

DNA, PROTEİNLER VE LİPİTLERDE OKSİDATİF DEĞİŞİMLER ÜZERİNE YAŞLANMANIN ETKİSİ: LENFOSİTLER, ERİTROSİTLER, PLAZMA VE DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİNLERDE İNCELEMELER

Ebru İLHAN, Jale BALKAN, Ümit MUTLU-TÜRKOĞLU, Serdar ÖZTEZCAN,
Alev KURU, Gülçin AYKAÇ-TOKER, Müjdat UYSAL

ÖZET

Serbest radikaller yaşlanmada önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda, genç (21- 40 yaş) ve yaşlı (61-85 yaş) olarak iki alt gruba ayrılan 55 sağlıklı kişinin plazmalarında lipit ve protein oksidasyonu, lenfositlerinde DNA hasarı tayin edilerek oksidatif stres ile yaşlanma arasındaki ilişki araştırılmak istendi. Ayrıca, genç ve yaşlı kişilerin düşük dansiteli lipoproteinlerinde (LDL) ve eritrositlerinde endojen ve uyarmalı lipit peroksit düzeyleri ölçüldü. Sonuçlarımıza göre, yaşlı kişilerin plazmasında lipit peroksit ve protein karbonil düzeylerinin, lenfositlerden elde edilen DNA'da oksidatif hasarın arttığı bulundu. Ayrıca, yaşlı kişilerde LDL ve eritrositlerde lipit peroksit düzeylerinin arttığı saptandı. Bu sonuçlara göre, yaşlı kişilerde oksidatif stresin arttığı açıkça görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, DNA, proteinler, lipitler, yaşlanma, insan

SUMMARY

The effect of aging on oxidative modifications in DNA, proteins and lipids: The investigations in lymphocytes, erythrocytes, plasma and low density lipoproteins. Free radicals play an important role in the process of aging. In this study, we wanted to investigate the relationship between the oxidative stress and aging in humans by determining lipid and protein oxidation in plasma as well as DNA damage in lymphocytes of 55 healthy subjects who were divided into two subgroups of age; young (21-40 years) and elderly (61-85 years). In addition, we determined endogenous and stimulated lipid peroxide levels in low density lipoproteins (LDL) and erythrocytes of young and elderly subjects. According to our results, lipid peroxide and protein carbonyl levels in plasma as well as DNA damage in lymphocytes is found to increase in elderly subjects, lipid peroxide levels also increased in LDL and erythrocytes of elderly subjects. Our results, clearly show the presence of oxidative stress in elderly subjects.

Key words: Oxidative stress, DNA, proteins, lipids, aging, human

GİRİŞ

Serbest radikaller ve lipit peroksitleri yaşlanmada önemli bir rol oynamaktadır (12). Genellikle deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, yaşlanmanın lipitler (8,26), proteinler (10) ve DNA'da (22) oksidatif değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, yaşlanmada oksidatif değişimlerin etkili olmadığını bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (5,13). Öte yandan, serbest radikallerin yaşlanmadaki rolü insanlarda da araştırılmaktadır. Bu araştırmalar büyük oranda lipit peroksit düzeyleri ölçümüne dayanmaktadır

(3,11,15). Bilindiği gibi, serbest radikaller lipitlerin yanısıra protein ve DNA gibi moleküllerini de etkilemektedir. Ancak, yaşlı insanlarda proteinler (11,14) ve DNA'daki (14,17) oksidatif değişimlere ilişkin bulgular azdır ve çelişkilidir. Bu nedenle çalışmalarımızda öncelikle genç ve yaşlı sağlıklı kişilerde plazma lipitleri ve proteinleri ile lenfositlerde elde edilen DNA'da oksidatif değişimler karşılaştırıldı (19).

Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu ateroskleroz patojenezinde etkin bir rol oynamaktadır (25). Yaşlanma önemli bir

aterojen risk faktörü olmasına rağmen, yaşlı kişilerde LDL oksidasyonuna ilişkin çalışmalar yetersizdir (15,23,24). Bu nedenle, çalışmalarımızda yaşlanmanın LDL-oksidasyonu üzerine etkisi de araştırıldı (3). Öte yandan, eritrositler lipit peroksidasyonu çalışmalarında bir model olarak kullanılırlar (6). Çok doymamış yağ asitlerince zengin olmaları, hemoglobün içermeleri bu duyarlılıkta etkili olmaktadır (6). Bununla birlikte, yaşlanmanın eritrositlerde prooksidan-antioksidan dengeye etkisi açıkça bilinmemektedir (2,4). Bu nedenle, çalışmalarımızda yaşlılıkta eritrositlerde lipit peroksidasyonuna duyarlılık da incelendi (2).

MATERYAL ve METOD

Bu çalışma genç (21-40 yaş; ort \pm SD; 30.0 \pm 4.6) ve yaşlı (61-85 yaş; 72.7 \pm 5.8) olarak iki gruba ayrılan 55 sağlıklı kişide (25 erkek, 30 kadın) yapıldı. Çalışmaya katılan tüm kişilerin bilinen bir hastalığı yoktu, rutin laboratuvar bulguları normaldi ve prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen herhangi bir ilaç almıyorlardı. Bu kişilerin benzer sosyoekonomik koşullara ve besin alışkanlıklarına sahip olmasına özen gösterildi. Genç ve yaşlı kişilerden kan örnekleri bir gece açlıktan sonra heparinli ve EDTA'lı tüplere alındı, plazma, eritrositler ve lenfo-

sitler ayrıldı. Plazmada lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehit (MDA) (27), protein oksidasyonunun göstergesi olarak ise protein karbonil (PK) (20) düzeyleri ölçüldü. Lenfositlerden izole edilen DNA'da oksidatif hasar ise Comet yöntemi ile belirlendi (9). Bu yöntem DNA sarmal kırıklarını tek tek hücre düzeyinde direkt olarak gösteren mikroeletroforetik bir yöntem olup hasara sahip DNA'nın görüntüsü floresans mikroskopunda kuyruklu yıldız benzediğinden yöntem 'Comet' yöntemi olarak isimlendirilir (Şekil 1).

LDL plazmadan tamponlanmış heparin kullanılarak elde edildi ve bu fraksiyonda endojen dien konjugatı (DC) (1) ve in vitro bakırla inkübasyon sonrası oluşan MDA düzeyleri ölçüldü (28). Eritrositlerde de endojen ve H₂O₂-uyarmalı MDA düzeyleri tayin edildi. (7) Sonuçlar ort \pm SD olarak verildi. İstatistik değerlendirmeler Student's t-testi ile yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen bulgular Tablo I'de gösterildi. Buna göre yaşlı kişilerde;

a) Plazma MDA ve PK düzeyleri gençlere oranla anlamlı artış gösterdi.

b) Lenfositlerden izole edilen DNA'da endojen ve H₂O₂-uyarmalı DNA hasarı arttı.

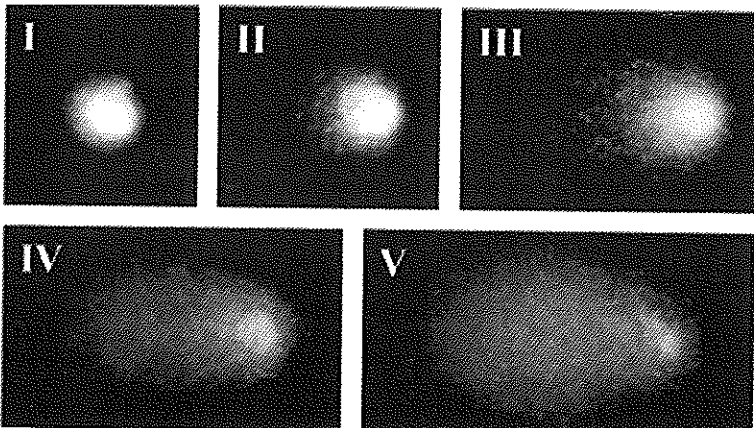
c) LDL'de endojen DC ve bakır-uyarmalı MDA düzeyleri arttı.

d) Yaşlı kişilerin eritrositlerinde H₂O₂-uyarmalı MDA düzeylerinde artış bulundu.

TARTIŞMA

Yaşlanma ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar genellikle lipit peroksidasyon düzeyleri ölçümüne dayanmaktadır (3,8,11,26). Bilin-

Şekil 1. En hasarsız DNA'dan (I), en hasarlı DNA (V)'ya dek değişen DNA floresans mikroskop görüntüleri



Tablo 1. Genç ve yaşlı kişilerin plazma, lenfosit, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve eritrositlerinde oksidatif stres göstergeleri (Ortalama \pm SD)

	Genç Kişiler	Yaşlı Kişiler
PLAZMA		
Lipit peroksidasyonu (μ mol MDA / L)	2.55 \pm 0.75 (n=25)	3.96 \pm 1.12 ^a (n=30)
Protein oksidasyonu nmol PK / mg protein	1.33 \pm 0.32 (n=25)	1.58 \pm 0.44 ^c (n=30)
LENFOSİTLER		
Endojen DNA hasarı (Comet Ünitesi)	65.0 \pm 30.3 (n=25)	130.2 \pm 49.8 ^a (n=30)
H ₂ O ₂ -uyarmalı DNA hasarı (Comet Ünitesi)	165.6 \pm 41.9 (n=25)	232.9 \pm 0.40.1 ^a (n=30)
LDL		
Endojen lipit peroksidasyonu (μ mol DK / L)	65.5 \pm 12.9 (n=25)	84.7 \pm 22.9 ^a (n=25)
Bakır-uyarmalı lipit peroksidasyonu (μ mol MDA / L)	22.0 \pm 4.18 (n=25)	27.3 \pm 4.74 ^a (n=25)
ERİTROSİTLER		
Endojen lipit peroksidasyonu (nmol MDA / ml eritrosit)	7.92 \pm 0.87 (n=25)	8.86 \pm 1.00 ^a (n=25)
H ₂ O ₂ -uyarmalı lipit peroksidasyonu (nmol MDA / ml eritrosit)	139.0 \pm 25.6 (n=25)	172.7 \pm 47.3 ^b (n=25)

^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.05$

MDA= Malondialdehit; PK= protein karbonil; DK= dien konjugatı

diği gibi, lipit peroksidasyonu genellikle MDA, DC ve lipit hidroperoksit düzeyleri ölçülerek incelenmektedir (21). Serbest radikallerin proteinlerde oluşturduğu oksidatif değişimler PK tayini ile (20), DNA'daki oksidatif değişimler ise 8-Hidroksi guanozin düzeyleri ölçümü, alkali elüsyon ve Comet testi gibi yöntemlerle belirlenmektedir (11). Çalışmamızda genç ve yaşlı kişilerde oksidatif stresi belirlemek için plazmada MDA ve PK düzeyleri tayinini ve lenfositlerden elde edilen DNA'da Comet testini uyguladık. Comet testi DNA'daki tek zincir kırıklarını gösteren bir test olup, bu testle endojen DNA hasarı gösterilebildiği gibi, in vitro koşulda H₂O₂ etkisi ile oluşan DNA kırıkları da gösterilebilmektedir. Bu koşuldaki ölçüm daha çok antioksidan potansiyelin bir göstergesidir (9). Öte yandan, MDA tayininin bazı in-

terferanslar gösterdiği bilinmekle birlikte (21), daha önce yaptığımız çalışmalarda plazmada MDA düzeylerinin DC (16), PK ve DNA hasarı (18) gibi ölçümlerle korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle, plazmada MDA tayininin de oksidatif stresi belirlemede uygun bir yöntem olduğunu ileri sürebiliriz. Buna göre, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar yaşlı kişilerde lipit, protein ve DNA'da oksidatif değişimlerin arttığını serbest radikal reaksiyonlarının yaşlanmadaki önemini göstermektedir.

LDL oksidasyonu üzerine incelemeler ateroskleroz çalışmalarında özel bir yer tutmaktadır (21,25). Yaşlılar bir aterojen risk faktörü olduğu için çalışmamızda

genç ve yaşlı kişilerde LDL oksidasyonu, endojen DC ve bakırla inkübasyon sonucu oluşan MDA düzeyleri ölçülerek araştırılmıştır. Sonuçlarımız yaşlı kişilerin LDL fraksiyonunda endojen DC ve bakırla uyandırılmış MDA düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar yaşlılarda LDL oksidasyonunun arttığını gösteren araştırmalarla uyumaktadır (15,24). Çalışmamızda ayrıca eritrositlerin lipit peroksidasyonuna duyarlılığı da incelendi. Bu amaçla, eritrositlerde endojen ve H₂O₂-uyarmalı MDA düzeyleri ölçüldü. Sonuçlarımıza göre, eritrositlerde de lipit peroksidasyonu yaşlı kişilerde artmaktadır.

Sonuç olarak, yaşlı kişilerde DNA, proteinler ve lipidlerde oksidatif değişimlerin arttığı açıkça görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ahotuba M, Ruutu M, Mantyla E: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 29: 139 (1996).
2. Balkan J, Aykaç-Toker G, Uysal M: H₂O₂-induced malondialdehyde formation in erythrocytes of young and elderly subjects. *Med Bull Istanbul* (2003) Baskıda.
3. Balkan J, Kanbağlı Ö, Mehmetçik G, Mutlu-Türkoğlu Ü, Aykaç-Toker G, Uysal M: Increased lipid peroxidation in serum and low-density lipoproteins associated with aging in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 27 (2002).
4. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M: Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 38: 66 (1992).
5. Cini M, Moretti A: Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 16: 53 (1995).
6. Clemens MR, Waller HD: Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 45: 251 (1987).
7. Cynamon HA, Isenberg JN, Nguyen CH: Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clin Chim Acta* 151: 169 (1985).
8. Doğru-Abbasoğlu S, Tamer-Toptani S, Uğurnal B, Koçak-Toker N, Aykaç-Toker G, Uysal M: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mech Ageing Dev* 98: 177 (1997).
9. Duthie S, Collins A: The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measuring using the comet assay) in human cells. *Free Radic Biol Med* 22: 717 (1997).
10. Goto S, Nakamura A: Age-associated, oxidatively modified proteins: a critical evaluation. *Age* 20: 81 (1997).
11. Kasapoğlu M, Özben T: Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 36: 209 (2001).
12. Knight JA: The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 35: 1 (2000).
13. Matsuo M, Gomi F, Dooley MM: Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech Ageing Dev* 64: 273 (1992).
14. Mecocci P, Fano G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U, Beal MF: Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 26: 303 (1999).
15. Mehmetçik G, Özdemirler G, Kanbağlı Ö, Toker G, Uysal M: Age-related changes in plasma lipid peroxidation and antioxidant system in human and rats. *Arch Gerontol Geriatr* 25: 305 (1997).
16. Mehmetcik G, Toker G, Uysal M: Endogenous and copper-induced lipid peroxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. *Horm Metab Res* 29: 63 (1997).
17. Mendoza-Nunez VM, Sanchez-Rodriguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA: Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Ageing Dev* 122: 835 (2001).
18. Mutlu-Türkoğlu Ü, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, Mirsal H, Beyazyürek M, Uysal M: Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J Lab Clin Med* 136: 287 (2000).
19. Mutlu-Türkoğlu Ü, İlhan E, Öztezcan S, Kuru A, Aykaç-Toker G, Uysal M: Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem* (2003) Baskıda.
20. Reznick A.Z, Packer L: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 359 (1994).
21. Sattler W, Malle E, Kostner GM: Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. *Method Mol Biol* 110: 167 (1998).
22. Schmerold I, Nierdermüller, H: Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp Gerontol* 36: 1375 (2001).
23. Schmuck A, Fuller CJ, Devaraj S, Jialal I: Effect of aging on susceptibility of low density lipoproteins to oxidation. *Clin Chem* 41: 1628 (1995).
24. Stulnig TM, Jurgens G, Chen Q, Moll D, Schönitzer D, Jarosch E, Wick G: Properties of low density lipoproteins relevant to oxidative modifications change paradoxically during aging. *Atherosclerosis* 126: 85 (1996).
25. Uysal M: Ateroskleroz, kalp- damar hastalıkları ve serbest radikaller. *Aktüel Tıp Dergisi* 5:15 (2000).
26. Uysal M, Seçkin Ş, Koçak-Toker N, Öz H: Increased hepatic lipid peroxidation in aged mice. *Mech Ageing Dev* 48: 85 (1989).
27. Wasowicz W, Neve J, Peretz A: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substance in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 39: 2522 (1993).
28. Zhang A, Vertommen J, Van Gaal L, De Leeuw I: A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta* 227: 159 (1994).