

Protoporfirinle Fotosensitize Edilmiş Eritrositlerdeki Hemoliz Mekanizmasına Sıcaklığın Etkisi Ve Eritrosit/ Protoporfirin/ İnsan Serum Albümini Sisteminin İncelenmesi[†]

Mehmet Dinçer Bilgin*, A.Eser Elçin**

* Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD. Aydın
** Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitim Bölümü. Ankara

Amaç: Bu çalışmalarda protoporfirinle fotosensitize edilmiş eritrositlerdeki hemoliz mekanizmasına sıcaklığın etkisi ile eritrosit/protoporfirin/insan serum albümini sisteminin soğrulma ve floresans spektrumlarının incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Protoporfirinle fotosensitif hale getirilen insan eritrositleri, çeşitli sıcaklıklarda (5-35°C) görünür ışına maruz bırakılıp, takiben karanlıkta değişik inkübasyon sıcaklıklarında (5-42°C) bekletilerek oluşan gecikmiş fotohemoliz ölçümleriyle birlikte protoporfirin eritrosit ve serum albümin solüsyonundaki soğrulma ve emisyon spektrumları ölçülerek eritrosit/protoporfirin/insan serum albümini sistemi incelendi.

Bulgular: Protoporfirin ile fotosensitize edilmiş eritrositlerde görünür ışık uygulanması ve takip eden karanlık devredeki sıcaklıkların artmasıyla, gecikmiş fotohemolizin hızlandığı görüldü. Spektrometrik incelemelerde eritrosit/protoporfirin/ insan serum albümini sisteminde 632 nm'de kuvvetli ve 700 nm civarında ise zayıf emisyon bandı izlendi. Protoporfirin ile insan serum albümini bulunan ortamda eritrositlerin varlığından bağımsız olarak 648 nm'de oluşan foto-ürün, uygulanan ışık dozu arttıkça azalmaktadır. Bu 648 nm'deki emisyon bandının varlığının eritrositlere bağlı protoporfirin tampon içinde insan serum albüminiyle reaksiyona girdiğini gösterdi.

Sonuç: Gecikmiş fotohemoliz hızı ışık dozunun karesine olan ilişkisinin sıcaklık değişimi sonucu arttığı ve sıcaklığa bağımlı fotohemoliz eğrilerinin "Çok Vuruşlu Hedef Teori" ile uyumlu olduğu saptandı. Eritrosit/protoporfirin/insan serum albümini sisteminin spektral ve fotohemolitik özellikleri, eritropoietik porfir hastalarının eritrositleriyle benzerlik gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Protoporfirin, Fotosensitizasyon, İnsan serum albümini, Eritrosit

The Effect of Temperature on Photosensitization of Erythrocyte Hemolysis by Protoporphyrin and Evaluation of Erythrocyte/ Protoporphyrin/ Human Serum Albumin System

Objectives: In this study, we aimed to investigate the effect of temperature on photosensitization of erythrocyte hemolysis by protoporphyrin. We also investigated absorption and fluorescence spectra of erythrocyte/protoporphyrin/human serum albumin system.

Material and Methods: Delayed photohemolysis measurements were made in photosensitized erythrocytes by protoporphyrin at irradiation temperatures from 5°C - 35°C and post-irradiation incubation temperatures from 5°C - 42°C. By measuring absorption and emission spectra of protoporphyrin on erythrocyte and human serum albumin (HSA) solutions, erythrocyte/protoporphyrin/HSA system was investigated.

Results: Delayed photohemolysis were accelerated at higher irradiation temperature and higher post-irradiation incubation temperature in photosensitized erythrocytes by protoporphyrin. By using spectrometric investigations, strong emission band at 632 nm and a weaker band near 700 nm were determined on erythrocyte/protoporphyrin/HSA system. A 648 photoproduct band was obtained when protoporphyrin was irradiated in the presence of HSA without erythrocyte and this band continued to decrease with increasing irradiation. The formation of the 648 nm band with HSA alone strongly suggests that protoporphyrin bound to erythrocyte reacts with HSA in the buffer.

Conclusion: Delayed photohemolysis rate were increased with the square of the light dose over this range of temperature. These temperature dependent photohemolysis curves are consistent with a kinetic model based on

multihit target theory. The spectral and photohemolysis properties of the erythrocytes/protoporphyrin/HSA system have been of interest in connection with erythrocyte from erythropoietic porphyria patients.

Key Words: Protoporphyrin, Photosensitization, Human serum Albumin, Erythrocyte

+Bu çalışmanın bir kısmı 8-12 Ekim 2003 tarihindeki 15. Ulusal Biyofizik Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Eritrositlerdeki gecikmiş (ışına maruz kaldıktan sonra oluşan) fotohemoliz araştırmalarında çoğunlukla fotosensitif ajan olarak protoporfirin IX (PpIX) kullanılmaktadır.^{1,2} Bu araştırmalarda eritrosit solüsyonu PpIX ile karanlıkta inkübe edilip pre-hemolitik ışın dozuna maruz tutulmaktadır ve takiben %100 hemoliz gerçekleşmesine kadar tekrar karanlıkta bırakılmaktadır. Eritrosit membranında oluşan fotokimyasal hasar, eritrositlere bağlı bulunan fotosensitif ajanların ışığa maruz kalmasıyla tetiklenmektedir.¹ Hemolize yol açan membran hasarına;¹ eritrosit membranındaki hedeflere ışıkla uyarılan fotosensitif ajanın doğrudan etkisi ² eritrosit membranındaki hedeflere singlet oksijen veya aktif oksijen ara ürünlerinin etkisi ve ³ eritrosit membranının bütünlüğünü bozan foto-yıkım ürünlerinin oluşması yol açabilmektedir.³ Gecikmiş fotohemoliz eğrileri, fraksiyonel hemolizin karanlık inkübasyon zamanına karşılık olan grafiğinden elde edilirler ve sigmoid şekildedir. Hücrelerin %50 sinin hemoliz olması için gereken zaman (t_{50}), gecikmiş fotohemoliz hızını değerlendirmede kullanılan bir parametredir. Deneysel olarak değişik konsantrasyonlardaki PpIX veya ışın dozu ile ortam sıcaklığının fotohemoliz eğrilerine olan etkisi, kinetik bir model olan “Çok Vuruşlu Hedef Teori” (ÇVHT) sonuçlarıyla uyum göstermektedir.^{4,5}

Klinikte eritropoietik porfirili (EPP) hastalardaki derinin ışığa duyarlılığında, ışığa bağlı olarak eritrositten serum proteinlerine PpIX transferi olmakta ve takiben PpIX’un endotel hücrelerin membranına transferi olmaktadır. EPP’li hastaların eritrositleri ortamda albümin bulunmadığında hızla fotohemolize uğramakta fakat bu fotohemoliz ortamda insan serum albümini bulunduğu inhibe edilmektedir.^{6,7} EPP’li hastalara karaciğer naklinden önce hem-albümin verilmesi ve plazmaferez uygulanması ile plazma ve eritrosit PpIX düzeylerinde düşüş gözlenmiş ve hastalarda ışığa duyarlılık belirtileri oluşmadığı izlenmiştir.⁸ EPP’li hastalardaki deri belirtileri, protoporfirin endotel hücrelerinde birikmesi ve güneş ışığına maruz kalma sonucu foto-

hasar oluşturması şeklinde gözlenmektedir. Burada, PpIX’un plazmadaki albüminden veya lipoproteinlerden endotel hücrelerin membranına transferi gerçekleşmektedir.⁶ Bu transfer işlemini ışığa maruz kalma hızlandırmaktadır. Bu çalışmada yukarıda özetlenen bulgular, PpIX ile insan eritrositlerinin *in vitro* etkileşmesi bakımından karşılaştırıldı.

Bu çalışmada; PpIX ile fotosensitize edilmiş eritrositlerdeki hemoliz mekanizmasına sıcaklığın etkisiyle eritrosit/PpIX/insan serum albümini sisteminin soğrulma ve floresans spektrumlarının incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Spektrometrik Ölçümler

PpIX, insan serum albümini, metanol ve Triton X-100 (TX100) Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, ABD)’den satın alındı. PpIX’un metanol ve %1’lik TX100 içeren tuzlu fosfat tamponundaki (%0.9 NaCl içeren 10mM fosfat tamponu, pH 7.4) soğrulma spektrumları Unicam (Model UV-530, İngiltere) spektrofotometre ile ölçüldü. PpIX’ın değişik sistemlerdeki (Eritrosit/ PpIX/ İnsan Serum Albümini Sistemi) emisyon spektrumları Hitachi floresans spektrometresiyle (Model FL-2500, ABD) ölçüldü. Bu sistemlerde uyarılma dalga boyu 400 nm olarak kullanıldı. Floresansın şiddetine göre spektrometredeki aralık mesafesi 2.5 nm veya 10 nm olarak seçildi. Bütün işlemleri minimum ışık içeren karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Gecikmiş Fotohemoliz Deneysel Düzenegi

Gönüllü sağlıklı yetişkin erkekte sitratlı tüpe alınan kan 1500 r.p.m 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Serumdan ayrılan eritrositler, 10 mM tuzlu fosfat tamponuyla (pH 7.4) yıkandılar. Eritrosit süspansiyonu hemositometrede $5.0 \pm 0.2 \times 10^7$ hücre/cm³ olacak şekilde sulandırıldı ve örnekler hazırlandı. Bu örnekler tuzlu fosfat tamponunda hazırlanmış çeşitli konsantrasyondaki PpIX ile 37°C etüvde, 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tuzlu fosfat tamponu ile örnekler yıkanarak eritrositlere bağlı olmayan PpIX ortamdan uzaklaştırıldı ve spektrofotometrik olarak eritrositlere bağlı PpIX konsantrasyonu belirlendi.

Hazırlanan örneklerin önce 10 dakika karanlıkta oksijenlenmesi sağlandı. Bu örneklerden ilk grup 24°C’de ve ikinci grup değişen sıcaklıklarda (5°C,

Protoporfirinle Fotosensitize Edilmiş Eritrositlerdeki Hemoliz Mekanizmasına Sıcaklığın Etkisi Ve Eritrosit/ Protoporfirin/ İnsan Serum Albümini Sisteminin İncelenmesi

12°C, 24°C, ve 35°C) 180 sn görünür ışığa maruz bırakıldı. Işık kaynağı olarak Corning C.S. No. 0-52 filtre (>360 nm) filtre edilen 200 W yüksek basınçlı cıva/ksenon ark lambası kullanıldı. Bu kaynağın kuvveti 360-700 nm arasında 14 mW/cm² olarak ölçüldü. Manyetik karıştırıcılı ve sıcaklığı ayarlanabilir 2 x 2 cm cam küvetteki örneklerden ışımayı takiben ilk gruptaki örnekler değişen sıcaklıklarda (5°C, 24°C, 37°C, ve 42°C) ve ikinci gruptaki örnekler ise 24°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre ile OD₇₅₀ (750 nm de ışın saçılımının olduğu optik yoğunluk) ölçümleri yapıldı ve sonra fraksiyonel hemoliz (%100 hipotonik fosfat tampon referans olarak kullanıldı) değerleri belirlendi. Deneysel olarak belirlenen bu değerler ekte açıklanan ÇVHT ile analiz edildi. Bu teoriyi açıklayan matematiksel denklemlerde ışığa maruz kalma sırasındaki fotokimyasal vuru sayısı (m) ve karanlık evredeki termal vuru sayısı (q) kullanıldı.⁵ Bu çalışmada değişken sıcaklıklarda hesaplanan ölçümler Tablo 2' de verildi ve kinetik model parametreleri ÇVHT ile hesaplandı. Bütün deney işlemleri minimum ışık içeren karanlık ortamda gerçekleştirildi. Deney düzenine kontrolünde PpIX içermeyen eritrosit örneklerinin aynı işlemlere maruz bırakılması sonucu ihmal edilebilir seviyede fotohemoliz olduğu izlendi.

İstatistiksel Analiz

Değişen ışığa maruz bırakma ve karanlıkta inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen deneysel gecikmiş fotohemoliz verilerinin analizi için SPSS 12.0 istatistik programı kullanıldı. Non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi sıcaklık

uygulamalarının deneysel verilerinin değerlendirilmesi için kullanıldı. Deneysel verilerle ÇVHT ile hesaplanan verileri ise Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Protoporfirin Soğrulma ve Floresans Spektrumları

PpIX'un metanol ve %1'lik TX100 içeren tuzlu fosfat tamponundaki solüsyonları soğrulma spektrumunda monomer yapı göstermektedir. Bu spektrumlarda PpIX 408 nm' de kuvvetli soğrulma bandı ile uzun dalga boylarında azalan zayıflıkta 4 adet Q bandı izlendi (Şekil 1). Buna karşılık gelen floresans spektrumunda 631-635 nm'de kuvvetli, 700 nm yakınında da zayıf emisyon bandı gözlemlendi (Şekil 2). PpIX'un değişik sistemlerde ölçülen floresans emisyon tepe dalga boyları Tablo 1'de verilmektedir. İnsan serum albümini ve eritrositlere bağlı PpIX'un emisyon spektrumundaki tepe noktalarının, PpIX'un metanol ve TX100'daki değerleriyle benzerlik taşıması, PpIX monomerlerinin baskın floresans ajan olduğunu göstermektedir.

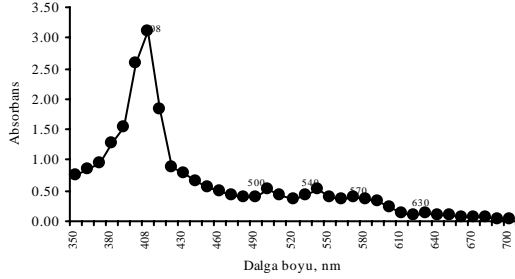
Floresans spektrometrik incelemelerde, insan serum albümini/ PpIX/ eritrosit sisteminde 632 nm'de kuvvetli ve 700 nm civarında ise zayıf emisyon bandı belirlendi. Bu emisyon bantlarında floresans şiddetinin birbirine oranı 4:1 şeklindedir. Tablo 1'de görülen emisyon tepe dalga boylarındaki floresans şiddet değerleri için de, bu oran yaklaşık olarak aynıdır.

Tablo 1. Protoporfirin değişik sistemlerdeki floresans değerleri

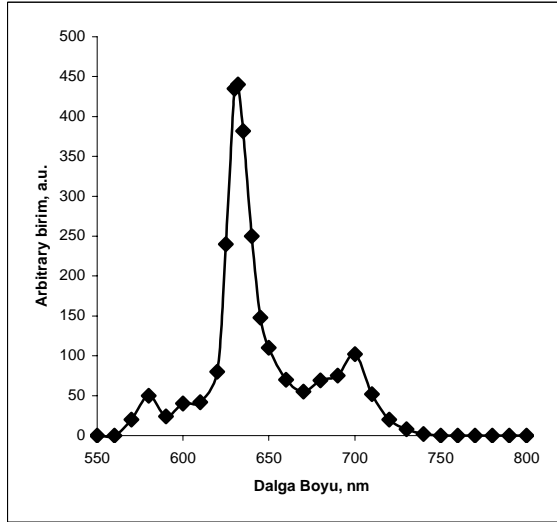
Sistem *	Aralık mesafesi	Emisyon tepe dalga boyları ve floresans şiddet değerleri (arbitrary unit; a.u.)	
PpIX / Metanol	2.5 cm	631±0.2 nm 1800±100	699±0.6 nm 350±40
PpIX / %1'lik TX100 / Tuzlu fosfat tamponu	2.5 cm	632±0.4 nm 2600±200	700±0.2 nm 500±60
PpIX / İnsan serum albümini / Tuzlu fosfat tamponu	2.5 cm	633±1 nm 40±4	703±2 nm 11±2
	10 cm	633±1 nm 400 ±20	699±2 nm 120±25
PpIX / Eritrosit solüsyonu / Tuzlu fosfat tamponu	2.5 cm	636±1 nm 25±2	705±3 nm 6±3
	10 cm	635±1 nm 220±8	703±1 nm 50±5

* 5 µM PpIX ve 30 µM insan serum albümini kullanılmıştır. Tepe noktasında floresans şiddet değeri ± %10 içerisindedir. Her bir durum için deney 3 kere tekrarlanmıştır.

Şekil 1. PPIX'un %1'lik TX100 içeren tuzlu fosfat tamponundaki soğrulma spektrumu



Şekil 2. PPIX'un (1 µM) %1'lik TX100 içeren tuzlu fosfat tamponundaki floresans emisyon spektrumu



PPIX ile insan serum albümini bulunan ortamda, floresans spektrumunda eritrositlerin varlığından bağımsız olarak 648 nm'de oluşan foto-ürün, maruz bırakıldığı ışın dozu arttıkça azaldığı izlendi. Bu emisyon bandının varlığı, eritrositlere bağlı protoporfirin tampon içindeki insan serum albüminiyle reaksiyona girdiğini göstermektedir.

Gecikmiş Fotohemoliz Ölçümlerinde Sıcaklığın Etkisi

İnsan eritrosit solüsyonları 24 saat karanlık ortamda, 10 µM PPIX varlığı veya yokluğunda, 24°C veya 37°C'de bekletildiğinde anlamlı bir düzeyde hemoliz göstermediği izlendi. PPIX ile fotosensitif hale getirilen insan eritrositleri, çeşitli sıcaklıklarda (5°C-35°C) görünür ışığa maruz bırakılıp, takiben karanlıkta değişik inkübasyon sıcaklıklarında (5°C-

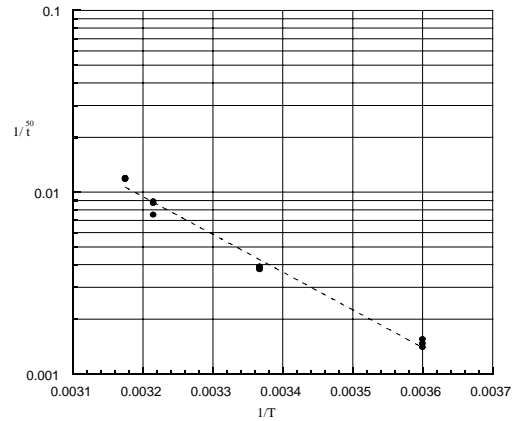
42°C) bekletildiğinde oluşan gecikmiş fotohemoliz hız parametresi olan t_{50} değerleri belirlenerek bu değerler Tablo 2'de verildi. Gecikmiş fotohemoliz hız sabitinin, çeşitli fotosensitif ajanlar için

$$1 / t_{50} = a t_{irr}^k \quad (1)$$

üssel formülü ile hesaplandığı gösterilmektedir.¹⁻⁴ Burada t_{irr} ışına maruz bırakma süresi ve k ise hesaplanan üssel değerdir. PPIX için k üssel değerinin, $T_{irr} = 24^\circ\text{C}$ ve $T_{ink} = 37^\circ\text{C}$ şartlarında 2 olarak hesaplandı. Bu çalışmada, PPIX ile fotosensitize edilmiş gecikmiş fotohemoliz reaksiyonlarındaki $k=2$ değerine, T_{irr} veya T_{ink} sıcaklıklarının önemli etkisinin bulunmadığı belirlendi.

$\log(1/t_{50})$ ' a karşılık $1/T_{ink}$ grafiği ve Arrhenius denklemi kullanıldığında, termal aktivasyon enerjisinin (ΔE) 9.9 ± 0.7 kcal/mol olduğu hesaplandı (Şekil 3). Protoporfirin ile fotosensitize edilmiş eritrositlerde, ışığa maruz bırakılma sırasında veya bunu takip eden karanlık devredeki sıcaklığın artmasıyla oluşan gecikmiş fotohemolizin hızlandığı t_{50} değerlerinin incelenmesi ile Tablo 2' de görülmektedir. Sabit inkübasyon sıcaklığında, sabit ışın dozu, sabit PPIX konsantrasyonunda, ve değişken görünür ışığa maruz bırakma sıcaklığında gerçekleşen gecikmiş fotohemoliz eğrileri Şekil 4'de verilmektedir.

Şekil 3. Gecikmiş fotohemoliz hızının inkübasyon sıcaklığına (°Kelvin) bağlılığı Arrhenius denklemi ile gösterilmiştir. 10 µM PPIX içeren eritrosit solüsyonu 24°C ışına maruz bırakılmıştır. Regresyon çizgisinin eğimi 9.9 kcal/mol olarak aktivasyon enerjisine karşılık gelmektedir.



Protoporfirinle Fotosensitize Edilmiş Eritrositlerdeki Hemoliz Mekanizmasına Sıcaklığın Etkisi Ve Eritrosit/ Protoporfirin/ İnsan Serum Albümini Sisteminin İncelenmesi

Tablo 2. Sıcaklığın gecikmiş fotohemoliz hızı üzerine etkisi ¹

T _{irr} (°C) ²	T _{ink} (°C)	t _{irr} (dakika)	t ₅₀ (dakika) ³	Çok Vuruşlu Hedef Teoriye göre hesaplanan parametreler		
				m	q	□ (dakika ⁻¹)
24	5	3	680±60 (3)	2	3	0.4±0.1
24	24	3	260±40 (3)	2	7	3.0±0.5
24	37	3	115±10 (3)	2	7	6.9±0.6
24	42	3	85±5 (3)	2	7	9.4±0.2
5	24	3	56±4 (3)	2	6	13.8±0.1
12	24	3	51±2 (3)	2	6	15.2±0.2
24	24	3	30±3 (3)	2	4	16.7±0.3
35	24	3	15±2 (3)	2	2	15.2±0.5

¹ Işığa maruz bırakma sıcaklığı, T_{irr}; Karanlıkta inkübasyon sıcaklığı, T_{ink}; Işığa maruz bırakma süresi, t_{irr}; Ortamdaki eritrositlerin %50'sinin hemoliz olması için geçen süre, t₅₀; Fotokimyasal vuru sayısı, m; Termal vuru sayısı, q; Eşleşme sabiti, □.

² Işığa maruz bırakma sıcaklığı (T_{irr}) sabitken 10 µM PpIX + eritrosit solüsyonu kullanılmıştır. Işığa maruz bırakma sıcaklıkları değişken yani karanlıkta inkübasyon sıcaklığı (T_{ink}) sabiten iken 5 µM PpIX + eritrosit solüsyonu kullanılmıştır.

³ Tekrarlanan deney sayısı parantez içinde verilmiştir.

Kruskal-Wallis testi ile yapılan analizde; (1) sabit sıcaklıkta ışığa maruz kalan ve değişik sıcaklıklarda karanlıkta inkübe edilen (p=0.016) ve (2) değişik sıcaklıklarda ışığa maruz kalan ve sabit sıcaklıkta karanlıkta inkübe edilen (p=0.019) örneklerde, gecikmiş fotohemoliz ile sıcaklık arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi ile Şekil 4'deki deneysel veriler ile onlara uygun ÇVHT ile hesaplanan verilerin değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (deneysel 5°C – teorik 5°C için p= 0.069; deneysel 24°C – teorik 24°C için p=0.655; deneysel 37°C – teorik 37°C için p=0.180; deneysel 42°C - teorik 42°C için p=0.285).

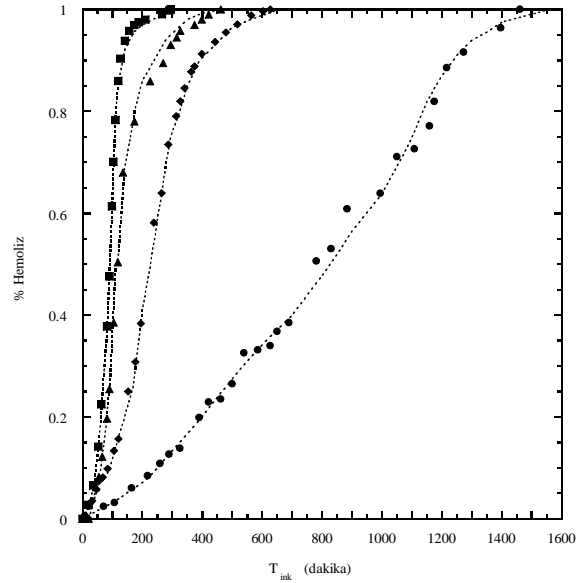
EPP' li hastaların hücrelerinde olduğu gibi, 5 µM PPIX + 30 µM insan serum albümini ile inkübe edilen eritrositler, 5 dakika süreyle 24°C ışına maruz bırakılmalarını takiben 24 saat 24°C karanlıkta bekletildiğinde, belirgin bir hemolitik değişiklik gözlenmedi.

Protoporfirin "Photobleaching" Etkisi

Eritrositlere bağlı 5 µM PpIX' in, 3 dakika ışına maruz bırakılmasıyla %6 "photobleaching" oluşurken, floresans foto-ürün oluşmadı. Bu etki porfirin halkalarının yıkımıyla oluşmaktadır ve oluşan görünür "photobleaching" hızı 30 µM insan serum albümini bulunduğu da yaklaşık olarak benzer saptandı. İnsan serum albüminine bağlı PpIX (ortamda eritrosit olmadığına), ışığa maruz bırakıldığında oluşan foto-ürün spektrumunun, PpIX/insan serum albümini/eritrosit sistemine benzerlik gösterdiği ve sonuçta her iki sistemde de, PpIX'un insan serum

albümini ile reaksiyona girdiği izlendi.

Şekil 4. Gecikmiş fotohemoliz eğrileri; Şekiller: 10 µM PpIX' un eritrosit solüsyonunda 3 dakika süreyle ● 5°C; ◆ 24°C; ▲ 37°C; ■ 42°C ışına maruz bırakılmış takiben sabit 24°C inkübasyon sıcaklığında karanlıkta oluşan deneysel gecikmiş fotohemoliz verileri *Noktali Çizgi*: m=2, q=7 (5°C de 3), ve □ değeri sıcaklık sırasıyla 0.4, 3, 6.9, ve 9.4 dk⁻¹ olacak şekilde Denklem (1) ve (2) kullanılarak "Çok Vuruşlu Hedef Teori" ile hesaplanan veriler



TARTIŞMA

İnsan serum albümini, düşük konsantrasyonlarda PpIX ile duyarlılaştırılmış hücreleri fotohemolize karşı korumaktadır. Bu etkili korumadan insan serum albümin molekülünün yapısının sorumludur.⁹ Ayrıca insan serum albümini ile eritrositlerin bağlanması, PpIX'un insan serum albüminine ve PpIX'un insan

serum albümini varlığında eritrosite bağlanmasının, aynı foto-ürünü oluşturmasıyla desteklenmektedir. PpIX'un insan serum albüminine bağlanması, yapısındaki triptofan kalıntılarının intrinsik floresanslarını söndürmektedir.¹⁰ Bu etkileşim insan serum albümine bağlı PpIX'un zayıf floresans etkinliğini açıklamaktadır. "Photobleaching" reaksiyonu PpIX'un azalmasına yol açan intramoleküler işlemleri içermektedir ve bu tür reaksiyonlar triarilmetan boya ile sığır serum albümini arasında gösterilmiştir.¹¹ Eritrositlere bağlı PpIX (insan serum albümini olmadığı ortamda) düşük floresans etkinliği bağlanma bölgesi etkileşiminin sonucunda oluşabildiği gibi, bağlı PpIX'un büyük kısmının floresans vermeyen yapıda bulunmasından da kaynaklanabilir.

PpIX/insan serum albümini/eritrosit sistemine ışığın etkisi EPP'li hastalardaki deri fotosensitizasyonu ile ilişkili olup, bu hastalardan alınan eritrositler PpIX'un hemoglobin (veya globin) türlerine bağlı olmasıyla ilişkili olarak 626 nm'de floresans ışımaya vermektedirler.¹² EPP'li hücreler morötesi ışığa maruz bırakıldığında 626 nm'de bulunan emisyon bandı 636 nm'ye floresans şiddeti azalarak kaymaktadır.^{6,13} Bu PpIX'un globinden lipid yapılarına hücre içi transferini gösteren bir etkidir ve EPP'li hastalarda benzer reaksiyonlar *in vivo* olarak olmaktadır. Sonuçta aralıklı ışın uygulamalarının eritrositlerdeki PpIX'un önce serum albüminine takiben de derinin endotel hücrelerine transferi sağlanmaktadır.¹³

Bu çalışmada insan serum albümininin eritrosit/PpIX sisteminin floresans değerine karanlıkta etkisi bulunmadığı gösterildi. PpIX'a bağlı eritrositler ve insan serum albümininin benzer floresans spektrumu vermesi, EPP mekanizmasındaki ışığa bağlı olarak insan serum albümininden protoporfirin ortama transferini tam olarak açıklayamamaktadır.

Gecikmiş fotohemoliz mekanizmasında ana pre-hemolitik fotokimyasal hedef eritrosit membranında bulunan band 3 proteindir. Bu sonuç; band 3 proteini fotosensitif ajan olan eosin izotiyosiyanat ile kovalent olarak bağlandığında oluşan gecikmiş fotohemoliz hızının serbest olduğu duruma göre 50-100 kere fazla olmasıyla desteklenmektedir.¹⁴ İnsan eritrositleri 37°C ve daha düşük sıcaklıklarda en az 30 saat inkübe edildiğinde hemoliz gözlenmediği bildirilmektedir.¹⁵ Hipertermi (46°C ile 54°C arasında) tek başına 59 kcal/mol aktivasyon enerjisi ile K⁺ iyonunun hücre dışına çıkmasına neden olmakta ve bunu hemoliz takip etmektedir.¹⁶ Prinsze ve ark. ışığa maruz kalma sonrası devredeki hipertermi ışığa duyarlı hale gelmiş band 3 proteinindeki yapısal

değişikliklerin K⁺ hücre dışına çıkmasının artmasına yol açtığını bildirmektedir.¹⁶

Bu çalışmadaki gecikmiş fotohemoliz termal aktivasyon enerjisinin (Q_{ink}) 9.9±0.7 kcal/mol olması, Q_{ink} sabit T_{irr} değerinde ölçüldüğü için aktifleştirilen işlemlerin sıcaklığa bağlı olarak band 3 proteinindeki değişikliklere bağlanamaz. Gecikmiş fotohemoliz hızı üzerine artırılmış olan T_{irr} etkisi band 3 proteininde yapısal değişiklik ve/veya membran bütünlüğünde değişikliklere neden olmaktadır.

Gecikmiş fotohemoliz hızı sabitinin ışık dozunun karesine olan bağlılığı, ışığa maruz bırakma sonucu oluşan lizis için hücre membranındaki iki hedefin (band 3 proteini ve fosfolipitler) fotokimyasal hasarının gerekli olduğunu işaret etmektedir.¹⁻⁴ Gecikmiş fotohemolizin analizinde, ışına maruz kalma sırasındaki fotokimyasal safha ve takiben karanlıktaki termal safha, hücrenin alacağı fotokimyasal vuru sayısı (m) olasılığı ile orantılı olan 1. derece eşleşme sabiti (α) ile ilişkilidir. Sabit T_{irr} ve T_{ink} sıcaklıklarında gecikmiş fotohemoliz eğrileri, fotokimyasal vuru sayısı (m), termal vuru sayısı (q) ve eşleşme sabiti (α) ile uyum içinde bulunmaktadır.⁴ Bu çalışmada değişken sıcaklıklarda hesaplanan ölçümler ve ÇVHT ile hesaplanan kinetik model parametreleri ile değişken T_{irr} ve T_{ink} sıcaklıklarında k=2 olarak kalması, termal aktivasyonun sadece ara basamaklarının hızını etkilediğini, fakat başlangıçtaki fotokimyasal olayların kinetik reaksiyonlarını etkilemediğini işaret etmektedir. Eşleşme sabitinin (α) ile T_{ink} birlikte artması, fotokimyasal hasarın lizise dönüşmesindeki hız sabitini tanımlanmasında tutarlı olduğu izlenimi vermektedir.

Işık enerjisi; EPP hastalarının dokularında oluşan foto-hasar mekanizmasında rol oynadığı gibi, dokulara toksik PpIX salınımını artırarak hastalığın patogeneğinde de rol alır¹⁷ ve oluşan serbest oksijen radikalleri fotodinamik hücre hasarını da arttırmaktadır. EPP'li hastalarda primer olarak yüzeysel deri kapillerlerinin endotel hücrelerinde gerçekleşen hasar, insan serum albumini gibi ortamdaki protoporfirini bağlayan ajanlar ile azaltılabilir. EPP tedavisinde, klinikte kullanılan β -karoten, deride oluşan fotosensitizasyon belirtilerini bazı hastalarda azaltmasına karşın porfirin düzeyini etkilememektedir.³ Askorbik asit ve α -tokoferol ile birlikte β -karoten kullanılmasıyla bazı hastalarda daha etkili antioksidan inhibisyon sağlamakta ve semptomlar azaltılabilmektedir.¹⁸ EPP tedavisinde kullanılan tedavi seçenekleri henüz semptomları tedavi edici özelliktedir ve araştırmalar sürmektedir.¹⁹

EK: Çok Vuruşlu Hedef Teori (ÇVHT)

Bu teori, fotosensitize edilen eritrositlerde önce fotokimyasal ve takiben termal hasar oluşmasıyla hemoliz meydana geldiğini ileri sürmektedir ve bunu matematiksel olarak açıklamaktadır. Fotokimyasal hasar oluşma olasılığı “m” fotokimyasal vuru sayısı ve takiben termal hasar oluşma olasılığı ise “q” termal vuru sayısı ile açıklanmaktadır. Fotokimyasal safhayı tanımlamak için kullanılan denklem;

$$G(\beta C_e t') = 1 - e^{-(\beta C_e t')} \sum_{v=0}^{v=m-1} (\beta C_e t')^v / v! \quad (1)$$

G :Eritrositte oluşan fotokimyasal pre-hemolitik hasarın olasılığı

β :Birim fotosensitif ajan konsantrasyonu

başına etkili ışık dozu miktarı

C_e :Etkili olan fotosensitif ajan

konsantrasyonunu

t' :Pre-litik ışığa maruz bırakma zamanını

şeklinde ifade edilmektedir.

Termal hemoliz olasılığı aşağıdaki denklem ile tanımlanmıştır;

$$Hp(t) = 1 - e^{-(\alpha G t)} \sum_{u=0}^{u=q-1} (\alpha G t)^u / u! \quad (2)$$

t :Termal inkübasyon zamanı

Hp(t):Termal inkübasyon zamanı sonra fraksiyonel hemoliz oluşma olasılığını

α :Fotokimyasal ve termal safhalar arasındaki eşleşme hız sabiti

G :Eritrositte hemolitik fotokimyasal hasar olasılığını

Bu denklemler soğurulan düşük ışık dozu ve kısa karanlık inkübasyon zamanları için limitler $\beta C_e t' \rightarrow 0$ ve $\alpha G t \rightarrow 0$ olarak tanımlandığı zaman $j = k = m$ eşitliğini gösterir.

KAYNAKLAR

- Grossweiner LI, Fernandez JM, Bilgin MD. Photosensitization of red blood cell hemolysis for photodynamic agents. *Lasers Med Sci* 1998; 13: 42-54.
- Khalili M, Grossweiner LI. Sensitization of photohemolysis by benzoporphyrin derivative monoacid ring A and porphyrins. *J Photochem Photobiol B Biol* 1997; 37: 236-44.
- Grossweiner LI. The science of phototherapy: An introduction. Dordrecht: Springer. 2005.
- Bilgin MD, Al-Akhras MA, Khalili M, Hemmati H, Grossweiner LI. Photosensitization of red blood cell hemolysis for lutetium texaphyrin. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 121-7.
- Bilgin MD, Elçin AE. Fotosensitize edilen eritrositlerdeki hemoliz kinetik modeli: Çok Vuruşlu Hedef Teori. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 5: 5-10.
- Brun A, Sandberg S. Light-induced redistribution and photobleaching protoporphyrin in erythrocytes in patients with erythropoietic protoporphyria: An explanation of the rapid fading of fluorocytes. *J Photochem Photobiol B Biol* 1988; 2: 33-41.
- Brun A, Sandberg S. Mechanisms of photosensitivity in porphyric patients with special emphasis on erythropoietic protoporphyria. *J Photochem Photobiol B Biol* 1991; 10: 285-302.
- Reichheld JH, Katz E, Banner BF, Szymanski IO, Saltzman JR, Bonkovsky HL. The value of intravenous heme-albumin and plasmapheresis in reducing postoperative complications of orthotopic liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *Transplantation* 1999; 67: 922-8.
- Richard P, Blum A, Grossweiner LI. Hematoporphyrin photosensitization of serum albumin and subtilisin BPN. *Photochem Photobiol* 1983; 37:287-91.
- Morgan WT, Smith A, Koskelo P. The interaction of human serum albumin and hemopexin with porphyrins. *Biochim Biophys Acta* 1980; 624: 271-81.
- Indig GL. Photochemistry of triarylmethane dyes bound proteins. In: Dougherty TJ, Katzir A, eds. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy V*, SPIE 1996, 2675: 228-37.
- van Steveninck J, Dubbelman TMAR, de Goeij AFPM, Went LN. Binding of protoporphyrin to hemoglobin in red blood cells of patients with erythropoietic protoporphyria. *Hemoglobin* 1977; 1:679-90.
- Brun A, Sandberg S. Photodynamic release of protoporphyrin from intact erythrocytes in erythropoietic protoporphyria: the effect of small repetitive light doses. *Photochem Photobiol* 1985; 41:535-41.
- Pooler JP. A new hypothesis for the target in photohemolysis: Dimers of the band 3 protein. *Photochem Photobiol* 1985; 43:263-66.
- Gershfeld NL, Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *Membr Biol* 1988; 101: 67-72.
- Prinsze C, Tjissen K, Dubbelman TMAR, van Steveninck J. Potentiation of hyperthermia-induced haemolysis of human erythrocytes by photodynamic treatment. *Biochem J* 1991; 277: 183-8.
- Thunell S, Harper P, Brun A. Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. IV. Pathophysiology of erythropoietic protoporphyria-diagnosis, care and monitoring of the patient. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 581-604.
- Böhm F, Edge R, Foley S, Lange I, Truscott TG. Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *J Photochem Photobiol B Biol* 2001; 65: 177-83.
- Murphy GM. Diagnosis and management of erythropoietic porphyrias. *Dermatol Ther* 2003; 16: 57-64.

Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr. Mehmet Dinçer Bilgin
Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı, 09100 Aydın
Fax : 256 212 3169
Tel : 256 225 3166- 147
GSM : 533 336 9295
E-Posta : mdbilgin@adu.edu.tr