

ERİTROSİT MEMBRAN PROTEİNLERİNE SERBEST RADİKALLERİN ETKİSİ*

A. Erdinç YALIN¹, Serap YALIN², Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ¹, Sedefgül YÜZBAŞIOĞLU¹,
Kıymet AKSOY¹

EFFECTS OF FREE RADICALS ON ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS

Summary: The effects of oxidative damage on membrane proteins in α -thalassemia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) enzyme deficient cases were investigated. Also the levels of Superoxidedismutase (SOD), and Malondialdehyde (MDA) were estimated. For the scope of this study, 10 G6PD enzyme deficient ($8 < U/gHb$) cases and 5 cases with α -thalassemia were chosen. Erythrocyte ghosts were prepared according to Dodge method and membrane proteins were separated using 8.3 % SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, then fraction quantities determined by a densitometer. SOD and MDA levels were measured according to Fridovich ve Ohkawa method. In 2 cases with α -thalassemia; along with Band 3 protein deficiency, MDA levels were found to be high. In the same way, in 6 G6PD deficient cases, Band 3 protein deficiency and high MDA levels were determined. As a result of this study, although, no any meaningful SOD level relationship among α -thalassemia and G6PD deficient cases, a notable relationship between levels of Band 3 protein and MDA were observed.

Key Words: Free radical, lipid peroxidation, antioxidant, MDA

Özet: Oksidatif hasarın eritrosit membran proteinlerine etkisini incelenmek amacıyla α -talasemili ve Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) enzim aktivitesi eksik olan olguların membran proteinleri ile Superoksitdismutaz (SOD) ve Malondialdehid (MDA) düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamına G6PD enzim aktivitesi eksik ($< 8 \text{ U/gHb}$) 10 olgu ve α -talasemi tanısı konulmuş 5 olgu alınmıştır. Dodge yöntemine göre eritrositten gost hazırlanarak % 8,3'lük SDS-PAGE yöntemiyle membran proteinleri moleküler ağırlığına göre ayrıştırılmış, jeller Coomassie Brilliant Blue ile boyanıp fraksiyonların miktarı dansitometrede okunmuştur. Fridovich ve Ohkawa yöntemlerine göre SOD ve MDA düzeyleri çalışılmıştır. α -talasemili 2 olguda Band 3 protein eksikliği ile birlikte MDA değerleri yüksek bulunmuş, aynı şekilde G6PD enzim aktivitesi eksik olan 6 olguda Band 3 eksikliği ve MDA değeri yüksek bulunmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre α -talasemi ve G6PD enzim düzeyi ile SOD arasında direkt bir ilişki bulunamamış fakat Band 3 protein eksikliği ile MDA arasında ilişki olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Serbest radikal, lipid peroksidasyonu, antioksidan, MDA

GİRİŞ

Serbest radikaller dış orbitallerinde tek sayıda ortaklaşmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapı

larındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler(1). Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir. Fakat organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır(2).

¹Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana

²Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

* "III. Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi, 17-20 Ekim 2001, Ankara" da Poster Olarak Sunulmuştur.



Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli tepkimelerden geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur. Serbest radikaller hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler.

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar ve sonrasında sürekli oluşum halindedirler. Oksidan moleküller, zigot döneminden itibaren natal ve postnatal dönemlerde organizmanın canlılığı devam ettikçe, doğal olarak normal biyolojik işlemler sırasında oluşmaları yanında organizmaya girince hastalık oluşturabilecek veya yabancı madde etkisini gösterecek durumlarda da az veya çok bulunur. Organizmada serbest radikaller endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirme süreci içerisinde. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halindedir. Denge bozulmadıkça organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulup serbest radikallere bağlı etkiler ortaya çıkmaktadır(2-6).

Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı sonucunda lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan peroksidasyon olayı, serbest radikaller tarafından başlatılır ve lipid hidro peroksitlerinin aldehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonuçlanır. Membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu membran organizasyonunu bozarak hücrenin yapısı bozulur. Peroksidasyon esnasında oluşan lipid hidroperoksitleri membranın hidrofobik iç kısmından yüzeye doğru göç etme eğilimindedir. Bunun sonucunda membranın yapısal düzeni bozulur ve fonksiyonu etkilenir(7).

Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucunda vücutta oluşan çeşitli ürünler; lipidlerin haricinde karbonhidratların, proteinlerin ve DNA'nın yapısını da etkileyerek proteinlerin denatürasyonuna, enzim inaktivasyonuna, DNA sarmal kırıklarına ve baz modifikasyonuna neden olur. Bu değişiklikler de birçok patolojik olaylara zemin hazırlar(8).

Çukurova Bölgesi heterojen bir toplum olup bölgede kalıtsal kan hastalıklarından α -talasemi ve G6PD enzim eksikliği sıkça gözlenmektedir. Bölgede yapılan populasyon taramaları sonucunda α -talasemi insidansı % 3,3 ve G6PD enzim eksikliği de % 8,2 olarak saptanmıştır(9).

Bu çalışmada talasemili olgularda demir birikimi-ne, G6PD enzim aktivitesi eksik olan olgularda da NADPH düzeylerindeki azalmaya bağlı olarak eritrosit membranında gelişen oksidatif hasarın eritrosit membran proteinlerine ve SOD ile MDA düzeylerine etkisi araştırılmak istenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim aktivitesi eksik (<8 Ü/gHb) olan 10 olgu ve α -talasemi tanısı konulmuş 5 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Olguların G6PD enzim kinetiği çalışılmıştır. Dodge yöntemine göre eritrositten gost hazırlanarak % 8,3'lük SDS-PAGE yöntemiyle membran proteinleri moleküler ağırlığına göre ayrıştırılmıştır. Jeller Coomassie Brilliant Blue ile boyanıp yıkandıktan sonra fraksiyonların miktarı dansitometrede okunmuş, Fridovich ve Ohkawa yöntemlerine göre Süperoksit dismutaz (SOD) ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri çalışılmıştır.

G6PD Aktivite Tayini

Eritrositler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra bir hacim eritrosit paketi, iki hacim %0.02 digitonin ve iki hacim 20 μ M NADP, 1 mM β -merkaptetanol ve 1 mM EDTA içeren 5 mM pH 7.0 sodyum fosfat (NaP) tamponu (tampon X) kullanılarak hemolizat

hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi 0.1 M MgCl₂, 6 mM G6P ve 2 mM NADP içeren 1 M Tris-HCl pH 8.0 tamponu içerisinde ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 37°C'de bir dakikada 340 nm'de oluşan 1 µmol NADPH olarak saptanmış, spesifik aktivite ise Ünite/gHb olarak verilmiştir(10,11).

Enzimin DE-52 Selüloz ile Saflaştırılması

2x10 cm çapındaki kolon DE-52 selüloz jeli ile doldurularak kolon pH'sı 7.0 oluncaya kadar tampon X ile yıkanmıştır. Hemolizat kolona tatbik edildikten sonra kolona bağlanmayan proteinler tampon X ile, kolona bağlanan proteinler ise 0.25M KCl içeren tampon X ile yıkanarak 3ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzim preparatında kinetik parametreler çalışılmıştır (12-14).

Kinetik Çalışma

20-200 µM G6P ve 4-40 µM NADP kullanılarak Lineweaver-Burk eğrisi çizilerek Km G6P ve NADP saptanmıştır. 6 mM 2d-G6P, 6 mM Gal-6P, 2 mM NAD ve 2 mM dNADP kullanılarak analogların yüzde kullanımı tespit edilmiştir (12).

Eritrosit Membran Proteinleri

Eritrosit membranını hazırlamak için 5ml tam kan kullanılmış ve tam kan örneklerinin plazması MDA ölçümünde kullanılmıştır. Eritrositler 310 mOsm'lik fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmış, yıkanan eritrositlerden 2 mL alınıp üzerine 28 mL 20 mOsm fosfat tamponu eklenip üç defa 11000 rpm'de 40 dakika santrifüj edilerek hipotonik lizis işlemiyle eritrosit membranları hazırlanmıştır. 8 M üre, %2 β-merkaptoetanol ve %2'lik sodyum dodesil sulfat (SDS) karışımı kullanılarak membran proteinleri çözünür hale getirilmiştir (15). Bu işlemden sonra membran proteinleri %8.3'lük sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Jeller Coomassie Brilliant Blue (%0.5) ile bir gece inkübe edilip boyandıktan sonra boya artıkları asetik asit-metanol-su (5:1:5) karışımıyla temizlenmiştir. Spektrin, Ankyrin ve Band 3 proteinlerinin miktarı

545 nm'de dansitometrede (Cliniscan 2) okunmuştur (16).

Antioksidan Sistem

MDA Ölçümü

Plazma (100 µL) %8.1'lik SDS, %20'lik asetik asit ve %0.8'lik Tiyobarbitürik asit ile muamele edilip 95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulup üzerine 5 mL n-Butanol/Piridin (15/1) çözeltisi eklenerek vorteksleme ile karıştırılmıştır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik kısım alınarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-260) 532 nm dalga boyunda absorpsiyon okunmuştur (17).

SOD Yöntemi

0.5 mL eritrosit, su ile hemoliz edildikten sonra 0.01 mM fosfat tamponu (pH 7.0) ile lizat hazırlanmış, eritrosit lizatına (25 µL), Ksantin, 2,4 iyodofenil 3,4 nitrofenol 5-feniltetrazolium klorid (INT) ve 3-sikloheksilamino 1-propan sülfonik asit (CAPS) ve ksantin oksidaz içeren tampondan (850 µl) ilave edilerek, 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm'de havaya karşı başlangıç absorpsiyonu (A₁), 3 dakika sonra ikinci absorpsiyon (A₂) spektrofotometrede (Shimadzu) okunmuştur.

Çalışma körü (25 µL 10 mM fosfat tamponu) SOD içermediği için inhibisyona uğramamış tepkime olarak kabul edilip %100 olarak alınmıştır. Tüm standartların (850 µL substrat karışımı + 125 µL ksantin oksidaz) % inhibisyon değeri körleriyle oranlanarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır (18).

BULGULAR

α-talasemi tanısı konulan olguların eritrosit membran proteinlerinden Band 3 eksikliği 2 olguda (EY, FS) gözlenmiştir (Tablo 1). Ayrıca α-talasemili olguların SOD ve MDA düzeyleri ölçüldüğünde 3 olguda (MS, EY, FS) SOD ve 2 olguda MDA değerleri (EY, FS) yüksek bulunmuştur (Tablo 2).



Tablo 1. α -talasemili olguların eritrosit membran proteinleri

Olgu	Spektrin (%)	Ankyrin (%)	Band 3 (%)
M.S.	19	5	23
E.Y.	21	7	18 ↓
F.S.	21	4	16 ↓
E.K.	22	4	20
E.Ü.	23	4	22
Normal sınır	21±3	5±1	21±2

Tablo 2. α -talasemili olguların antioksidan sistem düzeyleri

Olgu	SOD (Ü/gHb)	MDA (nmol/L)
M.S.	1612 ↑	2,8
E.Y.	1415 ↑	3,9 ↑
F.S.	1943 ↑	3,7 ↑
E.K.	1202	0,9 ↓
E.Ü.	1052	1,5
Normal sınır	1030±188	2,2±0,7

G6PD enzim aktivitesi eksik olan olguların enzim kinetiği çalışmasında KmG6P ve NADP değeri 7 olguda yüksek, NAD kullanımı tüm olgularda yüksek, dNADP kullanımı 6 olguda yüksek, galaktoz kullanımı ise 7 olguda yüksek bulunmuştur (Tablo 3). O olguların eritrosit membran protein sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. Tabloda gözlemlendiği gibi 3 olguda Spektrin eksikliği, 1 olguda Ankyrin eksikliği ve 6 olguda da Band 3 eksikliği bulunmuştur. Tablo 5'de gözlemlendiği gibi SOD enzim düzeyi 1 olguda yüksek, MDA değeri ise 6 olguda yüksek bulunmuştur.

TARTIŞMA

Aerobik organizmalarda moleküler oksijenin varlığı ve bunun elektron alma eğiliminden dolayı, reaktif oksijen türleri hücrelerde sürekli dolaşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen reaktif oksijen türleri protein, lipid ve nükleik asit gibi önemli hücrenel bileşenlerle reaksiyona girebilme özelliğindedir. Reaktif oksijen türlerinin yaşlanmayla ve ayrıca bir çok hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır (19-21).

Organizmada reaktif oksijen türlerinin hasar oluşturuca etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri

gelişmiştir. Normal koşullarda bu toksik türlerin hasar oluşturuca etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir. Esasında serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddeler ve infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli moleküllerdir. Ancak serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (22)

Eritrositler sürekli hücre içi ve hücre dışı serbest radikallere maruz kalmaktadır. Çünkü membranları poliansatüre yağ asitlerinden zengindir. Ayrıca sürekli olarak yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalırlar ve güçlü geçiş metallere sahiptirler. Bunun yanında eritrosit içerisinde sürekli olarak oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesi süperoksit anyonlarının oluşmasına neden olmaktadır (23). Eritrositlerin dışında granülositler, makrofajlar ve metabolik olarak aktif hücreler hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu üretirler. Bu ürünler ekstrasellüler alana diffüze olabilirler ve muhtemelen eritrositlerle etkileşirler. Eritrositlerde lipid peroksidasyonunun artmasının bir diğer nedeni serbest radikaller artarken antioksidanlarda görülen azalmadır.

Hemoglobin lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Peroksitlere fazla maruz kalma lipid peroksidasyonuna ve OH[•] oluşumuna neden olabilen demir iyonlarının salınımına öncülük edebilir. Ancak normal eritrosit, oksidatif hasara karşı oldukça dirençlidir. Çünkü etkin bir koruma mekanizması vardır. Hücrenin iç kısmı katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz bakımından zengin ve ayrıca oksidatif olarak modifiye proteinleri hidroliz edebilen bir proteolitik sisteme sahiptir (23).

Reaktif oksijen türleri ve bunun sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünleri bir çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Lipid peroksidasyonu bazı metal şelatörlerini de içine alan bir çok

toksik ajanla ilişkili olup hastalıklara temel hazırlamaktadır. Talasemi majör, G6PD enzim eksikliği ve otoimmün hemolitik anemi gibi çeşitli hemolitik anemilerde eritrositlerin otooksidasyonuna yatkınlığı artmaktadır. Ayrıca eritrosit yaşlanmasında lipid peroksidasyonunun arttığı rapor edilmiştir (24).

Tablo 3. G6PD enziminin kinetik verileri

Olgu	G6PD (Ü/gHb)	Km (µM)		Analog (%)		
		G6P	NADP	NAD	dNADP	Galaktoz
A.S	0	74 ↑	2	4,4 ↑	98 ↑	24 ↑
S.A	2,3	156 ↑	9 ↑	6,1 ↑	73 ↑	82 ↑
G.E	4,0	147 ↑	8 ↑	7,7 ↑	78 ↑	4 ↓
S.D.	1,2	85 ↑	5 ↑	7 ↑	59	25 ↑
H.K	6,0	69	3	6 ↑	65 ↑	35 ↑
E.Y.	5,5	156 ↑	12 ↑	6 ↑	20 ↓	75 ↑
E.R.	3,8	61	26 ↑	61 ↑	89 ↑	9
E.T.	4,6	150 ↑	37 ↑	5 ↑	3 ↓	74 ↑
M.K.	1,5	100 ↑	10 ↑	9 ↑	70 ↑	19 ↑
T.A.	1,9	60	3	1	57	8
Normal sınır	>8	50-70	2-4	>1	55-60	7-15

Tablo 4. G6PD enzim aktivitesi eksik olguların eritrosit membran proteinleri

Olgu	Spektrin (%)	Ankyrin (%)	Band 3 (%)
A.S	22	7	17 ↓
S.A	18	5	17 ↓
G.E	18	6	19
S.D.	21	7	16 ↓
H.K	21	5	21
E.Y.	12 ↓	5	22
E.R.	25	4	17 ↓
E.T.	22	4	18 ↓
M.K.	15 ↓	2 ↓	18 ↓
T.A.	16 ↓	4	20
Normal sınır	201 ± 3	5 ± 1	21 ± 2

Talasemideki genetik defekte bağlı olarak hemoglobin yapımına katılmayan alfa ve beta globin zincirleri eritrosit içinde birikir. Biriken globin zincirlerinin oksidasyonundan sonra Heinz body cisimcikleri meydana gelir. Bunlar hücre içerisinde presipite olarak membran proteinlerine bağlanır ve normal eritrositin yapı ve fonksiyonu bozarlar.

Talasemili hastaların ve demir eksikliği olan bireylerin eritrositlerinde hemoglobin miktarının azaldığı bilinmektedir. Bu durum talasemililerde hidrojen peroksit ile inkübasyon sonucu globin oligomerlerinin oluşması ve peroksidasyon sonucu görülen oksidatif hasarlar nedeniyle ana eritrosit membran proteinlerinde bozulmaya neden olur. Demirin fazla miktarda bulunması endojen serbest oksijen radikallerinin oluşmasına dolayısıyla eritrositlerde oksidatif hasara neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca demir iyonlarının lipidi katalize ettiği ve fenton reaksiyonu ile de protein peroksidasyonuna katıldığı bilinmektedir. Oksidatif hasar sonucu eritrosit membranındaki hasarlar membran yapısında yer alan lipidlerin peroksidasyonu nedeniyle de ortaya çıkabilir (25,26). Lipid peroksidasyonundaki bozukluk membran yapısını, dolayısıyla membran proteinlerini etkiler. Lipid peroksidasyonun sekonder ürünü olan malondialdehitin (MDA) ölçümüyle bunun miktarı saptanabilir (27). Bu çalışmada, α-talasemili 2 olguda SOD (EY, FS) enzim aktivitesinin ve MDA düzeyinin arttığı ve eritrosit membran proteinlerinden Band 3'ün eksik olduğu gözlenmiştir (Tablo 1,2). Aynı şekilde G6PD enzim eksikliği olan 6 olguda MDA düzeyinin yüksek ve Band 3 proteininin eksik olduğu fakat SOD enziminde bunlara paralel olarak artış veya düşüş gözlenmemiştir. (Tablo 4,5).

Sitoplazmik bir enzim olan G6PD pentoz fosfat yolunun ilk basamağında NADP'ye hidrojen transfer edilmesinden sorumludur. Bu basamakta üretilen NADPH hücrelerde redükte glutatyonun oluşmasında ve birçok biyosentetik reaksiyonlarda gerekli bir kofaktördür. Redükte glutatyon hücredeki oksidatif metabolitlerin bir temizleyicisi gibi davranır ve glutatyon peroksidaz enziminin yardımıyla hidrojen peroksidi suya dönüştürür. G6PD aktivitesinin azalması hücre içinde oluşan serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonu için



gerekli olan NADPH oluşumunu bozar sonuçta hücrede antioksidan sistem düzeyinde azalış ve membran yapısında bozukluk ortaya çıkar (28,29). Fakat bu çalışmada G6PD aktivitesi eksik ve kinetik yapıları normalden farklı olan olgularda uyumlu olarak SOD artışı veya düşüşü gözlenmemiştir (Tablo 3-5). G6PD enzimi eksik olguların 3 ünde Spektrin, 1 inde Ankyrin ve 6 sında Band 3 eksikliği saptanmış ancak Band 3 eksikliği olan 6 olguda MDA değerlerinin artmış olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5. G6PD enzim aktivitesi eksik olguların antioksidan sistem düzeyleri

Olgu	SOD (Ü/gHb)	MDA (nmol/L)
A.S.	830↓	3,3↑
S.A.	865	5,5↑
G.E.	840↓	0↓
S.D.	890	3,9↑
H.K.	833↓	0↓
E.Y.	1130	2,7
E.R.	950	3,1↑
E.T.	1355↑	8,4↑
M.K.	818↓	12,6↑
T.A.	1130	2,9
Normal sınır	1030±188	2,2±0,7

Lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA'nın yüksek olduğu α -talasemili ve G6PD enzimi eksik bütün olgularda Band 3 protein eksikliği saptanmış ve sonuç olarak da lipid peroksidasyonunun membran proteinlerinden en fazla Band 3 proteinini etkilediği gözlenmiştir..

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF.2000M.18 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Leccia, M.T., Beani, J.C. (1994) Free radicals. Eur. J. Dermatol. 4,387-388.

- Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. Lancet. 344,721-724.
- Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr. Rev. 55,S44-S52.
- Frei, B., Stocker, R., Ames B.N. (1988) Antioxidant defense and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85,9748-9752.
- Yao, J.K., van Kammen, D.P. (2001) Oxidative damage and schizophrania: an overview of the evidence and its therapeutic implications. CNS. Drugs. 15(4),287-310.
- MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur. J. Pharmacol. 429(1-3),195-207.
- Gutteridge, J.M.C. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem. 41(12),1819-1828.
- Kehrer, J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol. 23(1),21-48.
- Yüregir, G.T., İsbir, T. (1984) Incidence and interaction of HbS and G6PD deficiency in Çukurova, Turkey. Doğa. 2,232-243.
- Beutler, E. (1984) Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. s. 68-71, 3rd Ed., Orlando: Grune & Stratton, Inc.
- Yüregir, G.T., Aksoy, K. (1987) Klinik Biyokimya Laboratuvar Teknik ve Yöntemleri. s. 66-79, Adana:Çukurova Üniversitesi Basımevi.
- Aksoy, K., Yüregir, G.T., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1987) Three new G6PD variants, G6PD Adana, G6PD Samandağ and G6PD Balcalı in Çukurova, Turkey. Hum. Genet. 76,199-201.
- Aksoy, K., Yüregir, G.T., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1990) Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD B⁺ varyantı : G6PD Antakya. Ç.Ü. Tıp. Fak. Dergisi. 15(2),186-191.
- Beutler, E. (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene deficiency. N. Engl. J. Med. 324, 169-173.
- Dodge, J.T., Mitchell, C., Hanahan, D.J. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100,119-130.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10,2606-2616.

17. Ohkawa, H., Ohishi, N., Tagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95,351-358.
18. Fridovich, I., Mc Cord, J.M. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for Erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244,6049-6055.
19. Mashima, R., Witting, P.K., Stocker, R. (2001) Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12(4),411-418.
20. Mercuri, F., Quagliaro, L., Ceriello, A. (2000) Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes. Technol. Ther.* 2(4),589-600.
21. Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauveux, M.C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.P., Rainfray, M. (2001) Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age. Ageing.* 30(3),235-241.
22. Halliwell, B. Free radicals and antioxidant: a personal view. (1994) *Nutr. Rev.* 52,253-265.
23. Das, S.K., Nair, R.C. (1980) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br. J. Haematol.* 44,87-92.
24. Hochstein, P., Jain, S.K. (1981) Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Fed. Proc.* 40, 183-188.
25. Meral, A., Tuncel, P., Sürmen-Gür, E., Özbek, R., Öztürk, E., Günay, U. (2000) Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 17(8),687-693.
26. Chakraborty, D., Bhattacharyya, M. (2001) Antioxidant defense status of red blood cells of patients with beta-thalassemia and Ebeta-thalassemia. *Clin. Chim. Acta.* 305(1-2),123-129.
27. Shinar, E., Rachmilewitz, E.A. (1990) Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin. Haematol.* 27,70-82.
28. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry.* 3rd Ed., New York:Worth publishers.
29. Yücel, G., Yeşilkaya, A., Aksu, T.A., Yegin, A., Alıcıgüzel, Y. (1997) Increased resistance to oxidative stress in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient hemolysates in the presence of enzyme substrates. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27(1),55-59.