. Atorvastatin uygulanan grupta, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesinde artış kontrol grubundan yaklaşık olarak %40 daha fazladır.

**Çizelge.4.2.** Atorvastatin ve kontrol gruplarına ait eritrosit membranı toplam enzim aktivitesi ve Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- ATPaz enzim aktivite düzeyleri. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir, ( n=12), \*: p<0.0001, kontrol grubundan fark.

	<b>Kontrol</b>	<b>Atorvastatin</b>
<b>Toplam Enzim Aktivitesi</b> (µmolsPi/mg protein/dak)	0.0072± 0.000029	0.0093±0.000078*
<b>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaz</b> (µmolsPi/mg protein/dak)	0.0042 ± 0.000039	0.0056 ± 0.00035*

#### **4.2.2. Eritrosit Membran Lipit Kompozisyonu Değerleri**

Kontrol ve atorvastatin gruplarına ait membran lipid kompozisyonu değerleri çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Atorvastatin grubunda eritrosit membranı kolesterol düzeyinde istatistiksel olarak önemli azalma meydana geldi. Eritrosit membranındaki bu azalma kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat olarak saptanmıştır. Eritrosit membranı fosfolipid düzeyinde de istatistiksel olarak önemli artışlar saptanmıştır. Bu sonuçlarla uyumlu olarak kolesterol/fosfolipid oranı atorvastatin grubunda kontrol grubuna kıyasla azalmalar meydana gelmiştir.

#### **4.2.3. Plazma Lipid ve Hepatik Enzim Düzeyleri**

Kontrol ve atorvastatin gruplarına ait plazma lipid değerleri çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait plazma lipid değerleri, standart yem ile beslenen koyalarda, genel literatüre uygunluk göstermektedir (160,161). Atorvastatin uygulanan grupta plazma total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol değerlerinde ise iki grup arasında önemli bir fark saptanmamıştır.

Plazma alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri üzerine atorvastatin uygulamasının herhangi bir etkisi saptanmamıştır

#### **4.2. Eritrosit Deformabilitesinin Değerlendirilmesi**

Kontrol ve atorvastatin gruplarından elde edilen kan örnekleriyle yapılan ölçümlerde, uygulanan kayma kuvveti attıkça beklendiği gibi eritrosit deformabilitesinin de arttığı şekil 4.1 a' da gösterilmiştir. Kontrol ve atorvastatin

grupları arasında, farklı kayma kuvvetlerinde ölçülmüş deformabilite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik olmamıştır.

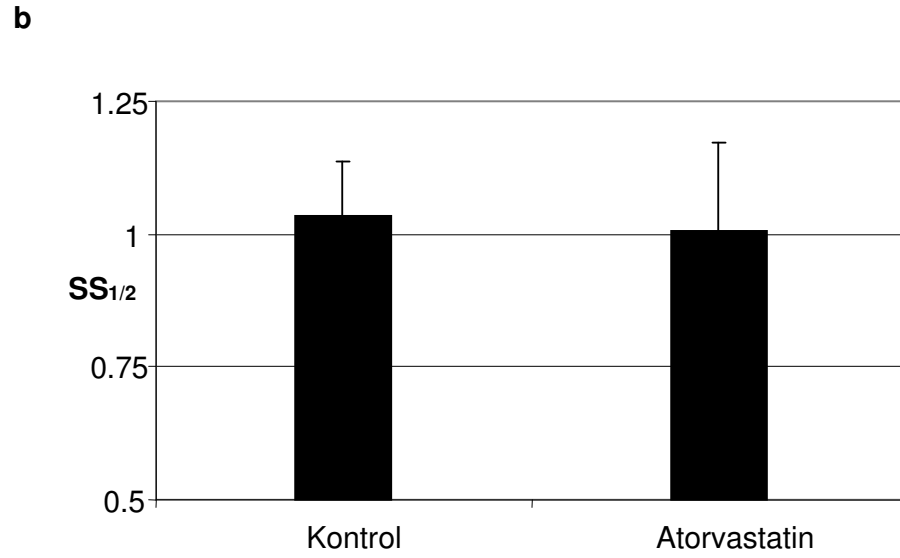
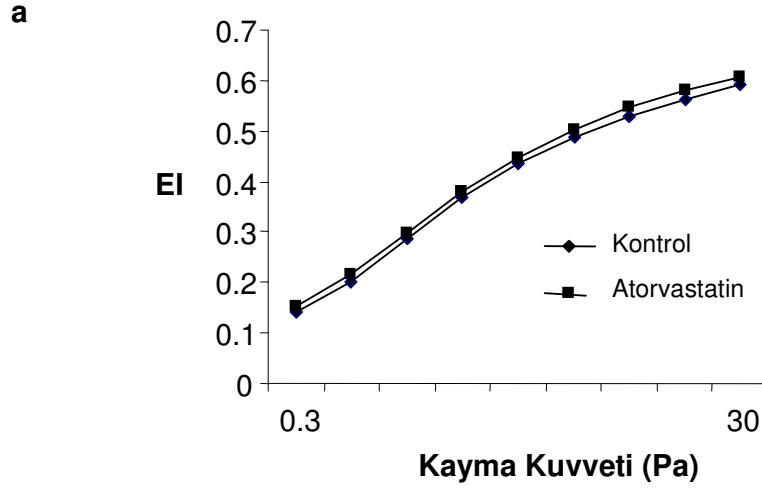
**Çizelge.4.3.** Kontrol ve atorvastatin uygulanan koblalarda eritrosit membranı lipid içeriği değerleri. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir, (n=12). †: p<0.001, kontrol grubundan fark.

	<b>Kontrol</b>	<b>Atorvastatin</b>
<b>Kolesterol</b> (mmol/l)	0.6890 $\pm$ 0.008	0.3922 $\pm$ 0.020 <sup>†</sup>
<b>Fosfolipid</b> (mmol/l)	20.89 $\pm$ 0.14	49.23 $\pm$ 2.55 <sup>†</sup>
<b>C / P</b>	0.032 $\pm$ 0.03	0.008 $\pm$ 0.001 <sup>†</sup>

Kontrol ve atorvastatin uygulanan grupların, SS<sub>1/2</sub> değerlerindeki değişiklikler ise şekil 4.1 b'de gösterilmiştir. Kontrol ve atorvastatin grupları arasındaki bu değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

**Çizelge.4.4.** Kontrol ve 20 mg/kg/gün atorvastatin uygulanan gruplarda plazma lipid ve karaciğer enzim aktivite değerleri. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. (n=12) : \*: p<0.0001; †: p<0.001, kontrol grubundan fark. LDL, düşük dansiteli; HDL, yüksek dansiteli; VLDL, çok düşük dansiteli lipoprotein; TG, trigliserid; ALT, alanin transaminaz; AST, aspartat aminotransferaz

Plazma lipidleri ve Lipoproteinler (mg/dL)	<b>Kontrol</b>	<b>Atorvastatin</b>
<b>Total-kolesterol</b>	34.08 $\pm$ 1.72	17.42 $\pm$ 1.70 <sup>†</sup>
<b>LDL-kolesterol</b>	21.17 $\pm$ 1.4	5.250 $\pm$ 2.2 <sup>†</sup>
<b>HDL-kolesterol</b>	2.667 $\pm$ 0.14	2.333 $\pm$ 0.14
<b>VLDL-kolesterol</b>	10.25 $\pm$ 0.78	9.833 $\pm$ 1.06
<b>TG</b>	60.64 $\pm$ 2.4	42.60 $\pm$ 3.7*
<b>Karaciğer Enzimleri (U/L)</b>		
<b>ALT</b>	51.75 $\pm$ 3.7	51.10 $\pm$ 3.7
<b>AST</b>	55.64 $\pm$ 4.6	55.90 $\pm$ 5.4



**Şekil.4.1.** Kontrol ve atorvastatin gruplarına ait eritrosit EI değerleri ve  $SS_{1/2}$  değerleri. **a.** 0.3–30 Pa arası kayma kuvvetlerindeki eritrosit EI değerleri. **b.** maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ( $SS_{1/2}$ ) değerleri. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=12).

## TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki, kobaylara 20 mg/kg/gün atorvastatin uygulanmasından sonra plazma LDL kolesterol, trigliserid ve total kolesterol konsantrasyonları kontrol grubuna göre önemli bir şekilde azalmıştır. Bu doz subra farmakolojiktir ve insanlarda uzun süren tedaviden sonra benzer değişiklikler meydana gelir. Atorvastatin uygulamasının sonunda alınan kan örneklerine ait kırmızı kan hücresi, hemoglobin ve hematokrit değerleri kontrol değerlerine göre önemli bir şekilde artmıştır. Ortalama eritrosit hacmi atorvastatin grubunda istatistiksel olarak önemli bir azalma olmasına rağmen, beyaz kan hücresi, ortalama eritrosit hemoglobin değerlerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Bu çalışmada, atorvastatin uygulamasından sonra eritrosit membranı lipid kompozisyonunda da önemli değişikliklerin meydana geldiği gösterilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta eritrosit membranı kolesterol içeriğinde bir azalma, fosfolipid içeriğinde ise bir artış söz konusudur. Lipid kompozisyonundaki bu değişikliğin sonucu olarak eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranı da azalmıştır. Eritrosit membranındaki bu değişimlere  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  enzim aktivitesindeki artma eşlik etmiştir. Membrandaki bu yapısal ve fonksiyonel değişimlere rağmen eritrosit deformabilitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Bu çalışmada model olarak kobayın kullanılma sebeplerinin başında lipoprotein ve hepatik kolesterol metabolizmasının insan ile büyük benzerlikler göstermesi gelmektedir (162,163). Buna ek olarak temel kolesterol taşıyıcısı olan LDL' de insan ve kobay arasında önemli benzerlikler bulunmaktadır (162). İnsan ve kobaylarda yapılan çalışmalarda statin tedavisiyle plazma LDL-kolesterol konsantrasyonunda benzer düzeyde azalmalar olduğu gösterilmiştir (70–73). Overektomize kobayların plazma lipid profilleri postmenopozal kadınların lipid profiliyle aynıdır (160). İnsanlarda olduğu gibi kobaylarda da egzersiz sırasında plazma triaçilgliserol seviyesinde azalma ve plazma HDL-kolesterol seviyesinde artma olur. Kobaylar beslenme faktörlerine, ilaç tedavilerine, askorbik asit eksikliğine, oksidatif strese, hormonal değişimlere insanların vermiş olduğu yanıtlara benzer cevaplar verirler (162,163).

Bu çalışmada atorvastatin tedavisinden sonra alınan kan örneklerinde OEK' de bir azalma saptanmışken, OEHK' da herhangi bir değişiklik saptanamamıştır. Eritrosit membranında bulunan  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  enzimi, eritrosit katyon ve su içeriğini düzenleyerek hücre içi viskozitenin ve yüzey alanı-hacim oranının kontrolünü sağlar (4,16,82). Eritrosit membranındaki sodyum-potasyum pompasının az çalışması veya ouabain ile inhibe edilmesi eritrosit sitoplazmasında  $\text{Na}^+$  birikmesine neden olur (111–113). Buna bağlı olarak hücrenin hacminde meydana gelen değişikliklerden dolayı hücre küresel bir hale gelir.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  aktivitesindeki artış ise hücre hacminde azalmaya neden olur (16,82). Artmış pompa aktivitesine

bağlı olarak hücre dışına çıkan sodyum ve su miktarında artış olur. Bunun sonucunda hücre hacminde azalma meydana gelir. Dehidratasyon sonucu hücre içi viskozitede artış meydana gelebilir (4–6). Hücre içinde artan Hb, iskelet proteinlerinden spektrinle çapraz bağlar yaparak deformabilitenin azalmasına neden olabilir (4,5).

Eritrositler kemik iliğinde hemopoetik ana hücrelerin diferansiyasyonu sonucunda ortaya çıkarlar. Yaklaşık 120 gün ömürleri bulunan eritrositler, bu sürenin sonunda dalak, karaciğer ve kemik iliğindeki mononükleer fagositler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır (2,4). Bu çalışmada atorvastatin uygulamasının sonunda alınan kan örneklerine ait kırmızı kan hücresi, hemoglobin ve hematokrit değerleri kontrol değerlerine göre önemli bir şekilde artmıştır. Kemik iliğinde eritrosit üretiminin uyarılması ya da dalakta eritrosit yıkımının azalmış olmasından dolayı kırmızı kan hücrelerinin sayısında artış gözlenmiş olabilir. Başka bir değişle eritrositlerin yaşam süresi uzamış olabilir. Eritrosit membranının kolesterol içeriği azaldığında, fosfolipid içeriği arttığında yani kolesterol/fosfolipid oranı azaldığında, membran akışkanlığı ve sodyum-potasyum aktivitesi artar ve hücrelerin yaşam süreleri uzar (120–122). Artan kırmızı kan hücrelerinden dolayı hematokrit değeri de artmıştır. Plazma hacminde bir azalmanın olma ihtimalide hematokrit değerinin artmasına neden olabilecek başka bir faktördür (76).

Eritrosit membranı, hücrenin şekil değiştirme yeteneğinin belirlenmesi ve yapısal bütünlüğünün sağlanarak bikonkav disk yapısındaki hücre şeklinin korunmasında önemli rol oynar. Membran lipidlerinin, eritrosit deformabilitesine doğrudan önemli bir etkisinin bulunmadığı, ancak membran kolesterol/fosfolipid oranındaki değişikliğin dolaylı olarak membran fonksiyonlarını değiştirmesinin eritrosit deformabilitesinin belirlenmesinde etkili olduğu hususunda fikir birliği vardır (5–7,83). Endojen lipid sentezi yapamayan eritrositlerin membran kolesterol/fosfolipid oranı plazma lipid düzeyinden etkilenir. Plazma kolesterol düzeyi yüksek olan hastalarda eritrosit membranında kolesterol/fosfolipid oranının arttığı (144–147), eritrosit membran fonksiyonlarının ve akışkanlığının bozulduğu gösterilmiştir (143)

Birçok klinik çalışma verileri koroner arter hastalığı (KAH) tanısı konulmuş hastalarda lipid düşürücü tedavinin başlanılmasını kuvvetle desteklemektedir. Bu hastaların hastalık seyirlerinde olumlu yönde bir değişiklik yapabilmek için temel ilke plazma lipid profilinin normalleştirilmesi olmalıdır. Bu nedenle plazma kolesterol konsantrasyonunun düşürülmesi KAH ve komplikasyonlarının önlenmesi için gereklidir. Son yıllarda klinik çevrelerce plazma lipid düzeyleri için “ne kadar düşük, o kadar iyi” kavramı yerleşmeye başlamıştır (23,24,25,53,54,57). Statinler olarak bilinen 3- hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri yüksek plazma kolesterol seviyesine sahip hastalarda yaygın olarak kullanılan, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde geniş yeri olan ajanlardır (164). Statin tedavisiyle plazma trigliserid seviyesinin %10–30, kolesterol seviyesinin %15–40, LDL-kolesterol seviyesinin ise %20–60 oranında düştüğü gösterilmiştir (165–168). Bu çalışmada, normal diyetle beslenen kobaylara üç hafta süresince, günde tek doz (20 mg/kg/gün) olmak üzere, oral gavaj yoluyla atorvastatin verilmiştir. Kullanılan atorvastatin dozu gerek insan gerekse hayvan çalışmalarındaki sonuçlardan yola çıkılarak belirlenmiştir (70,71). Birçok çalışmada,



20 mg/kg/gün dozunda kullanılan atorvastatin tedavisinin plazma LDL-kolesterol, trigliserid ve total kolesterol seviyelerinde anlamlı azalmalar oluşturduğu (70–73); öte yandan, daha yüksek dozlardaki kullanımının, plazma lipid seviyelerinde önemli ölçüde ek bir azalma yaratmadığı gösterilmiştir (53,66). Bu çalışmada da, 20 mg/kg/gün atorvastatin tedavisinden sonra alınan kan örneklerinde yapılan ölçümlerde HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol değerlerinde önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, plazma LDL-kolesterol, trigliserid ve total kolesterol konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmalar saptanmıştır. Benzer sonuçlar kontrollü insan çalışmalarında da saptanmış olup uzun süreli ilaç kullanımı sonrasında plazma lipid düzeylerinin normalin altına düştüğü gösterilmiştir (23,24,25,53,54,57).

Atorvastatin tedavisinden sonra eritrosit membranı kolesterol içeriğinde azalma, fosfolipid içeriğinde ise artma saptanmıştır. Eritrosit membranı lipid kompozisyonunda meydana gelen bu değişikliklerin doğal sonucu olarak, membran kolesterol/fosfolipid oranı da azalmıştır. Eritrosit membranındaki tüm bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Membran lipid içeriğinde meydana gelen tüm bu değişikliklere rağmen eritrosit deformabilitesinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durum eritrosit deformabilitesinin esas belirleyicisinin membran iskelet proteinleri olmasına bağlanabilir (131,133,135). Öte yandan membran lipid içeriği, özellikle kolesterol/fosfolipid oranı eritrosit membran akışkanlığının belirleyicisidir. Hücre membran akışkanlığı, membranların lipid içeriğiyle hesaplanır ve kolesterol/fosfolipid oranına bağlıdır (169). Eritrosit membranındaki kolesterol içeriğinin artmasıyla, membran akışkanlığının azaldığı bilinmektedir (170). Bunun yanı sıra biyolojik membranlardaki lipid/protein oranı ve protein çeşitlerinin de membran akışkanlığı üzerine etkisi bulunmaktadır (171).

Bu çalışmanın bir diğer sonucu atorvastatin tedavisi alan kobaylardan elde edilen eritrosit membranlarında  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPaz aktivitesinde saptanan artıştır. Atorvastatin kullanımı ile eritrosit membranındaki hem total enzim aktivitesinde hem de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artışın meydana geldiği gösterilmiştir. Bu bulgu eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranında saptanan azalma ile uyum içindedir. Eritrosit membranının kolesterol/fosfolipid oranındaki değişikliklere, membran permeabilitesi, membran transport fonksiyonları, membran proteinlerindeki konformasyonel değişiklikler ve özellikle de membran enzim aktivitesindeki değişikliklerin de eşlik ettiği bilinmektedir (172–173). Eritrosit katyon ve su içeriğini düzenleyen esas enzim olan  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaz aktivitesi membran lipid tabakasının akıcılığından etkilenmektedir (116). Eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranındaki artışın fosfolipidler tarafından uyarılan ATPaz aktivitesini inhibe ettiği, buna karşılık membran akışkanlığını arttıran doymamış fosfolipidlerin varlığının enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (174). Eritrosit membranı fosfolipid içeriğinde azalmaya yol açan oksidan ajanların kullanıldığı çalışmalarda da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (175). Kısaca eritrosit membranı  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaz aktivitesi ile membran kolesterol içeriği arasında negatif fosfolipid içeriği arasında ise pozitif bir bağıntı mevcuttur.

Eritrosit membranı  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaz aktivitesinde meydana gelen bu artışla uyumlu olarak OEHK' da değişme yok iken, OEH' de azalma saptanmıştır. Eritrosit

sıvı ve katyon içeriğinin düzenleyicisi olan  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  pompasının aktivitesindeki artış, eritrosit hacminde küçülmeden sorumludur (16,82).

Sonuç olarak KAH tedavisinde yaygın olarak kullanılan statinler, plazma LDL ve total kolesterol düzeylerini etkili bir şekilde düşürmekle birlikte eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranında azalmaya ve  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  enzim aktivitesinde de artışa neden olmaktadır. Eritrosit membranında meydana gelen bu değişikliklerin eritrosit deformabilitesinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. Eritrosit deformabilitesinin değişmesinde, membrandaki lipidlerin katkısının çok önemli olmadığı ancak membran iskelet proteinlerinin önemli rolü olduğu konusunda fikir birliği vardır (5,6,133). Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak statin tedavisi ile sağlanan hipokolesteroleminin eritrosit deformabilitesi üzerine olumsuz etkisinin saptanmaması, bu tedavinin en azından eritrosit mekaniği açısından güvenilir olduğunu düşündürmektedir.

## SONUÇLAR

1) Atorvastatin uygulanmasından sonra plazma LDL-kolesterol, trigliserid ve total kolesterol konsantrasyonları kontrol grubuna göre önemli bir şekilde azalmasına rağmen VLDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeylerindeki değişiklikler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

2) Atorvastatin grubuna ait kan örneklerinde kırmızı kan hücresi, hemoglobin ve hematokrit değerleri kontrol değerlerine göre önemli bir şekilde artmıştır. Ortalama eritrosit hacminde de önemli bir azalma saptanmıştır. Beyaz kan hücresi, ortalama eritrosit hemoglobin değerlerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

3) Atorvastatin uygulamasından sonra eritrosit membranı lipid kompozisyonunda da önemli değişikliklerin meydana geldiği gösterilmiştir. Atorvastatin uygulanan grupta eritrosit membranı kolesterol içeriğinde bir azalma, fosfolipid içeriğinde ise bir artış söz konusudur. Lipid kompozisyonundaki bu değişikliğin sonucu olarak eritrosit membranı kolesterol/fosfolipid oranı da azalmıştır. Eritrosit membranı total enzim aktivitesi ve  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPaz enzim aktivitesinde de artma saptanmıştır.

4) Bu çalışmamızda atorvastatin tedavisinden sonra ortaya çıkan hipokolesteroleminin eritrosit membranı lipid kompozisyonunda değişiklik yaratmasına rağmen eritrosit deformabilitesi üzerine etkili olmadığı gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- 1) Charm S.E., Kurland G.S. Blood flow and microcirculation. New York: *JohnWiley&Sons*; 3–210,1974.
- 2) Merrill E.W. Rheology of blood. *Physiol. Rev.* 49: 863–888,1969.
- 3) Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 177–192,1987.
- 4) Wintrobe M. M., Lee G.R., Boggs D.R., Bithell T.C., Foerster R.J., Athens J.W., Lukens J.N. The mature erythrocyte. In: *Clinical Hematology*. Philadelphia: Lea-Febiger; 75–133, 1981.
- 5) Mohandas N. Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 776–782, 1992.
- 6) Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 30: 171–192,1993.
- 7) Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 787–818, 1994.
- 8) Chien S., Sung L.P. Molecular basis of red cell membrane rheology.. *Biorheology.* 27: 327–344,1990.
- 9) Lipowsky R & Sackmann E (eds). *The Structure and Dynamics of Membranes*. Amsterdam: *Elsevier*, 1995.

- 10) Engelman B., Duhm J. Effect of cholesterol and dipalmitoyl phosphatidylcholine enrichment on the kinetics of Na-Li exchange of human erythrocytes. *J. Membr. Biol.* 122: 231–38, 1991.
- 11) Chen Q., Amaral J. Excess membrane cholesterol alters human gallbladder muscle contractility and membrane fluidity. *Gastroenterology* 116: 678–85, 1999.
- 12) Schroeder F., Frolov A. Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213: 150–77, 1996.
- 13) Schroeder F., Woodford J.K. Cholesterol domains in biological membranes. *Mol. Membr. Biol.* 12: 113–19, 1995.
- 14) Sheetz M.P. Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol.* 20: 175–188, 1983.
- 15) Weed R.I. The importance of erythrocyte deformability. *Am. J. Med.* 49: 147–150, 1970.
- 16) Mohandas N., Shohet S.B. The role membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin. Hematol.* 10: 223–237, 1981.
- 17) Noji S., Taniguchi S., Kon H. An EPR study on erythrocyte deformability. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 55: 85–105, 1991.
- 18) Hasegawa S., Hiruma H., Uyesaka N., Noguchi C.T., Schechter A.N., Rodgers G.P. Filterability of mixtures of sickle and normal erythrocytes. *Am. J. Hematol.* 50: 91–97, 1995.

- 19) Dormandy J., Boyd M., Ernest F. Red cell filterability and myocardial infarction. *Scand. J. Clin. Med.* 156: 195–198, 1981.
- 20) Saldanha C., Sargento L., Moterio J., Perdigao C., Riberio C., Martins-Silva J. Impairment of the erythrocyte membrane fluidity in survivors of acute myocardial infarction. A prospective study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 20: 111–116, 1999.
- 21) McMillan D.E., Utterback N.G., Mithell T.P. Doublet formation of diabetic erythrocytes as a model of impaired membrane viscous deformation. *Microvasc. Res.* 26: 205–220, 1983.
- 22) Goldstein J.L., Kita T., Brown M.S. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 309: 288–96, 1983.
- 23) The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383–1389, 1994.
- 24) Smilde T.J., Van Wissen S., Wollersheim H., Trip M.D., Kastelein J.J.P., Stalenhaef A.F.H. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomized, double-blind trial. *Lancet* 357: 577–581, 2001.
- 25) The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* 339: 1349–1357, 1998.
- 26) Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica. Biophysica. Acta.* 1529: 245–256, 2000.

- 27) Glomset J. A. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *Journal Of Lipid Research*. 9: 155–167, 1968.
- 28) Gundermann K. J. The “Essential” Phospholipids as a Membrane Therapeutic, *Polish Section of European Society of Biochemical Pharmacology*, Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Academy, SZCZECIN, 1993.
- 29) Lange Y., Molinarol A. L., Chauncey T. R., and Steck T. L. On the Mechanism of Transfer of Cholesterol between Human Erythrocytes and Plasma. *The Journal Of Biological Chemistry*. 258(11): 6920–6926, 1983.
- 30) Hui S. W., Stewart C. M., Carpenter M. P. and Stewart T. P.. Effects Of Cholesterol On Lipid Organization in Human Erythrocyte Membrane. *J. Cell Biology*, 85: 283–291, 1980.
- 31) Cannon C., Nissen S., Eckel R. American College of Cardiology Annual Scientific Session. *American Heart Association*, 2004.
- 32) Aronow H. D. . The Myocardial Ischemia Reduction with Acute Cholesterol Lowering trial: MIRACuLous or not, it's time to change current practice. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med*. 3 (1): 3, 2002.
- 33) Scheen A.J., Kulbertus H. Reversing Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering (REVERAL) and Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy (PROVE-IT): confirmation of the concept " the lower, the better" for cholesterol therapy in patients with coronary heart disease. *Rev. Med. Liege*. 59(3):167–73,2004.
- 34) Burtis C.A., Ashwood E.R. Fundamentals of clinical chemistry. In: Stein E.A., Myers G.L., eds. Lipids, Apolipoproteins and lipoproteins. 4th ed. *Philadelphia: Saunders Company*:375–401, 1996.

- 35) Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, , 4th ed., Chap 10, 2002.
- 36) Harvey L., Arnold B., Lawrence Z. S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. E. *Molecular Cell Biology* .New York; W. H. Freeman and Company, Chap 5, 2000.
- 37) Mahley R. W., Weisgraber K. H., and Farese R. V., Jr. Williams Textbook of Endocrinology ECTION VIII: Chap 34. 2003
- 38) Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur. Heart J.* 19 (Suppl A) : A20–3, 1998.
- 39) Witztum J.L. Durugs used in the treatment of hyperdyslipidemias. In: Hardman J.G., Limbird L.E., Molinof P.B., Ruddon R.W., Gilman A.G., eds. Goodman and Gilman’s the pharmacological Basis of Therapetics, 9th ed. New York : McGrow-Hill International Book Co.; chap 36 : 875-97, 1996.
- 40) Russell D.W. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 6: 103–10, 1992.
- 41) Singer S.J. and Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731, 1972.
- 42) Cooper G. M. *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc; Chap 12, 2000.
- 43) Brown M.S. and Goldstein J.L., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed., A. G. Gilman, L. S. Goodman, T. W. Rall, and F. Murad, Eds. (Macmillan), 828, 1985.



- 44) Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 5th Edition, Chaps 12,26, 2002.
- 45) Brewer H.B., Zech L.A., Greg R.E., Schwartz D., Schaefer E.J. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann. Intern. Med.* 98: 623–40, 1983.
- 46) Walker K. H., Hall D. W., Hurst W. J. *Clinical Methods, The History, Physical, and Laboratory Examinations*, Stoneham (MA): Butterworth Publishers Third ed., Chap 31; 1990.
- 47) Brown MS, Goldstein JS. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am.* 251: 57–66, 1984.
- 48) Ad. Hoc. Committee of AHA to Design a Dietary Treatment of Hyperlipoproteinemia. Recommendations for Treatment of Hyperlipidemia in Adults. A Joint Statement of the Nutrition Committee and the Council on Arteriosclerosis. *Circulation*; 72: 1067A-90A., 1984.
- 49) Betteridge D.J. *Lipids and Lipoproteins*, Volume1, Groupe Fournier, Martin Dunitz Ltd, pp. 1–20, 1996,
- 50) Rubin E., Farber J.L. (Eds.) *Pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 3rd ed. pp. 491–509, 520- 522. 1999.
- 51) Nabel E.G. Genomic medicine: Cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 72; 349–60, 2003.
- 52) Kreisberg R.A., Oberman A. Medical management of hyperlipidemia/dyslipidemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 88: 2445–61, 2003.
- 53) National Institute of Health Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection,

Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (NIH Publication No.01 .3670).Bethesda,MD: *National Institutes of Health*. 2001.

- 54) Empana J.P., Ducimetiere P., Arveiler D., Ferrieres J., Evans A., Ruidavets J.B., Haas B., Yarnell J., Bingham A., Amouyel P., Dallongeville J. PRIME (Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction) Study Group. Are the Framingham and PROCAM (Prospective Cardiovascular Munster) coronary heart disease risk functions applicable to different European populations? The PRIME Study. *Eur. Heart J.* 24(21): 1903–11, 2003.
- 55) Glasser S.P., Selwyn A.P., Ganz P. Atherosclerosis: Risk factors and the vascular endothelium. *American Heart Journal* 31: 379–384, 1996.
- 56) Gordon T, Castelli W.P., Hjortland M.C., Kannel W.B., Dawber T.R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am. J.Med.* 62: 707–14, 1977.
- 57) Cleeman J.I., S.M. Grundy, D. Becker, L.T. Clark, R.S. Cooper, M.A. Denke, W.J. Howard, D.B. Hunninghake, D.R. Illingworth, R.V. Luepker, P. McBride, J.M. McKenney, R.C. Pasternak, N.J. Stone, L. Van Horn, H.B. Brewer, N.D. Ernst, D. Gordon, D. Levy, B. Rifkind, J.E. Rossouw, P. Savage, S.M. Haffner, D.G. Orloff, M.A. Proschan, J.S. Schwartz, C.T. Sempos, S.T. Shero and E.Z. Murray, Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III), *Jama-Journal of the American Medical Association* 285 , 2486–2497, 2001.
- 58) Harper C.R., Jacobson T.A. New perspectives on the management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *Archives of Internal Medicine* 159: 1049–57, 1999.

- 59) Memon L., Kalimanovska V. S., Jovic P., Spasi S., Stanojevic N. B.. Determination of cholesterol in erythrocyte membrane. *Jugoslov. Med. Biochem.* 22: 213–219, 2003.
- 60) Bretscher M.S. The molecules of the cell membrane *Sci. Am.* 253(4): 100–109, 1985.
- 61) Atac B, Brahaj D, Frishman W.H., Lerner R. Anemia and hypocholesterolemia. *Heart Dis.* 5(1): 65–71, 2003.
- 62) Shores J., Peterson J, Vanderjagt D., Glew R.H. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J. Natl. Med. Assoc.* 95(9): 813–7, 2003.
- 63) Wu L.Y., Yang T.C., Kuo S.W., Hsiao C.F., Hung Y.J., Hsieh C.H., Tseng H.C., Hsieh A.T., Chen T.W., Chang J.B., Pei D. Correlation between bone mineral density and plasma lipids in Taiwan. *Endocr. Res.* 29 (3): 317–25, 2003.
- 64) Yokoyama M., Suto Y., Sato H., Arai K., Waga S., Kitazawa J., Maruyama H., Ito E. Low serum lipids suggest severe bone marrow failure in children with aplastic anemia. *Pediatr Int.* 42(6): 613–9, 2000.
- 65) Tatidis L., Vitols S. , Gruber A. , Paul C., Axelson M. Cholesterol catabolism in patients with acute myelogenous leukemia and hypocholesterolemia suppressed levels of a circulating marker for bile acid synthesis. *Cancer Lett.* 20; 170(2): 169–75, 2001.
- 66) Hartman C. , Tamary H. , Tamir A. , Shabad E. , Levine C. , Koren A. , Shamir R. Hypocholesterolemia in children and adolescents with beta-thalassemia intermedia. *J. Pediatr.* 141(4): 543–7, 2002.

- 67) Kalantar Z. K. , Ikizler T.A. , Block G., Avram M.M. , Kopple J.D. Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients causes and consequences. *Am. J. Kidney. Dis.* 42(5): 864–81, 2003.
- 68) Gordon B.R. , Parker T.S. , Levine D.M., Saal S.D. , Wang J.C. , Sloan B.J. , Barie P.S. , Rubin A.L. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit. Care. Med.* 24: 584–89, 1996.
- 69) Marais A.D., Firth J.C., Bateman M.E., Byrnes C.P. Martens and J. Mounthey, Atorvastatin: An effective lipid-modifying agent in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1527–31, 1997.
- 70) Sever P.S., Dahlof B., Poulter N.R. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA). *Lancet*, 361: 49–58, 2003.
- 71) Conde K., Vergara-Jimenez M., Krause B.R., Newton R.S. , Fernandez M.L. Hypocholesterolemic actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic cholesterol metabolism and lipoprotein composition in the guinea pig. *J. Lipid. Res.* 37 (11): 2372–82, 1996.
- 72) Conde K., Graciela P., Roger S., Fernandez N. and M. L. Hypocholesterolemic effects of 3-hydroxy–3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in the guinea pig: Atorvastatin versus simvastatin. *Cardiovascular and Pulmonary Pharmacology.* 2952: 203–8, 1999.
- 73) Burnett J.R., Wilcox L.J., Telford D.E., Kleinstiver S.J., Barrett P.H., Newton R.S., Huff M.W. Inhibition of HMG-CoA reductase by atorvastatin decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B

- production in miniature pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (11): 2589–600, 1997.
- 74) Cromer A.H. Physics for the life sciences. McGraw-Hill; 152–154, 1981.
- 75) Matrai A., Whittington R.B., Skalak R. *Biophysics*. In: Chien S., Dormandy J., Ernst E., Matrai A.: *Clinical Hemorheology*. Dordrecht-Boston-Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers; 9–71, 1987.
- 76) Stoltz J.F. Hemorheology: Pathophysiological significance. *Acta Med.* 6: 4–13, 1985.
- 77) Wells R., Goldstone J. Rheology of the red cell and capillary blood flow. In: Gabelnick H.L., Litt M. (Eds.): *Rheology of biological systems*. Springfield: Charles C Thomas; 5–11, 1973.
- 78) Wells R., Schmid S. H. Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. *J. Appl. Physiol.* 27: 213–217, 1969.
- 79) Lowe G.D. O. Clinical blood rheology. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- 80) Schmid S. H., Wells R.E. Fluid drop-like behavior of erythrocyte disturbance pathology and its quantification. *Biorheology* 7: 227–234, 1971.
- 81) Wells R., Schmid S. H. Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. *J. Appl. Physiol.* 27: 213–217, 1969.
- 82) Dealunay J. The enzymes of red blood cell plasma membrane. *Biomedicine* 26: 357–361, 1977.

- 83) Sheetz M.P. Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Semin Hematol.* 20: 175–188, 1983.
- 84) Bevers E.M., Comfurius P., Dekkers D.W., Zwaal R.F. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1439: 317–330, 1999.
- 85) Onat T., Emerk K. *Temel Biyokimya*, Saray Med. Yayıncılık, 865–873, 1996.
- 86) Stryer L. *Biochemistry* 3<sup>rd</sup> ed. W.H. Freeman and Company, 283–312, 1988.
- 87) Shohet S.B. Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids. *The New Eng. J. Med.* 286: 577, 1972.
- 88) Lee G.R., Bithel T.C., Foester J. *Wintrobe's Clinical Hematology* 9<sup>th</sup> ed, Lea & Febiger, 101-103, 746-749, 1993.
- 89) Fisher K.A. Analysis of membrane halves: Cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 173, 1976.
- 90) Cooper R.A., Bleich H.L., Boro E.S. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *The New Eng. J. Med.* 18: 371–377, 1977.
- 91) Jandl J.H. *Blood Textbook of Hematology*. 1<sup>st</sup> ed. Little, Brown and Company, 49–111, 1987.
- 92) Alonso C., Pries A.R., Gaehtgens P. Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *Am. J. Physiol.* 253: 553–561, 1993.

- 93) Palek J., Liu S.C. Dependence of spectrin organization in red cell membranes on cell metabolism: Implications for control red cell shape deformability, and surface area. *Semin Hematol.* 16: 75–93, 1979.
- 94) Nash G.B., Gratzner W.B. Structural determinations of the rigidity of the red cell membrane. *Biorheology* 30: 397-407, 1993.
- 95) Baskurt O.K., Yavuzer S. Some hematological effects of oxidants. In: Environmental Oxidants Nriagu J.O., Simmons M., (Eds.): Advances in environmental science and technology. New York-Chichester-Brisbane-Toronto- Singapore: John Willey & Sons, Inc. 12: 405–423, 1994.
- 96) Fairbanks G., Avruch J., Patel V.P. Phosphorylation and dephosphorylation of spectrin. *J. Supramol. Struct.* 9: 97–112, 1978.
- 97) Chiu D. , Kuypers F. , Lubin B. Lipid peroxidation in human red cells. *Semin Hematol.* 26: 257–276, 1989.
- 98) Hoffman J.F. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am. J. Med.* 41: 666–680, 1966.
- 99) Kyte J. Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. The relationship between molecular structure and the mechanism of active transport. *J. Biol. Chem.* 250: 7443–7449, 1975.
- 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) Yingst D.R. Modulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by Ca<sup>++</sup> and intracellular proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 291–303, 1988.

- 102)** Sweadner K. J. Isoenzymes of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys Acta.* 988: 185–220, 1989.
- 103)** Skou J. C. Na-K pump. *M. Enzymol.* 156: 1–25, 1988.
- 104)** Jorgenson P. L. Mechanism of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump; protein structure and conformation of the pure Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys Acta.* 694: 27–68, 1982.
- 105)** Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W. *Harper's Biochemistry.* Twenty second edition, Large Medical Publications, 1990.
- 106)** Kyte J. Properties of the two polypeptides of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247 (33): 7642–7649, 1972.
- 107)** Tanguichi K., Tonomura Y. Inactivation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> dependent ATPase by phospholipids. *Bio. Chemistry.* 69: 543–557, 1971.
- 108)** Hegyvary C., Post R.L. Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 246 (17): 5234–52–40, 1971.
- 109)** Schuurmans S.F., Bonting S.L. Transport adenosine triphosphatases. *Physiol. Rev.* 61: 1–76, 1981.
- 110)** Deuticke B., Haest W.M. Lipid modulation of transport proteins in vertebrate cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 221–235, 1987.
- 111)** Depont J.J.H.H.M., Van Eeden A.V.P. , Bonting S.L. Role of negatively charged phospholipids in highly purified Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase from rabbit kidney outer medulla. *Biochim. Biophys Acta.* 508: 464–477, 1978.



- 112)** Goldman S.S., Albers R.W. Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. The role of phospholipids. *J. Biol Chem.* 248(3): 867–874, 1973.
- 113)** Jaernfelt J. Lipid requirements of functional membrane structure as indicated by the reversible inactivation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys Acta.* 266: 91–96, 1972.
- 114)** Kimelberg H.K., Papahadjopoulos D. Phospholipid requirements for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity: Head group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim. Biophys. Acta.* 282: 277–292, 1972.
- 115)** Wheeler K.P., Whitham R. The involvement of phosphatidylserine in adenosine triphosphatase activity of the sodium pump. *J. Physiol.* 207: 303–328, 1970.
- 116)** Walker J.A., Wheeler K.P. Polar head-group and acyl chain requirements for phospholipid dependent Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 394: 135–144, 1975.
- 117)** Lijnen P, Petrov V. Cholesterol modulation of transmembrane cation transport systems in human erythrocytes. *Biochem. Mol. Med.* 56: 52–62, 1995.
- 118)** Wiley J.S., Cooper R.A. Inhibition of cation cotransport by cholesterol enrichment of human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 413: 425–431, 1975.
- 119)** Cooper R.A., Leslie M.H., Kright D., Detweiler D.K. Red cell enrichment and spur cell anemia in dogs fed cholesterol enriched atherogenic diet. *J. Lipid Res.* 21: 1082–9, 1980.
- 120)** Cooper R.A. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.* 297. 371–377, 1977.

- 121)** Gordon L.M. and Mobley P.W. Membrane lipids, membrane fluidity and enzyme activity. In: *Membrane fluidity in biology*, L.M. Gordon, Ed. Academic Press, New York, pp. 1–49, 1985.
- 122).** Quinn P.J. The fluidity of cell membranes and its regulation, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 38: 1–104, 1981.
- 123)** Jennings M.L. Topograph of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 999–1027, 1989.
- 124)** Thompson T.E., Tillack T.W. Organisation of glycosphingolipids in blayers and plasma membranes of mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys.* 14: 361–386, 1985.
- 125)** Nuhn P. Phospholipide und biologische Aktivität *Pharmazie*.37: 681–701, 1982.
- 126)** Shinitzky M. Membrane fluidity and cellular functions In: *Physiology of Membrane Fluidity* (M.Shinitzky, Ed.), CRC Press, Boca Raton Fla, 1–51, 1984.
- 127)** Storch J., Kleinfeld A.M. The lipid structure of biological membranes . *TIBS.* 10: 418-421, 1985.
- 128)** Salvioli G., Rioli G., Lugli R., Salati R. Membrane lipid composition of red blood cells in liver disease: regression of spur cell anaemia after infusion of polyunsaturated phosphatidylcholine. *Gut* 19: 844–850, 1978.
- 129)** Owen J.S., Bruckdorfer K.R., Day R.C, McIntyre N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* 23: 124–132, 1982.

- 130)** Mohandas N., Chasis J.A., and Shohet S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. *Semin Hematol.* 20: 225–242, 1983.
- 131)** Mohandas N. and Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape regulation by trans-membrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 30: 171–192, 1983.
- 132)** Rapaport S.I. (Ed.): The red cell. In: West J.B. (Ed.): *Physiological basis of medical practise.* Baltimore: Williams Wilkins; 390–408, 1985.
- 133)** Mohandas N., Chasis J.A., Shohet S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 20: 225–242, 1983.
- 134)** Hochmuth R.M., Waugh R.E. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 209–219, 1987.
- 135)** Mohandas N., Clark M.R., Jacobs M.S., Shohet S.B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J. Clin. Invest.* 66: 563–573, 1980.
- 136)** Clark M.R., Shohet S.B., Gottfried E.L. Hereditary hemolytic disease with increased red blood cell phosphatidyl choline and dehydration: one, two, or many disorders. *Am. J. Hematol.* 42: 25–30, 1993.
- 137)** Lolascón A., Giudice M. E., Perotta S., Alloisio N., Morle L., Delaunay J. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. *Hematologica* 83: 240–257, 1998.
- 138)** Kunt T., Schineider S., Pfutzner A., Goitum K., Engelbach M., Schauf B., Beyer J., Forst T. The effect of human proinsulin c-peptide on

erythrocyte deformability in patients with type I diabetes mellitus. *Diabetologi.* 42: 465–471, 1999.

- 139)** Hacıoglu G., Yalcin O., Bor-küçükay M., Ozkaya G., Baskurt O.K. Red cell rheological properties in various rat hypertension models. *Clin Hemorheol Microcir* 24: 25–31, 2001.
- 140)** Baskurt O.K., Belmont D., Meiselman H.J. Red cell deformability in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157. 421–427, 1998.
- 141)** Kayar E., Mat F., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology* 38: 405–414, 2001.
- 142)** Salvioli G. Relationships between lipid composition of erythrocytes and their deformability. In: *Phospholipids and Atherosclerosis* (P.Avogaro, M.Mancini, G. Ricci, R.Paoletti, Eds.) Raven Press, New York, 81–90, 1983.
- 143)** Koter M., Franiak I., Strychalska K., Broncel M. and Jezierska J. C. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 36(2): 205–215, 2004.
- 144)** Martinez M., Vaya A., Marti R., Gil L., Lluch I., Carmena R. and Aznar J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thrombosis Research* 83: 375–88, 1996.
- 145)** Schick B.P. and Schick P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochimica Biophysica Acta.* 833: 281–290, 1985.

- 146)** Schick B.P. and Schick P.K. The effect of hypercholesterolemia on guinea pig platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochimica Biophysica Acta.* 833: 291–302, 1985.
- 147)** Vaya A., Martinez M., Guillen M., Dalmau J. and Aznar J. Erythrocyte deformability in young familial hypercholesterolemics. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 19: 43–48, 1998.
- 148)** Carreiras M.M., Proverbio T., Proverbio F., Marin R. Preeclampsia and Na-K-ATPase activity of red blood cell ghosts from neonatal and maternal blood. *Biol. Neonate* 79(1): 5-8, 2001.
- 149)** Baure J.D. Laboratory investigation of hemoglobin. In: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, edited by Sonnenwirth AC, Jarelt L. *St Louis, MO: Mosby* p.809–902, 1980.
- 150)** Lowry O.H, Rosebrough A., Farr L. and Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 193: 265–272,1951.
- 151)** Hanahan D.J., Ekholm J.E. The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes a comparison of different lytic procedures. *Arch. Biochem. Biophys.* 187: 170–179, 1978.
- 152)** Rose H.E., Oklander M. Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res.* 6: 428–431,1965.
- 153)** Baure J.D., Ackerman P.G. Phospholipids in clinical laboratory methods. *CO Mos- by Comp. St. louis:* 450–51, 1974.
- 154)** Heider G.J., Boyett R.L. The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture. *J. Lipid. Res.* 19: 514–18, 1978.

- 155)** Bergmeyer H.U., Horder M. and Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) scientific committee, analytical section: approved recommendations (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1), *J. Clin. Chem. Biochem.* 24, 497–510, 1986.
- 156)** Bergmeyer H.U., Horder M. and Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) scientific committee, analytical section: approved recommendations (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2), *J. Clin. Chem. Biochem.* 24, 481–495, 1986.
- 157)** Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S. and Richmond W.F.P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470–475, 1974.
- 158)** Hardeman M.R., Goedhart P.T., Dobbe J.G.G. and Lettinga K.P. Laser-assisted optical rotational cell analyzer (lorca). A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin. Hemorheol.* 14: 605–618, 1994.
- 159)** Baskurt O.K. and Meiselman H.J. Analyzing shear stress-elongation index curves: comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 31: 23–30, 2004.
- 160)** Fernandez M.L. Guinea pig as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 10–20, 2001.

- 161)** Maeda K., Yasunari K., Sato E.F. and Inoue M. Enhanced oxidative stress in neutrophils from hyperlipidemic guinea pig. *Atherosclerosis*. 181: 87–92, 2005.
- 162)** Conde K., Vergara J. M., Krause B.R., Newton R.S., Fernandez M.L. Hypocholesterolemic actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic cholesterol metabolism and lipoprotein composition in the guinea pig. *J Lipid Res* 37 (11) : 2372–82, 1996.
- 163)** Krause B.R. and Newton R.S. Animal models for the evaluation of inhibitors of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 1: 57–72, 1991.
- 164)** Endo A. The discovery and development of HMG-Co A reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 33: 1569–82, 1992.
- 165)** La Rosa J.C., He J., Vuupturi S. Effect of statins on risk of coronary disease; meta analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 282: 2340–6, 1999.
- 166)** Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* 339: 1349–57, 1998.
- 167)** Sever P.S., Dahlof B., Poulter N.R., Wedel H., Beevers G., Caulfield M., Collins R., Kjeldsen S.E., Kristinsson A., McInnes G.T., Mehlsen J., Nieminen M., O'Brien E., Ostergren J. ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo- Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-- Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. *Lancet*. 5: 361(9364):1149–1158, 2003.

- 168)** Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., Isles C.G., Lorimer A.R., MacFarlane P.W., McKillop J.H., Packard C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 16: 333(20): 1301–1307, 1995.
- 169)** Shepherd J., Blauw G.J., Murphy M.B., Bollen E.L, Buckley B.M., Cobbe S.M., Ford I., Gaw A., Hyland M., Jukema J.W., Kamper A.M., Macfarlane P.W., Meinders A.E., Norrie J., Packard C.J., Perry I.J., Stott D.J., Sweeney B.J., Twomey C., Westendorp R.G. PROSPER study group. PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomized controlled trial. *Lancet.* 23: 360(9346): 1623–1630, 2002.
- 170)** Gordon L.M, Mobley P.W. Membrane lipids, membrane fluidity, and enzyme activity. In: Gordon LM, ed. *Membrane Fluidity in Biology*, vol 4. New York: *Academic Press*: 1–49, 1985.
- 171)** Tall A.R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 34: 1255–1274, 1993.
- 172)** Yawata Y., Miyashima K., Sugihara T., Murayama N., Hosoda S., Nakashima S. Self-adaptive modification of red cell membrane lipids in lecithin cholesterol transferase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 769: 440–8, 1984.
- 173)** Cooper R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.* 297: 371–377, 1977.
- 174)** Chasis J.A., Shohet S.B. Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Annu. Rev. Physiol.* 49: 237–48, 1987.



- 175)** Rabini R.A., Petruzzi E., Staffolani R., Tesei M., Fumelli P., Pazzagli M. Diabetes mellitus and subjects' ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte. *Eur. J.Clin. Invest.* 27: 327–332,1997.

## ÖZGEÇMİŞ

Mehmet ÜYÜKLÜ, 1977 yılında Kahramanmaraş' ın Pazarcık ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini doğduğu yerde tamamlayarak 1997 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite eğitimine başladı. Üniversiteden mezun olduktan sonra Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında devam etmekte olan IR03 TW0129501A2 (FOGARTY INTERNATIONAL CENTER) nolu projede bir yıl görev aldıktan sonra 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2005 yılında aynı bölüme araştırma görevlisi olarak atandı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.