

KANIN DEPO EDİLMESİ SÜRESİNCE ERİTROSİT LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN POTANSİYELİNDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLER VE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİSİ*

Fatih GÜLTEKİN¹, Mehmet AKDOĞAN¹, İrfan ALTUNTAŞ¹, Namık DELİBAŞ¹, Mahiye Kaptanağası¹

CHANGES IN ERYTHROCYTE LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL DURING STORAGE OF BLOOD AND PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN

Summary: The aim of this study was to improve the quality of stored blood by adding melatonin to the blood bag. Therefore, the changes in lipid peroxidation and antioxidant potential during storage of erythrocytes and protective effect of melatonin were investigated. The whole bloods were taken from fifteen donors, which of five was control group, five was study group 1 and the rest five was study group 2. Low dose (50 µg/ml) and high dose (5000 µg/ml) of melatonin was added to the blood bags of study group 1 and study group 2, respectively. Red Blood Cells (RBC) were counted in whole blood. Potassium level and lactate dehydrogenase (LDH) activity were measured in plasma for determination of hemolysis. The levels of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and antioxidant defense potential (AOP) were studied in erythrocytes for determination of lipid peroxidation and antioxidant system, respectively. The measurements were performed at the day 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, and 35 of the storage. The levels of TBARS and potassium and the activity of LDH increased depending on storage time whereas AOP and RBC decreased ($p < 0.001$ for the changes in TBARS, LDH, potassium and AOP of all groups; $p < 0.05$ for the changes in RBC of control group and study group 1). The comparisons of groups in the same measurement days were as follows: TBARS, RBC, potassium and LDH significantly decreased whereas AOP increased in study group 2 compared to control group ($p < 0.05$). There was no significant difference between study group 1 and control group ($p > 0.05$). These results suggest that high dose of melatonin added to the stored blood can improve the viability and longevity of red blood cells by reducing cell damage caused by free radicals.

Key Words: Erythrocyte, storage, lipid peroxidation, antioxidant, melatonin

Özet: Bu çalışmada, depo kanlarına melatonin ilave edilerek kalitelerinin artırılması amaçlandı. Bu amaçla depolanma süresince eritrositlerdeki lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan potansiyelindeki değişiklikler ile melatoninin koruyucu etkileri araştırıldı. Beşi kontrol grubu, beşi çalışma grubu 1 ve beşi çalışma grubu 2'de olmak üzere toplam on beş donörden tam kan alındı. Çalışma grubu 1'in kan torbalarına düşük doz (50 µg/ml), çalışma grubu 2'nin kan torbalarına ise yüksek doz (5000 µg/ml) melatonin eklendi. Kan torbalarından eritrositler (Red Blood Cells - RBC) sayıldı. Hemoliz derecesini değerlendirmek amacıyla plazma potasyum düzeyi ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi ölçüldü. Eritrositlerdeki lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için eritrositlerdeki tiobarbitürik asitle reaksiyona giren substratların (TBARS) düzeyi araştırıldı. Antioksidan sistem hakkında bilgi almak amacıyla eritrosit antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri çalışıldı. Ölçümler, depolanmanın 0., 1., 3., 5., 7., 10., 14., 21., 28. ve 35. günlerinde yapıldı. TBARS ve potasyum düzeyleri ile LDH aktivitesi depolanma süresine bağlı olarak artarken, AOP ve RBC'de azalma görüldü (tüm gruplarda TBARS, LDH, potasyum ve AOP değişiklikleri için $p < 0.001$, kontrol grubu ve çalışma grubu 1'deki RBC değişiklikleri için $p < 0.05$). Aynı ölçüm günlerinde gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda; TBARS, RBC, potasyum ve LDH çalışma grubu 2'de kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük iken AOP anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Çalışma grubu 1 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu sonuçlardan hareketle, depo kanlarına yüksek konsantrasyonda melatonin ilave edilmesinin, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını azaltarak eritrositlerin yaşam kabiliyetini ve süresini artırabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Eritrosit, depolanma, lipid peroksidasyonu, antioksidan, melatonin

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

* "XVth National Congress of Biochemistry and The Second International Biosciences Days, İzmir, TURKEY, 2000" de poster olarak sunulmuştur



GİRİŞ

Depo kanlarının ömrünü artırarak daha uzun süre kullanabilmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. 1947 yılında antikoagülan olarak asid-sitrat-dekstroz (ACD) kullanımı ile başlayan çalışmalar değişik besleyici formüllerle devam etmiştir (1,2). 1957 yılında sitrat-fosfat-dekstroz, 1960 yılında buna ilave adenin, 1978 yılında ise glukoz eklenmesiyle sitrat-fosfat-dekstroz-adenin (CPDA-1) elde edilmiş ve depolanma süresi 35 güne ve mannitol ilavesiyle 42 güne çıkarılmıştır (3-4). Diğer taraftan bazı araştırmacılar eritrositlerin yaşam süresini etkileyen antioksidanların durumlarını araştırmışlardır. Depo edilen kanlarda lipid peroksidasyonu (LP) artmakta ve antioksidanlar azalmaktadır (5-8). Nitekim Aslan ve ark (5) depo edilen kanlarda LP'nun arttığını, bunun yanında antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. Lachant ve ark. (8) depo kanlarında glutasyon düzeylerinin düştüğünü, Lee (6) ise glutasyon ve etilen diamin tetraasetik asit ilave etmenin LP'nunu azalttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde metal bağlayıcı şelatörlerin ilavesiyle LP'nun düştüğü gösterilmiştir (7). Depo kanlarında antioksidan olarak melatonin ilave edilmiş bir çalışmaya rastlayamadığımızdan bu çalışmada antioksidan olarak melatonin kullanıldı. Melatonin pineal glandın başlıca salgı ürünü olup, biyolojik saate uyum, uyku indükleyici ajan ve immün sistem ayarlayıcısı vb fonksiyonları vardır. Son yıllarda eksojen melatonin uygulamasının DNA, membran lipidleri ve sitozolik proteinleri oksijen kaynaklı serbest radikal hasarından koruduğu gösterilmiştir (9). Değişik dokular üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda, beyin, pankreas, umbilikal ven ve eritrositlerde değişik yollarla indüklenen serbest radikal hasarlarının melatonin tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (10-14).

Biz de çalışmamızda, depo edilen kanlarda LP ve antioksidan potansiyelde meydana gelen değişiklikleri incelemeyi, buna ilave olarak da depo kanlarına antioksidan olarak melatonin ilave

edilmesinin bu değişikliklere etkisini araştırmayı ve böylece kanlarının kalitesini artırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 15 gönüllüden alınan kanlarla Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Hematoloji Laboratuvarları ile Isparta Kızılay Kan Merkezi'nde gerçekleştirildi. Gönüllülerin beşi (üçü kadın, ikisi erkek) kontrol grubunu oluştururken diğer beşi (ikisi kadın üçü erkek) çalışma grubu 1'i ve kalan beşi (ikisi erkek üçü kadın) ise çalışma grubu 2'yi oluşturdu. Ortalama yaşları kontrol grubu, çalışma grubu 1 ve çalışma grubu 2'de sırasıyla 28 (8, 33 (6 ve 30 (9 yıl idi. Gönüllüler herhangi bir şikayeti olmayan sağlıklı kişilerdi ve tam kan sayımları ile serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), Glukoz, Bilirubin, Üre ve Kreatinin düzeyleri normal düzeylerde idi. Önce gönüllülerden CPDA-1 ile antikoagüle edilmiş kan torbaları (Kansuk, Türkiye) kullanılarak birer ünite kan alındı. Kontrol grubu kan torbalarına bir ilave yapılmazken çalışma grubu 1'e düşük doz melatonin (N-Asetil-5-Metoksitriptamin, Sigma, USA), çalışma grubu 2'ye ise yüksek doz melatonin eklendi. Erişkinlerde plazma melatonin düzeyi günün değişik saatlerinde 10 - 60 pg/ml arasında değişmektedir. (15). Normal şahıslara jelatin içinde 80 mg oral verilen melatonin serum melatonin düzeyinde 350 - 10 000 kat artışa neden olmaktadır (16). Bununla beraber 1-5 mg oral alımlarda ise 10 - 100 kat artışlar görülmektedir (17). Oral yüksek doz melatonin alınmasıyla ilgili ciddi bir yan etki veya risk rapor edilmemiştir. İnsanlarda uzun süre yüksek doz melatonin alınması ile doza bağımlı oluşan fizyolojik etkiler henüz yeteri kadar araştırılmamıştır. Bunun yanında bariz bir endokrin aksiyonu olmamasına karşın farmakolojik dozlarda melatonin alımından sonra sağlıklı bireylerde luteinizasyon hormonunda düşme ve prolaktin konsantrasyonunda artma rapor edilmiştir (18, 19). Bu çalışmada

fizyolojik ve farmakolojik doz olmak üzere çalışma grubu 1'in torbalarına 50 pg/ml, çalışma grubu 2'nin torbalarına ise 5000 pg/ml konsantrasyonda melatonin eklendi. Bunun için önce melatonin % 1'lik alkol çözeltisinde çözüldü, daha sonra uygun miktarlarda dilüe edildi. Kan torbaları Isparta Kızılay Kan Merkezi depolarında +4 oC'de saklandı. 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 ve 35. günlerde kan torbaları yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve ölçümler için numune alındı. Alınan numunelerden eritrosit sayımları (red blood cell - RBC) yapıldıktan sonra santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve plazmalarda potasyum düzeyleri ile LDH aktiviteleri çalışıldı. Ayrılan eritrositler ise üç kez serum fizyolojik ile yıkanarak -70 oC'de derin dondurucuda saklandı. Çalışmanın bitmesini takiben hepsi çözülerek tek seride eritrositlerdeki LP'nun bir göstergesi olan tiobarbitürik asitle reaksiyona giren substratlar (TBARS) ve antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri çalışıldı. Ayrıca ölçüm yapılan her gün alınan numunelerden kültür yapıldı ve torbalarda herhangi bir patojen üremediği görüldü.

TBARS ölçümü

TBARS için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (20). Metodun prensibi MDA-TBA (malondialdehit - tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de verdikleri absorbanın ölçülmesi esasına dayanır.

AOP ölçümü

AOP, Durak ve ark.'nın (21) yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde, reaksiyon ortamı ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerine (O₂·-) bir saat süreyle maruz bırakılır. Reaksiyon ortamındaki TBARS konsantrasyonu, O₂·- radikal oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra ölçülür. İki değer arasındaki fark antioksidan potansiyelle ters orantılıdır.

Tablo I. Depolanma süresince eritrosit tiobarbitürik asitle reaksiyona giren substratların (TBARS) düzeyleri (nmol/gHb). Veriler Ortalama±SD şeklinde verilmiştir. Tüm gruplar için n=5.

Depolanma süresi (gün)	Kontrol grubu	Çalışma grubu 1 (düşük doz melatoninle)	Çalışma grubu 2 (yüksek doz melatoninle)
0	2,72±0,52	2,71±0,55	2,70±0,44
1	2,73±0,60	2,75±0,51	2,73±0,36
3	2,96±0,61	2,91±0,65	2,77±0,48
5	3,10±0,52	2,94±0,47	2,85±0,51
7	4,61±0,66	3,54±0,55	3,19±0,70
10	4,43±0,53	4,25±0,64	3,31±0,51
14	5,85±0,73	4,82±0,70	3,40±0,77
21	5,93±0,80	4,81±0,57	3,94±0,65
28	6,19±0,73	5,00±0,77	4,12±0,64
35	6,34±0,95	5,20±0,91	4,48±0,81

Tablo II. Depolanma süresince eritrosit antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri (1/nmol/gHb). Veriler Ortalama±SD şeklinde verilmiştir. Tüm gruplar için n=5.

Depolanma süresi (gün)	Kontrol grubu	Çalışma grubu 1 (düşük doz melatoninle)	Çalışma grubu 2 (yüksek doz melatoninle)
0	0,01016±0,00201	0,01011±0,00295	0,01016±0,00425
1	0,00958±0,00380	0,00947±0,00251	0,00995±0,00391
3	0,00869±0,00351	0,00901±0,00167	0,00976±0,00276
5	0,00829±0,00130	0,00851±0,00151	0,00969±0,00212
7	0,00405±0,00147	0,00411±0,00178	0,00601±0,00154
10	0,00385±0,00191	0,00344±0,00147	0,00562±0,00132
14	0,00290±0,00070	0,00301±0,00101	0,00532±0,00112
21	0,00253±0,00072	0,00295±0,00078	0,00502±0,00148
28	0,00194±0,00061	0,00264±0,00072	0,00477±0,00093
35	0,00172±0,00073	0,00211±0,00079	0,00442±0,00112

Potasyum ve LDH ölçümü

Potasyum ölçümleri ISE (iyon-selektif-elektrot) yöntemi ile, LDH aktivitesi ölçümleri ise kinetik UV metotla ticari kit (Olympus Diagnostica GmbH, İrlanda) kullanılarak Olympus AU640 (Japon) marka otoanalizöründe yapıldı.



Kan sayımları otomatik kan sayım **İstatistik** cihazında (Coulter STKS, USA) ile yapıldı.

Tablo III. Depolanma süresince plazma Laktat Dehidrogenaz (LDH) düzeyleri (U/L). Veriler Ortalama±SD şeklinde verilmiştir. Tüm gruplar için n=5.

Depolanma süresi (gün)	Kontrol grubu	Çalışma grubu 1 (düşük doz melatoninle)	Çalışma grubu 2 (yüksek doz melatoninle)
0	682±104	681±100	686±80
1	696±91	685±85	702±111
3	907±102	873±102	726±93
5	1176±103	1039±110	751±174
7	1244±139	1301±120	784±167
10	1385±166	1402±180	806±150
14	1483±165	1320±159	822±162
21	1593±230	1601±210	961±140
28	1754±147	1684±200	998±169
35	1893±241	1800±195	1331±207

Tablo IV. Depolanma süresince plazma potasyum düzeyleri (mmol/L). Veriler Ortalama±SD şeklinde verilmiştir. Tüm gruplar için n=5.

Depolanma süresi (gün)	Kontrol grubu	Çalışma grubu 1 (düşük doz melatoninle)	Çalışma grubu 2 (yüksek doz melatoninle)
0	4,26±0,39	4,20±0,39	4,25±0,73
1	5,26±0,52	5,21±0,48	4,40±0,66
3	6,95±0,40	7,82±0,40	4,86±0,77
5	9,93±1,05	10,20±0,84	5,02±1,04
7	11,93±1,48	11,11±1,48	7,05±1,43
10	13,18±1,83	14,10±2,01	8,03±1,43
14	16,23±1,83	15,90±1,83	9,14±1,71
21	19,13±2,13	19,01±1,80	12,27±1,62
28	23,42±2,74	22,42±2,14	13,59±2,02
35	25,53±2,25	24,91±2,45	16,06±2,71

Her grupta depolanma süresince anlamlı bir değişiklik olup olmadığını belirlemek için Friedman testi, anlamlılık varsa başlangıca göre hangi günden itibaren anlamlılığın başladığını tespit etmek için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. Aynı günlerdeki kontrol ve çalışma gruplarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Korelasyon analizinde Pearson testi yapıldı. İstatistikler "SPSS 7.0 for Windows" paket programında yapıldı.

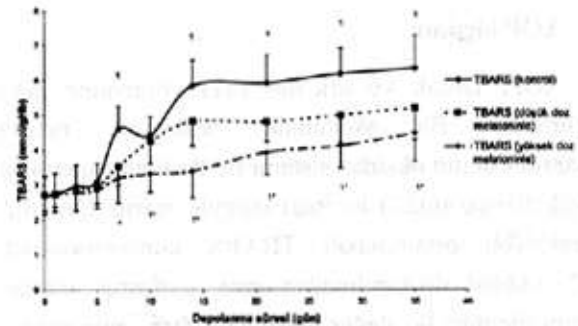
Tablo V. Depolanma süresince RBC (Red Blood Cell) sayımları (milyon/mikrol). Veriler Ortalama±SD şeklinde verilmiştir. Tüm gruplar için n=5.

Depolanma süresi (gün)	Kontrol grubu	Çalışma grubu 1 (düşük doz melatoninle)	Çalışma grubu 2 (yüksek doz melatoninle)
0	5,01±0,64	4,99±0,54	4,97±0,32
1	5,00±0,35	5,00±0,40	4,85±0,54
3	4,97±0,53	4,85±0,50	4,85±0,55
5	4,94±0,33	4,90±0,40	4,87±0,75
7	4,89±0,49	4,85±0,45	4,80±0,54
10	4,87±0,47	4,83±0,40	4,81±0,45
14	4,83±0,52	4,81±0,61	4,79±0,81
21	4,78±0,36	4,75±0,41	4,77±0,56
28	4,11±0,54	4,50±0,42	4,67±0,55
35	3,75±0,50	3,80±0,63	4,54±0,43

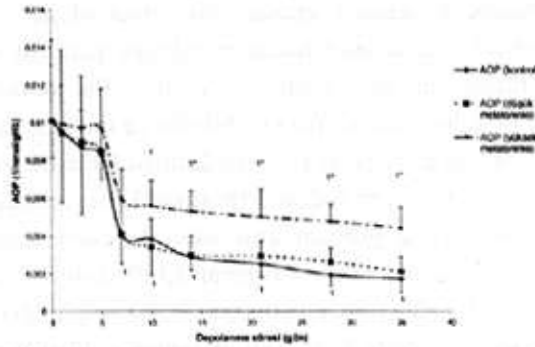
BULGULAR

Kontrol ve çalışma gruplarında her parametrenin günlere göre değişimi ortalama (standart sapma olarak Şekil 1-5'de gösterilmiştir. TBARS, AOP, potasyum ve LDH parametrelerindeki zaman içindeki değişimler, tüm gruplarda anlamlıydı ($p<0.001$, Friedman testi). RBC'in zaman içindeki değişimi kontrol grubunda ve çalışma grubu 1'de anlamlı iken ($p<0.05$, Friedman testi), çalışma grubu 2'de anlamlı değildi ($p>0.05$, Friedman testi).

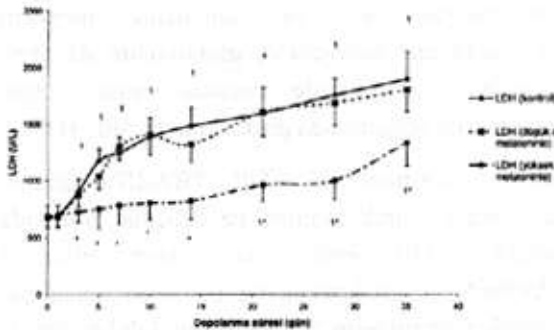
Şekil 1. Depolanma süresince eritrositteki tiobarbiturik asitle reasinona giren substratların (TBARS) düzeyleri. 1= Başlangıçla (0).



gün) karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; * = Aynı ölçüm günü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Mann Whitney U test.



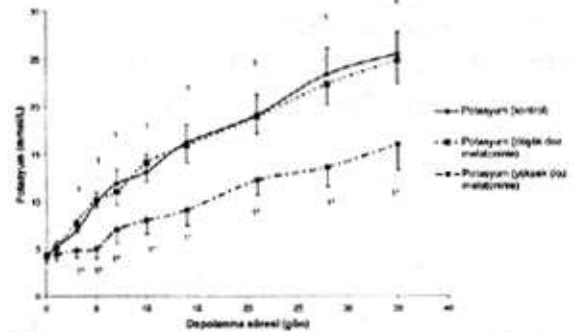
Şekil 2. Depolanma süresince eritrosit antioksidan potansiyel (AOP) düzeyleri. 1= Başlangıçta (0. gün) karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; * = Aynı ölçüm günü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Mann Whitney U test.



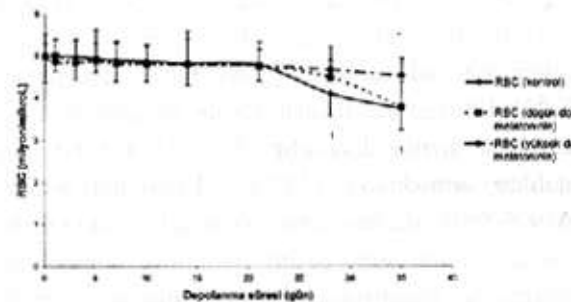
Şekil 3. Depolanma süresince plazma Laktat Dehidrogenaz (LDH) düzeyleri. 1= Başlangıçta (0. gün) karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; * = Aynı ölçüm günü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Mann Whitney U test.

Aynı ölçüm günlerinde, kontrol grubu ile çalışma grubu 1'in karşılaştırılmasında hiç bir parametrede anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$, Mann Whitney U test). Kontrol grubu ile çalışma grubu 2'nin karşılaştırılmasında, TBARS 7. günden itibaren çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$, Mann Whitney U test). AOP 14. günden itibaren çalışma grubu 2'de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$, Mann Whitney U test). Plazma potasyum düzeyi ve LDH aktivitesi 3. günden itibaren çalışma grubu 2'de kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$, Mann Whitney U test). RBC ise çalışma grubu 2'de

kontrol grubuna göre sadece 35. günde anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$, Mann Whitney U test).



Şekil 4. Depolanma süresince plazma potasyum düzeyleri. 1= Başlangıçta (0. gün) karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; * = Aynı ölçüm günü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Mann Whitney U test.



Şekil 5. Depolanma süresince RBC (Red Blood Cell) sayımları. 1= Başlangıçta (0. gün) karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; * = Aynı ölçüm günü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar, $p<0.05$, Mann Whitney U test.

TBARS, başlangıçta (0.gün) göre kontrol grubunda 7. günden itibaren anlamlı olarak artarken, çalışma grubu 2'de 10. günden itibaren anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test). Bunun tersine AOP başlangıçta göre kontrol grubunda 7. günden itibaren, çalışma grubu 2'de ise 10. günden itibaren anlamlı düşüktü ($p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test). Plazma potasyum konsantrasyonu kontrol grubu ve çalışma grubu 2'de başlangıçta göre 3. günden itibaren yüksekti ($p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test). Plazma LDH aktivitesi



ise başlangıca göre kontrol grubunda 3. günden itibaren, çalışma grubu 2'de ise 21. günden itibaren yüksekti ($p < 0.05$, Wilcoxon Singed Ranks test). RBC depolanma süresi içinde zamana bağlı olarak çalışma grubu 2'de anlamlı olarak değişmezken ($p > 0.05$, Friedman testi), kontrol grubunda başlangıca göre 28. günden itibaren anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$, Wilcoxon Singed Ranks test). AOP ile TBARS arasında günler dikkate alınmaksızın yapılan korelasyon analizinde anlamlı bir ilişki bulundu ($p < 0.05$, $r: -0.486$).

Kontrol grubu ile çalışma grubu 1 arasında anlamlı bir fark olmadığından tartışma kısmında sadece kontrol ve çalışma grubu 2 tartışılacaktır. "Çalışma grubu 2"den "çalışma grubu" olarak bahsedilecektir.

TARTIŞMA

Eritrosit antioksidan metabolizması eritrosit hayatiyeti için oldukça önemlidir. LP, hücre hasarı ve ölüm için oldukça kabul gören bir mekanizmadır (22, 23). LP bazı metal şelatörlerini de içine alan bir çok toksik ajanla ilişkilidir (23, 24). LP bir çok hastalıkta artmaktadır (23-25). Talasemia majör, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği ve otoimmün hemolitik anemi gibi çeşitli hemolitik anemilerde eritrositlerin otooksidasyona yatkınlığının arttığı gösterilmiştir (26). Ayrıca eritrosit yaşlanmasında LP'nun arttığı rapor edilmiştir (27).

Bu çalışmada hem kontrol ve hem de çalışma grubunda depolanma süresine bağlı olarak eritrositlerde LP anlamlı olarak artmıştır. Depo kanlarında yapılan diğer çalışmalarda da LP'nun arttığı gösterilmiştir (5, 7, 28) Bu artışın nedeni eritrositlerin sürekli olarak hücre içi ve hücre dışı serbest radikallere maruz kalmalarıdır (29, 30). Çünkü membranları poliansatüre yağ asitlerinden zengindirler. Ayrıca sürekli olarak yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalmaları ve güçlü geçiş metallere sahiptirler. Bunun yanında eritrosit içerisinde sürekli olarak oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesi devamlı olarak

süperoksit anyonlarının oluşmasıyla sonuçlanır (31). Eritrositlerin dışında granülositler, makrofajlar ve metabolik olarak aktif hücreler hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu üretirler (32-36). Bu ürünler ekstrasellüler alana diffüze olabilirler ve muhtemelen eritrositlerle etkileşirler (36-38). Eritrositlerde LP'nun artmasının bir diğer nedeni serbest radikaller artarken antioksidanlarda görülen azalmadır. Nitekim Aslan ve ark. (5) depo kanlarında zaman içinde antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Yine Racek ve ark. (28) depo kanlarında eritrosit SOD ve tam kan GSH-Px aktivitelerinin düştüğünü göstermişlerdir. Noble ve ark. (39) ise glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin düştüğünü rapor etmişlerdir. Enzimatik antioksidanların yanı sıra enzimatik olmayan antioksidanlardan indirgenmiş glutatyonun da depo kanlarındaki eritrositlerde zamana bağlı olarak azaldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (40, 41).

Mevcut çalışmamızda AOP, TBARS'ın tersine zamana bağlı olarak kontrol ve çalışma grubunda azalmıştır. AOP, enzim ve enzim olmayan antioksidanların etkilerinin topluca bir ifadesidir. Antioksidan enzimlerin bir kısmının inhibe olması her ne kadar AOP'de bir azalmaya neden olabilirse de diğer antioksidanların düzeyleri yeterli ise total AOP fazla etkilenmeyecektir. Aynı şekilde enzim olmayan antioksidanların da ortamda tükenmesi total AOP'yi fazlaca etkilemeyebilir. Bu yüzden sadece bazı antioksidan enzimlerin veya diğer bazı enzim olmayan antioksidanların bir kısmının vereceği bireysel bilgiden daha kıymetli bilgi verecektir. Çünkü AOP total antioksidan kapasite hakkında bireysel antioksidanlardan daha fazla bilgi vermektedir. Zaman içinde AOP'nin düşmesi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalması, enzim olmayan antioksidanların kullanılarak tükenmesi vb nedenlere bağlı olabilir.

Antioksidan sistemi güçlendirmek için depo kanlarına değişik antioksidanlar ve metal şelatörleri eklenmiştir (7, 30). Bunun yanında, bazı

çalışmalarda, donörler, kan vermeden önce belirli sürelerde antioksidan tabletler kullanmışlardır (28). Bu çalışmaların hepsinde antioksidanların gerek kan vermeden önce kullanılması ve gerekse kan torbalarına ilave edilmesiyle LP anlamlı olarak düşmüş ve eritrosit yaşam sürelerine anlamlı katkılar sağlanmıştır.

Bu çalışmada kan torbalarına melatonin eklenmesi ile eritrosit LP'u anlamlı olarak düşerken AOP anlamlı olarak artmıştır. Bunun nedeni melatoninin oldukça etkili bir antioksidan olması olabilir. Melatonin lipofilik ve hidrofilik karakterinden dolayı hem membran ve hem de sitozolde antioksidan özellik gösterir (42). Melatoninin in vivo antioksidan etkisini iki yolla gösterebilir (43). Birinci yol, kendisinin direk olarak serbest radikalleri toplaması veya onların oluşmasını engellemesi, ikinci yol ise endojen antioksidan enzimleri aktive ederek indirek yoldan serbest radikalleri toplaması (44-47). Örnek olarak melatonin hidroksil, peroksil, singlet oksijen ve hipoklorus asit'i direk olarak zararsız hale getirirken değişik dokularda SDO ve GSH-Px enzimlerinin hem aktivite ve hem de sentezlerinin artırmaktadır (43, 48-50). Depo kanlarına melatonin eklenmesiyle eritrosit içinde AOP artacak ve serbest radikallerin neden olduğu LP azalacaktır.

Bu çalışmada, melatonin ilavesi, RBC'de kontrol grubuna göre daha az azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, eritrosit hemolizinin güzel bir göstergesi olan plazma potasyum düzeyleri ve LDH aktivitesi melatonin ilave edilen çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Dolayısıyla depo kanlarına melatonin eklenmesi hemolizi anlamlı olarak azaltmıştır. Hemolizin azalması AOP'in artması ve LP'nun azalmasıyla ilgili olabilir.

Melatoninin antioksidan etkisini ancak yüksek dozlarda gözlemledik. Düşük doz melatonin ilavesi, çalışılan parametrelerde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Nitekim melatoninin in vitro antioksidan

özelliğini fizyolojik konsantrasyonlarda göstermediği, ancak yüksek farmakolojik konsantrasyonlarda gösterebildiği rapor edilmiştir (51).

Sonuç olarak, depo kanlarına yüksek konsantrasyonda melatonin ilave edilmesinin, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını azaltarak eritrositlerin yaşam kabiliyetini ve süresini artırabileceği kanısına vardık.

KAYNAKLAR

1. Gibson, J. G, Evans, R. D, Aus, J. C, Sack, T, Peacock, W. C. (1947) The post-transfusion survival of preserved human erythrocytes stored blood, or in resuspension, after removal of plasma, by means of two isotopes of radioactive iron. *J. Clin. Invest.* 26,715-738.
2. Ross J. F, Finch, C. A, Peacock, W. E, Sammons, M. C. (1947) The in vitro preservation and post-transfusion survival of stored. *Blood. J. Clin. Invest.* 26,687-703.
3. Orlina, A. R, Josephson, A. M. (1969) Comparative viability of blood stored in ACD and CPD. *Transfusion.* 9,62-69.
4. Federal Register. (1978) 43(151),34457, Part 640.
5. Aslan, R, Şekeroğlu, M. R, Tarakçıoğlu, M, Köylü, H. (1997) Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood. *Haematologia.* 28,233-237.
6. Lee, D. M. (1980) Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochem. Biochys. Res. Comm.* 95,1663-1672.
7. Knight, J. A, Voorhees, R. P, Martin, L, Anstall, H. (1992) Lipid peroxidation in stored red cells. *Transfusion.* 32,354-357.
8. Lachant, N. A, Noble, N. A, Myrhe, B. A, Tanaka, K. R. (1984) Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion red cell survival. *Am. J. Hematol.* 17,237-249.
9. Reiter R, J. (1996) Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur. J. Endocrinol.* 134,412-420.
10. Pless, G, Frederiksen, T. J, Garcia, J. J, Reiter, R. J. (1999) Pharmacological aspects of N-acetyl-5-methoxytryptamine (melatonin) and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (pinoline) as



- antioxidants: reduction of oxidative damage in brain region homogenates. *J. Pineal. Res.* 26(4),236-246.
11. Morioka, N, Okatani, Y, Wakatsuki, A. (1999) Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice. *J. Pineal. Res.* 27(4),202-209.
 12. Qi, W, Tan, D. X, Reiter, R. J, Kim, S. J, Manchester, L. C, Cabrera, J, Sainz, R. M, Mayo, J. C. (1999) Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 44(11),2257-2262.
 13. Wakatsuki, A, Okatani, Y. (2000) Melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. *J. Pineal. Res.* 28(3),172-178.
 14. Gultekin, F, Delibas, N, Yasar, S, Kilinc, I. (2001) In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos ethyl in rats. *Arch. Toxicol.* DOI 10.1007/s002040100219 (online).
 15. Waldhauser, F, Dietzel, M. (1985) Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 453,205-214.
 16. Waldhauser, F, Waldhauser, M, Lieberman, H. R, Denf, M. H, Lynch, H. J, Wurtman, R. J. (1984) Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology.* 39,307-313.
 17. Dollins, A. B, Zhdanova, I. V, Wurtman, R. J, Lynch, H. J, Deng, M. H. (1994) Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91,1824-1828.
 18. Nordlund, J. J, Lerner, A. B. (1977) The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45,768-774.
 19. Wright, J. M, Aldhous, M, Franey, C, English, J, Arendt, J. (1986) The effects of exogenous melatonin on endocrine function in man. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 24,375-382.
 20. Draper, H. H, Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 186,421-431.
 21. Durak, I, Karabacak, H. I, Buyukkocak, S, Cimen, M. Y. B, Kacmaz, M, Omeroglu, E, Ozturk, H. S. (1998) Impaired antioxidant defence system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. *Nephron.* 78,207-211.
 22. Gutterige, J. M. C, Quinlan, G. T. (1983) Malondialdehyde formation from lipid peroxides in thiobarbituric acid test: The role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J. Appl. Biochem.* 5,293-299.
 23. Hallivell, B. (1984) Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Med. Biol.* 62,71-77.
 24. Knight, J. A, Voorhees, R. P, Martin, L. (1992) The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 22,207-213.
 25. Stocks, J, Offerman, E. L, Modell, C. B, Dormandy, T. L. (1972) The susceptibility autoxydation of human red cell lipids in health and disease. *Brit. J. Haemat.* 23,713-724.
 26. Stocks, J, Kemp, M, Dormandy, T. L. (1971) Increased susceptibility of red-blood-cell lipids to autoxidation in haemolytic states. *Lancet.* 1,266-269.
 27. Hochstein, P, Jain, S. K. (1981) Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.* 40,183-188.
 28. Racek, J, Herynkova, R, Holecek, V, Jerabek, Z, Slama, V. (1997) Influence of antioxidants on the quality of stored blood. *Vox. Sang.* 72,16-19.
 29. Chiu, D, Lubin, B, Shohet, S. B. (1982) Peroxidative reactions in red cell biology. *Free Radicals in Biology* (vol 5). (Derleyen: Pryor, W.), s. 115-160, Academic, San Diego.
 30. Chiu, D. T. Y, Claster, S. (1988) Measurement of red cell membrane oxidation and the generation of oxidative intermediates. *Red Cell Membrane.* (Derleyen: Shohet, S. B, Mohandes, N.), s. 203-236, Churchill, Livingston.
 31. Carrel, R. W, Winterbourn, C. C, Rachmilewitz, E. A. (1975) Activated oxygen and hemolysis. *Br. J. Haematol.* 30,259-264.
 32. Biaber, B, Curnett, J. T, Kipnes, R. S. (1977) Biologic defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 85,235-244.
 33. Jain, S. K, Shohet, S. B. (1984) A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: Evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood.* 63,363-367.
 34. Salin, M. L, McCord, J. M. (1975) Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 56,1319-1323.



35. Weiss, S. J, Young, J, LoBuglio, A. F. (1981) Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 68,714-721.
36. Weiss, S. J. (1980) The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 255,9912-9917.
37. Claster, S, Chiu, D. T. Y, Quintanilha, A. (1984) Neutrophils mediated lipid peroxidation in human red cells. *Blood.* 64,1079-1084.
38. Claster, S, Quintanilha, A, Schott, M. A. (1987) Neutrophil-induced K⁺ leak in human red cells: A potential mechanism for infection-mediated hemolysis. *J. Lab. Clin. Med.* 109,201-210.
39. Noble, N. A, Tanaka, K. R, Myhre, B. A, Johnson, D. E. (1982) Red cell enzyme activity during blood storage and reactivation of phosphofructokinase. *Am. J. Hematol.* 13,1-7.
40. Swarup, S, Dutta, M. C, Ghosh, S. K, Chatterjea, J. B. (1966) Levels of erythrocytic reduced glutathione (GSH) and its stability during preservation of blood. *Bull. Calcutta. School. Tropical. Med.* 14,77-83.
41. Palek, J, Volek, V. (1964) Glutathione instability in stored blood. *Experientia.* 20,420-424.
42. Shida, C. S, Castrucci, A. M. L, Lamy-Freund, M. T. (1994) High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal. Res.* 16,198-201.
43. Tan, D. X, Chen, L. D, Poeggeler, B, Manchester, L. C, Reiter, R. J. (1993) Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine. J.* 1,57-60.
44. Pierrefiche, G, Topall, G, Cauboin, G, Henriot, I, Laborit, H. (1993) Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80,211-223.
45. Tan, D. X, Reiter, R. J, Chen, L. D, Poeggeler, B, Manchester, L. C, Barlow-Walden, R. L. (1994) Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis.* 15,215-218.
46. Abe, M, Reiter, R. J, Orhii, P, Hara, M, Poeggeler, B, Balrow-Walden, L. R. (1994) Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence for an antioxidative effect for melatonin. *J. Pineal. Res.* 17,94-100.
47. Melchiori, D, Reiter, R. J, Attia, A. M, Hara, M, Burgos, A, Nistico, G. (1995) Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life. Sci.* 56,83-85.
48. Reiter, R. J. (1993) Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26,1141-1155.
49. Pierri, C, Marra, M, Moroni, F, Decchioni, R, Marcheselli, F. (1994) Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55,PL271-276.
50. Reiter, R, Tang, L, Garcia, J. J, Nunoz-Hoyos, A. (1997) Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60,2255-2271.
51. Brzezinski, A. (1997) Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336,186-194.