

SAĞLIKLI İNSANLARDA ERİTROSİT MEMBRANI Na⁺-K⁺ATPaz VE Ca²⁺ ATPaz AKTİVİTELERİNE VE SİYALİK ASİD DÜZEYLERİNE YAŞLANMANIN ETKİSİ*

Hikmet KOÇAK, Pernur ÖNER*

ÖZET

Bu çalışma, eritrosit membranı Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz aktivitelemi ile sialik asid düzeyleri üzerine yaşa bağımlı olabilecek değışiklikleri araştırmak için planlanmıştır. Yaş ortalaması 64 olan 14 yaşlı olgunun eritrosit membranı Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz aktivitelemi de, yaş ortalaması 28 olan 14 gencin enzim aktivitelemi göre anlamlı olmayan azalma saptandı. Hücre içi ve dışı Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonları ile plazma ve eritrosit membranı sialik asid düzeyleri yaşlılarda artırmaya eğilimli bulundu, ancak yalnız plazma Na⁺ artışı anlamlı idi. Bu bulgulara göre; her iki enzim aktivitelemi ilerleyen yaş ile etkilenmediği ve yaşlanma olayının hücre hacmi ve homeostazisi mekanizmalarında ve membran yapısında organizma aleyhine olabilecek değışikliklere yol açmadığı düşünöldü.

Anahtar Kelimeler: Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz, sialik asid, yaşlanma, eritrosit,

SUMMARY

Effect of aging on Erythrocyte Membrane Na⁺-K⁺ATPase and Ca²⁺ ATPase Activities and Sialic Acid Levels in Healthy Subjects. This study was planned to investigate the changes on erythrocyte membrane Na⁺-K⁺ATPase ve Ca²⁺ ATPase activities and sialic acid levels that may be related to aging. An insignificant decrease was obtained in the erythrocyte membrane Na⁺-K⁺ATPase and Ca²⁺ ATPase activities of 14 old subjects with a mean age of 64 according to the enzyme activities of the 14 young subjects whose mean age was 28. The intracellular and extracellular Na⁺ and K⁺ concentrations and the plasma and erythrocyte membrane sialic levels were found with a tendency to increase in the elder subjects but only the plasma Na⁺ increase was significant.

According to these findings, it is thought these two enzyme activities were not affected with increasing age and the aging process do not make some negative changes on cell volume and homeostasis mechanisms and on membrane structure.

Key Words: Na⁺-K⁺ATPase ve Ca²⁺ ATPase, sialic acid, aging, erythrocyte

GİRİŐ

Yaşlanma olayı sırasında oluşan fizyolojik ve biyokimyasal değışikliklerin belirlenmesinde, çeşitli dokularda spesifik enzim aktivitelemiindeki değışikliklerin ölçölmesi önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Yaşlanmadan ileri gelebilecek membran yapısındaki biyokimyasal ve morfolojik değışiklikler, iyonların homeostazisini de bozabilir. Gerçekten insan ve hayvanlarda yapılan tüm vücut elektrolit incelemelerinde hücre içi sodyum konsantrasyonunun ilerle-

yen yaşla birlikte arttığı (2,4,10) ve bunun sodyumun pasif difizyonunda artış ile birlikte aktif transportunda yavaşlamaya bağlı olabileceği bildirilmiştir (4,10). Yaşlanma olayları, kalsiyum homeostazisi ile de ilişkilidir (13).

Na⁺-K⁺ATPaz, membran bütönlüğünün ve hücredeki iyonik asimetrinin, Ca²⁺ ATPaz ise Ca²⁺ homeostazisinin korunmasından sorumlu başlıca membrana-bağlı transport enzimleridir. Yaşlanmaya bağlı, insan ve hayvanlarda eritrosit ve diğer dokuların

Mecmuaya Geldiği Tarih: 18.12.1998

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Faköltesi, Biyokimya Anabilim Dalı, apa, İstanbul.

* İstanbul Tıp Faköltesi Mecmuasının 62:2, 1999 sayısında yayınlanan bu yazı anlam değışikliğine yol açan bazı hatalar nedeniyle tekrar basılmıştır.

Na⁺-K⁺ATPaz aktivitelerinde çoğunlukla azalma (2,3,8,15) veya artma olduğu (7) ya da yaşlanmanın hiçbir etkisinin olmadığı (16,21) bildirilmiştir.

Diğer taraftan, eritrositlerin dolaşımdaki canlılıklarının başlıca belirleyicisi olarak kabul edilen sialik asidin, yaşlı eritrositlerin membranında gençlere göre azaldığı bildirilmiştir (18). Bütün bu bilgilerin ışığında yapılan bu çalışmada, eritrosit membranının önemli yapısal ve fonksiyonel bileşikleri olan membrana-bağlı transport ATPaz aktiviteleri (Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz) ve sialik asid (NANA) düzeylerindeki yaşa bağlı olabilecek değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Yaşları 23-24 (ort:28) ve 51-88 (ort:64) arasında değişen tamamen sağlıklı 14'ü genç, 14'ü yaşlı toplam 28, kadın ve erkekten alınan kan örnekleri çalışmanın materyalini oluşturdu. Tüm olguların boy ve ağırlıkları ölçülerek vücut kitle indeksleri (VKI'leri) hesaplandı. Tüm olgulardan sabah ve aç olarak 20-25 ml heparinli venöz kan alındı. Genç kadınlarda, kan alma devresi olarak postmenstrüel devre seçildi. Alınan heparinli kan hemen 950xg'de 15 dak. soğuk santrifüj edilerek plazma ve kan hücreleri ayrıldı. Plazma ve lökosit ve trombosit zengin üst tabaka su trompuyla uzaklaştırıldıktan sonra eritrositler 3 kez 5 hacim buz soğukluğunda 115 mM MgCl₂ ile (+4C⁰'de 15 dak. 21250xg'de) santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Yıkanmış eritrosit kitlesi bidistile su ile hemoliz edildi. Hemolizatta eritrosit içi Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonları flame fotometri ile ölçüldü (11).

Eritrosit membranı eldesi, Wood ve Beutler (22) metoduna göre yapıldı. 1,5ml çökmüş eritrositler, yaklaşık 30 ml pH 7.4'lük 0.1 mM EDTA ve 7.03 mM Tris bileşimindeki

hemoliz eriyiği ile hemoliz edildi ve +20C'de 15 dak. 23400xg'de santrifüjlendi. Bu işlem, membran tamamen renksiz olarak elde edilinceye kadar en az üç kere tekrar edildi. Elde edilen hemoglobinsiz eritrosit membranında Rahman ve arkadaşlarının (12), Davis ve Blas (5), yöntemleri esas alınarak küçük değişikliklerle Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz aktiviteleri ve total sialik asid düzeyi ölçüldü (6). ATPaz aktiviteleri, 90 dk.'da mg protein başına serbestleşen nmol Pi olarak hesaplandı. Plazma; sodyum, potasyum (11) ve total sialik asid ölçümleri için kullanıldı (19). Enzim süspansiyonlarının içerdiği protein düzeyleri Lowry (9), inorganik fosfor ölçümü ise Taussky ve Shorr (20) yöntemine göre yapıldı.

İstatistiksel analiz yöntemi olarak her iki gruba ait bulguların değerlendirilmesinde Student-t ve farklı varyanslar için Mann Whitney-U testleri uygulandı.

BULGULAR

14 genç olgunun (ort.yaş: 27.85±3.08) VKI: 21.88±2.31, 14 yaşlı olgunun (ort.yaş: 63.85±9.96) VKI: 25.24±2.43 bulunmuştur. Tüm olguların vücut kitle indeksi (kg/m²), normal ağırlığın üst sınırı kabul edilen 27'nin altında bulunmuştur. Genç grupta Na⁺-K⁺ATPaz ; 132.6±55.1 ve Ca²⁺ ATPaz; 664.3±290.6, yaşlı grupta ise Na⁺-K⁺ATPaz ; 109.6±39.9 ve Ca²⁺ ATPaz; 538.1±358.8 olarak bulunmuştur. Yaşlı grupta Na⁺-K⁺ATPaz ve Ca²⁺ ATPaz aktivitelerinde gençlere göre anlamlı olmayan azalma saptanmıştır. Yaşlı grupta saptanan ATPaz aktiviteleri azalmasının % oranları Na⁺-K⁺ATPaz için 17.3, ve Ca²⁺ ATPaz için 18.9 olup istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.

Tablo 1'de gösterildiği gibi, yaşlı grupta gençlere kıyasla plazma ve eritrositlerde Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonlarında ve total sialik asid düzeylerinde anlamlı olmayan artış bul-

Tablo. Genç ve yaşlı olgularda ATPaz aktiviteleri, plazma ve eritrosit Na⁺, K⁺ konsantrasyonları ve sialik asit düzeyleri (Ort. ±SD)

| | Genç Grup | Yaşlı Grup |
|---|-------------|-------------|
| Na ⁺ -K ⁺ ATPaz (nmol Pi/mg prot./90 dk.) | 132.6±55.1 | 109.6±39.9 |
| Ca ²⁺ ATPaz (nmol Pi/mg prot./90 dk.) | 664.3±290.6 | 538.1±358.8 |
| Na ⁺ P (mmol/L) | 139.0±9.4 | 145.0±3.0* |
| K ⁺ P (mmol/L) | 3.8±0.4 | 4.0±0.4 |
| Na ⁺ E (mmol/L) | 7.2±1.3 | 8.1±2.7 |
| K ⁺ E (mmol/L) | 113.6±8.1 | 119.9±8.9 |
| Plazma T. Sialik asit (mmol/L) | 1.9±0.3 | 2.1±0.3 |
| Eritrosit membranı T. Sialik asit (µmol/g prot.) | 100.8±25.6 | 111.0±28.2 |

*p<0.05

Na⁺P: Plazma, K⁺P: Plazma, Na⁺E: Eritrosit, K⁺E: Eritrosit

lanmuş olup sadece plazma Na⁺ konsantrasyonunda orta derecede anlamlı (p<0.05) bir artma bulunmuştur.

TARTIŞMA

Organizma (konak) yaşlanmasının membran transport fonksiyonu ve önemli yapısal bileşeni olan sialik asit üzerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada, yaş ortalaması 65 civarında olan yaşlılarda, membrana-bağlı ATPaz aktivitelerinde anlamlılık olmayan azalma saptanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada da 17-40 yaş ile 41-60 yaş arasındaki kişilerde benzer sonuçlar elde edilmiş ve 60'lı yaşlardan önce Na⁺-K⁺ATPaz enzim aktivitesinin değişikliğe uğramadığı bildirilmiştir (3).

Genç ve yaşlı kişilerde eritrosit membranı enzim aktivitelerinde anlamlı farklılık bulunmamasını şu yargılara bağlayabiliriz; a) Öncelikle yaşlanmaya bağlı olarak eritrosit membranı fonksiyonel ATPaz birimleri sayısında bir kayıp olmadığını düşünebiliriz. Çünkü, Na⁺-K⁺ATPaz baskılanmasında primer olay, Na⁺-K⁺ATPaz birimleri sayısındaki azalmadır (3). Diğer olasılıklar b) membran viskozitesinde değişiklik olmadığı, c) ve/veya yaşlanma sonucu dolaşımında Na⁺-

K⁺ATPaz inhibitörü (ya da inhibitörlerinin) artmamış olduğudur.

Genç ve yaşlıların eritrosit membranı Na⁺-K⁺ATPaz 'ında anlamlı bir fark bulunmadığından, yaşlılarda anlamlı olmayan hafif eritrosit Na⁺ konsantrasyonu artışının, artmış ekstrasellüler Na⁺ konsantrasyonu sonucu, sodyumun pasif transportunun uyarılmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, başka araştırmacılar da, yaşlılarda gençlere göre eritrosit Na⁺ konsantrasyonunda anlamlı olmayan artış bulmuşlardır (4). Bir başka çalışmada, genç ve yaşlıların intrasellüler Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (14). Bazıları ise, yalnızca yaşlı kadın grubunda intrasellüler Na⁺ konsantrasyonunda anlamlı bir artış bildirmiştir (19).

Genç ve yaşlı olgularda, gerek plazma gerekse eritrosit membranı sialik asit düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmasa da, yaşlılarda total sialik asit düzeyinin artmaya eğilimli olduğu anlaşılmaktadır. Yaşlanma ve sialik asit düzeyleri ile ilgili literatürdeki nadir çalışmalardan birinde, sağlıklı kadın ve erkeklerde sialik asidin ilerleyen yaşla hafifçe arttığı bildirilmiştir. Yaşlanmanın lenfosit sialik asit düzeylerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada sialik asit, 20-80 yaş

arası erkeklerde 10'ar yaş aralı incelendiğinde anlamlı farklılık göstermemiştir⁽¹⁾. Bizim incelediğimiz yaş grupları olan 20-30 yaşın sialik asit düzeyleri, 51-60 yaş grubuna göre belirgin daha az, 61-70 yaş grubu ile hemen hemen aynı düzeyde, fakat anlamlı bulunmamıştır⁽¹⁾. Bizim olgularımızda yaşlılarda artmaya eğilimli fakat anlamlı bulunmayan plazma ve eritrosit membranı sialik asit düzeyleri ile ilgili bulgularımız, bu literatür bulgularına yine uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, yaşlanma olayının membranın yapısal bileşenlerinde (sialik asit) bir kayıba yol açmadığı gibi, membrana bağlı ATPaz aktivitelerinde de anlamlı değişiklikler saptanmadığından membranöz aktivite ve hücrel homeostazisin normal işlevinin sürdürülmesine engel bir ortam oluşturmadığı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Allalouf D, Komlos L, Notman J, Halbrecht I, Levinsky H: Sialic acid content and sialyltransferase activity in human lymphocytes with advancing age. *Mech Ageing Dev* 44:45 (1988).
2. Amano M, Imata K, Suzuki K, Nakaoka H, Fuji J: Age-related reduction in the number of rabbit erythrocyte Na, K-ATPase. *Tohoku J Exp Med* 159:131 (1989)
3. Bozzo C, Goria M, Marena S, Velgia F, Pagano G: Lymphocyte Na-K-ATPase is reduced in aged people. *Metab.* 8:808 (1990).
4. Cumberbatch M, Morgan DB: Relations between sodium transport and sodium concentration in human erythrocytes in health and disease. *Clin Sci.* 60:555 (1981).
5. Davis PJ, Blas SD: In vitro stimulation of human red blood cell Ca²⁺ ATPase by thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 99:1073 (1981).
6. Deny PC, Denny PA, Allerton SE: Determination of sialic acid using 2-thiobarbituric acid in the absence of hazardous sodium arsenite. *Clin Chim Acta* 131:333 (1983).
7. Est M, Erjavec E, Krzan M: Age-related changes changes of erythrocyte Na⁺-K⁺ATPase activity. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 25:35 (1989).
8. Hennesy J F: Vascular tissue Na⁺-K⁺ATPase activity and aging in the F344 rat. *Mech Ageing Dev* 43:153 (1988).
9. Lowry OH, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J.: Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193:265 (1951).
10. Naylor GJ, Dick DAT, Worall EP, Dick EG, Dick P, Boardman L: Changes in the erythrocyte sodium pump with age. *Gerontology* 23:256 (1977).
11. Paci A, Cocci F, Cristofani R, Balzan S, Mezzasalma L, Piras F, Giachetti M, Ghione S: Comparison of intra erythrocyte and intraleucocyte sodium content and erythrocyte fragility in normotensive subjects. *J Nuclear Med Allied Sci* 32:101 (1988).
12. Rahman M, Koh H, Primera MI, Del Grmeco F, Quintanilla AP: Na-K-Adenosine triphosphatase and cation content in the erythrocyte in essential hypertension. *J Lab Clin Med* 107:337 (1986).
13. Samaja M, Rubinacci A, Motterlini R, De Ponti A, Postinaro N: Red cell ageing and active calcium transport. *Exp Gerontol* 25:279 (1990).
14. Schmalzing G, Pfaff E, Breyer-Pfaff U: Red cell ouabain binding sites, Na⁺-K⁺ATPase and intracellular Na⁺ as individual characteristics. *Life Sci* 29:371 (1981).
15. Schulte BA, Schmiedt RA: Lateral Wall Na⁺-K⁺ATPase and endocochlear potentials decline with age in quietreated gerbils. *Hearing Res* 61:35 (1992).
16. Simat BM, Morley JE, From AHL, et al.: Variables affecting measurement of human red cell Na⁺-K⁺ATPase activity technical factors feeding, aging. *Am J Clin Nutr* 40:339 (1984).
17. Stefenelli N, Klotz H, Engel A, Bauer P: Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections and chronic liver diseases. *J Cancer Res Clin Oncol* 109:55 (1985).
18. Stibler H, Sydow O: The sialic acid and galactose concentrations in erythrocyte membranes in patients with myotonic dystrophy, limp-girdle and facioscapulo humeral dystrophy. *J Neurological Sci* 59:389 (1983).
19. Sydow G: A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochim Acta* 44:1721 (1985).
20. Taussky HH, Shorr E: A micro colorimetric method for determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202:675 (1953).
21. Tozzi-Ciancarelli MG, Fedele F, Tozzi E, et al : Age-dependent changes in human erythrocyte properties. *Clin Hemorheology* 9:999 (1989).
22. Wood L, Beutler E: Temperature dependence of sodium potassium activated erythrocyte adenosine triphosphatase. *J Lab Clin Med* 70:288 (1967).