



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**TALASEMİ KRİTERİ OLARAK
HÜCRE İÇİ KALSIYUM, KARNİTİN,
MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE BU KRİTERLERİN
ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ VE KARNİTİN
TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Behiye TOPTAŞ

Antalya, 2002



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**TALASEMİ KRİTERİ OLARAK
HÜCRE İÇİ KALSIYUM, KARNİTİN,
MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE BU KRİTERLERİN
ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ VE KARNİTİN
TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Behiye TOPTAŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Aşlı BAYKAL

“Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 20.01.0103.21 Proje No ile Desteklenmiştir.”

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir.”

Antalya, 2002

TEŐEKKÖR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.T.Aslan AKSU ve tez hocam Sayın Doç.Dr. Aslı BAYKAL başta olmak üzere,

Değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Suat ARTVINLİ'ye, Sayın Prof.Dr. Tomris ÖZBEN'e, Sayın Prof.Dr.Yakup ALICIGÜZEL'e, Sayın Prof.Dr.Gültekin YÜCEL'e, Sayın Doç.Dr.Saadet GÜMÜŐLÜ'ye, Sayın Doç Dr. Akın YEŐİLKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma,

Biyokimya Anabilim Dalının idari ve laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Behiye TOPTAŞ

Antalya,2002

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. β-TALASEMİDE PATOFİZYOLOJİ	
2.1.1. Globin Zinciri Fazlalığı	3
2.1.2. Eritrosit Membranında Değişiklikler	4
2.1.3. Hem Ve Membran Etkileşimi	6
2.1.4. Demir Fazlalığı	6
2.1.5. Membran Lipidlerinde Değişiklikler	6
2.1.6. Membran Proteinlerinde Değişiklikler	8
2.1.7. Talasemik Eritrositlerde Hemikrom Oluşumu	8
2.2. KARNİTİN	11
2.2.1. Karnitinin Tarihçesi	11
2.2.2. Karnitinin Metabolizması	11
2.2.3. Hücre İçi Mekanizmada Karnitinin Rolü	13
2.2.4. Karnitinin Fonksiyonları	14
2.2.5. Karnitin Ve Antioksidan Sistem	14
2.2.6. Karnitinin Terapötik Kullanımı	17
2.2.6.1. Kalıtsal Karnitin Yetersizliği	17
2.2.6.2. Edinsel Karnitin Yetersizliği	18
2.2.7. Karnitin Ölçüm Metodları	18
2.3. HÜCRE İÇİ KALSİYUM	19
2.3.1. β-Talasemide Kalsiyum Homeostazı	21
2.3.2. Hücre İçi Serbest Kalsiyum Ölçümü	23
2.4. MALONDİALDEHİD	23
2.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ	24
2.5.1. Eritrositler	24
2.5.2. Eritrosit Deformabilitesi	25
2.6. ERİTROSİT AGREGASYONU	26
2.7. OKSİDAN STRES VE ERİTROSİTLER	28

3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. ERİTROSİT HÜCRE İÇİ KALSİYUM TAYİNİ	32
3.2. PLAZMA SERBEST KARNİTİN TAYİNİ	33
3.3. PLAZMA TBARS TAYİNİ	35
3.4. ERİTROSİT TBARS TAYİNİ	36
3.4.1. Hemoglobin Tayini	38
3.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	39
3.6. ERİTROSİT AGREGASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	41
3.7. TAM KAN SAYIMI	41
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	42
4. BULGULAR	43
4.1. ERİTROSİT HÜCRE İÇİ KALSİYUM DÜZEYLERİ	43
4.2. PLAZMA SERBEST KARNİTİN DÜZEYLERİ	45
4.3. PLAZMA TBARS DÜZEYLERİ	46
4.4. ERİTROSİT TBARS DÜZEYLERİ	47
4.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ	48
4.6. ERİTROSİT AGREGASYONU	49
4.7. ERİTROSİT TAM KAN PARAMETRELERİ	51
5. TARTIŞMA	52
6. ÖZET	60
7. SUMMARY	61
8. KAYNAKLAR	62

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Eritrosit hücre içi kalsiyum değerleri	44
Tablo 2. Plazma serbest karnitin düzeyleri	45
Tablo 3. Plazma TBARS düzeyleri	46
Tablo 4. Eritrosit TBARS düzeyleri	47
Tablo 5. Eritrosit elongasyon indeksi	48
Tablo 6. Otolog plazma içinde ölçülen eritrosit agregasyon indeksi	49
Tablo 7. Dekstran 70 içinde ölçülen eritrosit agregasyon indeksi	50
Tablo 8. Eritrosit tam kan parametreleri	51

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Serbest α -globin zincirlerinin aşırı üretiminin etkileri	5
Şekil 2. Talasemik eritrosit membran bileşenlerinde hasar ve değişikliklerle Sonuçlanan oksidatif hasarlar zincirinin şematik gösterimi	10
Şekil 3. Karnitinin yapısal formülü	11
Şekil 4. Karnitin biyosentezinin şeması	12
Şekil 5. Yağ asitlerini, iç mitokondrial membrandan karnitin bağımlı transportu	13
Şekil 6. Kalsiyum depoları, sinyal sistemleri ve hücrel taşıyıcılarının şeması	21
Şekil 7. Eritrosit agregatları	28
Şekil 8. Eritrositteki peroksidatif reaksiyonlara karşı koruyucu sistemler	30
Şekil 9. Karnitin standart grafiği	34
Şekil 10. Plazma MDA standart grafiği	36
Şekil 11. Eritrosit MDA standart grafiği	38
Şekil 12. Eritrosit deformabilite tespitinin ölçüm ve deteksiyon sistemi LORCA'nın şematik çizimi	40
Şekil 13. Eritrosit elongasyonu sırasında difraksiyon paternindeki değişiklik; elongasyon indeksinin hesaplanması	40
Şekil 14. Eritrosit hücre içi kalsiyum değerleri	44
Şekil 15. Plazma serbest karnitin düzeyleri	45
Şekil 16. Plazma TBARS düzeyleri	46
Şekil 17. Eritrosit TBARS düzeyleri	47
Şekil 18. Eritrosit elongasyon indeksi	48
Şekil 19. Otolog plazma içinde eritrosit agregasyon (M) indeksi	49
Şekil 20. Dekstran 70 içinde eritrosit agregasyon (M) indeksi	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha çoğunun yapılamaması ile karakterize olan ve ülkemizde de yaygın olarak görülen (heterozigot insidansı %1.66 iken homozigotların milyonda 71 dolayında olduğu söylenmektedir) hemoglobinopatiler talasemi olarak bilinir.

β -Talaseminin güncel tedavisini oluşturan kan transfüzyonu ve şelasyon tedavisinin önemli komplikasyonları vardır. Son yıllarda talasemi tedavisinde yeni yaklaşımlar denenmektedir. Talasemi etyolojisinin ve patogenezinin tam olarak anlaşılması, efektif bir tedavi modelinin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

Bazı hemolitik anemilerde (örak hücreli anemi, β -talasemi) eritrosit kalsiyum homeostazındaki değişikliklerin hastalığın semptomlarından sorumlu olabileceği bildirilmiştir. β -Talasemide total eritrosit kalsiyum içeriğinin artmasının nedeni, kalsiyum depolayan endositotik veziküllerin sayıca artmasıdır. Bu hemolitik anemilerde aynı zamanda hücre içine kalsiyum transport hızının arttığı veya kalsiyum pompasından dışarı kalsiyum çıkışının azaldığı tespit edilmiştir (1,2).

Talasemik eritrositlerde tanımlanan membran anormalliklerinin, hastalığın patogenezinde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Hemoglobin membran ilişkisinin eritrosit deformabilitesini tanımladığı ve eritrosit ömrünün de deformabilite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (3). Kalsiyum konsantrasyon artışının, hemoglobine bağlı membran ve eritrosit reolojik özelliklerine etkisi olduğu bildirilmiştir (3).

Talasemik eritrositlerin oto-oksidasyona normal hücrelerden daha çok duyarlı olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres altındaki eritrositlerde, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA (malondialdehid) seviyesinde artış gözlenmiştir (4).

Vücutta endojen olarak sentezlenebilen ve antioksidan etkisi olan L-karnitin, talasemi hastalarında ortaya çıkan oksidatif hasara karşı eritrositleri koruyucu etkisinin olabileceğini düşündük. L-karnitin Fenton reaksiyonuna giren demir ile şelasyon yaparak, hidroksil radikali üretimini inhibe eder ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeylerini azaltır. L-karnitin hücre membranını stabilize ettiği de bilinmektedir.

Biz bu çalışmamızda β -talasemi hastalarının, L-karnitin tedavisi almadan önce ve aldıktan sonraki hücre içi kalsiyum, eritrosit deformabilitesi, plazma MDA ve eritrosit MDA düzeylerini saptadık. Ayrıca plazma serbest karnitin düzeylerini de ölçerek, L-karnitin tedavisinin bu parametreleri nasıl etkilediğini görmeyi amaçladık. Plazma L-karnitin

seviyesindeki artış, β -talasemi hastalığının patogeneğinde önemli rolü olan bu parametreleri olumlu yönde mi etkiliyor? Membranı peroksidatif hasardan koruduğı ve membranı stabilize ettiğı bildirilen karnitin, β -talasemi tedavisinde alternatif bir seçenek olabilir mi? Çalışma sonunda bu sorulara verebileceğimiz olumlu yanıtlar; günümüzde zor, pahalı ve ciddi yan etkileri olan tedavi yöntemlerine alternatif seçenekler sunabilir.

β -Talasemi hastalarının eritrositlerinde yapısal ve fonksiyonel olumsuz değışiklikler olmaktadır. Karnitin tedavisi sonrası plazma karnitin seviyesindeki artışın peroksidatif hasarı azalttığını ve bu azalmanın hastalığın fizyopatogenezi üzerine olumlu etkisi olabileceğini düşünerek, L-karnitin bu hastalarda terapötik bir ajan olabileceğini göstermeye çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

1925’ te Thomas Cooley ve Pearl Lee italyan orjinli çocuklarda görülen; splenomegali ve karakteristik kemik değişimleri ile kendini gösteren şiddetli bir anemi çeşidini tanımladılar (5). Sonraki 10 yılda, bir çok İtalyan araştırmacı tarafından birbirinden bağımsız olarak daha hafif çeşitleri tanımlandı (6). Tüm ilk vakalar Akdeniz orjinli çocuklarda bildirildiğinden, hastalık daha sonra talasemi olarak adlandırıldı. Thalassa, Yunanca’da deniz anlamına gelir. Sonraki çalışmalarda, Cooley ve Lee’nin, Akdeniz’le sınırlı kalmayıp tropikal ülkelerde yaygın olarak görülen resesif Mendel tipi bir hastalığın homozigot veya heterozigot formlarını tanımladıkları ortaya çıktı. Hemoglobinin α - ve β - zincirlerinin defektif sentezinden kaynaklanan α - ve β - talasemiler, insanlarda en yaygın görülen monogenik hastalık olarak tanındı.

β -Talasemi hastalarında yaklaşık 200 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Çoğu, küme içinde küçük nükleotid değişimleri olsa da, delesyonlar da β -talasemiye yol açabilir. Tüm mutasyonlar, ya β -globin zincirlerinin sentez edilememesiyle veya sentezinde azalma ile sonuçlanır.

2.1. β -TALASEMİDE PATOFİZYOLOJİ

2.1.1.GLOBİN ZİNCİRİ FAZLALIĞI

Şiddetli β -talaseminin, β -globinin hasarlı üretiminden kaynaklandığı, retikülositlerde globin biyosentezinin direkt ölçümü ile tespit edilmiştir (7). Eşleşecek non- α komponentleri olmayan fazlalık α - zincirler, metil viyole boyamasında gösterilebilen çözünmez inklüzyonlar oluştururlar. Eritrositlerdeki ve talasemi majorlu hastaların çekirdekli eritroid hücrelerindeki α - globin inklüzyonları ilk olarak Fessas ve arkadaşları ile Nathan ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (8). Inklüzyonların eritroid hücreler üzerine bir çok zararlı etkisi vardır ve şiddetli ineffektif eritropoeze yol açtıklarına inanılır. İntrasitoplazmik inklüzyonlar hücre membranlarına hasar verir, hücre içi iyonik çevreyi rahatsız eder ve dolayısıyla eritroid hücrelerinin intramedüller ölümüne katkıda bulunur. Ayrıca α -inklüzyonlar hücre deformabilitesini de azaltır (9).

2.1.2. ERİTROSİT MEMBRANINDA DEĞİŞİKLİKLER

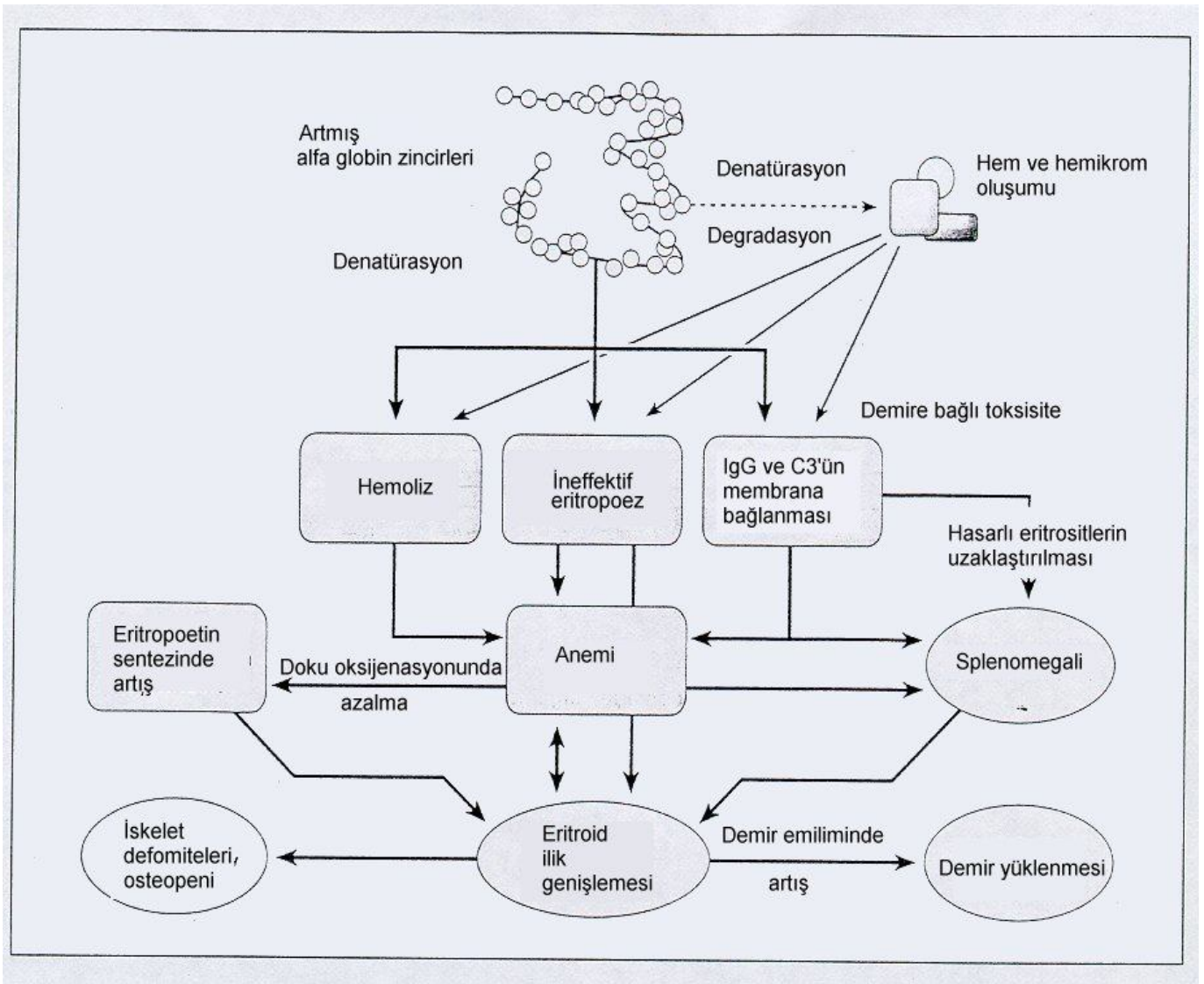
Talasemik eritrositlerde bir çok membran anormallikleri tanımlanmıştır. Bu anormallikler presipite olan hemoglobin zincirlerinin yıkımı sonrası oluşan fazla globinden doğan oksidatif hasarla ve ayrıca hem ve demirin hücre membranıyla birleşmesi ile ilişkilidir. Diğer anormallikler, fazla globin zincirlerinin hücre membran iskeleti ile selektif etkileşimi sonucu oluşabilir. Oksidasyondan sonra globin zincirleri ve demir, bakır gibi eser metaller serbest oksijen radikallerini oluştururlar. Bu serbest oksijen radikalleri membrana oksidatif hasar verir. Eritrosit membranındaki lipidlerin peroksidasyonu, değişen membran lipid bileşimi ve dağılımı ile yansır: Lipid peroksidasyonundan sonra membran komponentlerinin polimerizasyonu, kation kaybı ve dehidratasyonu, azalan hücre deformabilitesi ve fosfolipid çift katmanının artan rijiditesi. Serum ve eritrosit E vitamini seviyesinde gözlenen azalmalar, oksidan strese kaynaklanan hızlanmış tüketimin sonucu olabilir. Talasemik eritrositlerde kalsiyum içeriğinin artması da membran hasarının başka bir göstergesidir (8).

β -Talasemide eritrosit membran proteini 4.1'in, spektrinin aktine bağlanmasını artırma kapasitesi azalmıştır. Fazla α -globin zincirlerinin ve bunların yıkım ürünlerinin eritrosit membranında ve iskeletinde birikiminin sonuçları üzerine yapılan çalışmalarda, spektrin'in bant 3'e oranında ve bant 4.1'in fonksiyonunda anormallikler göstermiştir (10). İskeletle ilgili globin miktarı; anormal hücresel rijiditeyle direk koreledir (11). Bu durum; membran iskeletine bağlı olan α -globinin; eritrosit reolojik özelliklerindeki değişikliklerden sorumlu olduğunu gösteren güçlü bir bulgudur. Transgenik talasemik farelerde yapılan çalışmalarda; β -globin üretiminde sadece %10'luk bir artış, membran iskeletiyle ilgili globin miktarında %50'lik bir azalmaya yol açmıştır ve bu azalma; deformabilitede orantısız bir 3 katlık artışa neden olmuştur (11).

Fazla membran demirinin, membran değişikliklerini artırdığı gözlenmiştir. Bu da talasemi hastalarında eritrosit membranının, potansiyel tedavi hedefi olarak görülmesine neden olmuştur. Bir fare modelinde, membranla ilişkili α -globin zincirleriyle bağlantılı olarak artan hücresel rijidite ve azalan stabilite, membran demirine bağlanan ajanlara maruz bırakma sırasında önemli derecede düzelmiştir (12).

Talasemik eritrositlerin oksidatif strese artan duyarlılığı bu eritrositlerin hemolizinde önemli rol oynar (13). Oksidatif hasarı kolaylaştıran mekanizmalar çok sayıdadır ve eritrositlerde fazla miktarda eşleşmemiş globin zinciri, yüksek konsantrasyonda hücre içi non-hemoglobin demir içeriği ve bu hücrelerdeki düşük hemoglobin konsantrasyonu sonucu ortaya çıkar. Temel genetik hasarın sonucu olarak, β -talasemik eritrositler fazla miktarda α -

globin zinciri içerir ve bu zincirler β -talasemik eritrositlerde birikir. Oksidasyon sonrası, stabil olmayan hemoglobinlerin invitro serbest oksijen radikal türlerini oluşturduğu bilinmektedir (süperoksit anyonu ve güçlü hidroksil radikali gibi). Oksijen radikalleri, oksidatif olaylar zincirini başlatır; önce daha fazla methemoglobin oluşumuna, daha sonra geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz hemikromların oluşumuna yol açar. Hemikromlar, inklüzyon cisimcikleri ve/veya Heinz cisimcikleri olarak tanımlanır (13).



Şekil 1 : Serbest α -globin zincirlerinin aşırı üretiminin etkileri (5).

2.1.3. HEM VE MEMBRAN ETKİLEŞİMİ

Talasemik eritrosit membranında hem etkileşiminin tam konumu henüz bilinmemektedir. Ancak serbest hem ya lipid çift katmanı ile, ya da spektrin, aktin ve protein 4.1 gibi hücre iskelet proteinleri ile etkileşim gösterme yeteneğindedir. Hem molekülünün oksidatif hasara direk katkısı henüz açığa çıkarılmamışken, yıkımı kendi başına eritrosit oksidasyonunda temel rol oynayan demir salınımı ile birlikte gerçekleşir (13).

2.1.4. DEMİR FAZLALIĞI

Eser metaller, özellikle de bakır ve demir, eritrositte ve saflaştırılmış hemoglobinde oksidatif hasar yaratabilen endojen serbest oksijen radikallerinin aşırı oluşumuna neden olan ajanlar olarak tanımlanır. Artan miktarlarda non-hemoglobin demir, talasemik eritrositlerde ilk defa Bessis tarafından bildirilmiştir. Hücre içi demir havuzuna ek olarak talasemik hastalar aynı zamanda düşük moleküler ağırlıklı demir komplekslerini, plazma proteinlerine gevşek bağlanmış şekilde bulundururlar. Eser metallerin ve oksijence zengin eritrosit içi çevrenin kombinasyonu, oksijen toksisitesine yol açan şartlara uygundur. Fenton reaksiyonuna katılan demir iyonları, lipid ve protein peroksidasyonunda katalizör olarak rol oynar (13). Fizyolojik koşullarda demir iyonları; moleküler oksijenin, aşırı reaktif radikal türlerine dönüşümünü katalizlemeye uygun değildirler. Çünkü; demir iyonu proteinlere bağlıdır, bu da demir iyonunun, hücre hasarına yol açabilecek reaksiyonlara katılmasını önler. Protein olmayan hücresel bir havuz (düşük moleküler ağırlıklı demir) da tespit edilmiştir. Talasemi de dahil, demir yüklenmesinin olduğu çeşitli patolojik koşullarda; serumda ve hücresel havuzda düşük moleküler ağırlıklı demirin arttığı bildirilmiştir. β - talasemide antioksidan durum ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır (14). Oksidatif hasarı engellemek için, eritrositlerin normal fonksiyon gösteren hemoglobin yanında, güçlü antioksidan kapasitesinin de olması gerekir (13).

2.1.5. MEMBRAN LİPİDLERİNDE DEĞİŞİKLİKLER

Talasemik eritrositlerde, lipid peroksidasyonunun artış gösterdiğine dair veriler mevcuttur. Membran lipidlerinin bileşimi çalışıldığında, toplam hücre lipidlerinde neredeyse iki kat artış bulunmuştur. Bu gözlemin anlamı hala açık değildir, ancak talasemik eritrositlerde görülen yüksek yüzey/hacim oranından kaynaklanabilir. Talasemik eritrositlerde membran fosfolipidlerinin organizasyonu çalışıldığında, fosfolipidlerin anormal dağılım gösterdiği bulunmuştur; fosfatidilkolinin çoğu iç çift katman yaprakçığında bulunurken,

fosfotidiletanolaminin çoğu dış yaprakçıktadır. Sadece membran lipidlerinin dağılımı anormal değil, aynı zamanda düşük fosfotidiletanolamin yüzdesi ve araşidonik asid gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) de daha düşük yüzdesi tespit edilebilmiştir. Hem PUFA'ların hem de fosfotidiletanolaminlerin peroksidasyona özellikle hassas oldukları bilinir. Bunların talasemik eritrosit membranlarında azalması, aşırı oranda oksitlendiklerini gösterir (13). Giardini ve arkadaşları total fosfolipid, kolesterol ve özellikle PUFA'ların serum seviyelerinde önemli bir azalma göstermiştir. Talasemi hastalarında karaciğer hasarı tespit edildiğinden, bu verilerin basit olarak karaciğerde azalan sentezinden kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak, olgun eritrositlerin de novo fosfolipid sentezini gerçekleştiremeyeceği ve hasarlı fosfolipid içeriğinin tamir edilme mekanizmalarından birinin plazma ile değişme olduğu akılda tutulmalıdır. Talasemik hastalardaki düşük plazma fosfolipid seviyeleri, artan peroksidatif hasarın bir göstergesi olabilir. Böyle bir hasarın başka bir göstergesi, eksojen oksidan stresi takiben, talasemik eritrositlerin yüksek malondialdehid (MDA) içeriğidir. Temelde PUFA'ların oksidasyonu sonucu ortaya çıkan bu yıkım ürünü, aynı zamanda talasemik hastaların retiküloendotelial sistem (RES) organlarında yüksek miktarlarda bulunur. Membran fosfolipidlerinin PUFA'ları tarafından çoğaltılan serbest radikal zincir reaksiyonlarında görev alan ve bir antioksidan olan alfa-tokoferol (E vitamini) seviyeleri talasemik hastalarda düşük bulunmuştur. Bu yetersizlik büyük olasılıkla artan tüketim nedeniyle.

Lipid peroksidasyonu, membran komponentlerinin polimerizasyonuna neden olur, dolayısıyla hücre deformabilitesini azaltır. Ayrıca, fosfolipid çift katmanının rijiditesini de arttırdığı bildirilmiştir (13).

Bu değişimlerin bir açıklaması, membran komponentlerine bağlı fazla globin zincirlerinin varlığı ile olabilir. Ayrıca, MDA'nın kendisi de membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına neden olur. Bunun sonucunda eritrosit membran rijiditesini arttırarak eritrosit deformabilitesinin azalmasına yol açar.

Talasemik eritrositlerin anormal mekanik özellikleri; yapısında bulunan oksitlenmiş lipidler, fazla globin zincirleri ve membran proteinlerinden kaynaklanmaktadır. Talasemik eritrositlerin anormal lipid asimetrisi, azalmış PUFA konsantrasyonu, artmış MDA seviyeleri ve sonuçta düşük E vitamini seviyeleri gösterilebileceği bildirilmiştir.

2.1.6. MEMBRAN PROTEİNLERİNDE DEĞİŞİKLİKLER

Talasemik eritrosit membran proteinlerinin, oksidatif stres tarafından hasara uğradığını öne süren ilk çalışmalar ile; talasemik eritrositin hidrojen peroksite maruz bırakılmasının ardından membran proteinlerinin artan derecede çapraz bağlandığı ve titre edilebilir membran tiyollerinde azalma olduğu gösterilmiştir.

Talasemik eritrositlerin düzensiz şekilleri eritrosit membran iskeletinin hasara uğramış olabileceğini gösterir. Çünkü iskelet ağının deformabilite ve stabilite gibi farklı eritrosit fonksiyonlarını düzenlemede önemli olduğu düşünülür.

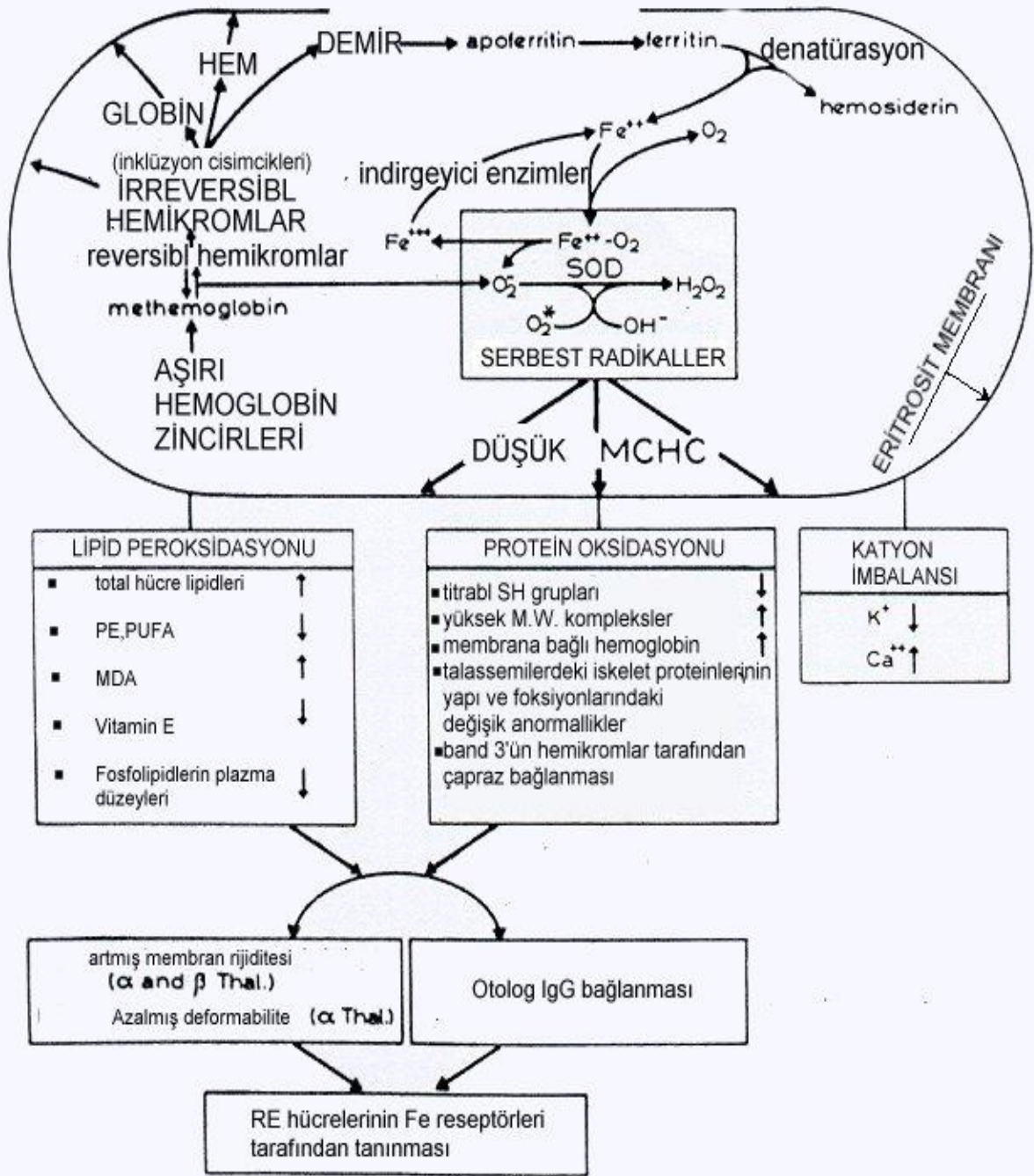
Normal eritrositlerin sülfhidril oksitleyici ajanlara in vitro olarak maruz bırakılmasının spektrinde değişikliklere neden olduğu bilinir: Normal eritrositlerin, tetratiyonat ve diamid gibi kimyasal oksidanlara maruz bırakılmasının ardından spektrin çapraz bağlanması tesbit edilmiştir. Temel hücre iskelet proteininin oksidatif hasara karşı artan hassasiyeti, sülfhidril gruplarının bazılarının eritrosit membranının PUFA'larına topografik yakınlığı ile açıklanabilir. Talasemik spektrinde görülen tüm yapısal anormalliklere rağmen, bu proteinin farklı fonksiyonlarının korunduğu görülmüştür. Spektrinin tersine, diğer hücre iskelet protein etkileşimleri talasemik eritrositlerde anormaldir. Protein 4.1; hücre iskelet proteinleri spektrin ve aktin, integral proteinler olan glikoforinler, muhtemelen protein 3 ve aynı zamanda membran fosfolipidleri ile etkileşime girdiğinden bir kilometre taşı proteindir. Yakın zamanda elde edilen veriler, protein 4.1'in, eritrosit membran stabilitesini düzenlemede çok önemli rolü olduğunu göstermiştir. Talasemi hastalarının eritrositlerinden saflaştırılan protein 4.1'in; spektrinin aktine bağlanma yeteneğini azalttığı saptanmıştır (13). Protein 4.1'in β -talasemik eritrositlerde kantitatif yetersizliği bulunmadığından, oksidatif bir edinilmiş yapısal lezyon gerçekleştiği ve protein 4.1 moleküllerinin yarısı kadarını etkilediği kabul edilmiştir. Bu anormal durum, bazı aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonu sonucu ortaya çıkabilir.

2.1.7. TALASEMİK ERİTROSİTLERDE HEMİKROM OLUŞUMU

Hemoglobinin geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hemikromlara denatürasyonu sonucu Heinz cisimcikleri oluşur. Denatüre hemoglobin agregatları en yaygın olarak, artan oksidan stres ile birlikte bulunur. Talasemide Heinz cisimciklerinin morfolojik görünümü, α veya β -globin zincirlerinin eşit olmayan sentezine bağlanmıştır. Bunlar stabil değildir ve presipite olma ve oksidasyon ile kolayca hemikromlara dönüşme eğilimindedirler.

Hemikromun, protein 3'ün sitoplazmik birimi ile birleşmesinin patofizyolojik rolü, Low ve arkadaşlarının çalışmalarından sonra daha fazla ilgi odağı olmuştur. Low; hızla büyük moleküler boyutlara ulaşan, çözünmez bir ko-polimerin oluşumunun ve eritrosit membranında hemikromların birikmesinin, membran düzleminde protein 3 kümelenmesini sağladığını gösterdi (13). Talasemik eritrositler aynı zamanda artan miktarlarda otolog Ig G bağlama yeteneğindedir. Çoğunlukla yaşlı eritrositlerde yapılan önceki çalışmalar, başka bir otolog antikorun (anti protein 3) hasarlı eritrositlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olduğuna işaret etmiştir. Eritrosit yüzeyinde yaşlı hücre antijeninin oluşumu; ki anti-protein 3 antikoru bu antijene yöneliktir, hemoglobin denatürasyonu, hemikrom oluşumu ve sonuçta protein 3 kümelenmesi ile tetiklenir.

Talasemik eritrositlerde ciddi oksidatif hasar meydana gelir. Globin zincir presipitasyonu sırasında, serbest radikaller oluşur. Presipite olmuş hemoglobin zincirlerinden demir ve globin serbest bırakılır. Globin zincirlerinin eritrosit membranı ile etkileşime girip membranı parçaladığı, hücre iskeletini hasara uğrattığı bildirilmiştir. Hemin rolü talasemik eritrositlerde detaylı olarak çalışılmamıştır. Demir fazlalığı, Fenton reaksiyonu yoluyla peroksidasyon katalizörü olarak bilinir, ayrıca çeşitli eritrosit membran bileşenlerine (lipidler, proteinler) hasar verir. Denatüre olmuş hemoglobin, hemikromlar şeklinde protein 3 ile agregat oluşturur ve sonuçta spesifik antikor bağlanmasına neden olur, bu da eritrositlerin dolaşımdan uzaklaştırılması ile sonuçlanır. Ancak, kaydedilen ilerlemeye rağmen, talasemik eritrositlerde artan oksidatif stresin mekanizmasını anlama konusunda ek verilere hala ihtiyaç vardır.



Şekil 2: Talasemik eritrosit membran bileşenlerinde hasar ve değişiklikle sonuçlanan oksidatif hasarlar zincirinin şematik gösterimi (13).

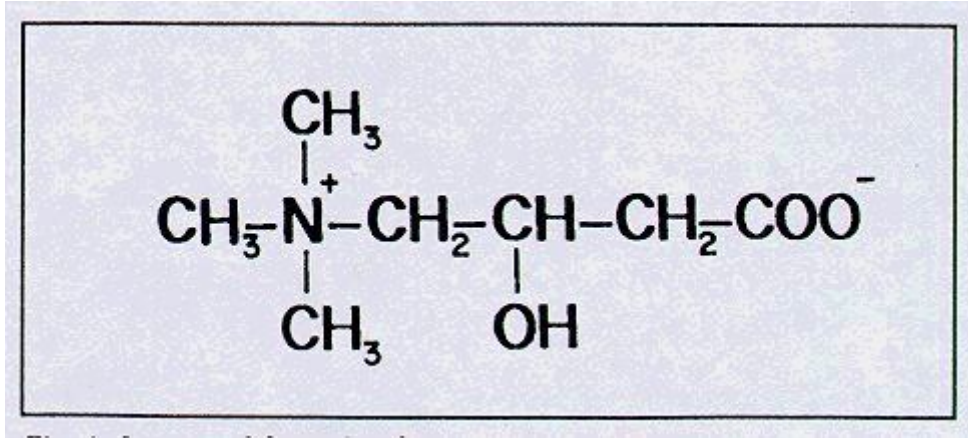
2.2. KARNİTİN

2.2.1. KARNİTİNİN TARİHÇESİ

Karnitin (3-hidroksi-4-trimetilaminobütirik asit), ilk kez 1905 yılında sığır kas dokusundan izole edilmiştir. Ancak biyolojik etkileri üzerinde yapılan bir çok çalışmaya rağmen, yarım yüzyıl boyunca fonksiyonu açıklık kazanmadı (15). 1952 yılında Tenebrio malitor isimli bir yemek kurdu için bir büyüme faktörü olduğu keşfedildi ve B_T vitamini olarak isimlendirildi (16). 1959'da Fritz; karnitinin, karaciğer ve kalp kasında uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunu artırdığını göstermiştir. 1966 yılında; karnitin palmitoil transferazın, iç mitokondrial membranda ve açıl-KoA sentetazın dış mitokondrial membranda yer aldıkları gösterildi. 1971 yılında lizinin karnitin öncüsü olduğu belirtildi.

2.2.2. KARNİTİNİN METABOLİZMASI

Karnitin, β-hidroksi-γ-trimetilamonyum bütirattır.

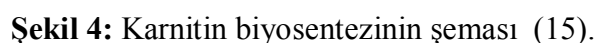


Şekil 3: Karnitinin yapısal formülü (17).

Aminoasitler gibi karnitinin de yalnızca L formu dokularda sentezlenir ve biyolojik aktivite gösterir. Serbest karnitin, 161.2 molekül ağırlığında bir zwitteriyonik moleküldür. Diyetteki karnitinin suda çözünen vitaminler gibi kolayca ve tamamen emildiği kabul edilir. Minimum günlük ihtiyacın 8-11 mg/gün olduğu öne sürülmüştür. İnsan vücudundaki karnitinin kaynağı; diyet karnitini ile lizin ve metiyonin metabolizmasından köken alan, biyolojik olarak sentezlenen karnitinden oluşur. Karnitin karaciğer ve böbrekte sentezlenir, iskelet kasında depolanır ve idrarla atılır (17,18).

Hayvanlarda ve insanda karnitin, vücut proteinlerinden serbest bırakılan trimetil lizinden oluşturulur. Çoğu doku trimetillizini bütirobetaine dönüştürebilir, ancak

Hamilton ve arkadaşları, *in vitro* olarak, insan ince barsak mukozasının karnitini iki mekanizma ile absorbe ettiğini gösterdi: Aktif transport ve pasif difüzyon. Karnitinin aktif transportu, enerji ve sodyum bağımlıdır ve D-karnitin ve L-asetilkarnitin ile inhibe edilir. Karnitin, portal kan ile karaciğere taşınır ve sistemik dolaşıma verilir. Karnitinin çeşitli hücre tiplerine girişi aktif bir işlemdir, yani transport bir konsantrasyon gradientine karşıdır (17).

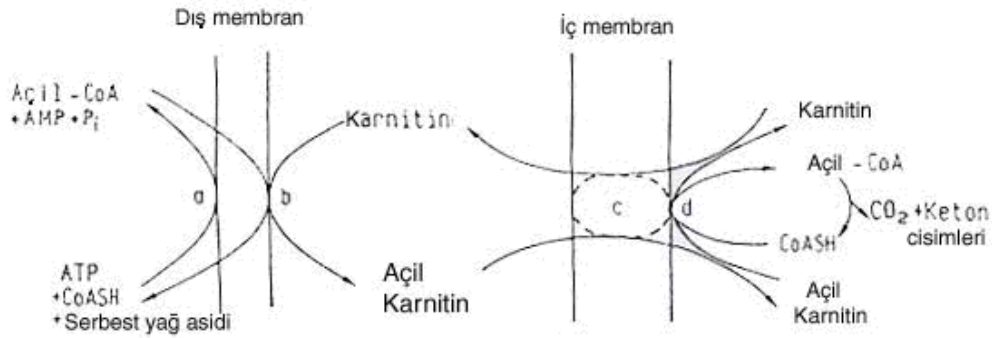


L- karnitin; L-lizin ve metiyonin esansiyel aminoasitlerinden sentez edilir. Karnitin dört karbon zincirini lizin molekülünün 3 den 6 ya kadar olan karbonlarından, amino gruplarını lizinin epsilon amino grubundan ve metil gruplarını da S-adenozil-metiyonin yoluyla L-metiyoninden alır (20).

2.2.3. HÜCRE İÇİ MEKANİZMADA KARNİTİNİN ROLÜ

Yapılan çalışmalar, karnitininin geri dönüşümlü olarak C_2 'den (asetat) C_{22} 'ye (erukat) kadar değişen zincir uzunluklarındaki karboksilik asitlerle açillenebileceğini gösterdi. Ayrıca yağ asidi oksidasyonu üzerindeki etkisinin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye transferi ile gerçekleştiğini gösterdi (21).

Karnitin translokaz ile karnitin palmitoiltransferaz I ve II yağ asidi transfer sistemini oluşturur. Dış mitokondrial membranda aktive edilmiş yağ asitlerinin mitokondri içine alınarak, matrikste β -oksidasyon enzimleri tarafından okside edilmelerine olanak verir.



Şekil 5: Yağ asitlerinin, iç mitokondrial membrandan karnitin bağımlı transportu (21).

- Dış mitokondrial membrandaki açilkoenzim A sentetaz
- Dış mitokondrial membrandaki dış karnitin palmitoiltransferaz I
- İç mitokondrial membranda karnitin / açilkarnitin translokaz
- İç mitokondrial membranda iç karnitin palmitoiltransferaz II

2.2.4. KARNİTİNİN FONKSİYONLARI

- 1- Uzun zincirli yağ asitlerinin, mitokondri iç zarından matrikse taşınması (22).
- 2- Mitokondrial Açıl KoA /KoA çiftinin tamponlanması (22).
- 3- Açıl grupları için “çöpçü” sistemi (22).
- 4- Peroksizomal yağ asit oksidasyonu; hücre içi ileti (22).
- 5- Dallı zincirli aminoasit metabolizması (22).
- 6- Hücre membranını stabilizasyonu ve kalsiyum transportu (22,23).
- 7- Sperm metabolizması (15,17).
- 8- Mitojenik stimülasyon sonrası hem mürin hem de insan lenfositlerinin proliteratif cevaplarını arttırmak (17).
- 9- Polimorfonükleer kemotaksisi arttırmak (17).
- 10- Lipid kaynaklı immün baskılanmayı nötralize etmek (17).
- 11- Klasterin, fetuin veya fibrinojen gibi agregat oluşturan proteinlerce indüklenen eritrosit agregasyonunu önlemede görev almak (17).

2.2.5. KARNİTİN VE ANTİOKSİDAN SİSTEM

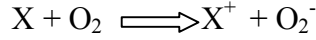
Serbest oksijen radikalleri; bir çok farklı patofizyolojik olayda yeralırlar. Bu nedenle; serbest radikal hasarında yeralan biyolojik olayların mekanizmalarının anlaşılması önem taşımaktadır. Bunların birçoğunda, serbest oksijen radikallerinin hedefi, vasküler sistemdir (24).

Herhangi bir atom veya molekül serbest radikal olarak tanımlanabilir. Bunun için serbest radikallerin dış yörüngelerinde bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron bulunması gereklidir. Çiftleşmemiş elektron varlığında atom veya molekül nisbeten stabil değildir ve yüksek reaktivitesi mevcuttur (25).

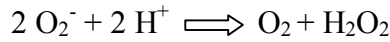
Son çalışmalarda, serbest oksijen radikallerinin nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, iskemi-reperfüzyon hasarı, karsinogenezis, radyasyon hasarı gibi biyolojik fenomenlere neden olduğu açıklanmıştır. Reaktif oksijen türlerinin genellikle dört tipi gösterilmiştir:

- 1- Süperoksit anyonu (O_2^-)
- 2- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- 3- Hidroksil radikali (OH)
- 4- Singlet oksijen (1O_2)

Bunlar biyolojik olarak önemli serbest radikallerin büyük bölümünü oluşturur (26). H_2O_2 ve $^1\text{O}_2$ serbest radikal olarak tanımlanmazlar; fakat bu türlerin serbet radikallere benzer olduğuna inanılır. Süperoksit kimyasında önemli ilk reaksiyon:



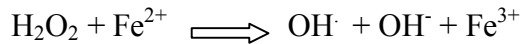
Bir X donöründen (hemoglobin, sitokrom, tiyol, redoks metal gibi) tek elektron, oksijen molekülüne transfer edilir. Oluşan süperoksit anyon radikali, reaktif bir tür değildir, ancak potansiyel olarak toksiktir. Biyolojik olarak daha tehlikeli hidroksil radikallerine dönüşebilir. Bu dönüşümde ilk evre süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonudur.



Hidrojen peroksit hücrelere özellikle toksik değildir, ancak hücresel membranları geçebilir ve bu özellik potansiyel olarak önemlidir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalini oluşturmak üzere süperoksit anyon radikali ile etkileşime girebilir. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir:



Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metaller, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır (27):



Hidroksil radikali yüksek reaktiviteye sahiptir ve kısa ömürlü bir oksiradikaldır. Proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerler. Bu reaksiyon lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Çoklu doymamış yağ asitleri hücre membranında yüksek konsantrasyonda mevcuttur ve radikallerin saldırısına hazırdır. Hidroksil radikali ile oluşan lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda bunu takiben, hücre parçalanması ve ölümü olur (27). Serbest oksijen radikalleri lipid yıkımı ve membran hasarı dışında; ayrıca sülfhidril enzim inaktivasyonuna, protein çapraz bağlarının ve DNA' nın bozulmasına neden olur (28).

Diğer biyolojik öneme sahip serbest radikaller; lipid hidroperoksit (ROOH), lipid peroksil radikali (ROO $\cdot$) ve lipid alkoksil radikali (RO $\cdot$) dir. Bunlar membran lipidleri ile ilişkilidir; nitrik oksit (NO), reaktif bir nitrojen türevidir; tiyil radikal (RS $\cdot$) ise sülfür atomunun eşleşmemiş elektron içerenidir. Karbon radikali (R₃C $\cdot$) ise hepatositlerin mikrozomlarında CCl₄ metabolizması sırasında üretilir.

Son çalışmalarda gösterilmiştir ki, düşük düzeydeki oksidatif stres sellüler proliferasyonu ilerletir, hücre dejenerasyonu ve ölümüne neden olur. Hücrelerin moleküler komponentleri içerisinde reaktif oksijen türlerinin hedefi; proteinler, membran lipidleri ve nükleik asitlerdir (26).

Membrana bağlı bir enzim olan Ca⁺²-ATPaz'ın, süperoksit anyon radikali (O₂ $\cdot^-$) ile inhibe edildiği, ancak bu mekanizmada; hidrojen peroksidin (H₂O₂) veya hidroksil radikalının (HO $\cdot$) yer almadığı tespit edilmiştir (24). Bu ilginç bir bulgudur; çünkü O₂ $\cdot^-$ zayıf bir oksidan olarak bilinir ve daha potansiyel bir oksidan olan HO $\cdot$; genellikle, Ca⁺²-ATPaz'ın oksidatif hasarı da dahil olmak üzere, pek çok durumda hasar veren bir reaktif oksijen türü olarak kabul edilmektedir. Fakat HO $\cdot$ 'nin reaktivitesi, difüzyon yeteneğini sınırlar ve bu yüzden hücresel hedeflere kolayca ulaşamaz. Diğer yandan O₂ $\cdot^-$; diğer moleküllerle çok az reaksiyona girdiği için konsantrasyonunda önemli değişiklik gözlenmez. Bu yüzden; herhangi bir fonksiyonel molekül O₂ $\cdot^-$ ye maruz kalırsa, o molekül oksidatif stres için spesifik bir hedef olabilir.

Çeşitli antioksidanlarla serbest radikal kaynaklı hasardan korunma mekanizmaları, büyük oranda araştırılmıştır. Antioksidan özellikleri olduğu bilinmeyen diğer ajanların da; serbest oksijen radikallerinin yer aldığı patolojik durumlarda koruyucu olduğu bildirilmiştir. Fakat serbest radikallere bağlı hasara karşı antioksidan sistem dışındaki koruma mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonu için esansiyel bir kofaktör olan L- karnitin ve türevlerinin; serbest radikallere bağlı hasarı önleyerek iskemik kalbi koruyabildiği bildirilmiştir (24). Karnitin türevidir olan propiyonil L-karnitin Ca⁺²-ATPaz'ı nasıl stimüle ettiği kesin değildir. L-karnitin türevinin membran içine yerleştiği ve membran stabilizasyonuna yol açtığı öne sürülmüştür. O₂ $\cdot^-$ 'nin; fosfolipid çift tabakasından daha ziyade membran bağlı Ca⁺²-ATPaz molekülünün SH gruplarına saldırabileceği öne sürülmüştür (24). Eritrosit Ca⁺²-ATPaz potansiyel olarak ootoksidatif modifikasyon ile hasara uğramaya açıktır, çünkü serbest tiyol grupları vardır ve doymamış membran lipidlerine yakın bulunur. Ca⁺²-ATPaz aktivitesi kısmen, membran tiyollerinin indirgenmiş hallerinde korunmalarına bağlıdır. Aktifleştirilmiş oksijenin, tiyolce zengin bir protein olan Ca⁺²-ATPaz'ı inhibe etme mekanizmalarından biri disülfid bağlarının oluşumudur (29).

Propiyonil L-karnitin; endotelial hücreleri Fe^{+3} - Fe^{+2} , hidrojen peroksit - Fe^{+2} veya ksantin oksidaz-ksantin sistemine karşı korur (30). Karnitinin demire bağlandığını; ve hidroksil radikallerinin üretiminde aktif olmayan kompleksler oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Demir iyonları ve diğer metaller; H_2O_2 'den oksijen derivelerinin oluşumunda çok önemlidirler (30).

Laktoperoksidaz; hidrojen peroksit ve iyodid iyonları varlığında; lipid peroksidasyonunu stimüle eder. Muhtemelen; yağ asitlerinden bir hidrojen atomu ayıran bir iyodin radikali oluşmaktadır. Laktoperoksidaz-hidrojen peroksit-iyodid iyonlarıyla singlet oksijen oluşumu da öne sürülmüştür (31). Bu sitolitik sistem; eritrosit membranını dakikalar içinde parçalayabilir. Başlangıçtaki membran hasarının ardından; çatlaklar oluşur ve hücresel komponentler serbest kalır. Sonuçta hücre membranı tamamen çözünür. Bu sitolitik sistemde eritrositler üzerine, karnitin türevlerinin etkileri araştırılmış. Bu ortamda eritrositlerin peroksidasyona yatkınlığı azalmıştır. Karnitin türevlerinin eritrositleri peroksidatif lizisten koruduğu saptanmıştır. Karnitin deriveleri varlığında MDA oluşum hızı azalır. Antiperoksidatif etkinin demir-bağlamaya ve hidroksil radikallerinin üretiminde aktif olmayan komplekslerin oluşumuna bağlı olduğu düşünülmektedir (31).

Asetil-L karnitin, ksantin oksidaz aktivitesini inhibe eder. Bu ilacın antioksidan özellikleri, ksantin oksidaz üzerinden serbest oksijen radikal oluşumunun azaltılmasıyla sağlanmış olabilir (28).

2.2.6. KARNİTİNİN TERAPÖTİK KULLANIMI

Karnitinin primer sistemik ve miyopatik karnitin yetersizliği durumlarının tedavisinde kullanıldığı gösterilmiştir. Sekonder karnitin yetersizliğine neden olan durumlarda da faydalıdır. Çoğu terapötik amaç için; 1-2 gr/gün'lük bölünmüş dozlar yeterli olmaktadır. İntravenöz dozlar 40- 100mg/kg arasında değişir. Çocuklarda oral L- karnitin; 100 mg/kg günlük dozu verilir (32).

2.2.6.1. KALITSAL KARNİTİN YETERSİZLİĞİ

Genetik defektlere bağlı karnitin yetersizliği heterojendir. Üç grupta toplanır: 1-Miyopatik karnitin yetersizliği: Otozomal resesif geçiş gösterir. Proksimal miyopati vardır. Zayıflık ve erime, kol ve bacakların proksimal kaslarında ve omurilik, boyun ve çenenin kaslarında daha belirgindir. Serum karnitin seviyeleri düşük ve hepatik karnitin seviyeleri normaldir (17).

2- Sistemik karnitin yetersizliđi: Otozomal dominant olarak geçiş gösterir. İlerleyici miyopati, çeřitli metabolik ensefelopati nöbetleri, hipoglisemi ve hiperammonemi ile karakterizedir. Kas, karaciđer ve plazmadaki toplam karnitin seviyeleri dūřuktur (17). Bu hastalarda orta zincirli ail-KoA dehidrogenaz yetersizliđi bulunmuřtur.

3-Organik asidüriler: Kısa, uzun ve orta zincirli ail-KoA dehidrogenaz yetersizliği, izovalerik asidemi, propiyonik asidemi ve metilmalonik asidemi bulunur. Üriner total karnitin boşaltımı artmıştır ve üriner açilkarnitin/ serbest karnitin oranı da artmıştır (17).

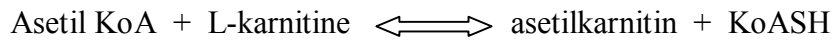
2.2.6.2. EDİNSEL KARNİTİN YETERSİZLİĞİ

- 1- Yetersiz karnitin alımı : Dūřuk karnitin ve lizin alımı, dūřuk demir alımı ve vejeteryan diyetle beslenmek buna neden olabilir.
- 2- Artan karnitin gereksinimi : Hamile ve emziren kadınlarda gereksinim artmıştır.
- 3- Artan karnitin kaybı: Hemodialize giren kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda, dializat sıvısına dramatik derecede plazma geçişi ve bozuk renal karnitin biyosentezi ile artan kayıp söz konusudur. Karboksil grubu içeren valproik asit ve benzoik asit gibi ksenobiyotikler, eğer bir ail-KoA sentetaz için substrat iseler invivo ortamda direk KoA esterlerini oluştururlar. Bu sıradışı KoA esterleri, intramitokondrial ail- KoA/KoA dengesini bozarlar. Fazla ail gruplarını uzaklaştırmak için karnitin kullanılır ve serbest KoA'nın rejenerasyonu mümkün olur (17).

2.2.7. L-KARNİTİN ÖLÇÜM METODLARI

Karnitin lmnde kullanılan birkaç metod vardır. Vücut sıvıları ve dokularındaki L-karnitin lm; L-karnitin ile asetil KoA'nın reaksiyona girip karnitin asetil transferaz enzimi aracılığıyla asetil L-karnitin ve serbest KoASH oluşturması prensibine dayanır (15).

Karnitine asetiltransferaz



Bu reaksiyonu monitörize eden iki temel metod kullanılır:

- 1- Radyoaktif işaretli asetil gruplarının, asetil KoA'dan asetil karnitine dönüşümünün lm.
- 2- KoASH oluşumunun enzimatik veya fotometrik lm (33).

Karnitin esterlerinin ayrıştırılması ve tanımlanması; gaz kromatografisi, radyoenzimatik yöntemle kombine edilmiş HPLC (yüksek performanslı likit kromatografisi) ve kütle spektrometrisi ile yapılabilir (34).

2.3. HÜCRE İÇİ KALSİYUM ($[Ca^{2+}]_i$)

İnsan vücudundaki temel katyonlardan biri olan Ca^{2+} un çoğu, kemiklerde ve dişlerde hidroksiapatit kristalleri olarak bulunur. Hücre dışı ve hücre içi sıvılarda ihmal edilebilir miktarda Ca^{2+} (insanda, toplam 1250 g' dan sadece birkaç gram) bulunur (35). Hücre dışı bölmelerde, ki buna kan plazması da dahildir, kemik depolarından içeri ve dışarı Ca^{2+} hareketi ile kontrol edilir ve yaklaşık 3mM'da fiks edilir. Bunun yaklaşık yarısı iyonize Ca^{2+} 'dur. Ca^{2+} , plazmada 3 fizyokimyasal durumda bulunur: %50'si serbest ya da iyonize, %40'ı plazma proteinlerine bağlı, %10'u da küçük anyonlarla (HCO_3^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , sitrat, laktat) kompleks yapmış şekilde bulunur (36). Serbest yada iyonize Ca^{2+} fraksiyonu biyolojik aktif olan formdur. Bu aktif formun plazma konsantrasyonu PTH, 1-25 dihidroksi vitamin D₃, kalsitonin gibi Ca^{2+} düzeyini regüle eden hormonlarla sıkıca düzenlenmektedir. Proteine bağlı olan Ca^{2+} fraksiyonunun yaklaşık % 80'i albumine bağlı iken, geri kalanı globulinlerle bağlıdır.

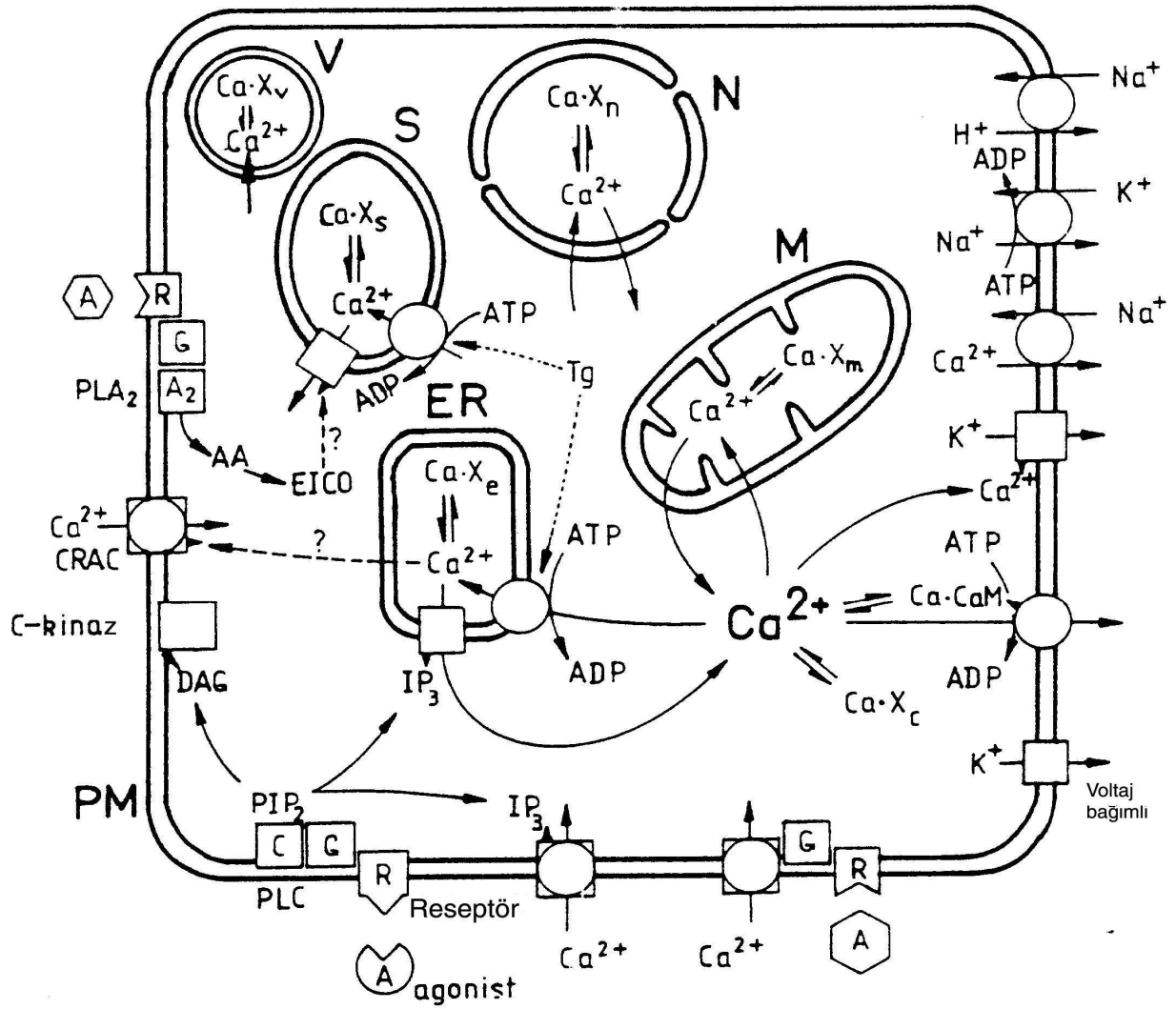
Plazma Ca^{2+} 'u önemini, $[Ca^{2+}]_i$ ile olan ilişkisinden alır. Çünkü $[Ca^{2+}]_i$, çeşitli subsellüler kompartmanlardaki biyokimyasal aktivitelere sinyal iletimini sağlar. Hücre dışında ve hücre içinde Ca^{2+} sinyali arasındaki ilişki iyi anlaşılamamıştır, ancak plazma havuzunun içinden Ca^{2+} un alındığı ve hücreye akışının sağlandığı, oldukça büyük bir depo oluşturduğu kanıtlanmıştır. Plazma Ca^{2+} un dar bir konsantrasyon aralığında tutulması, sabit bir Ca^{2+} kaynağının her zaman hücreler için mevcut olduğunu garantiler. Hücre dışı havuzdaki serbest Ca^{2+} miktarı (mM), hücre içi ortamla (μM ' ün altında) kıyaslandığında çok yüksektir. Bu durum Ca^{2+} üzerinde çok yüksek elektrokimyasal güç oluşturur. Bu sonuç Ca^{2+} un hücre içi düzenleyici olarak üstlendiği role çok uygundur. Çünkü plazma membranının Ca^{2+} a geçirgenliğindeki, fizyolojik uyarıların neden olduğu küçük değişiklikler bile sitozolik konsantrasyonunda çok önemli değişiklikler ortaya çıkaracaktır. Böyle büyük değişimler tabii ki, Ca^{2+} üzerindeki elektrokimyasal güç, yani hücreye penetre olma eğilimi çok küçük seviyede olsaydı daha zor elde edilebilirdi. Hücre dışı ve içi Ca^{2+} havuzlarının konsantrasyonları arasındaki farklılıklar Ca^{2+} un iyonize kısmı ile ilgilidir. Hücre dışı havuzda total Ca^{2+} un yaklaşık yarısı iyonize durumda iken, hücrelerin içinde sadece toplamın %0.1'i veya daha azı bu durumdadır. Ca^{2+} un mesajcı olarak kullanılma kararı verildiğinde,

hücrelerin $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonunu çok düşük tutmak için çeşitli yollar geliştirmesi zorunlu hale gelmiştir. Siklik nükleotidler, inozitol trifosfat veya diaçilgliserol gibi diğer biyolojik mesajcıların konsantrasyonları, metabolik sentez ve yıkım yoluyla kolaylıkla değiştirilebilir. Ca^{2+} konusunda bu mümkün olmadığından, bunu hücreler içinde kontrol etmek için farklı mekanizmalar geliştirilmesi gerekmiştir. Bugün hücreler bunu, Ca^{2+} 'u spesifik ligandlarla geri dönüşümlü olarak bağlamak yoluyla başarırlar (35).

$[Ca^{2+}]_i$, kas kontraksiyonu, hormon sekresyonu, glikojen metabolizması ve hücre bölünmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Hücre sitozolünde yaklaşık 10^{-6} - 10^{-7} mol/L'dir. Sitozolik Ca^{2+} , aynı zamanda Ca^{2+} transport proteinleri olarak da görev yapan Ca^{2+} bağlayıcı proteinler, dikarboksilik asitler ve fosfolipidler tarafından kısmen tamponlanmış olarak bulunur.

170'den fazla Ca^{2+} -bağlayıcı protein bulunmuştur. Fakat fonksiyonlarının küçük bir kısmı biliniyor. Kalmodulin, kalgranulin A ve B, grankalsin ve anneksin bu proteinlerden en fazla bilinenlerdir. Anneksinler (kalpaktin, lipokortin, endoneksin, kalsimedin ve kalsiyum/fosfolipid bağlayıcı diğer proteinleri içerir) Ca^{2+} 'un mikromolar konsantrasyonları varlığında membranlarda asidik fosfolipidlerle etkileşir ve eritrosit membranlarına bağlanabilir (37). Sitozolik Ca^{2+} -bağlayıcı proteinlerin en önemlisi olan kalmodulin ise plazma membranındaki Ca^{2+} -ATPaz pompasını aktive eder. Bunu protein kinaz A ve C aracılıklı Ca^{2+} -ATPaz fosforilasyonunu inhibe ederek sağlar. Kalgranulin ve grankalsin ise özellikle granülosit, monosit ve makrofajlarda bulunan Ca^{2+} -bağlayıcı proteinlerdir (37).

$[Ca^{2+}]_i$ 'un yaklaşık %90-99'u mitokondri, sarkoplazmik ya da endoplazmik retikulumda bulunur. Düşük sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu; plazma, mitokondri ve mikrozomal membranlarda yer alan Ca^{2+} transport sistemleri tarafından sağlanır. $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonu birkaç mekanizma ile değişebilmektedir. Bazı hormonlar ve ilaçlar membran permeabilitesini arttırırken Ca^{2+} 'un içe akışını da arttırır. Ca^{2+} pompaları da hücrelerden Ca^{2+} 'u çıkarır. Serbest Ca^{2+} , ayrıca hücre içindeki depolardan da salınabilir. Bazı hormonlar ikinci mesajcı sistem olarak fosfoinozitolü kullanır ve inozitoltrifosfat hücre içi depolardan Ca^{2+} salınmasına neden olur. Diaçilgliserol, Ca^{2+} bağımlı bir protein kinazı aktive eder. Hücre içi Ca^{2+} bağımlı bir protein olan kalmodulin, bazı enzim sistemlerinin (fosforilaz kinaz gibi) regülasyonunda önemlidir. Serbest Ca^{2+} 'un kendisi de direkt olarak bazı enzimleri (adenilat siklaz gibi) aktive ya da inhibe eder (36).



Şekil 6: Kalsiyum depoları, sinyal sistemleri ve hücresel taşıyıcılarının şeması (37).

Hücre çekirdeği (N), mitokondri (M), endoplazmik retikulum-Ca deposu (ER), alternatif Ca deposu (S), vezikül veya granül (V), bütün Ca- bağlayan proteinleri ihtiva eden sitozol (Ca.X), plazma membranı (PM), Kalmodülün (CaM), Fosfolipaz C (PLC), 1,2-diaçilgliserol (DAG), inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃), araşidonik asit (AA), fosfolipaz A₂ (PLA₂), ekozonoidler (EICO), reseptör (R), G protein (G), Ca depoları içindeki Ca²⁺ konsantrasyonu tarafından regüle edilen Ca kanalı (CRAC).

Plazma membranlarında Ca²⁺-transport eden üç sistem vardır: Spesifik bir ATPaz, bir Ca²⁺ kanalı ve bir Na⁺/ Ca²⁺ değiştiricisi (ancak Na⁺/ Ca²⁺ değiştiricisi olgun eritrositlerde bulunmaz). Toplam hücre kalsiyumunun uzun süreli kontrolünün plazma membran sistemlerinin aktivitesine bağlı olmasına rağmen, hücreler kalsiyum ihtiyaçlarının en büyük

kantitatif kısmını kendi sitozol veya organellerindeki Ca^{2+} havuzlarını kullanarak karşılar (17). İnsanlardaki eritrosit Ca^{2+} pompası; kalmodulin, kalpain, asidik fosfolipidler, özellikle fosfoinozitol 4,5 bifosfat ve protein kinaz A ve C tarafından regüle edilir (38).

Hücre içi kalsiyumundaki artışlar çeşitli hücrel disfonksiyonlara neden olur. Bunlardan bazıları şunlardır:

- 1- Mitokondride enerji eksikliği ile sonuçlanan oksidatif fosforilasyon bozukluğu.
- 2- Bleb formasyonu, hücre iskeletinde hasarla sonuçlanır.
- 3- Fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonu.
- 4- Proteaz aktivasyonu ile ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü.

Fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonu ile PAF (platelet aktive edici faktör) ve plazma membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asit üretilir. Araşidonik asitten lökotrienler ve metabolitleri oluşur. Fosfolipidlerin yıkılması, hücre membranı hasarına ve permeabilite artışına neden olur (39).

2.3.1. β -TALASEMİDE KALSIYUM HOMEOSTAZI

Kalsiyumun, membran plastisitesi, katyon değişimi ve hatta hücre ölümü dahil birçok kritik hücrel fonksiyonu modüle edebildiği düşünülür (40).

Eritrositlerde hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, çok az geçirgen olan bir membrandan düşük pasif içe akış ve Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz tarafından katalizlenen aktif dışarı akış ile kontrol edilir. Talasemik eritrositlerde α -globin zincirlerinin presipitasyonu normal membran fonksiyonunu engelleyebilir (41). β -Talasemik eritrosit hücresi içinde α -globin zincirlerinin fazlası stabil değildir ve eritrosit membranlarının fonksiyon ve yapılarını ters etkileyebilecek inklüzyonlar oluşturmak üzere presipite olurlar. Fosfolipid içeriği değişiklikleri, membran yüzey karbonhidrat birimleri üzerindeki değişiklikler ve hücre iskelet yapısı anormalliklerinin dahil olduğu membran bozuklukları makrofajlar için sinyal oluştururlar. Eritrositlerin bütünlüğünün korunması için önemli bir fonksiyon, çok dik bir elektrokimyasal gradiente karşı düşük hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının korunmasıdır. Bu hem içe doğru Ca^{2+} a düşük membran geçirgenliği hem de membran –bağımlı enzim Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaz tarafından katalizlenen aktif bir dışı akış mekanizması aracılığıyla gerçekleşir. β -talasemik hastaların eritrositleri anormal yüzey özelliklerine, artmış fosfolipid içeriğine, azalmış deformabiliteye ve yüksek Ca^{2+} içeriğine sahiptir (41). Hücre içi Ca^{2+} birikiminin nedenleri henüz açık değilse de, bir çok olasılık vardır. Bu hücrelerde Ca^{2+} 'un pasif içe akışlarında artış olmuştur. Bu da membran bariyerinde bir lezyonun varlığına işaret eder.

Biriken kalsiyum, Ca^{2+} pompasının ulaşamayacağı bölgelerde yerleşebilir (talasemik eritrositlerde gerçekleştiği bilinen endositik vakuollerde tutulan Ca^{2+} veya α -globin agregatlara bağlı olan gibi). Bu agregatlar, aynı zamanda pompa bölgelerine kalmodulin ulaşılabilirliğini engelleyerek Ca^{2+} atılımını kötü yönde etkileyebilir (41).

Eritrositlerde Ca^{2+} birikiminin, ortalama hücre hacminde azalma ve ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonunda artışı indüklediği bilinir. İnsan eritrositlerinde, hücre içi kalsiyum hücre deformabilitesini etkiler ve birçok enzim sistemlerini regüle eder (42).

2.3.2. HÜCRE İÇİ SERBEST KALSIYUMUN ÖLÇÜMÜ

Canlı hücrelerinde sitozolik serbest kalsiyumun ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ilk ölçümleri 1960'larda kas hücrelerinde aequorin ile yapılmıştır. 1970'lerde iki yeni metod, bis-azo absorbands boyaları ve kalsiyum-selektif mikroeletrotlar ortaya çıkmıştır. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ büyük kas hücreleri dışında çok az sayıda hücre tipinde güvenilir olarak ölçülebilmektedir. 1982'de yeni bir floresan boya quin-2 ile bir kimyasal yol bulunmuştur. Fura-2 ve indo-1 gibi üstün boyaların keşfi ile tüm hücre alanlarında lokalize $[\text{Ca}^{2+}]_i$ için ölçüm teknikleri geliştirilmiştir (43). İdeal metod; prensip olarak, yaklaşık 10 nM Ca^{2+} konsantrasyonunu; aşırı miktarda Mg^{2+} ve diğer fizyolojik katyonların varlığında ölçebilecek şekilde olmalıdır. Eğer bir indikatör kullanılıyorsa; bunun ideal olarak plazma membranından geri diffüze olmaması ve hücre içi membran sınırlarından tekrar dağılmaması gerekir. Son yıllarda floresan Ca^{2+} şelatör esterlerinin kullanımı sayesinde küçük hücrelerde çalışılabilir hale gelmiştir. Bu esterler, pasif diffüzyonla hücre içine girerler ve içeride ester kısmın uzaklaşmasıyla bloke edilir. Bu floresan esterleri; artık büyük hücrelerde bile tercih edilen bir metod haline gelmiştir.

Fura-2, diğer floresan Ca^{2+} şelatörlerinden daha tatmin edicidir; çünkü çok daha düşük intrasellüler konsantrasyonlarda daha yüksek floresans verir. Bir başka avantajı da; intrasellüler floresan bileşiklerinin interferansı nedeniyle oluşan floresans emisyon piklerinin, spektrum bölgelerinden uzaklaştırılabilmesidir (35).

2.4. MALONDİALDEHİD (MDA)

MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan, deoksiribozun bir hidroksil radikaliyle yıkımından ve prostaglandin biyosentezinin bir yan ürünü olarak meydana gelir. MDA'nın; yaşlanmada, mutagenizde ve karsinogenizde rol aldığı gösterilmiştir. Yaşlanma veya dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli invivo durumlarda meydana gelen lipid peroksidasyonunun şiddetinin ve besinlerde meydana gelen oksidatif bozulma

miktarının bir göstergesi olarak MDA uzun zamandır kullanılmıştır (44). Biyolojik örneklerdeki MDA'yı tespit etmek amacıyla; TBA (tiyobarbitürik asit) testi, HPLC (yüksek – performanslı likit kromatografisi) ile direk saptama, MDA/TBA-HPLC metodları, MDA/fenilhidrazin-HPLC metodları ve gaz kromatografisi gibi metodlar geliştirilmiştir (44).

Lipid peroksidinin bir ürünü olan MDA; hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın bir göstergesidir. Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonu sonucu üretilen MDA'nın, bağlı formlara çevrildiği; bunların da yapısal olarak biyomoleküllerin primer amino grupları ile bağlantılı oldukları bildirilmiştir. Nair ve arkadaşları, MDA'nın primer aminlere karşı yüksek reaktivite göstererek, asidik koşullar altında Schiff bazlar oluşturduğunu göstermişlerdir.

MDA için mevcut analitik teknikler, TBA ile reaksiyon üzerine kuruludur. TBA ayrıca bir çok maddeyle de reaksiyona girebilir; örneğin diğer lipid oksidasyon ürünleri, safra pigmentleri, aminoasitler ve şekerler; ve sonuçta interferans veren kromojenler meydana gelir. MDA, TBA ile en reaktif bileşik olsa bile; TBA ile reaksiyon sonucu oluşan ürünlere MDA yerine TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri) denmesi daha anlamlıdır (45).

2.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ

2.5.1. ERİTROSİTLER

Eritrositler respiratuvar gazları taşırlar. (46). Matür eritrositler 8µm çapında, bikonkav disk şeklinde hücrelerdir. Hücrenin yüzey alanı 140µm², hacmi ise ortalama 90 fL olarak belirlenmiştir. Bu hücreler kemik iliğinde üretilir ve periferik dolaşıma katılmadan önce çekirdeklerini kaybederler. Olgun eritrositlerin, oksijen taşıyan pigment olan hemoglobinden oluşan amorf bir sitoplazmaları vardır. Eritrositlerin bikonkav disk şeklinin korunmasında etkili dört faktör olduğu ileri sürülmüştür. Bunlar, membran içindeki elastik kuvvetler, yüzey gerilimi, membran yüzeyindeki elektriksel kuvvetler, ozmotik ve hidrostatik kuvvetlerdir. Ayrıca hücre şeklinin korunmasında eritrositlerin içinde bulundukları ortamın özellikleri de büyük önem taşımaktadır. Eritrosit membranı iç yüzeyindeki membran iskelet proteinleri de bu düzenlemede görev alır (47). Eritrositler bulundukları ortamın özelliğine göre şekilsel bir esneklik gösterirler ve bunun gerçekleşmesinde eritrosit membran iskeletinin büyük rolü vardır.

Eritrosit membran lipidlerinin büyük kısmını fosfolipidler (%49,5) ve esterleşmemiş kolesterol (%47,1) oluşturur. Fosfolipidler taşıdıkları elektrik yüklerine göre nötral ve negatif yüklüler olmak üzere iki gruba ayrılır. Nötral fosfolipidler;

fosfotidil kolin ve sfingomiyelin, negatif yüklüler ise; fosfotidil etanolamin, fosfotidil serin, fosfotidil inozitol'dür. Yağ asidlerinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi zar akışkanlığında önemlidir.

2.5.2.ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ

Eritrosit deformabilitesi ; hem fizyolojik eritrosit yaşlanmasında hem de hastalık durumunda dolaşımdaki eritrositlerin ömrünü belirleyen önemli bir parametredir (48). Eritrositlerin disk şeklinde olması, eritrosit fonksiyonları açısından önemlidir. Bikonkav disk şeklinde olması deforme olma yeteneğini kolaylaştırır. Böylece 8 µm çapındaki eritrositlerin, 2-3 µm çapındaki kapiller alanda optimal hareketi sağlanmış olur (49).

Deformabilitenin birimi; elongasyon indeksi (EI) dir. EI; elipsoid difraksiyon paterninin iki eksenini arasındaki fark ile; bu eksenlerin toplamı arasındaki oran olarak tanımlanır (48).

Hücre deformabilitesini (hücre bütününe, deforme edici güçlere cevap olarak, yeni bir şekil alabilmesini) belirleyen dört önemli faktör tanımlanmıştır:

- 1- Yüzey alanı / hacim oranı
- 2- Şekil
- 3- Sitoplazmik viskozite
- 4- Membranın mekanik özellikleri.

Yüzey alanı /hacim oranı, eritrosit şekli ve internal viskozite etkileri geniş çapta çalışılmış olsa da; intrinsek membran özelliklerinin, hücresel deformabiliteye katkısı hala çok açık değildir (3). Ek olarak; eritrosit reolojik özelliklerinin detaylı karakterizasyonu başarıyla tamamlansa da; membrandaki yapısal değişiklikler de (membran proteinlerinin çapraz bağlanması, oksidan hasarın birikmesi ve hemoglobin bağlanmasının artışı gibi) hücresel reolojideki yetersizliğe katkıda bulunabilir. Spesifik olarak;

- 1- Eritrositlerin; membran materyal özelliklerinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu çok iyi bilinmektedir. Moleküller arası veya molekül içi proteinlerin etkileşimindeki artışın; membran deformabilitesi üzerinde derin etkisi olabilir.
- 2- Hemoglobinin, eritrosit membranı ile etkileşimi; temel olarak pH'ya ve iyonik güce dayanmaktadır.

- 3- Çeşitli hücre içi elamanların (hücre içi iyonlar gibi) hemoglobinin membrana yapışmasını etkileyerek, membran özelliklerini düzenlemedeki rolü, henüz tam olarak analiz edilmemiştir.

Eritrosit deformabilitesi üzerine kalsiyumun rolü; bazı tartışmalara neden olmuştur. Hemoglobinin; membrana, kalsiyum ve/veya magnezyum aracılığıyla bağlanması ile ilgili raporlar olsa da ; kalsiyum iyonlarının, membranın mekanik özelliklerini, hücre iskelet proteinleriyle direk etkileşim yoluyla mı, yoksa protein ağının kısımlarıyla kalsiyum aracılı bir hemoglobin etkileşimiyle mi değiştirdiği hala kesinlik kazanmamıştır. Fakat kalsiyumun, hemoglobinin eritrosit proteinlerine bağlanmasını artırdığı gösterilmiştir (50).

Eritrosit sitoplazmasının akışkanlığı da eritrositlerin mekanik özelliğini etkilemektedir. Sitoplazmanın önemli bir içeriği olan hemoglobin konsantrasyonu sitoplazma akışkanlığını belirler (47,51).

Eritrosit deformabilitesi iç ortamın ozmotik basınç değişikliklerinden etkilenir. Plazma ozmolaritesinde ortaya çıkan bir artış hücre hacminde bir azalmaya yol açarak, hemoglobin konsantrasyonunu artırır. Hücre iskelet proteinleri ile hemoglobin arasında veya membran proteinleri arasında oluşan çapraz bağlar eritrosit deformabilite yeteneğini bozar (52,53).

2.6. ERİTROSİT AGREGASYONU

Eritrositlerin agregabilitesi kan akımının özellikle mikrodolaşımda önemli bir belirleyicisidir. Normalde, kan akımı doku perfüzyonu için gerekli olan eritrosit agregatlarını dağıtma işi için yeterlidir. Artan agregabilite normal eritrosit agregatlarından daha büyük biçimli olmayı sağlar, özellikle akım hızının düşük olduğu mikrosirkülasyonda kan akımıyla disagregasyona direnç olabilir. Artan eritrosit agregasyonu parabolik olarak akıma karşı direncin major bir belirleyicisi olan kan vizkositesini arttırır (54). Yükselen kan vizkositesi kan akımını düşürmesi, azaltması nedeniyle eritrosit agregasyonunu arttırır.

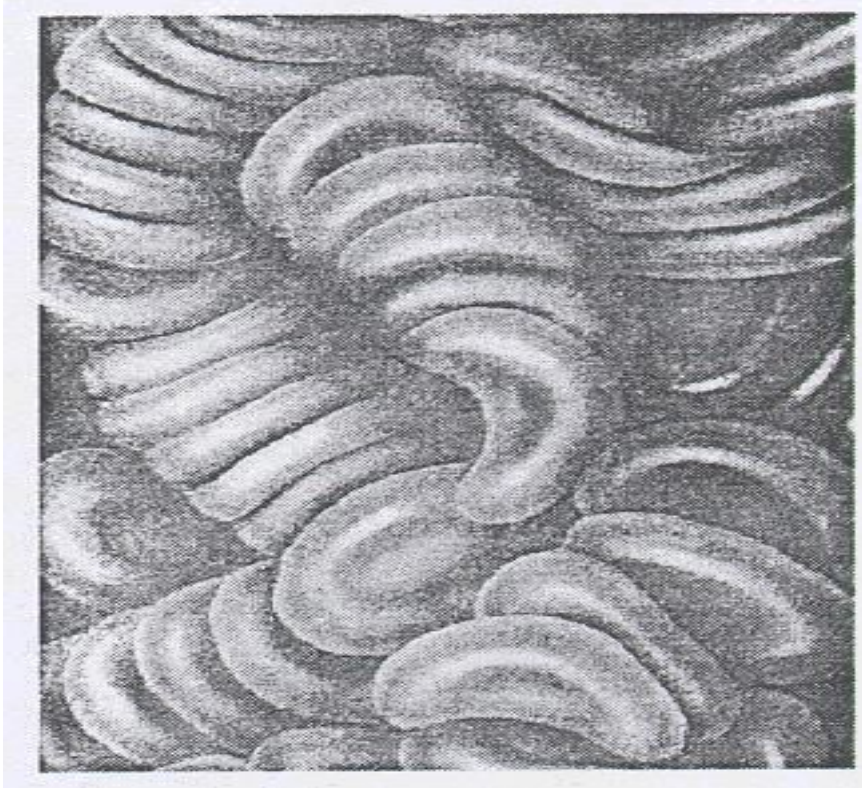
Eritrosit agregasyonunun büyüklüğü, karşı koyan kuvvetlerle belirlenir: Negatif yüklü hücreler arasındaki itici güçler, plazma proteinlerinin varlığında indüklenen hücre-hücre adezyonu ve kan akımıyla indüklenen karşı koyucu kayma kuvveti (54).

Bu engeller azalan doku perfüzyonuna ve iskemiye yol açar. Böylece küçük kan damarlarında trombus oluşumuna katkıda bulunur. Eritrosit agregabilitesi, hemodinami için en önemli parametredir.

Talasemi hastalığı eritrosit yaşam süresinin kılmasına ve kronik anemiye yol açar, morfolojik ve fonksiyonel eritrosit anomalileriyle karakterizedir. Son yıllarda talasemi hastalarında yapılan çalışmalarda; dolaşım problemlerinin ve kronik bacak ülserlerinin görünmesine yol açan mikrosirkülatuar engeller, arteriyel-venöz tromboz ve geçici iskemik atakların görüldüğü bildirilmiştir. Talasemi majorlu hastaların eritrosit membranlarında anormallikler bildirilmiş ve bu hücrelerin agregabilitesinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu eritrositler normal eritrositlerden daha az hidrate ve daha rijittir. Ayrıca bu sonuç, azalan deformabilite ile ve artan agregabilite ile birleştirilebilir. Bu hastaların eritrosit membran sialik asit düzeyleri normalden daha düşüktür ve bu, azalmış yüzey yükünü gösterir. Eritrosit agregabilitesi güçlü şekilde membran kompozisyonuna ve yüzey yüküne bağlıdır.

Eritrosit agregasyonu gerek plazmanın, gerekse eritrositlerin çeşitli özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Fibrinojenin eritrosit agregasyonu sırasında güçlü bir aracı olduğu bilinir. Plazma proteinleri, özellikle fibrinojen ve immünglobulinler, eritrosit agregasyonunda önemli rol oynar (55,56). Plazma globulin fraksiyonlarındaki değişimler, osmolarite ve pH değişiklikleri gibi faktörler de eritrosit agregasyonunu etkiler. Hematokrit değerindeki artış, eritrosit membranının fiziko-kimyasal özelliklerindeki (membran yüzeyinin özellikleri ve yüzey yükü) değişimler, hücre şekli ve eritrositin şekil değiştirme yeteneği de eritrosit agregasyonunu etkileyen faktörler arasında sayılabilir.

Oksijen serbest radikallerinin eritrosit agregasyonu üzerindeki etkisi bu oksidanların hücre içi ve hücre dışı kaynaklı olmasına bağlı olarak değişmektedir (57,58).



Şekil 7: Eritrosit agregatları.

2.6. OKSİDAN STRES VE ERİTROSİTLER

Süperoksit anyonları, elektron transfer sistemi ve fagozitoz gibi in vitro fizyolojik reaksiyonların ve fagozitozun korunmasında vazgeçilmezdir. Ancak aşırı miktarda oluşmaları ve sonrasında diğer aktif oksijen türlerinin oluşumu, çeşitli sitotoksik etkiler yaratır. Kırmızı kan hücreleri, hücresel ve moleküler seviyelerde peroksidatif membran hasarının mekanizmasını açığa çıkarmak için yoğun olarak kullanılmışlardır. Eritrosit, aktif oksijen türü kaynağı olan hemoglobini içerir. Fizyolojik olarak oluşan oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu, süperoksit anyon salınımı ve sonrasında hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi diğer reaktif oksijenlerin oluşumu ile sonlanır. Çünkü oksijen diğer aktif oksijen türlerine kolayca dönüşebilir. Dolayısıyla eritrositte süperoksit anyonunun aşırı miktarda üretimi, eritrositin fizyolojik özelliklerini ve sonuçta ömür uzunluklarını değiştiren potansiyel

bir neden olarak görülür. Birçok kanıt, eritrositte oksidatif hasarın, eritrosit deformabilitesi gibi fizyolojik fonksiyonlarda değişikliğe neden olduğuna işaret eder. Birçok çalışmada, aktif oksijen türleri ve/veya peroksit oluşturan bileşiklerin neden olduğu membran proteinlerinin polimerizasyonuna (çapraz bağlanma) bağlı olarak deformabilitenin azaldığı bildirilmiştir.

Yüksek oksijen girişine maruz kalındığında, serbest radikal reaksiyonlarının potent katalizörü olan demir ve çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin eritrositler zorunlu olarak hücre dışı ve hücre içi kaynaklı serbest radikallere maruz kalır.

Okside eritrositlerde, lipid ve protein değişiklikleri oluşur. Serbest radikaller çoklu doymamış yağ asitlerini içeren diğer lipid molekülleriyle reaksiyona girer. Okside kolesterol ve fosfolipidlerin doymamış yağ açıl grupları gibi lipid oksidasyon ürünleri membranın yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilir. Oksidan hasar sonucunda fosfolipid molekül türleri değişir ve eritrosit membranı bozulur.

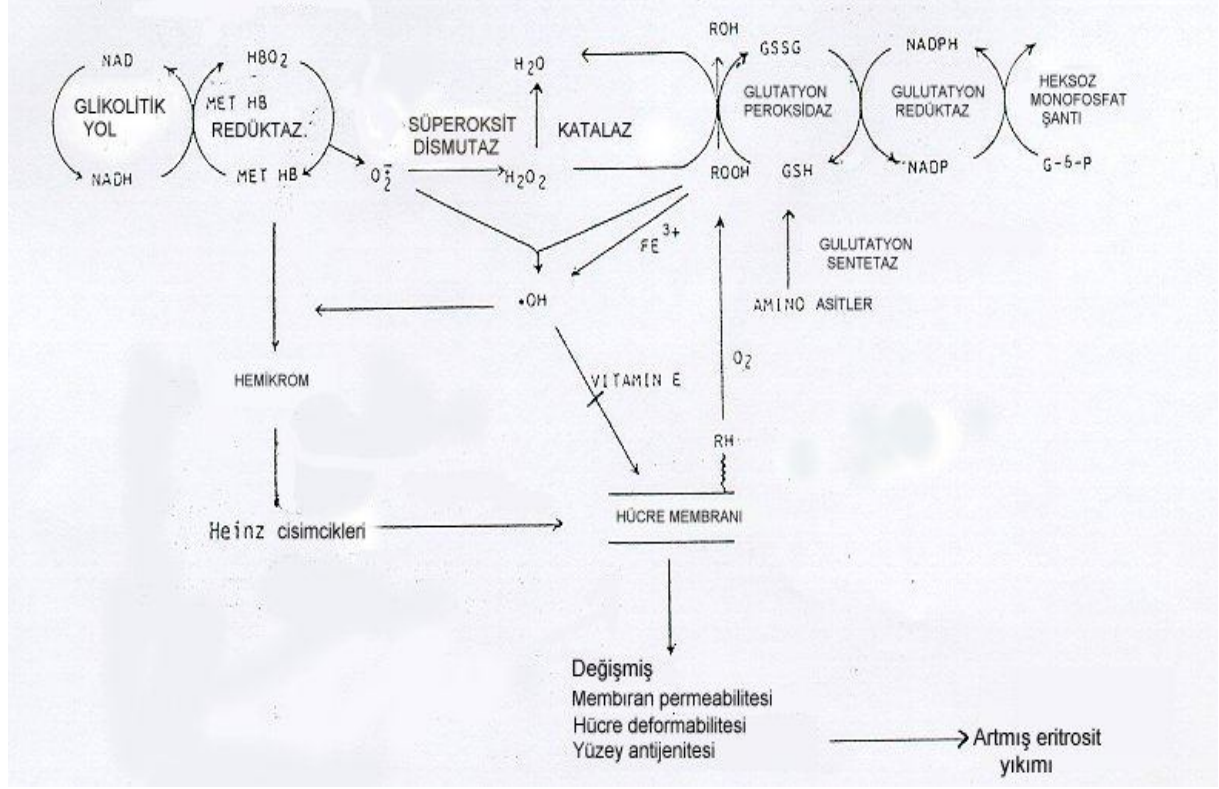
Oksidatif değişiklik sonucu oluşan patolojik eritrositlerde protein tiyol gruplarının kaybı ve aminoasitlerin oksidasyonu ile protein değişiklikleri oluşur (59). Peroksidan hasar, membrandaki fosfolipid ve diğer lipid komponentlerinde başlar, membran proteinlerine göç eder (60).

Eritrosit hücresinin tüm lipid ve protein bileşenleri, oksidan strese etkilenir. Bu bileşenler membranla ilişkili veya sitoplazmik olabilirler. Hemoglobin, eritrositin en önemli sitoplazmik bileşenidir ve tüm oksidatif işlemlerde önemli rol oynar. Diğer sitoplazmik proteinler, özellikle enzimler de oksidan etkiye maruz kalırlar ve fonksiyonları engellenir. Proteinler ve enzimlerde serbest radikallerin saldırıları sonucu polimerizasyon, polipeptit zincir kesimi ve aminoasitlerde kimyasal değişiklikler meydana gelir (61).

Membranda oksidatif hasar, genellikle fosfolipidlerde başlar ve kolayca membran proteinlerine yayılabilir, bunlara membran iskeleti de dahildir. Spektrin sülfidril grupları, aminofosfolipidlerde çoklu doymamış yağ asitlerine çok yakın konumlanmıştır. Bu durum bunları hasara özellikle çok duyarlı kılar. Sonuç olarak spektrin üniteleri, disülfid bağlarla çapraz bağlanabilir. MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri de, amino grupları içeren membran bileşenlerini çapraz bağlayabilir. Hb'nin de oksidan saldırı sonucu spektrin ile çapraz bağlandığı gösterilmiştir (62,63).

Oksidan stres altında gözlenen, lipid peroksidasyonu ile direk ilişkili olmayan diğer bir değişim, artan katyon geçirgenliğidir. Artan pasif katyon (çoğunlukla potasyum) geçirgenliği, muhtemelen membran -SH gruplarının oksidasyonu sonucu

gerçekleşir. Değişen su geçirgenliği ile birlikte potasyum sızıntısı gerçekleşir ve eritrositlerde dehidratasyon ile sonuçlanır. Öte yandan, lipid peroksidasyonu membran yapısını hasara uğratabilir ve hemoglobine bile duyarlı porlar oluşturur (64,65).



Şekil 8: Eritrositteki peroksidatif reaksiyonlara karşı koruyucu sistemler (61).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada; kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası olmak üzere üç grup oluşturuldu. Kontrol grubunu oluşturan birinci grupta; bilinen bir hastalığı olmayan, kronik ilaç kullanım öyküsü olmayan, fizik muayenesi ve rutin biyokimyasal tetkikleri normal olan, yaşları 3 ile 17 arasında değişen 20 sağlıklı çocuk bulunmaktadır. Tedavi öncesi grubu oluşturan ikinci grupta ise; Akdeniz Üniversitesi Tıp fakültesi Hastanesi Pediatri Anabilim Dalı Hematoloji Polikliniği'nde β - talasemi teşhisi ile düzenli olarak takip edilen ve bir aydır transfüzyon tedavisi almayan, yaşları 3 ile 17 arasında değişen 20 β - talasemili çocuk bulunmaktadır. Üçüncü grup ise; tedavi öncesi gruptaki 20 β - talasemi hastasının bir ay süreyle karnitin tedavisi almasıyla oluşturuldu.

Kontrol grubu ve hasta gruplarının kan örnekleri pediatri-hematoloji polikliniğinde alındı. Hasta ve kontrollerden; bir tane tam kan tüpüne ve iki tane de heparinli biyokimya tüpüne olmak üzere üç tüp kan alındı. EDTA'lı tam kan tüpüne alınan kan örneklerinin tam kan sayımları pediatri hematoloji polikliniğinde bulunan hematoloji analizörü (Cell-Dyn 1600, Abbot) ile yapıldı ve bu tam kan tüpü daha sonra Fizyoloji Anabilim Dalı Hemoreoloji laboratuvarına götürülerek eritrosit deformabilitesi ve agregasyon ölçümü için kullanıldı. Heparinli tüpe alınan örneklerden birisi; 2000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Bu plazmanın bir kısmı plazma MDA ölçümü için ayrılıp -20°C de saklandı. Plazmanın bir kısmı da plazma serbest karnitin ölçümü için -70°C de saklandı. Plazması ayrıldıktan sonra eritrosit paketi elde edebilmek için; hücre paketi üç kez izotonik fosfat tamponu ile yıkandı. Bu paketten hazırlanan süspansiyonlardan hemoglobin (Hb) ve MDA ölçümü yapıldı. Heparinli tüpe alınan diğer kan örneğinde ise; histopaque-1119 ilavesiyle eritrositlerin ayrılmasından sonra hazırlanan hücre paketinde; eritrosit hücre içi serbest kalsiyum ölçümü yapıldı.

3.1. ERİTROSİT HÜCRE İÇİ KALSIYUM TAYİNİ (35, 42, 43, 66, 67)

Prensip:

Eritrositlerde hücre içi kalsiyum tayini; Dufilho ve arkadaşlarının fluorofotometrik metoduna göre yapıldı. Fluoresan Ca^{2+} şelatörlerinden birisi olan Fura-2'nin, tetraasetoksimetil esteri olan Fura-2AM kullanılarak fluorofotometrik ölçüm yapıldı. Nispeten apolar olan fluoresan ester; pasif difüzyonla plazma membranından hücre içine serbestçe difüze olur. İçeride ester kısmının, sitozolik esterazlar tarafından uzaklaştırılmasıyla bloke edilir ve molekülün dört karboksil grubu ortaya çıkar. Oluşan Fura-2 Ca^{2+} kompleksinin; exitasyon dalga boyları 335-385 nm ve emisyon dalga boyu 510 nm deki fluoresansı spektrofotometre (Shimadzu RF-5000) ile ölçüldü. Fura-2 Ca^{2+} kompleksi ve kompleks oluşturmayan serbest Fura-2'nin fluoresans yoğunlukları arasındaki oran sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonlarını yansıtır.

Reaktifler :

1) HEPES tamponu (pH: 7.4):

123 mM NaCl (Sigma, S 7653), 5 mM KCl (Sigma, P 9333), 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, M 2670), 1.3 mM CaCl_2 (Sigma, C 1016), 10 mM Glukoz (Sigma, G 5767) ve 25 mM HEPES (Sigma, H 3375) distile suda çözüldükten sonra, son hacmi distile su ile 1000 mL' ye tamamlandı. Bu tampon 4 °C'de saklandı.

2) Fura-2AM (Sigma, F 0888): 1 mg Fura-2AM, 1 mL Dimetil Sülfoksit (Sigma, D 5879) içinde çözülerek 1 mM'lık Fura-2AM çözeltisi hazırlandı.

3) Histopaque-1119 (Sigma, 1119-1)

Yöntem:

Heparinize tüplere alınan kan örneklerinden, kan alındıktan sonraki iki saat içinde ölçümler yapıldı. Heparinli tüp içine 2 mL histopaque-1119 eklendikten sonra, 15 dakika süreyle soğutmalı santrifüjde (Kubota 5800) 4 °C'de ve 3500 rpm'de santrifüj edilerek, eritrositler bir kez histopaque-1119 ile yıkandı. Üst faz atıldıktan sonra, tüp içine 3 mL HEPES tamponu eklendi ve tüp yavaş bir şekilde alt üst edildikten sonra 10 dakika 4 °C'de 3500 rpm'de santrifüj edilerek histopaque-1119 elimine edildi. Üst faz atıldıktan sonra, tüpte kalan hücre paketinden 10 µL alarak, 1 mL HEPES tamponu içeren bir tüpe koyuldu. Böylece

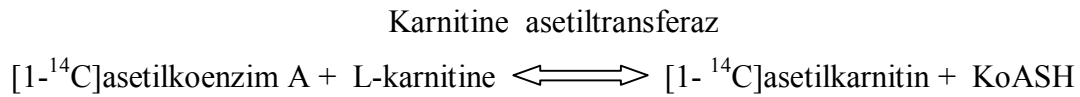
paketlenmiş hücreler, HEPES tamponuyla %1 hemotokrite dilüe edildi. Bu kırmızı hücre süspansiyonu içine 10 µL Fura-2AM eklendi ve 37 °C’de 25 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Böylece hücre dışı Fura-2AM elimine edildi. Üst faz aspire edilip atıldıktan sonra, tüp içerisine 2 mL HEPES tamponu ilave edildi.

Fluoresans spektrumu; Shimadzu RF-5000 spektrofotometre ile, eksitasyon dalga boyları 335-385 nm’de, emisyon dalga boyu 510 nm’de kaydedildi.

3.2. PLAZMA SERBEST KARNİTİN TAYİNİ (68,69,70)

Prensip:

Plazma L-karnitin düzeyleri, Cederblad ve Lindstedt tarafından tanımlanan radioenzimatik metoda göre sıvı sintilasyon cihazında ölçülmüştür. Metodun temel reaksiyonu :



Karnitin asetiltransferaz varlığında, L- karnitin [1-¹⁴C]asetilkoenzim A ile inkübasyonu, [1-¹⁴C]asetilkarnitin oluşumu ile sonuçlanır. Asetil koenzime A’nın fazlasını tutmak için anyon değiştirici reçine kolonu kullanıldı. Kolon eluentindeki izotop içeriği [1-¹⁴C]asetilkarnitinden kaynaklanıyordu. Eluentin izotop içeriği, sıvı sintilasyon sayacı (1500 TR-Carb^R, Packard) ile belirlendi.

Reaktifler:

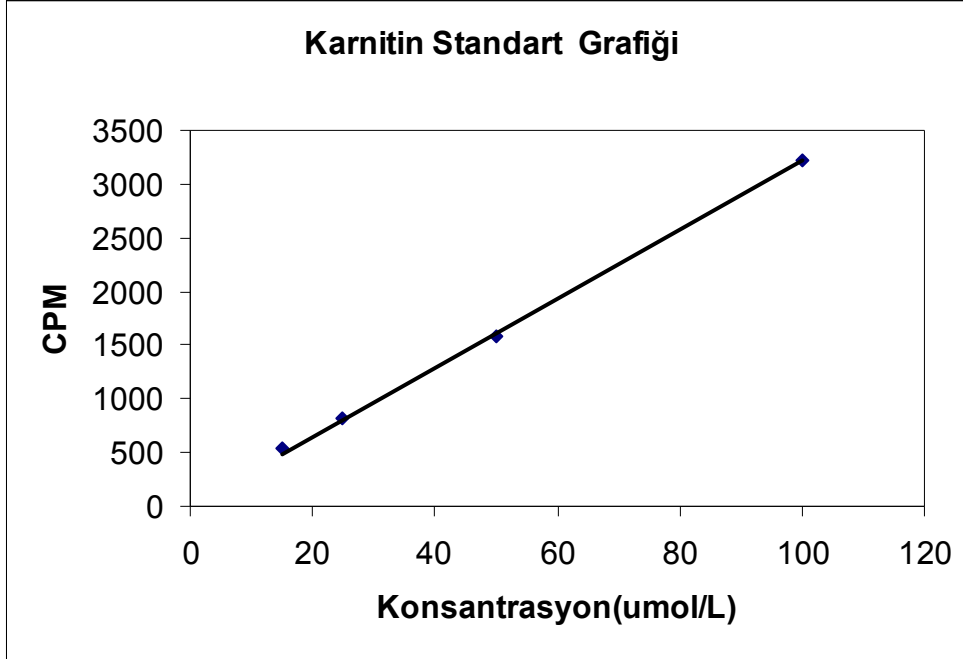
- 1) 1 mol/ L HEPES (Sigma, H 3375)
- 2) 40 mmol/L N-etilmaleimid (Sigma, E 3876)
- 3) 100 µmol/L [1-¹⁴C]asetil koenzim A (0.2 µCi/ mL) (Sigma, A 7925)
- 4) Karnitin asetiltransferaz (0.5 mg/mL) (Sigma, C 8757)
- 5) L-karnitin standart solusyonu (Sigma, C 0283); 15, 25, 50, 100 µmol/L konsantrasyonlarında hazırlandı.

Yöntem:

Heparinli tüpe alınan kan örneği 2000xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Ayrılan plazma kısımları –20 °C'de çalışma gününe kadar saklandı. Serbest karnitin ölçümü için 25 µL erimiş plazma örneği kullanıldı.

	Numune
HEPES (µL)	50
N-etilmaleimid (µL)	20
[1- ¹⁴ C]asetil koenzim A (µL)	100
Plazma (µL)	25
Karnitin asetiltransferaz (µL)	30

Bu karışım 37 °C'de bir saat inkübe edildi. Karışım; 2 cm x 0.5 cm Dowex AG 2-X8 (200-400 mesh, Klorid form (Sigma, 2X8-400)) kolonundan geçirildi. Bu kolon daha sonra iki kez 0.5 mL deiyonize su ile yıkandı. Total kolon eluenti toplandı. Bunun üzerine 10 ml sintilasyon sıvısı eklendi ve bir sıvı sintilasyon sayacı (1500 TR-Carb^R, Packard) kullanılarak izotop içeriği belirlendi. Sonuçlar µmol/L olarak verildi.



Şekil 9: Karnitin standart grafiği

3.3. PLAZMA TBARS TAYİNİ (44,45,71,72)

Prensip:

Plazma TBARS tayini Wasowicz ve arkadaşlarının fluorometrik metoduna göre yapılmıştır. TBA-reaktif maddeler (TBARS) ; ki bu madde primer olarak MDA'dan oluşur; iki molekül TBA ile kırmızı renkli bir ürün (MDA-TBA₂) oluşturur. Oluşan MDA-TBA ürününün, düşük pH'da n-bütanol ile ekstraksiyonundan sonra 525 nm (eksitasyon) ve 547 nm (emisyon) dalga boylarında fluoressansı ölçüldü.

Reaktifler:

- 1) 29 mmol/L tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma, T 5500): 8.75 M Asetik asit (Sigma, A 6283) içerisinde hazırlanır.
- 2) 5 mol/L hidroklorik asit (HCl) (Sigma, H 7020)
- 3) n-Bütanol (Sigma, B 1417)
- 4) Malondialdehid bis (dimetil asetal) (Sigma, T 1642) standart solüsyonu, 0, 0.5, 1, 2.5, 3.5, 5, 7, 8, 9, 10 µmol/L konsantrasyonlarında hazırlandı.

Yöntem:

Heparinli tüpe alınan kan örneklerinin plazması, 2000xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra ayrılarak -20 °C'de çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma günü -20 °C'den alınan örnekler oda ısısında çözündükten sonra çalışıldı.

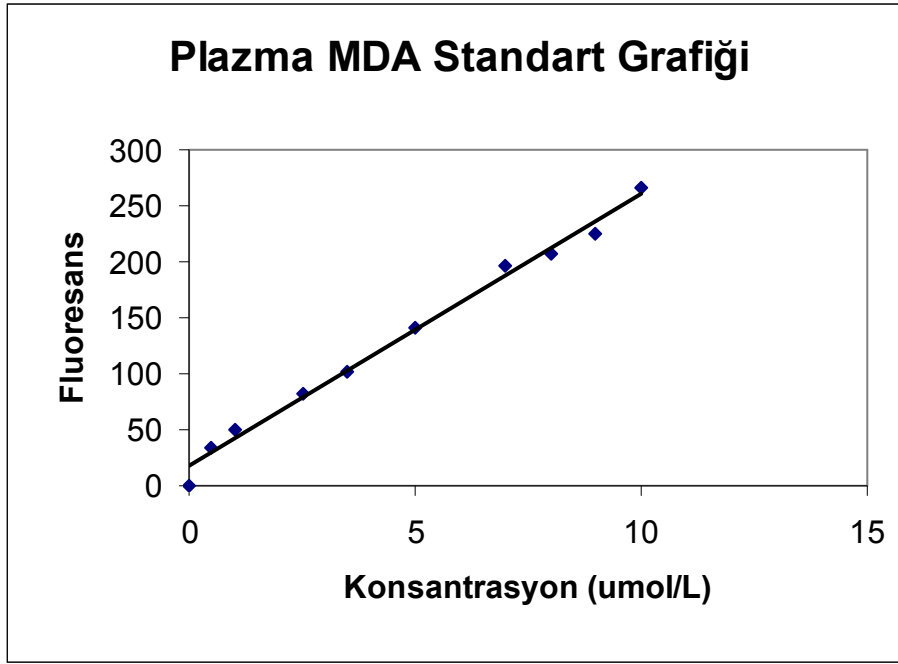
	Deney
Plazma (mL)	0.05
Distile su (mL)	1
TBA (mL)	1

Deney tüplerinin ağzı çok sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra, 100 °C kaynar su banyosunda 1 saat süreyle kaynatıldı ve su banyosundan çıkarıldıktan hemen sonra musluk suyu altında soğutuldu.

HCl (mL)	0.025
n-Bütanol (mL)	3.5

Tüm deney tüpleri 5 dakika süreyle vorteks ile karıştırıldı. Sonra 10 dakika süreyle 1500xg’de santrifüj edildi. Üst faz ayrıldıktan sonra spektrofotometrede (Shimadzu RF-5000) 525 nm (eksitasyon) ve 547 nm (emisyon) dalga boylarında floresansları okundu.

Örneklerin MDA içerikleri standart grafiğinden $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplandı.



Şekil 10: Plazma MDA standart grafiği

3.4. ERİTROSİT TBARS TAYİNİ (53)

Prensip:

Lipid peroksidasyon ürünlerinin TBA ile reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesi ve bu absorbansın spektrofotometrede (Schimadzu UV 1601) ölçülmesi prensibine dayanır. TBARS düzeyleri Stocks ve Dormandy’nin metoduna göre tayin edilmiştir.

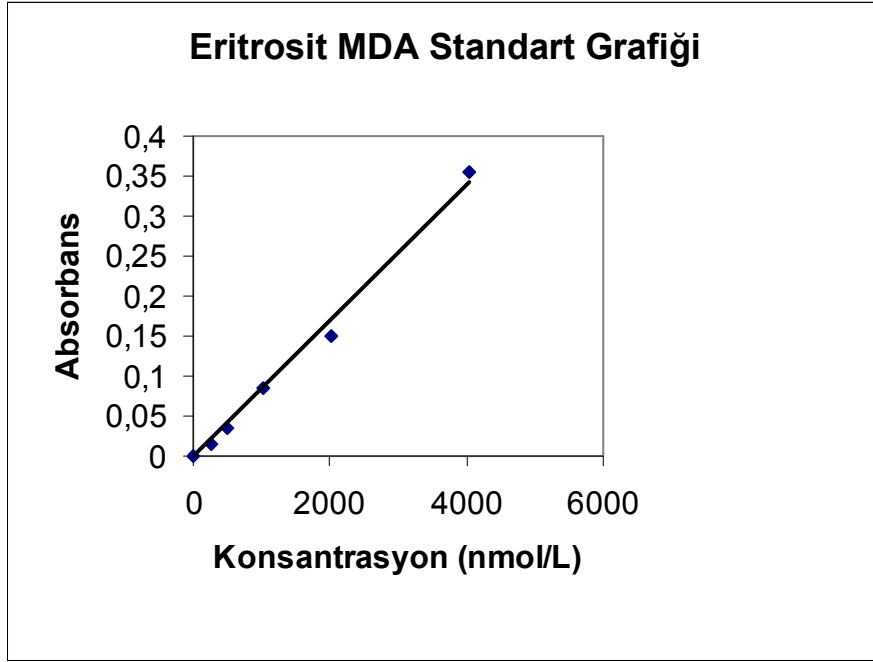
Reaktifler:

- 1) Fosfat NaCl tamponu (pH:7.4): 0.5 M KH_2PO_4 (Potasyum fosfat monobazik anhidröz, Sigma, P-5379); 0.5 M K_2HPO_4 (Potasyum fosfat, Sigma, P-8281); 0.15 M NaCl (Merc, 6400)
- 2) %30'luk TCA (Triklorasetik asit, Sigma, T 4885)
- 3) %1'lik TBA (2-Tiyobarbitürik asit, Sigma, T 5500): 0.05 M NaOH (Merk, 6462) içinde hazırlandı.
- 4) Malondialdehid bis (dietil asetal) (Sigma, T 9889) standart solüsyonu, 253.12, 506.25, 1012.5, 2025, 4050 nmol/L konsantrasyonlarında hazırlandı.

Yöntem:

Heparinli tüpe alınan kan örnekleri beklemeden çalışmaya alındı. 2000xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazması ayrıldı. Paket eritrositler üç kez fosfat NaCl tamponu ile yıkandıktan sonra yine aynı tamponla 10 kez dilüe edildi. Hazırlanan bu süspansiyonun 3 mL'si başka bir tüpe alındı ve üzerine 2 mL TCA solüsyonundan eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın 3ml'si alınarak başka bir deney tüpüne koyuldu ve üzerine TBA solüsyonundan 1 mL eklendikten sonra 15 dakika süreyle deney tüpleri kaynatıldı. Kaynatma süresi biter bitmez tüpler tüpler musluk suyu altında soğutuldu. Sonra 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu UV 1600) köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.

Numunelerin konsantrasyonları standart grafiğine göre hesaplandı. 10 kez dilüe edilen eritrosit paketinin hemoglobin içeriği, Drabkin yöntemine göre tayin edildi. TBARS düzeyleri nmol/g Hb olarak belirtildi.



Şekil 11: Eritrosit MDA standart grafiği

3.4.1. HEMOGLOBİN TAYİNİ (73)

Prensip:

Alkali pH'da, Potasyum ferrisiyanürle hemoglobin, methemoglobine dönüşür ve potasyum siyanürle de siyanmethemoglobin oluşur. En son oluşan bileşiğin absorbansı 546 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu UV 1600) okunur.

Reaktifler:

1) Drabkin ayırıcı: 1 g Sodyum bikarbonat (Sigma, S 6297), 200 mg potasyum ferri siyanür (Sigma, P-8131) ve 50 mg potasyum siyanür (Merk, 4965) karışımına 1000 mL oluncaya kadar distile su eklendi.

2) Hemoglobin standart solüsyonu: Hemoglobin (Sigma, H 7379) standart solüsyonu 1g/dL olacak şekilde hazırlandı.

Yöntem:

2.5 ml Drabkin ayırıcı üzerine, fosfat NaCl tamponu ile 10 kez dilüe edilmiş eritrosit paketinden 50 µl eklenerek 15 dakika karanlıkta ve oda ısısında bekletildi. Sonra spektrofotometrede (Schimadzu UV 1600) 546 nm dalga boyunda absorbans ölçümü köre karşı yapıldı.

3.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ (74,75)

Prensip:

Eritrosit deformabilitesi, bir ektasitometre (LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer), RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi.

Reaktifler:

1) PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4):

- 140 mM NaCl (Sigma, S 7653)
- 18.4 mM Na₂HPO₄ (Sigma, S 7927)
- 1.3 mM NaH₂ PO₄ (Sigma, S 8282)

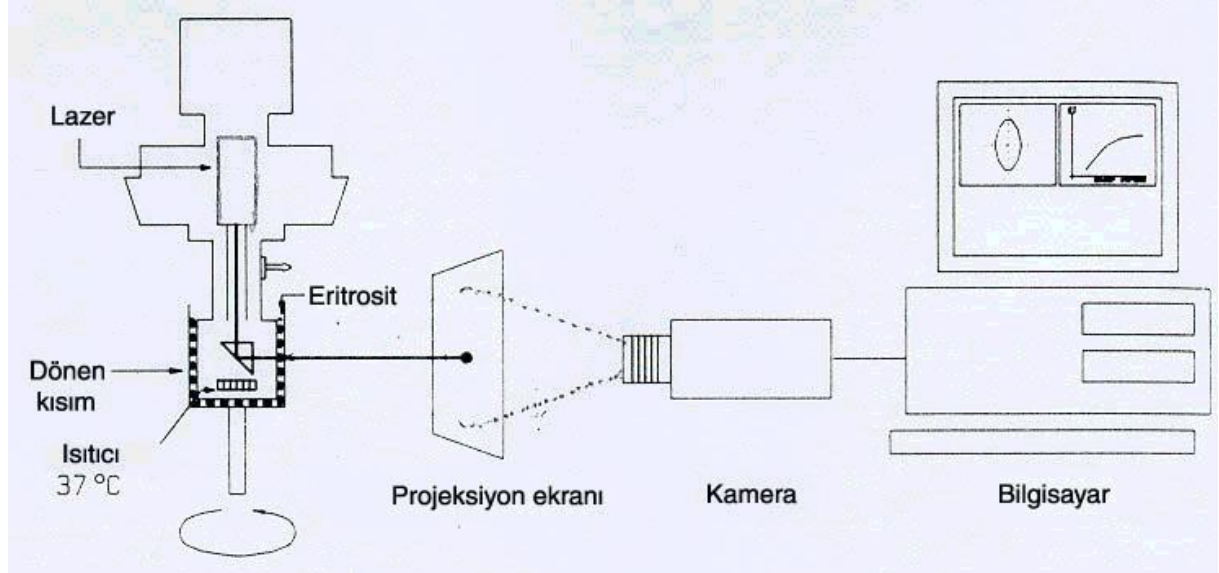
2) 0.14 M PVP (polivinil pirolidon, Sigma, PVP-360): 300 g PVP 6 litre PBS içinde çözündü ve 5 ml'lik kısımlar halinde bölünüp -70 °C de donduruldu. Sonra -20 °C de depolandı. Kullanmadan önce oda ısısında eritildi ve iyice karıştırıldı.

Yöntem:

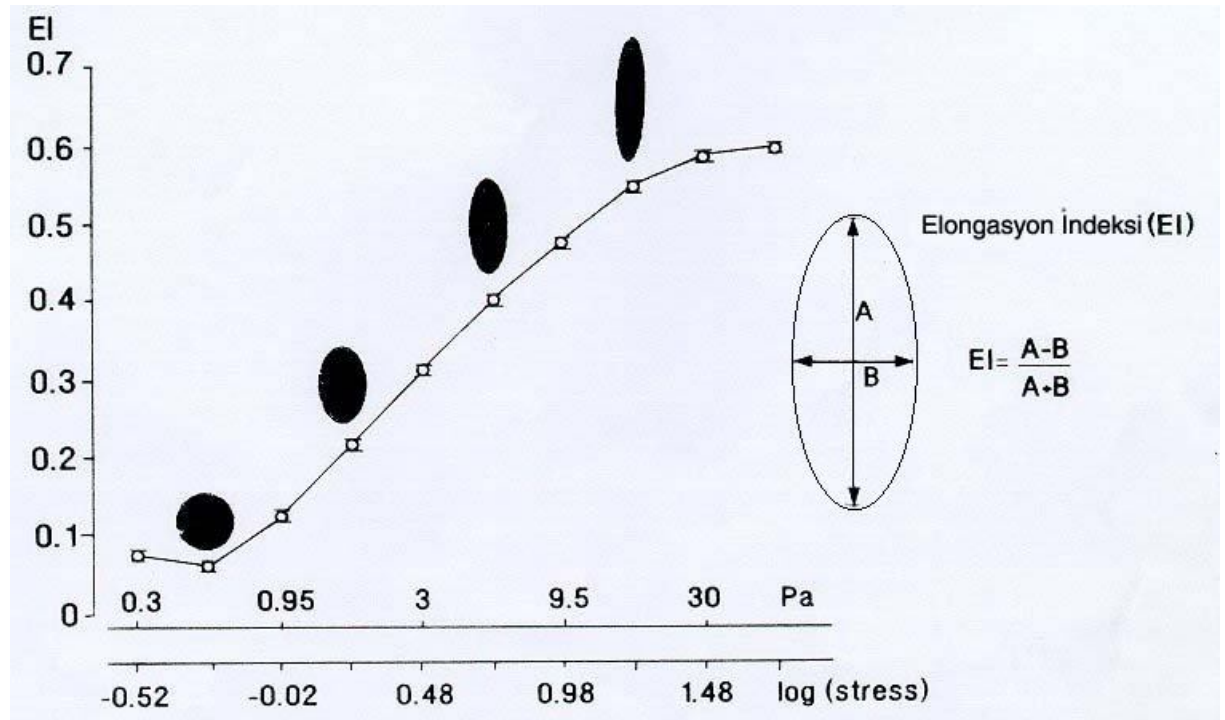
EDTA'lı tam kan tüpüne alınan örnekler bekletilmeden çalışıldı. Eritrositler, PBS içinde hazırlanmış 0.14 M PVP çözeltisi içinde, yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun 1 ml'si, aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan iki cam silindirden oluşan bir viskometre sistemine yerleştirilmişti. İki cam silindirin arasındaki boşluğu dolduran süspansiyon, dıştaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından, uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızda döndürülmesiyle, bu kuvvetlerin etkisinde bırakılmıştır. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından, PBS-PVP çözeltisinin viskozitesi de dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşır ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni, süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketinin yarattığı akıma orientasyonlarını yansıtır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoide dönüşümünün derecesi ile eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilite) arasında doğru orantı vardır. Elipsoid difraksiyon paterninin uzun (A) ve kısa

eksenlerinin (B) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanması, $EI = A-B/A+B$ şeklinde bir elongasyon indeksinin hesaplanmasına olanak tanır.

Bu çalışmada elongasyon indeksleri (EI) 0.5-15 Pascal (Pa) kayma kuvveti aralığında ölçülmüş ancak, değişimleri en iyi yansıtan 1.58 Pa kayma kuvvetindeki ölçüm sonuçları kullanılmıştır ve ölçümler 37 °C’de yapılmıştır.



Şekil 12: RBC deformabilite tespitinin ölçüm ve deteksiyon sistemi LORCA'nın şematik çizimi (74)



Şekil 13: RBC elongasyonu sırasında difraksiyon paternindeki değişiklik; elongasyon indeksinin hesaplanması (74)

3.6. ERİTROSİT AGREGASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ (76)

Prensip:

Eritrosit agregasyonu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında geliştirilmiş olan fotomerik agregometre kullanılarak ölçülmüştür. Bilgisayar kontrollü bu cihaz aralarında 0.3 mm mesafe bulunan, birbirine paralel iki cam plaka ve bunlardan birisini bilgisayar tarafından belirlenen hızda döndüren bir motordan oluşmaktadır. Bu iki cam plaka arasına yerleştirilen kan örneğinin ışık geçirgenliği, bir diyot (LED) tarafından gönderilen infrared ışık demeti, amplifikatör sistemi ve analog/dijital çevirici yardımıyla bilgisayara aktarılmış ve ışık geçirgenliğinin zamana karşı kaydedilmesi sağlanmıştır.

Reaktifler:

1) %1'lik Dekstran 500 (Sigma, D 5251)

Yöntem:

Ölçümün başlangıcında cam plakalardan birisi döndürülerek, kan örneği (ölçüm noktasında) 500 sn⁻¹ kayma hızında 10 saniye hareket ettirilmiştir. Kan örneği içindeki eritrosit agregatlarını parçalayan (disagregasyon) bu hareket sonrasında örnek aniden durdurulmuştur ve kan örneğinin ışık geçirgenliği 10 saniye süresince bilgisayar tarafından kaydedilmiştir. Kayma kuvvetlerinin ortadan kaldırılmasından sonra ortaya çıkan eritrosit agregasyonu sırasındaki ışık geçirgenliği değişikliğinin zaman içindeki seyri izlenerek agregasyonun büyüklüğü (derecesi) ve dinamiği saptanabilir. Bilgisayar, ışık geçirgenliği zaman eğrilerinin altında kalan alanı hesaplayarak, agregasyon derecesini yansıtan birimsiz bir agregasyon indeksi sağlamaktadır.

Eritrosit agregasyonu otolog plazma içinde veya agregasyon için standart bir süspansiyon ortamı kullanılan %1'lik Dekstran 500 içinde, 37 °C'de ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan örneklerin hematokrit değeri %10'a ayarlanmıştır.

3.7. TAM KAN SAYIMI

Tam kan örneklerinde eritrosit sayısı (RBC), hematokrit (Htc), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), eritrosit genişlik dağılımı (RDW) oranları elektronik hematoloji analizörü (Cell-Dyn 1600, Abbot) kullanılarak saptanmıştır.

3.8.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hasta grubuna ait tedavi öncesi ve tedavi sonrası parametrelerinin karşılaştırılmasında, Paired t-test kullanılmıştır.

Tedavi öncesi değerlerin, hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmasında ise, Student t-test kullanılmıştır.

Ayrıca parametrelere ait ortalama ve standart sapmalar da hesaplanmıştır.

İstatistiksel analizde SPSS 10,0,1 paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Yapılan istatistiksel incelemeler sonucunda; çalışmada ölçümü yapılan 7 parametrenin tümü için, kontrol grubu ile karnitin tedavisi kullanımına başlamayan tedavi öncesi grup arasında anlamlı bir farklılık bulundu. Ancak tedavi öncesi gruba 1 ay süreyle L-karnitin tedavisi verilmesi sonrası yapılan ölçüm ile tedavi öncesi ölçümler karşılaştırıldığında eritrosit agregasyonu ve tam kan sayımı dışındaki beş parametrenin (eritrosit hücre içi kalsiyum düzeyi, plazma TBARS düzeyi, eritrosit TBARS düzeyi, plazma serbest karnitin düzeyi ve eritrosit deformabilitesi) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

4.1. ERİTROSİT HÜCRE İÇİ KALSİYUM DÜZEYLERİ

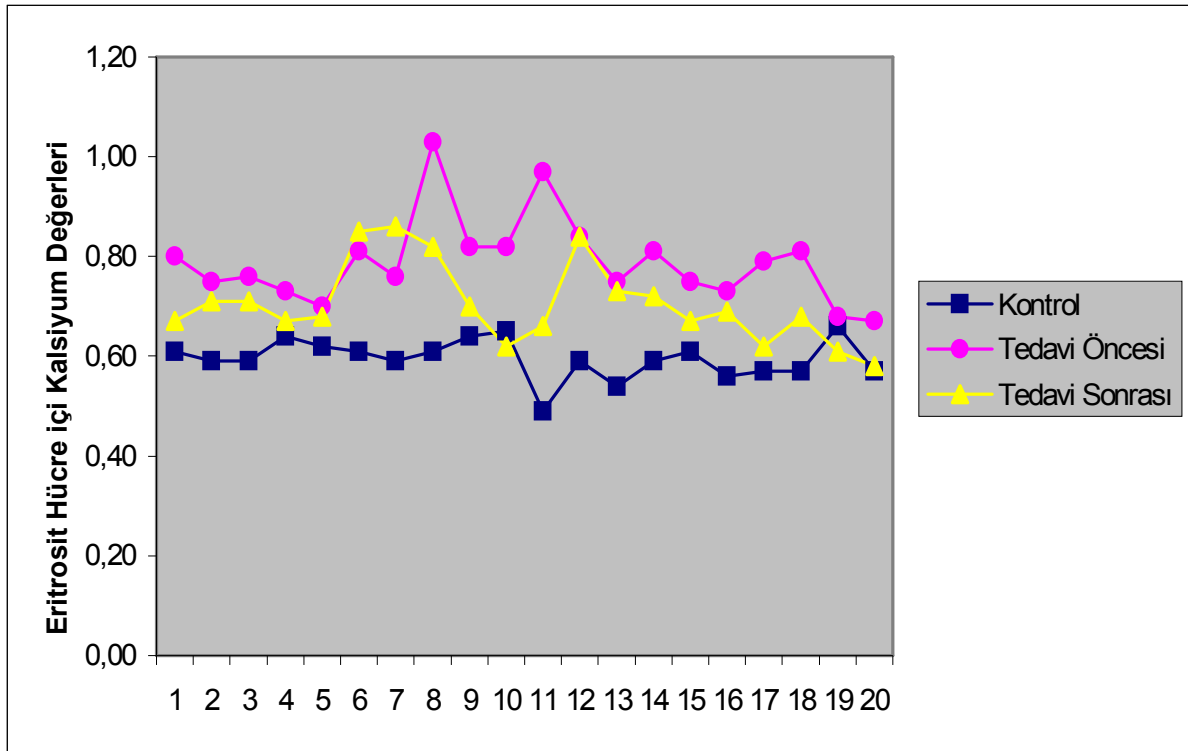
Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası gruptaki eritrosit hücre içi kalsiyum düzeylerinin ortalama $\pm$ SD değerleri ve bu üç gruptaki eritrosit hücre içi kalsiyum oranları değişimi sırasıyla tablo 1 ve şekil 14’de gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu arası karşılaştırma için Student t-test kullanılmıştır ve tedavi öncesi grubun eritrosit hücre içi kalsiyum düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup arası karşılaştırma için Paired t-test kullanılmıştır ve tedavi sonrası grubun eritrosit hücre içi kalsiyum düzeyleri, tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tablo 1: Eritrosit hücre içi kalsiyum değerleri

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	0.5950	0.03980
Tedavi öncesi	20	0.789 ^{***}	0.0870
Tedavi sonrası	20	0.7045 ⁺⁺	0.0806

*** p<0.001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

++ p<0.01 Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında



Şekil 14: Eritrosit hücre içi kalsiyum değerleri

4.2. PLAZMA SERBEST KARNİTİN DÜZEYLERİ

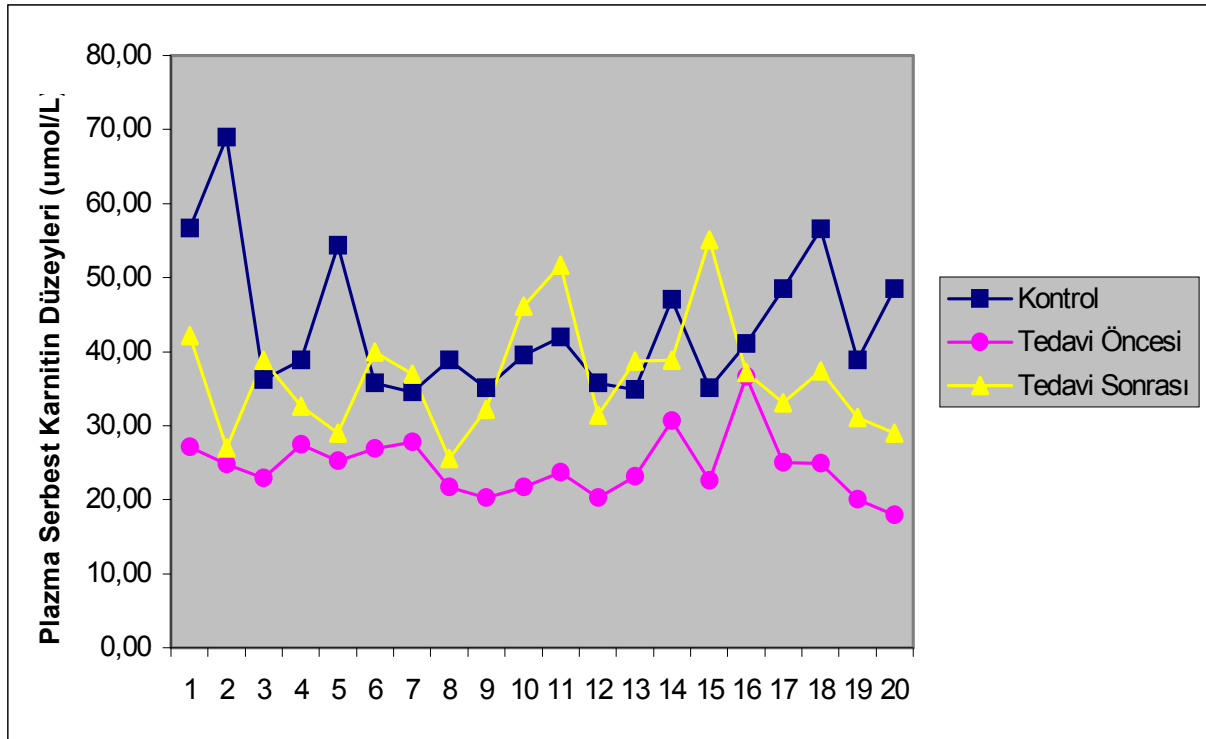
Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası gruptaki plazma serbest karnitin düzeylerinin ortalama $\pm$ SD değerleri ve bu üç gruptaki plazma serbest karnitin düzeylerinin değişimi sırasıyla tablo 2 ve şekil 15’de gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu arasında Student t-test ile yapılan karşılaştırmada, tedavi öncesi grubun plazma serbest karnitin düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup arasında Paired t- test ile yapılan karşılaştırmada, tedavi sonrası grubun plazma serbest karnitin düzeyleri, tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 2: Plazma serbest karnitin düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	43.3345	9.5533
Tedavi öncesi	20	24.5320***	4.2326
Tedavi sonrası	20	36.6940+++	7.7892

*** $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

+++ $p<0.001$ Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında



Şekil 15: Plazma Serbest Karnitin Düzeyleri

4.3. PLAZMA TBARS DÜZEYLERİ

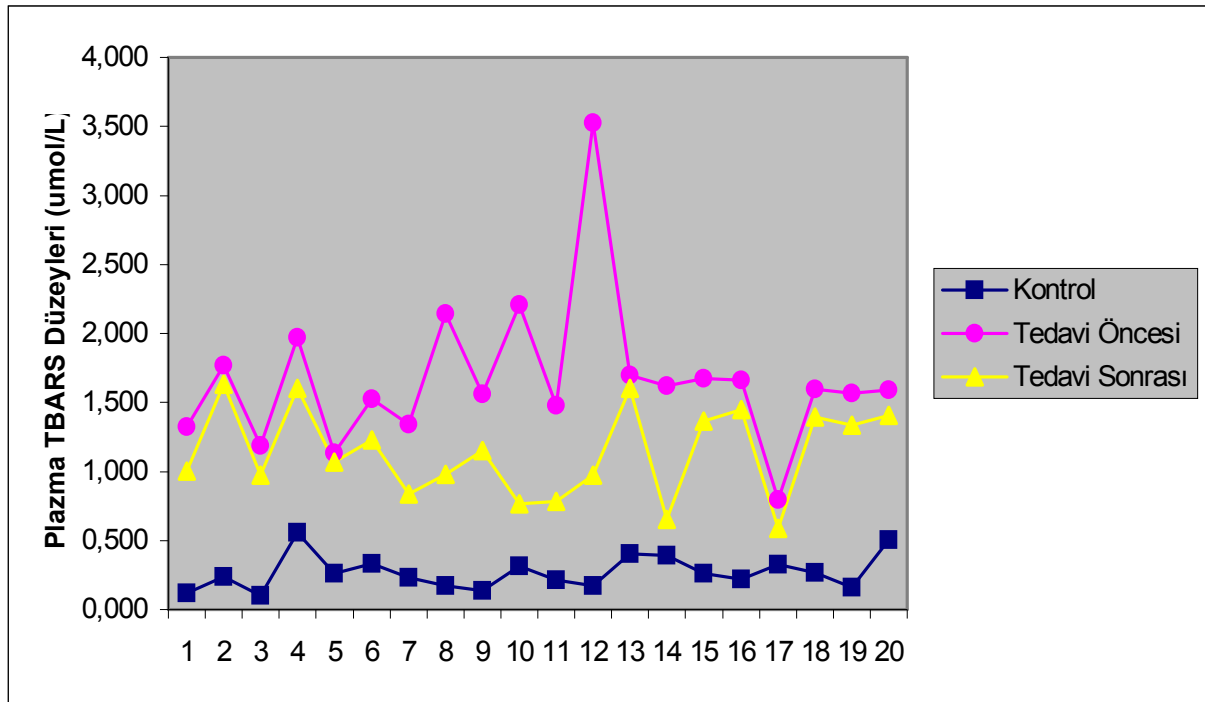
Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası gruplarda plazma TBARS düzeylerinin ortalama $\pm$ SD değerleri ve plazma TBARS düzeylerinin bu üç gruptaki düzeylerinin değişimi sırasıyla tablo 3 ve şekil 16'da gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu arası karşılaştırma için Student t-test kullanıldı ve tedavi öncesi grubun plazma TBARS düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup arası karşılaştırma için Paired t-test kullanıldı ve tedavi sonrası grubun plazma TBARS düzeyleri, tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.01$).

Tablo 3: Plazma TBARS düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	0.2690	0.1240
Tedavi öncesi	20	1.6684 ^{***}	0.5465
Tedavi sonrası	20	1.1399 ⁺⁺	0.3247

*** $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

++ $p<0.01$ Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında



Şekil 16: Plazma TBARS Düzeyleri

4.4. ERİTROSİT TBARS DÜZEYLERİ

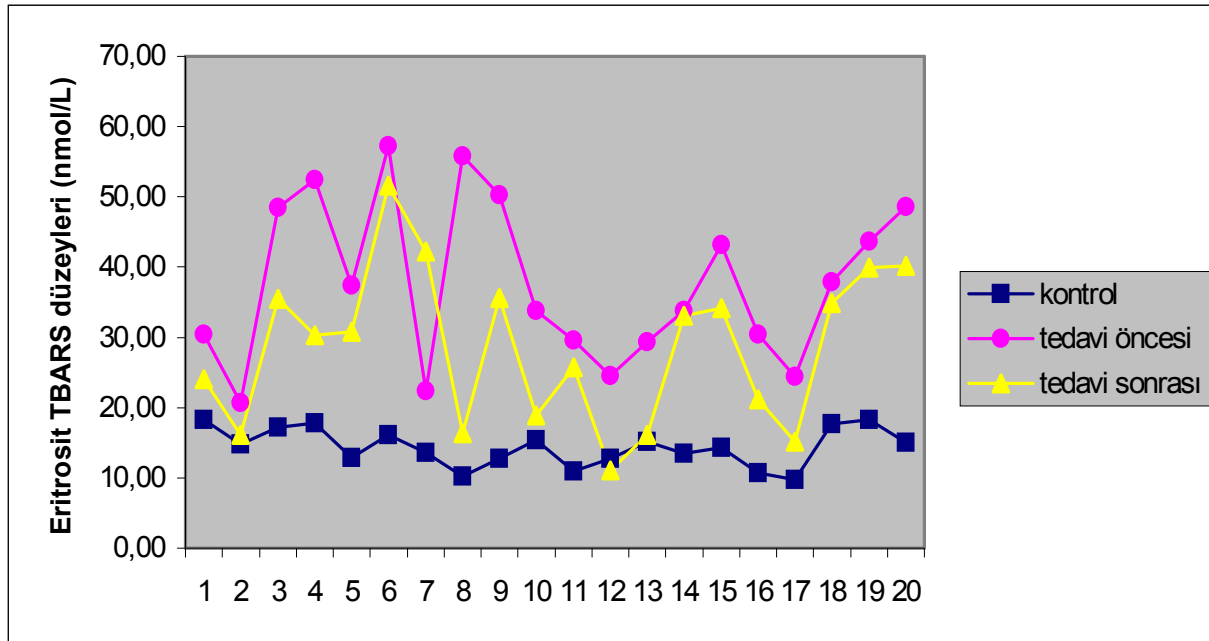
Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası gruplarda eritrosit TBARS düzeylerinin ortalama $\pm$ SD değerleri ve eritrosit TBARS düzeylerinin bu üç gruptaki değişimi sırasıyla tablo 4 ve şekil 17’de gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu arası karşılaştırma için Student t-test kullanıldı ve tedavi öncesi grubun eritrosit TBARS düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup arası karşılaştırma için Paired t-test kullanıldı ve tedavi sonrası grubun eritrosit TBARS düzeyleri, tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.01$).

Tablo 4: Eritrosit TBARS Düzeyleri (nmol/L)

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	14.3645	2.7041
Tedavi öncesi	20	37.7205***	11.5314
Tedavi sonrası	20	28.6455 ⁺⁺	11.0047

*** $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

++ $p<0.01$ Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında



Şekil 17: Eritrosit TBARS Düzeyleri

4.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ

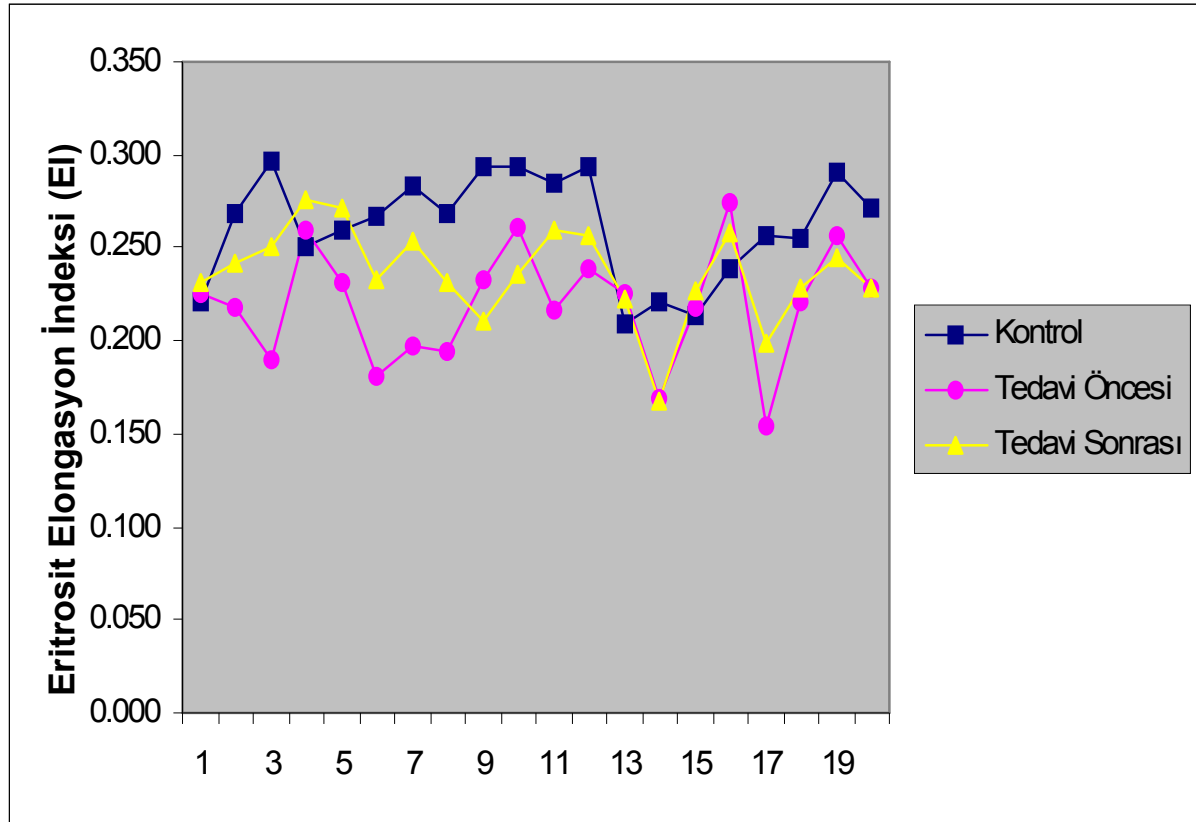
Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası grupların elongasyon indeksleri ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 5 ve şekil 18’de gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu Student t-test ile karşılaştırıldığında, tedavi öncesi grup elongasyon indeksleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup Paired t-test ile karşılaştırıldığında ise tedavi sonrası grubun elongasyon indeksleri, tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 5: Eritrositlerin 1.58 pascal (pa) kayma kuvveti altında ölçülen elongasyon indeksleri

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	0.2621	0.0285
Tedavi öncesi	20	0.2196 ^{***}	0.0316
Tedavi sonrası	20	0.2363 ⁺	0.0252

*** $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

+ $p<0.05$ Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında



Şekil 18: Eritrosit Elongasyon İndeksi

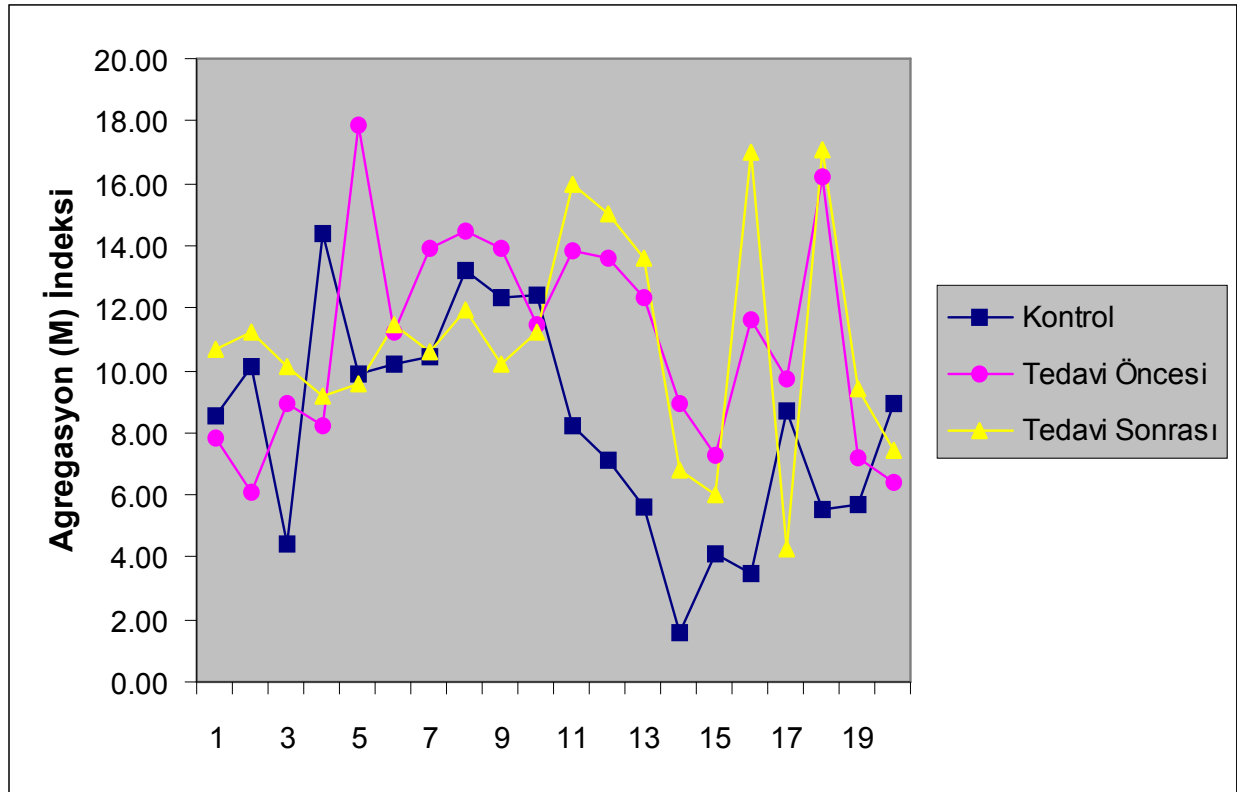
4.6. ERİTROSİT AGREGASYONU

Kontrol grubu, tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarda, otolog plazma içinde ölçülen eritrosit agregasyon (M) indeksleri ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 6 ve şekil 19’da gösterilmiştir. Tedavi öncesi grup ile kontrol grubu Student t-test ile karşılaştırıldığında agregasyon indekslerinin, tedavi öncesi grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup Paired t-test ile karşılaştırıldığında ise agregasyon indekslerinin, tedavi sonrası grupta tedavi öncesi gruba göre düşük olduğu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Tablo 6: Otolog plazma içinde ölçülen eritrosit agregasyon (M) indeksleri

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	8.2350	3.4977
Tedavi öncesi	20	11.045*	3.422
Tedavi sonrası	20	10.940	3.494

* $p<0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



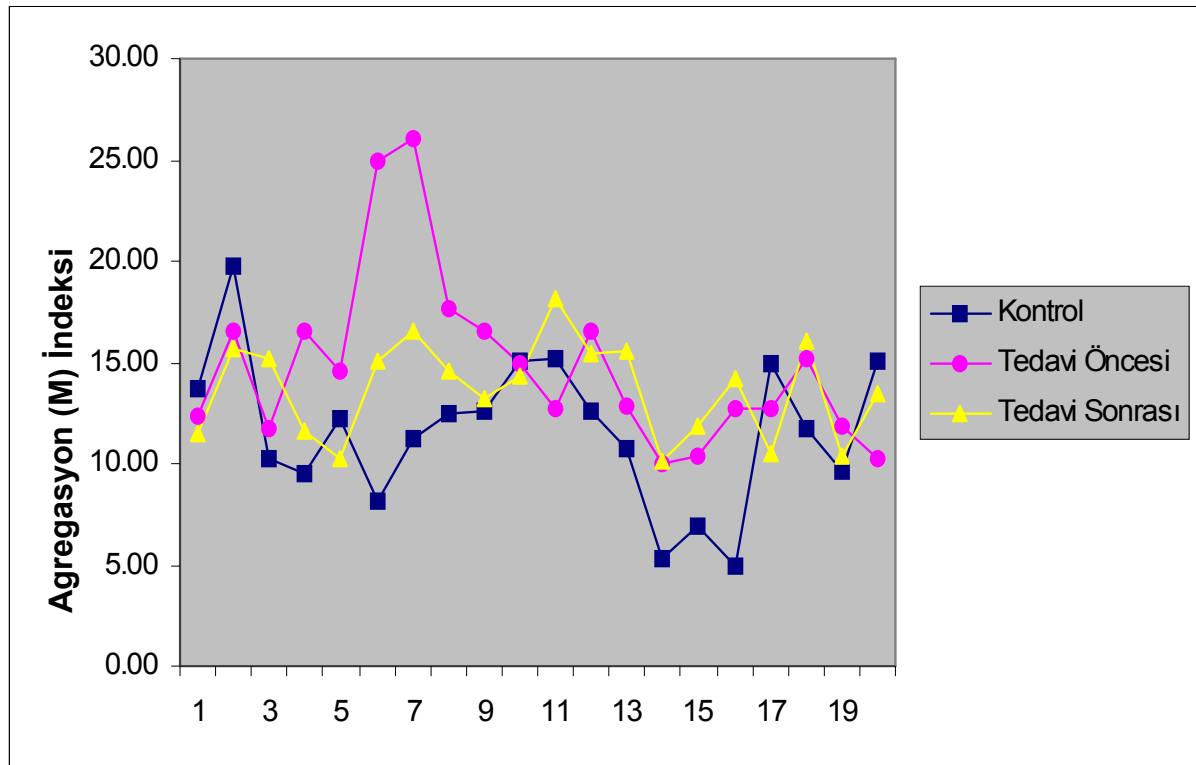
Şekil 19: Otolog Plazma İçinde Eritrosit Agregasyon (M) İndeksi

Eritrosit agregasyon indeksinin; yıkanmış eritrositlerin, standart agregasyon ortamı olarak kullanılan %1'lik dekstran 500 çözeltisi içinde yapılan ölçümlerinde ise tedavi öncesi grup ile kontrol grubu Student t-test ile karşılaştırıldığında, tedavi öncesi grubun eritrosit agregasyon indeksi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup Paired t-test ile karşılaştırıldığında ise tedavi sonrası grupta tedavi öncesi gruba göre agregasyon indeksleri düşük bulundu, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Dekstran 70 içinde ölçülen eritrosit agregasyon (M) indeksi ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 7 ve şekil 20 'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Dekstran 70 içinde ölçülen eritrosit agregasyon (M) indeksleri

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	20	11.605	3.6502
Tedavi öncesi	20	14.86*	4.3148
Tedavi sonrası	20	13.68	2.3799

* $p<0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil 20: Dekstran 70 İçinde Eritrosit Agregasyon (M) İndeksi

4.7. ERİTROSİT TAM KAN PARAMETRELERİ

Kontrol grubu, tedavi öncesi grup ve tedavi sonrası grupların tam kan parametrelerinin ortalama $\pm$ SD değerleri tablo 8’de gösterilmiştir. Eritrosit sayısı (RBC), hematokrit (Htc), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV) için tedavi öncesi grup ile kontrol grubu Student t-test ile karşılaştırıldığında, tedavi öncesi gruptaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Eritrosit genişlik dağılımı (RDW) ise tedavi öncesi grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) için tedavi öncesi grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Tedavi sonrası grup ile tedavi öncesi grup Paired t-test ile karşılaştırıldığında, MCHC dışındaki tam kan parametreleri için anlamlı bir istatistiksel fark bulunamadı ($p>0.05$).

Tablo 8: Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplarda eritrosite ilişkin tam kan parametrelerinin değerleri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Gruplar	n	RBC(M/ul)	Htc (%)	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCHC(g/dL)	RDW (%)
Kontrol	20	4.5800 $\pm$ 0.6269	39.2200 $\pm$ 4.3462	13.0450 $\pm$ 1.3539	85.1250 $\pm$ 5.1263	33.4400 $\pm$ 2.7810	13.4550 $\pm$ 0.9928
Tedavi öncesi	20	3.2260 *** $\pm$ 0.6433	24.175 *** $\pm$ 3.413	8.135 *** $\pm$ 1.054	76.05 *** $\pm$ 7.43	33.69 $\pm$ 1.3905	21.885 *** $\pm$ 9.131
Tedavi sonrası	20	3.1340 $\pm$ 0.6505	23.825 $\pm$ 4.610	7.85 $\pm$ 1.44	76.39 $\pm$ 5.95	33.06 + $\pm$ 1.637	22.170 $\pm$ 8.772

*** $p< 0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

+ $p<0.05$ Tedavi öncesi grup ile karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

β -Talasemi hastalığının patofizyolojisine açıklık kazandırmak amacıyla çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Özellikle β -talaseminin temeli olan ineffektif eritropoez, α -globin zincirlerinin zararlı etkisinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (5). Eşlenmemiş aşırı globin zincirlerinin, membranda birtakım değişikliklere neden olduğu kabul edilmektedir. Bu membran değişiklikleri; fosfolipidlerin oksidasyonu, hücre iskelet proteinlerinin modifikasyonu ve birbiriyle etkileşimleri, membranla bağlantılı ATPaz aktivitelerinin azalması ve katyon permeabilitesinin kolaylaşmasıdır. Bu tür değişiklikler, eritrosit dış yüzeyinin neoantijenlere maruz kalmasına, antikorların ve komplemanların bağlanmasıyla kolaylaşmasına neden olur. Bu değişiklikler de talasemik eritrositlerde deformabilitenin azalmasına ve rijiditenin artmasına katkıda bulunur (77).

Bu çalışma, bir ay süreyle oral yoldan 100mg/kg/gün karnitin tedavisi alan ve son bir aydır kan transfüzyonu almayan β -talasemi hastalarında yapıldı. Hastalarda tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere; eritrosit hücre içi kalsiyumu, plazma serbest karnitin seviyesi, eritrosit ve plazma TBARS seviyeleri ile eritrosit deformabilite ve agregasyonu ölçüldü.

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak, eritrosit ve plazmada TBARS düzeyleri ölçülmüştür. Tedavi öncesi plazma ve eritrosit TBARS düzeylerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Temelde çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan yıkım ürünü MDA'nın talasemi hastalarında yüksek bulunması, eritrosit membran lipidlerindeki peroksidasyonun bir göstergesidir. Talasemik eritrositlerde membran lipid analizinin yapıldığı çalışmalarda; çoklu doymamış yağ asitlerinin düşük yüzdesinin tespiti ve ayrıca fosfolipidlerin total miktarındaki artışa rağmen düşük oranda fosfatidiletanolamin bulunması, artmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (4).

β -Talasemi hastalarında lipid peroksidasyonunu göstermek amacıyla yapılan MDA analizi, TBA ile reaksiyon üzerine kuruludur. TBA, MDA dışında başka maddelerle de reaksiyona girdiğinden reaksiyon sonucu oluşan ürünler TBARS olarak ifade edilmiştir. Ancak MDA, TBA ile reaksiyona giren en önemli bileşiktir. Bu çalışmada β -talasemi hastalarında TBARS düzeylerini ölçmek için basit ve güvenilir bir yöntem olan fluorometrik metod kullanıldı (45).

Talasemik eritrositlerdeki membran yağ asidi dağılımı, lipid peroksidasyonunu değerlendirme açısından önemlidir. Otoksidasyon, normal eritrositlerde sabit olarak oluşan serbest radikallerce oluşturulur ve kararsız hemoglobinlerin varlığında özellikle artış gösterir.

Eritrositlerde bulunan hemoglobin, lipid peroksidasyonunu başlatan güçlü bir katalizördür (61). Yüksek oksijen girişine maruz kalındığında, serbest radikal reaksiyonlarının potent katalizörü olan demir ve çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin eritrositler zorunlu olarak hücre içi ve hücre dışı kaynaklı serbest radikallere maruz kalır. Eritrositlerde oksihemoglobin, süperoksit anyonların üretimiyle eş zamanlı olarak methemoglobine dönüşür (61). Talasemik eritrositlerdeki genel peroksit savunma mekanizmaları aynı oranda artış göstermez. Bu durum talasemik eritrositleri oto-oksidasyona daha duyarlı kılar (4).

Talasemik eritrosit membran lipidlerinin hasara uğradığını gösteren bir çalışmada Giardini ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Giardini ve arkadaşları, total fosfolipid, kolesterol ve özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin serum seviyelerinde önemli bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Talasemi hastalarında kan transfüzyonuna bağlı hepatik hasar tespit edildiğinden, bu sonuçların karaciğerde azalan sentezden kaynaklandığını düşünebiliriz. Ancak, olgun eritrositlerin de nova fosfolipid sentezini gerçekleştiremeyeceği, ve hasarlı fosfolipid içeriğinin tamir edilme mekanizmalarından birisinin plazma ile değişme olduğu da bilinmektedir. Talasemik hastalardaki düşük plazma fosfolipid seviyeleri, artmış lipid peroksidasyonunun dolaylı bir göstergesidir (13).

Talasemik eritrositlerin membran fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla eritrosit kalsiyum içeriği bazı çalışmalarda incelenmiş; eritrosit hücre içi kalsiyumunun artış gösterdiği ve Ca^{2+} -ATPaz'ın azaldığı bildirilmiştir (41). Eritrosit hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde, Ca^{2+} -ATPaz önemli bir kontrol mekanizmasıdır. Ca^{2+} -ATPaz, kalsiyumun hücre içinden hücre dışına aktif olarak çıkışını sağlar.

Bizim çalışma grubumuzu oluşturan β -talasemi hastalarında, eritrosit hücre içi kalsiyumu ölçüldüğünde, tedavi öncesi gruptaki değerlerin kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ($p<0.001$).

Bu hastalarda eritrosit hücre içi kalsiyum artışı muhtemelen şu nedenlere bağlı olabilir:

- 1- β -Talasemik eritrositlerdeki endositotik vakuollerde kalsiyumun tutulması veya α -globin agregatlarına bağlı olması nedeniyle, kalsiyumun Ca^{2+} -ATPazın ulaşamayacağı bölgelerde birikmesi.
- 2- Talasemik eritrositlerde hücre içinde oluşan agregatlar, Ca^{2+} -ATPaz bölgelerine kalmodulinin ulaşmasını engelleyerek hücreden kalsiyum çıkışını azaltabilir.
- 3- Süperoksit anyon radikali, Ca^{2+} -ATPaz üzerine inhibe edici bir etki gösterir. Aktifleştirilmiş oksijenin Ca^{2+} -ATPazı inhibe etme mekanizmalarından birisi, disülfid bağlarının oluşumudur (29). Ca^{2+} -ATPazın membranda lipidlere yakın bir

konumda olması ve serbest tiyol grupları içermesi nedeniyle, serbest oksijen radikalleri için bir hedef oluşturur.

- 4- Talasemik eritrosit membranında önemli bir defekt olması da hücre içine kalsiyum girişini arttırır.

Eritrosit deformabilitesi ya da stres uygulandığında hücrenin şeklini değiştirebilme kapasitesi eritrosit fonksiyonları açısından önemlidir. Mikrodolaşımdaki damarların çapı, eritrositlerin çapından daha küçük olduğu için, dolaşım sırasında hücrelerin şekil değiştirmesi gerekir. Eritrosit deformabilitesinin azalması, eritrosit ömrünün kısalmasında önemli bir rol oynar (78).

Eritrositlerin reolojik özellikleri detaylı olarak tanımlanmışsa da bu hücrelerin erken yıkımına neden olan biyokimyasal mekanizmalar daha az bilinmektedir. Membran yapısındaki değişikliklerle ilgili bazı olası mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlar membran proteinlerinin çapraz bağlanması, oksidatif hasar, sitoplazmik proteinlerin bağlanması ve hücre içi iyon dağılımının değişmesi şeklindedir. Hb-membran etkileşimleri de deformabiliteyi etkiler (3). Kalsiyum; katyon geçirgenliği, lipid içeriği ve hücre şeklini belirleyen hücre iskeletiyle ilgili pekçok membran fonksiyonu üzerine etki gösterir.

Hücre içi kalsiyumundaki bir artış, potasyum kanalını aktive eder ve hücre dışına potasyum çıkışı artar. Bunun sonucunda eritrositler dehidrate olur (2). Bu hastalarda membranın oksidatif hasarı da membran geçirgenliğinin değişmesine neden olabilir (79,80).

Talasemi hastalarında deformabilitenin azalma nedenlerinden birisi de hücre içi kalsiyum artışı sonucunda hücrede potasyum ve su kaybının gelişmesidir. Bunun sonucunda sitoplazmik viskozite artışı olur. Bu durum Gardos fenomeni olarak bilinir (51). Bu hastalardaki fazla α -globin zincirlerinin membran iskeletiyle birleşmesi sonucu oluşan membran hasarı da, membranın mekanik stabilitesinde önemli değişiklikler yaratarak deformabilitenin azalmasına neden olur. Eritrosit membran proteinlerinin, lipid peroksidasyon ürünleri tarafından çapraz bağ yaparak hasara uğraması sonucu, membran stabilitesi ve deformabilite azalır (81,82).

L-karnitin tedavisi verilmeden önce β -talasemi hastalarından alınan kan örneklerinde eritrosit deformabilitesini ölçtüğümüzde; tedavi öncesi hastalardaki elongasyon indeksinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu bulduk ($p<0.001$).

Eritrosit agregasyonun da ölçüldüğü bu çalışmada; agregasyon indeksinin, tedavi öncesi hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu. Tedavi öncesi hastalardaki agregasyon artışı, hem otolog plazma hem de dekstran 70 içinde yapılan ölçümlerde tespit edildi. Talasemi hastalarındaki agregabilite artışı muhtemelen bu

hastaların eritrosit membranlarında daha düşük miktarda sialik asit bulunmasına ve buna bağlı yüzey yükünün azalmasına, membranın daha rijit olmasına ve anormal şekillerinin olmasına bağlanabilir (28).

β -Talasemi hastalarında, 3-hidroksi-4-trimetilaminobütirik asit yapısında olan L-karnitin plazma serbest düzeylerini ölçtüğümüzde ise; tedavi öncesindeki değerlerin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu bulduk ($p<0.001$).

Talasemik hastalarda plazma serbest karnitin seviyesini, kontrol grubu değerlerine göre düşük bulmamızın muhtemel nedenleri ise:

- 1- Karnitin seviyesindeki azalma yetersiz diyet alımına bağlı olmayıp, bu hastalardaki artmış oksidatif strese yanıt olarak tüketimin artmasına bağlı olabilir.
- 2- Talasemik hastalarda gelişen hepatik hasara bağlı olarak endojen karnitin sentezinde olası bir yetersizlik olabilir.

Hastalara 1 ay süreyle oral yoldan 100 mg/kg/gün dozunda L-karnitin tedavisi verildi. Bu tedavi süresince hastalara kan transfüzyonu yapılmadı. Tedavi bitiminde hastalardan alınan kan örneklerinde, tedavi öncesi ölçümü yapılan parametrelerin tümü yeniden ölçülerek L-karnitin tedavisinin sonuçları değerlendirildi.

Tedavi sonunda eritrosit ve plazma TBARS düzeyleriyle eritrosit hücre içi kalsiyum düzeylerinin tedavi öncesine göre anlamlı olarak azaldığı bulundu. Deformabilitenin ise tedavi sonunda anlamlı olarak arttığı bulundu.

Çalışmanın sonunda eritrosit agregabilitesinin L-karnitin tedavisiyle azaldığı, ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$). Eritrosit agregasyonu hem plazma hem de eritrositlerin çeşitli özelliklerindeki değişimlerden etkilenir. Plazmadaki fibrinojen ve makroglobulin konsantrasyon artışları agregasyonun da artmasına neden olur. Agregasyonu etkileyen hücrel faktörler ise membran yüzey yükü, hücre şekli, hücre yaşı ve deformabilite gibi özelliklerdir. Meiselman ve arkadaşları eritrosit agregabilitesinde hücrel özelliklerin daha fazla önemli olduğunu belirtmişlerdir (55).

Eritrosit agregasyonunu açıklamak için iki model ortaya konulmuştur:

- 1- Köprüleme modeli: Bitişik (adsorbe) hücre yüzeylerinde bulunan makromoleküllere dayalı köprüleme güçlerinin, elektrostatik itim, membran gerilmesi ve mekanik kesime bağlı olarak ortaya çıkan disagregasyon güçlerine üstün geldiği model. Artan adsorbsiyon daha büyük eritrosit agregasyonuna yol açar. Böylece bu model, yüksek oranda agregate olan hücrelerin, daha az oranda agregate olan hücrelere oranla daha fazla protein veya polimer adsorbe edebileceğini öne sürmektedir.

2- Yoksunluk modeli: Eritrosit yüzey konsantrasyonunun daha düşük olduğu ve ozmotik bir gradientin hücre agregasyonuna yol açtığı yoksunluk modelinde tersi durum öne sürülür. Yüksek oranda agregre olan hücrelerin, daha az oranda agregre olanlardan daha az protein veya polimer adsorbe etmesi gerektiği belirtilmiştir (55).

Son zamanlarda yapılan eritrosit elektroforez çalışmalarının yoksunluk modelini desteklediği bildirilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda karnitin ve türevlerinin serbest radikal hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu, ancak O_2^- radikalini temizlemeyen bir madde olduğu bildirilmiştir. Karnitin ve türevlerinin Ca^{2+} -ATPaz molekülünün -SH gruplarını serbest radikal hasarına karşı koruduğu rapor edilmiştir. Yine bu ajanların membran içine inkorpore olduğu ve protein ve/veya fosfolipid kısımlara bağlanmak suretiyle membran stabilizasyonuna yol açtığı da öne sürülmüştür (24).

TBARS düzeylerinin tedavi sonunda azalması; karnitinin eritrosit membranı ve dolaşımdaki lipoproteinleri peroksidasyondan koruduğunu, ayrıca serbest radikaller tarafından hasarlanmış hücre membranını stabilize ettiğini gösterir.

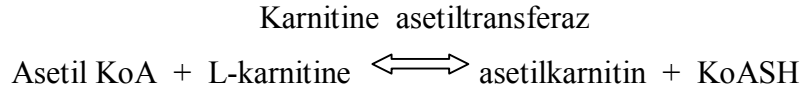
Bazı araştırmacılar karnitin ve türevlerinin demire bağlandığını ve hidroksil radikalının üretiminde aktif olmayan kompleksler oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (30). Bu hipotez talasemi gibi demir yüklenmesinin olduğu bir patolojide, karnitinin demire bağlanarak oluşturduğu antioksidan etki açısından önem kazanmıştır.

Çalışmanın sonunda, L-karnitinin eritrosit deformabilitesini arttırdığı bulundu. Karnitinin deformabilite üzerine olan bu etkisi, hücre içi kalsiyum iyonunun, Ca^{2+} -ATPaz aktivasyonuna bağlı azalışından kaynaklanabilir. Bu konuda yapılan çok az sayıdaki çalışmaya göre hücre içi kalsiyum artışı membran iç yüzüne bağlı olan spektrin-aktin ağının konfigürasyonunu değiştirerek membran sertleşmesine neden olmakta ve eritrosit membran rijiditesini arttırmaktadır (83). Karnitin hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak membrandaki bu rijidite artışını engelliyor olabilir.

Hücre içi kalsiyum artışı ile deformabilite arasındaki ilişkiyi açıklayan bir çalışmada ise; deformabilitenin hücre içi sinyal ileti sisteminin iki temel yolağı ile düzenlendiği, bunların Ca^{2+} -bağımlı ve cAMP bağımlı yollar olduğu bildirilmiştir. Bunların kinazları ve fosfatazları uyararak membran iskeletindeki anahtar proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyonu ile eritrosit deformabilitesini düzenlediği bildirilmiştir (84).

Plazma serbest karnitin düzeylerinin tayininde ; daha önceki metodların modifikasyonuna dayanan ve güvenilir bir metod olan radioenzimatik bir yöntem kullanıldı.

Bu yöntemin temel prensibini oluşturan reaksiyon şu şekildedir:



Radioenzimatik yöntemle karnitin ölçümünde 3 temel hata kaynağı mevcut idi:

1-Biyolojik örneklerde asetil karnitinin bulunması reaksiyonun sola doğru ilerlemesine neden olur.

Reaksiyon karışımına eklenen asetil KoA miktarı artırılarak ya da KoASH üretimi için biyokimyasal tuzak kullanılarak reaksiyonun sağa doğru işlemesi sağlanır. Bu çalışmada kimyasal tuzak olarak N-etilmaleimid (NEM) kullanıldı. Böylece reaksiyonun sağa doğru tamamlandığından emin olundu. NEM kullanmamızın diğer KoASH tuzağı olan kimyasallara (sodyum tetratyonat, ditiyonitro benzoik asit, okside glutatyon gibi) göre bazı avantajları vardır:

NEM; KoASH ürününü hızla uzaklaştırırken, karnitin asetil transferaz enzim aktivitesini inhibe etmez. Ayrıca asetil karnitin/ serbest karnitin oranı 90:1 kadar büyük olduğunda bile, serbest karnitin kesin tespitini sağlar.

2- Biyolojik örneklerde asetil karnitin bulunmasına bağlı olarak karnitin ölçümünde karşılaşılabileceğimiz ikinci bir hata kaynağı ise; asetil karnitin havuzunda [1-¹⁴C]asetilkoenzim A dan [1-¹⁴C]asetil değişimi olurken, mevcut olan serbest karnitin miktarının olduğundan daha fazla tayin edilmesidir. Bu durum ortama eklenen [1-¹⁴C]asetilkoenzim A miktarının artırılması ile önlenmeye çalışılır (68).

3- Karnitin ölçümünde karşılaşılabileceğimiz üçüncü bir hata kaynağı ise tris, fosfat tamponu gibi bazı tamponların interferansa neden olmasıdır. Karnitin asetil transferaz enzimi tarafından, bu tamponlar asetile edilebilir. Ayrıca tris tamponu, işaretlenmiş asetil KoA'nın Dowex kolonuna bağlanmasını da önlediği için değerlerin yüksek çıkmasına neden olur. Heps tamponu bu reaksiyon ortamında asetile olmadığı için en uygun tampon olarak kabul edilebilir.

Literatürde L-karnitin tedavisinin talasemi hastalarında hematolojik parametrelere etkileri üzerine iki çalışma bulunmuştur. Ancak bu hastalarda plazma karnitin seviyeleri ölçülmemiştir. Bu iki çalışmada karnitinin Hb F üzerine stimülatör bir etki gösterdiği ve transfüzyon aralıklarının uzadığı belirtilmiştir (85,86).

β-Talasemi hastalarında artan oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonunu, plazma ve eritrosit MDA düzeylerini ölçerek gösterdik. Eritrosit membranı ile ilgili fonksiyonları düzenlemede önemli role sahip hücre içi kalsiyum düzeylerini de ölçerek azalmış deformabiliteyi ve artmış agregabiliteyi açıklamaya çalıştık. Membran rijiditesindeki

artış ve buna bağlı olarak şekil değiştirme yeteneğinin azalmasında bir olası mekanizma da, eritrosit membran iskeletini oluşturan proteinler arasında peroksidasyona bağlı gelişen çapraz bağlanmadır.

Çalışmanın sonunda L-karnitin tedavisinin eritrositler üzerine oksidatif hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği tespit edildi. Ayrıca hücre içi kalsiyumunu azalttığı ve deformabiliteyi arttırdığı bulundu. Bu sonuca göre karnitinin eritrosit membran stabilizasyonunu sağlamada önemli bir role sahip olduğunu kabul edebiliriz.

Bu çalışmada L-karnitinin önemli etkilerinin ortaya konması yanında; bu ajanın kolay kullanılabilmesi, önemli bir yan etkisinin görülmemesi, endojen olarak sentezlenebilmesi ve maliyetinin düşük olması gibi özellikler de talasemi tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına neden olacaktır. Kuşkusuz talasemi hastalarındaki fizyopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri tam olarak açıklayabilmek için karnitin ve türevleriyle yapılacak daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak Hb'in oto-oksidasyonu ile birlikte gerçekleşen, süperoksit anyonunun tetiklediği sıralı oksidatif reaksiyonların eritrositlerin oksidatif hasarında anahtar rolü oynadığını söyleyebiliriz. Ayrıca talasemik eritrositlerin membran lipidleri ve proteinleri, artmış oksidatif stres tarafından hasara uğramaktadır. β -Talasemide fazla α -globin zincirlerinin daha kararsız olması ve monomerlerine daha çabuk ayrışması, α -globin zincirlerinin daha fazla oksijen radikali üretmesine neden olur.

β -Talasemi hastaları üzerinde yaptığımız bu çalışmada; artmış oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyonunun arttığını, muhtemelen Ca^{2+} -ATPaz molekülünün aktivite azalışına bağlı olarak hücre içi kalsiyumunun arttığını, deformabilitenin azaldığını ve agregasyonun arttığını tespit ettik. Hastaların tedavisinde antioksidan etkisi olduğu ileri sürülen L-karnitini kullandığımızda ise; lipid peroksidasyon ürünü MDA'nın ve hücre içi kalsiyumun azaldığı, deformabilitenin ve plazma serbest karnitin düzeyinin arttığı ve ayrıca agregasyonun ise anlamlı olarak değişmediği tespit edildi.

Talasemilerin tedavisiyle ilgili çalışmaların çoğu, hastalığın prenatal tanı ile önlenmesine ya da genetik defektin gen tedavisi ile düzeltilmesine yöneltilmişse de, talasemik eritrositlerde oksidatif hemoglobin denatürasyon hızının azaltılması veya önlenmesiyle yarar sağlayabilecek bir çok hasta vardır. Bugüne kadar bu anlamda uygulanan tek tedavi E vitamininin yüksek dozda kullanılmasıdır. Çünkü E vitamininin, talasemi hastalarının serumunda çok düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ancak E vitamini büyük olasılıkla

membran lipidlerindeki peroksidatif hasarı düzeltirken, membranın diğer komponentlerinde bu etkiyi göstermemektedir (13).

L-Karnitinin demire bağlanarak aktif olmayan kompleksler oluşturup Fenton reaksiyonunu engellemesi, Ca^{2+} -ATPaz molekülünün –SH gruplarını oksidasyondan koruması ve eritrosit membranının protein ve/veya fosfolipid kısımlarına bağlanarak membranı stabilize etmesi, talasemi tedavisindeki önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada L-karnitin tedavisiyle, eritrosit ve plazmada TBARS düzeylerinin azalması, eritrosit hücre içi kalsiyum düzeylerinin azalması, eritrosit deformabilitesinin artması ve agregasyonun değişmemesi şeklinde elde ettiğimiz sonuçların, L-karnitin ve türevleriyle yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar açısından önemli olduğu inancındayız.

6. ÖZET

Hemoglobinin α veya β zincir sentezindeki bozukluktan kaynaklanan talasemi hastalığı oldukça yaygın görülen bir hemoglobinopatidir. Bozukluk zincirin yapısından değil, yetersiz sentez edimesinden kaynaklanır. Eşlenmemiş aşırı globin zincirleri membranda önemli bazı değişikliklere neden olur. Yine talasemi hastalarının eritrositleri, normal hücrelere göre oto-oksidasyona daha duyarlıdır.

β -Talasemi hastalarına, düşük Hb değerlerini yükseltmek amacıyla sık sık kan transfüzyonu yapılmaktadır. Transfüzyona bağlı demir toksisitesini engellemek için hastalara şelasyon tedavisi de uygulanmaktadır. Uygulanması zor ve pahalı olan transfüzyon - şelasyon tedavisinin ciddi yan etkileri vardır.

Bir ay süreyle kan transfüzyonu almayan β - talasemi hastalarına 100 mg/kg/gün dozunda oral yoldan L-karnitin tedavisi uygulandı. Hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinde eritrosit hücre içi kalsiyumu, plazma serbest karnitin düzeyi, eritrosit ve plazma TBARS düzeyi, eritrosit deformabilitesi ve ayrıca eritrosit agregasyonu çalışıldı.

Çalışmamızın sonunda L-karnitin tedavisinin talasemi hastaları üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edildi. Tedavi öncesi hastaların eritrosit hücre içi kalsiyumu, eritrosit ve plazma TBARS düzeyleriyle eritrosit agregasyonu, kontrol grubu değerlerine göre daha yüksek bulundu. Plazma serbest karnitin düzeyleri ve deformabilite ise kontrollerden düşük bulundu.

Aynı hastalara bir ay süreyle L-karnitin tedavisi uygulandı. Tedaviden sonra ise; lipid peroksidasyonunun göstergesi olan TBARS düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, deformabilitenin arttığı, hücre içi kalsiyum değerlerinin düştüğü, agregasyonun ise anlamlı olarak değişmediği bulundu.

Sonuçlarımız; oksidan stresin arttığı β -talasemi hastalarında L-karnitin, antioksidan bir ajan olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. 3- β -hidroksi-4-trimetilaminobütirik asit yapısında olan L-karnitin, artmış hücre içi kalsiyumu azaltarak membran rijiditesini azaltır. Demir ile kompleks oluşturup Fenton reaksiyonunu inhibe eder ve oksidatif strese bağlı hasarı azaltır. Böylece eritrosit membran stabilizasyonunu sağlar ve eritrosit deformabilitesini artırır. Yaptığımız bu çalışma; L-karnitin, eritrositleri serbest oksijen radikal hasarına karşı koruyan önemli bir ajan olduğunu göstermektedir.

7. SUMMARY

Thalassemia, which results from defects in synthesis of α or β chain of hemoglobin, is a common hemoglobinopathical disorder. The defect occurs as a consequence of inadequate chain synthesis, rather than of a structural error. Unpaired excess globin chains cause some alterations in the membrane. The erythrocytes of thalassemic patients are more sensitive to auto-oxidation than normal cells.

Patients with β -thalassemia major receive frequent blood transfusions in order for their low Hb levels to be increased. Such patients also receive chelation therapy for prevention of transfusion-mediated iron toxicity. The transfusion-chelation therapy, which is quite difficult to apply, cause severe side effects.

β -Thalassemia patients who were not exposed to blood transfusion for one month received 100mg/kg/day oral L-carnitine therapy. Intracellular erythrocyte calcium, plasma free carnitine level, erythrocyte and plasma TBARS levels, erythrocyte deformability and also erythrocyte aggregation were investigated in blood samples from patients, obtained before and after the therapy. Plasma free carnitine levels and deformability were found to be low compared to those of the control subjects.

The same patients received L-carnitine therapy for a month. TBARS levels, which are indications of lipid peroxidation, were found to be decreased after the therapy, while deformability increased and intracellular calcium levels decreased, yet no significant change was detected in aggregation.

Our results support that L-carnitine is suitable to be used as an antioxidant agent in β -thalassemia patients, who have increased oxidant levels. L-carnitine, with a structure of 3- β -hydroxy-4-trimethylaminobutyric acid, increases membrane rigidity by reducing the increased intracellular calcium level. It inhibits the Fenton reaction by forming a complex with iron and reduces the damage resulting from oxidative stress. It thereby provides erythrocyte membrane stabilization and increases erythrocyte deformability. Our study indicates that L-carnitine is an important agent protecting erythrocytes against damage caused by free oxygen radicals.

8. KAYNAKLAR

1. Wiley JS, Mc Culloch KE. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmacol Ther* 1982; 18(2): 271-92.
2. Engelman B. Calcium homeostasis of human erythrocytes and its pathophysiological implications. *Klin Wochenenschr* 1991 Feb 26; 69(4): 137-42.
3. Friederichs E, Meiselman HJ. Effects of calcium permeabilization on RBC rheological behaviour. *Biorheology* 1994 Mar-Apr; 31(2): 207-15.
4. Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB. Lipid Membrane Peroxidation in β -Thalassemia Major. *Blood* 1976 March; Vol. 47: 495-505.
5. Nancy F, Olivieri MD. The β -Thalassemias. *The New England Journal of Medicine*, 1999 Vol. 341, No 2: 99-109.
6. Rietti F. Ittero emolitico primitivo. *Atti Accad Sci Med Nat Ferrara* 1925; 2: 14-9.
7. Heywood JD, Karon M, et al. Amino acid incorporation into alpha-and beta-chains of hemoglobin by normal and thalassemic reticulocytes. *Science* 1964; 146:530.
8. Oski FA, Nathan DG. *Hematology of Infancy and Childhood*. Fourth Edition. Chapter 22: The Thalassemias: 738-879. Philadelphia, Pennsylvania, 1993.
9. Poliack A, Yataganas P, et al. An electron-microscopic study of the nuclear abnormalities and erythroblasts in beta-thalassemia major. *Br J Haematol* 1974; 26: 203.
10. Schrier SL. Pathobiology of thalassemic erythrocytes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 75-8.
11. Sorensen S, Rubin E, Polster H, Mohandas N, Schrier S. The Role of Membrane Skeletal-Associated α -Globin in the Pathophysiology of β -Thalassemia. *Blood* 1990; Vol. 75, No. 6: 1333-1336.
12. Shalev O, Repka T, Goldfarb A, et al. Deferiprone (L_1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle RBC both in vitro and in vivo. *Blood* 1995; 86: 2008-13.
13. Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative Denaturation of Red Blood Cells in Thalassemia. *Seminars in Hematology*. 1990; Vol. 27, No. 1: 70-82.
14. Livrea MA, Tesoriere L, Pintavdi AM, Calabrese A, Maggio A, Friesleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative Stress and Antioxidant Status in β -Thalassemia Major: Iron Overload and Depletion of Lipid-Soluble Antioxidants. *Blood* 1996; Vol. 88, No. 9: 3608-3614.

15. Haeckel R, Kaiser E, Oellerich M, Siliprandi N. Carnitine: Metabolism, Function and Clinical Application. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; Vol. 28, No. 5: 291-295.
16. De Simone C, Famularo G. Carnitine Today. Springer-Verlag, 1997.
17. Tanphaichitr V, Leelahagul P. Carnitine Metabolism and Human Carnitine Deficiency. *Nutrition* 1993; Vol. 9, No. 3: 246-254.
18. Cederblad G, Finnstrom O, Martensson J. Urinary Excretion of Carnitine and Its Derivatives in Newborns. *Biochemical Medicine* 1982; 27: 260-265.
19. Rebouche CJ, Paulson DJ. Carnitine metabolism and function in humans. *Annu Rev Nutr* 1986; 6: 41.
20. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1147-52.
21. Bremer J. The Role of Carnitine in Intracellular Metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; Vol. 28, No. 5: 297-301.
22. Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G. L-Carnitine and its role in medicine: From function to therapy. Academic Press, 1992.
23. Carter L, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 1995; 10: 253-257.
24. Suzuki YJ, Packer L, Ford GD. Relationships Between the Effects of Superoxide Anion and Palmitoyl-L-carnitine on the Ca^{2+} -ATPase of Vascular Smooth Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 823-827.
25. Park JL, Luchess BR. Mechanisms of Myocardial Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1905-12.
26. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International* 1999; 49: 91-102.
27. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion Injury After Intestinal Ischemia. *Critical Care Medicine* 1993; Vol. 21, no. 9: 1376-86.
28. Di Giacomo C, Latteri F, Fichera C, Sorrenti V, Campisi A, Castorina C, Russo A, Pinturo R, Vanella A. Effect of Acetyl-L-Carnitine on Lipid Peroxidation and Xanthine Oxidase Activity in Rat Skeletal Muscle. *Neurochemical Research* 1993; Vol. 18, No. 11: 1157-1162.
29. Hebbel RP, Shalev O, Foker W, Rank BH. Inhibition of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by activated oxygen through thiol-and lipid-dependent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 862: 8-16.

30. Ronca G, Ronca F, Yu G, Zucchi R, Bertelli A. Protection of isolated perfused working rat heart from oxidative stress by exogenous L-propionyl carnitine. *Drugs Exptl Clin Res* 1992; XVIII (11/12): 475-480.
31. Bertelli A, Conte A, Ronca G. L-Propionyl carnitine protects erythrocytes and low density lipoproteins against peroxidation. *Drugs Exptl Clin Res* 1994; xx (5): 191-197.
32. Goodman and Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1991; 1545-1547.
33. Deufel T. Determination of L-carnitine in biological fluids and tissues. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 307-311.
34. Bieber LL, Kerner J. Short-chain acylcarnitines: Identification and quantitation. *Methods in Enzymology* 1986; 123: 264-284.
35. Carafoli E. Intracellular Calcium Homeostasis. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 395-433.
36. Murrey RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. Twenty-third Edition. Chapter 44: Hormone Activation: 486-498. Appleton, Lange, Stamford, Connecticut, 1993.
37. Scharff O, Foder B. Regulation of Cytosolic Calcium in Blood Cells. *Physiological Reviews* 1993; Vol. 73, No. 3: 547-570.
38. Wright LC, Chen S, Roufogalis BD. Regulation of the Activity and Phosphorylation of the Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase by Protein Kinase C in Intact Human Erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; Vol. 306, No. 1: 277-284.
39. Hayachi N, Tsujii M, Itah T, Sakura H, Tsuji S, Tanimura H, Ogiwara T, Yashihara H, Kawano S, Sato N, Kamado T. Changes in the Intracellular Calcium Ion Concentration in the Gastric Mucosa in a Rat Ischemia-Reperfusion Model. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24(suppl 162): 43-46.
40. Schrier SL, Johnson M, Jung I, Krueger J. Calcium Distribution Within Human Erythrocytes. *Blood* 1980; Vol. 56, No. 4: 667-676.
41. Shalev O, Mogilner S, Shinar E, Rachmilewitz EA, Schrier SL. Impaired Erythrocyte Calcium Homeostasis in β -Thalassemia. *Blood* 1984; Vol. 64, No. 2: 564-566.
42. David-Dufilho M, Montenay-Garestier T, Devynck MA. Fluorescence measurements of free Ca^{2+} concentration in human erythrocytes using the Ca^{2+} -indicator fura-2. *Cell Calcium* 1988; 9: 167-179.
43. Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987; 248: 313-328.

44. Ohya T. Reactivity of Alkanals towards Malondialdehyde (MDA) and the Effect of Alkanals on MDA Determination with a Thiobarbituric Acid Test. *Biol Pharm Bull* 1993, 16 (11): 1078-1082.
45. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin Chem* 1993; 39/12: 2522-2526.
46. Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, Foerster RJ, Athens JW, Lukens JN. The mature erythrocyte; In *Clinical Hematology*, Philadelphia: Lea-Febigen; 75-107, 1981.
47. Mohandas N, Chasiss JA, Shohet SB. The Influence of Membrane Skeleton on Red Cell Deformability, Membrane Material Properties, and Shape. *Seminars in Hematology* 1983; Vol. 20, No. 3: 225-242.
48. Dondorp AM, Chotivanich KT, Fucharoen S, Silamut K, Vreeken J, Kager PA. Red cell deformability, splenic function and anaemia in Thalassemia. *British Journal of Haematology* 1999; 105: 505-508.
49. Scott MD, Lubin H, Beuzard Y. α -and β -haemoglobin chain induced changes in normal erythrocyte deformability: comparison to β Thalassemia intermedia and HbH disease. *British Journal of Haematology* 1992; 80: 519-526.
50. Friederichs E, Farley RA, Meiselman HJ. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability. *Am J Hematol* 1992 Nov; 41 (3): 170-7.
51. Health BP, Mohandas N, Wyatt JL, Shohet SB. Deformability of isolated red blood cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; 691: 211-219.
52. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen Radicals Stimulate Intracellular Proteolysis and Lipid Peroxidation by Independent Mechanisms in Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; Vol. 262, No. 17: 8220-8226.
53. Stocks J, Dormandy TL. The Autooxidation of Human Red Cell Lipids Induced by Hydrogen Peroxide. *British Journal of Haematology* 1971; 20: 95-111.
54. Chen S, Eldor A, Barsthein G, Zhanq S, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Yedgar S. Enhanced aggregability of red blood cells of β -thalassemia major patients. *Am J Physiol* 1996; 270: 1951-1956.
55. Meiselman HJ. Red Blood Cell Role in RBC Aggregation. *Clinical Hemorheology* 1993; Vol. 13: 575-92.

56. Donner M, Mills P, Stoltz JF. Influence of Plasma Proteins on Erythrocyte Aggregation. *Clinical Hemorheology* 1989; Vol. 9: 715-721.
57. Uyesaka N, Hasegawa S, Ishioka N, Ishioka R, Shio H, Schechter AN. Effects of Superoxide Anions on Red Cell Deformability and Membrane Proteins. *Biorheology* 1992; 29: 217-229.
58. Yedgar S, Hovav T, Barsthein G. Red blood cell intracellular interactions in oxidative stress states. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999; 21(3-4): 189-93.
59. Saltman P. Oxidative Stress: A Radical View. *Seminars in Hematology*; Vol. 26, No. 4: 249-256, 1989.
60. Simie MG, Taylor KA. Introduction to Peroxidation and antioxidant mechanisms; In MG Surgenor, KA Taylor, JF Ward and C von Sonntag (eds), *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, Plenum, New York and London, 1-10, 1988.
61. Chiu D, Kuypers F, Lubin B. Lipid Peroxidation in Human Red Cells. *Seminars in Hematology*; Vol. 26, No. 4: 257-276, 1989.
62. Baskurt OK, Yavuzer S. Some Hematological Effects of Oxidants. *Enviromental Oxidants*; 407-423, 1994.
63. Synder LM, Fortier NL, Trainor Jacobs J, Leb L. Effect of Hydrogen Peroxide Exposure on normal Human Erythrocyte Deformability, Morphology, Surface Characteristics, and Spectrin-Hemoglobin Cross-linking. *J Clin Invest* 1985; Vol 76: 1971-1977.
64. Mohandas M, Shohet SB. The Role of Membrane-associated Enzymes in Regulation of Erythrocyte Shape and Deformability. *Clinics in Haematology* 1981; Vol. 10, No. 1: 223-237.
65. Kuypers FA, Scott MD, Schott MA, Lubin B, Tsun-Yee Chiu D. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 535-545.
66. Baykal A, Isbir M, Ozmen S, Ogutmen C. The Influence of Blood Pressure on Intracellular Ca^{2+} Content in Erythrocytes: Effects of Cadmium Chloride and Nifedipine. *Clin and Exper Hypertension* 1996; 18 (1): 77-86.
67. McDonough PM and Button DC. Measurement of cytoplasmic calcium concentration in cell suspensions: correction for extracellular Fura-2 through use of Mn^{2+} and Probenecid. *Cell Calcium* 1989; 30: 171-180.
68. de Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA. Measurement of L-carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and in adults. *Clinica Chimica Acta* 1990; 187: 317-328.

69. Marzo A, Cardase G, Corbelletta C, Verga P, Vinciguerra C. Interference of Heparin in Plasma Levocarnitine Determination with Radioenzyme Assay. *Arzneim-Forsch/ Drug Res* 1995; 45(11), Nr. 12: 1303-1306.
70. du Plooy S, Dippenaar N, Smith K. A Quick Reproducible Radiometric Assay Method for Free and Total Carnitine in Plasma and Urine. *SAJ Clin Nutr* Vol. 89, No. 2: 196-198.
71. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 7: 1209-1214.
72. Conti M, Morand PC, Levillion P, Lemonnier A. Improved Fluorometric Determination of Malondialdehyde. *Clin Chem* 1991; 37/7: 1273-1275.
73. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical Aspects of Hematology, In *Textbook of Clinical Chemistry*, Ed. By Tietz NW. WB Saunders Company, Philadelphia; 1498-1535, 1986.
74. Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP. Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyser (L.O.R.C.A.); I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clinical Hemorheology*: Vol.14, No. 4: 605-618, 1994.
75. Hardeman MR, Goedhart PT, Schut NH. Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyser (L.O.R.C.A.); II. Red Blood Cell Deformability: Elongation Index Versus Cell Transit Time. *Clinical Hemorheology*: Vol.14, No. 4: 619-630, 1994.
76. Baskurt OK, Küçükatay-Bor M, Yalçın Ö, Meiselman HJ, Armstrong JK. Standard aggregating media to test the “aggregability” of rat red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 22: 161-166.
77. Wailairat P, Kittikalayawang A, Chaicharoen S. The thalassemic red cell membrane. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 23 Suppl 2: 74-8, 1992.
78. Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. Analysis of Factors Regulating Erythrocyte Deformability. *J Clin Invest* 1980; Vol. 66, September: 563-573.
79. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bound CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; Vol.94, October:11651-11656.
80. Clark MR, Shohet SB. The effect of abnormal hemoglobins on the membrane regulation of cell hydration. *Tex Rep Biol Med* 1980-81; 40: 417-29.
81. Mohandas N, Chasis JA. Red Blood Cell Deformability, Membrane Material Properties and Shape: Regulation by Transmembrane, Skeletal and Cytosolic Proteins and Lipids; *Seminars in Hematology* 1993; Vol. 30, No. 3: 171-192.

82. Daviest KJA, Goldberg AL. Proteins Damaged by Oxygen Radicals Are Rapidly Degraded in Extracts of Red Blood Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; Vol. 262, No. 17: 8227-8234.
83. Watabane H, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayachi H, Yamazaki N. Alterations of Human Erythrocyte Membrane Fluidity by Oxygen-Derived Free Radicals and Calcium. *Free Radical Biology and Medicine* 1990; Vol. 9: 507-514.
84. Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca^{2+} influx and cAMP-mediated signaling pathways. *AJP-Cell Physiology* 1997; Vol. 273: 1828-1834.
85. Yesilipek MA, Yegin O. Carnitine Therapy in Beta Thalassemia Major. *Acta Haematol* 1998; 100: 162-163.
86. Palmieri L, Ronca F, Malengo S, Bertelli A. Protection of beta-thalassemic erythrocytes from oxidative stress by propionyl carnitine. *Int J Tissue React* 1994; 16(3): 121-9.