

YAŞLANMANIN PLAZMA OKSİDATİF PROTEİN HASARINA ETKİSİ*

Ufuk ÇAKATAY, Ayşegül TELCİ,
İlker Aydın YILMAZ, Tülay AKÇAY,
Ahmet SİVAS

Background and Design.- An increase in oxidative stress may contribute to the development of oxidative protein damage in aging. In the present study, we investigated the relation between aging and oxidative protein damage parameters such as plasma protein carbonyl and protein thiol, as well as oxidative stress parameters such as total thiol, nonprotein thiol and lipid hydroperoxides in the plasma samples of young adult, adult and young old individuals.

Results.- Protein carbonyl and lipid hydroperoxide levels were significantly increased in aging individuals. On the other hand, total thiol and protein thiol levels were significantly decreased in aging individuals. Protein carbonyl, protein thiol, and lipid hydroperoxide levels were significantly correlated with age.

Conclusion.- The result of this study suggests that increased plasma protein carbonyl levels and decreased plasma protein thiol levels in aging individuals may reflect the oxidative protein damage.

Çakatay U, Telci A, Yılmaz İA, Akçay T, Sivas A. The effect of aging on plasma oxidative protein damage. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31: 220-223.

**Anahtar Kelimeler:* Oksidatif protein hasarı, Karbonil, Tiol; *Key Words:* Oxidative protein damage, Carbonyl, Thiol; *Alındığı Tarih:* 30 Haziran 2000; Dr. Ufuk Çakatay, Uz. Dr. Ayşegül Telci, Prof. Dr. Ahmet Sivas: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı; Bio. İlker Aydın Yılmaz, Prof. Dr. Tülay Akçay: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. A Telci, Ataköy 9. Kısım, S2 Blok A Kapısı, Daire 7, İstanbul

<http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2000v31/s4/004a6.htm>

Yaşlanmayla ilgili olarak öne sürülen teorilerden biri olan serbest radikal teorisinde; canlının yaşamı boyunca etkilendiği reaktif oksijen türlerinin (ROS) oksidatif hasara neden olabileceği öne sürülmektedir. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar, yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açar.¹ Daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, serbest radikallerin DNA,^{2,3} proteinler¹⁻⁶ ve lipidlerde^{3,6,7} hasara yol açtığı bildirilmiştir. Diğer taraftan oksidatif strese bağlı olarak oluşan in vivo DNA ve protein hasarının, lipidlerdeki hasardan daha önemli olduğu öne sürülmektedir.⁸ Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir.⁸⁻¹⁰

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil (PCO) düzeylerindeki artış⁸⁻¹⁰ ve protein tiol düzeylerindeki azalma^{11,12} ile karakterizedir. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asid kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PCO ürünleri meydana gelir.^{8,10} PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir.^{8,10} Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiol gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur.^{11,12} Protein

tiolleri (PSH) antioksidan fonksiyonlarını peroksidasyonu başlatan oksidanları tutarak gösterir. Böylelikle vitamin E ve/veya lipidler oksidatif ataktan korunur.¹³

Amacımız plazmada, PCO oluşumu ve PSH azalması ile karakterize olan oksidatif protein hasarının, yaşlanmadan nasıl etkilendiğini ve diğer oksidatif stres parametreleriyle ilişkisini genç erişkin, erişkin ve genç yaşlı bireylerde araştırmaktır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışmada İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarında çalışmakta olan sağlıklı kişilerden ve yakınlarından alınan venöz kan örnekleri kullanıldı. Çalışmamızda genç erişkin, erişkin ve genç yaşlı bireylerin yaş dağılım aralığı sırasıyla (19-25), (26-65), (65-75) yıl olarak kabul edildi^{14,15} ve bu yaş gruplarına uygun sağlıklı gönüllülerden sabah aç olarak 8.00-9.00 saatleri arasında, heparinli vakumlu tüplere venöz kan örnekleri alındı. Çalışmaya alınan gönüllülerin herhangi bir interferansa neden olabilecek antioksidan madde kullanmamalarına dikkat edildi.

Ayrılan plazmalarda oksidatif protein hasarını saptamak amacıyla spektrofotometrik (Ultraspec 4050 LKB) olarak hemen PCO,⁸ oksidatif stresi saptamak için ise total tiol (TSH),¹¹ non-protein tiol (NP-SH)¹¹ ve lipid hidroperoksid (LHP) düzeyleri çalışıldı.¹⁶ Ok-

sidatif protein hasarını saptamakta kullanılan PSH düzeyleri, PSH = T-SH - NP-SH formülünden yararlanılarak hesaplandı.¹¹ Peletlerdeki protein miktar belirtimi *Folin-Lowry* metoduna göre ticari kit ile (Sigma) yapıldı,

Bulgularımızın istatistiksel olarak değerlendirilmesi, SPSS (The Statistical Package for Social Sciences) istatistik programı ile Kruskal-Wallis nonparametrik ANOVA (varyans analizi) ve Spearman korelasyonu kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama (standart sapma olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Bulgularımız Tablo I'de topluca gösterilmektedir. Genç yaşlı grubun plazma PCO düzeyleri, genç erişkin ve erişkinlere göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.001$), P-SH düzeyleri ise anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.001$). Genç yaşlı grubun plazma T-SH düzeyi, genç erişkin ($p < 0.001$) ve erişkinlere ($p < 0.01$) göre anlamlı derecede düşüktü. Genç yaşlı grubun plazma NP-SH düzeyi erişkinlere göre anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ($p < 0.01$). Diğer taraftan genç yaşlı grubun plazma LHP düzeyi genç erişkin ve erişkinlere göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.001$).

Her üç grupta yapılan korelasyon analizinde PCO ile yaş arasında ($r =$

Tablo I. Genç erişkin, Erişkin, Genç Yaşlı Bireylerdeki Oksidatif Protein Hasarı ve Oksidatif Stres Parametreleri (Ortalama±Standart Sapma)

	Genç Erişkin (n=21)	Erişkin (n=20)	Genç Yaşlı (n=18)
PCO (nmol/mg protein)	0.67 ± 0.12	0.61 ± 0.10 a**	0.73 ± 0.12 b*** c***
P-SH (mM)	575.85 ± 105.15	387.16 ± 36.15 a***	287.94 ± 77.48 b*** c***
T-SH (mM)	676.33 ± 33.30	472.57 ± 34.65 a***	402.08 ± 52.66 b** c***
Np-SH (mM)	100.48 ± 26.64	85.41 ± 23.88 a***	114.14 ± 56.10 b**
LHP (mM)	0.700 ± 0.42	0.911 ± 0.50 a***	1.08 ± 0.45 b*** c***

PCO; Protein karbonil, P-SH; Protein tiol, Np-SH; Non-protein tiol, LHP; Lipid hidroperoksid, a: Genç erişkin vs Erişkin, b: Erişkin vs Genç yaşlı, c: Genç erişkin vs Genç yaşlı, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$

0.47, $p < 0.01$) ve PSH ile yaş arasında ($r = -0.79$, $p < 0.001$) korelasyon saptandı. T-SH ile yaş arasında negatif bir korelasyon mevcuttu ($r = -0.72$, $p < 0.01$). NP-SH düzeyleri ile yaş arasında korelasyon saptanmadı ($r = 0.22$, $p > 0.05$). LHP ile yaş arasında korelasyon mevcuttu ($r = 0.47$, $p < 0.05$). PCO ile PSH arasında ($r = -0.11$, $p > 0.05$) ve PCO ile Np-SH arasında ($r = 0.11$, $p > 0.05$) korelasyon saptanmadı. Buna karşılık PCO ile T-SH arasında güçlü bir korelasyon mevcuttu. ($r = -0.51$, $p < 0.001$). PCO ile LHP arasında korelasyon saptanmadı ($r = 0.34$, $p > 0.05$).

TARTIŞMA

Artmış oksidatif stresin yaşlanmada gelişen oksidatif protein hasarındaki rolü güncel olarak ilgi konusudur.^{1,2,5,6,17} Oksidatif protein hasarı sonucunda protein yapısında meydana gelen değişiklikler; agregasyon ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının değişikliğe uğraması olarak sıralanabilir. Bu değişiklikler sonucunda proteolize yatkınlık ve normal fonksiyonda azalma meydana gelir.¹

Garcia- Arumi ve ark.¹⁷ lenfositlerle yaptıkları bir çalışmada; yaşlı bireylerin antioksidan savunma mekanizmalarında yaşla azalma görülmediğini, buna karşılık PCO düzeylerindeki artışa bağlı olarak oksidatif protein hasarında artış görüldüğünü bildirmişlerdir. Diğer taraftan literatür araştırmamız sırasında yaşlanmayla ilgili olarak plazma PCO düzeyleri ile PSH, T-SH ve NP-SH düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda genç yaşlı grubun

plazma PCO düzeylerini, genç erişkin ve erişkinlere göre anlamlı derecede yüksek , P-SH düzeylerini ise anlamlı derecede düşük bulmamızı yaşlanmayla plazma proteinlerinde ortaya çıkan oksidatif protein hasarına bağlamaktayız. Her üç grupta PCO ve PSH ile yaş arasında saptanan korelasyon bu görüşümüzü desteklemektedir. Diğer taraftan yine her üç grupta T-SH düzeylerinde yaşla görülen azalmanın oksidatif protein hasarını gösteren bir bulgu olduğu görüşündeyiz. PCO ile T-SH arasındaki güçlü korelasyon bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksidanlar olan lipid epoksidleri, lipid hidroperoksidleri, lipid alkoksil, peroksil radikalleri ile enallerin yaşlanmayı hızlandırdığı bildirilmektedir.¹⁸ Her üç grupta LHP ile yaş arasında korelasyon saptamamıza karşılık , LHP ile PCO arasında korelasyon saptamadık. Bu nedenle oksidatif protein hasarının ve lipid peroksidasyonunun birbirinden bağımsız mekanizmalarla oksidatif hasara yol açtığı görüşündeyiz.

Sonuç olarak bu çalışma, yaşlanmayla artan plazma protein karbonil düzeyleri ile yaşlanmayla azalan plazma tiol düzeylerinin, oksidatif protein hasarındaki artışın göstergesi olabileceğini ortaya koymaktadır.

ÖZET

Oksidatif strese artış yaşlanma ile gelişen oksidatif protein hasarının sebeplerinden biri olabilir. Bu çalışmada, yaşlanma ile oksidatif protein hasarı parametrelerinden plazma protein karbonil ve protein tiolün yanı sıra, total tiol, nonprotein tiol ve lipid hidroperoksidleri gibi oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi genç

erişkin, erişkin ve genç yaşlı bireylerin plazmalarında araştırdık. Genç yaşlı grupta protein karbonil ve lipid hidroperoksid düzeyleri genç erişkin ve erişkin gruplara göre anlamlı olarak artmıştı. Yaş ile protein karbonil ve lipid hidroperoksid düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmasına karşılık, protein karbonil düzeyleri ile lipid hidroperoksid düzeyleri arasında korelasyon mevcut değildi. Genç yaşlı grupta total tiol ve protein tiol düzeyleri genç erişkin ve erişkin gruplara göre anlamlı olarak azalmıştı. Bu çalışmanın sonuçları yaşlanma ile artan plazma protein karbonil düzeyleri ile azalan plazma tiol düzeylerinin oksidatif protein hasarındaki artışın göstergesi olabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 448-462.
2. Sohal RS, Agarwal S, Sohal BH. Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech Ageing Dev* 1995; 81: 15-25.
3. Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of the rats. *FASEB J* 1996; 10: 1532-1538.
4. De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 53-61.
5. Leeuwenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, Heinecke JW. Oxidized amino acids in the urine of aging rats: Potential markers for assessing oxidative stress in vivo. *Am J Physiol* 1999; 276: 128-135.
6. Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol. Aging* 1995; 16: 53-57.
7. Cai Q, Tian L, Wei H. Age dependent increase of indigenous DNA adducts in rat brain is associated with lipid peroxidation product. *Exp Gerontol* 1996; 31: 373-385.
8. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
9. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 347-357.
10. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300: 145-156.
11. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233:381-385.
12. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB* 1999;13:233-244.
13. Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M. The effect of a-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285:344-350.
14. Beers MH, Berkow R. *The Merck Manual*. 17th Edition. St Ives, Clays Ltd, 1999; 2076-2077.
15. Shuman JM. Nutrition in aging. *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy'de*. Ed. Mahan LK, Escott-Stump S 9th edition. Philadelphia, WB Saunders, 1996; 287-288.
16. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233:182-189.
17. Garcia-Arumi E, Andreu AL, Lopez-Hellin J, Schwartz S. Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin Sci* 1998; 94: 447-452.
18. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 91: 7915-7922.