

# ERİTROSİTLERDE İRRADİYASYONDAN SONRA HUSULE GELEN PERMEABİLİTE ARTIŞI \* )

Dr.M. Münip YEĞİN(\*\*)

## ÖZET

742 rad dozunda Gamma radyasyonuna tabi tutulmuş erythrocytlede  $K^{42}$  yardımı ile hücre zar permeabilitesi ölçülmüştür.

İrradiye edilmiş hücrelerde kontrollara göre % 1,7 - 2 nisbetinde permeabilite fazlalığı tesbit olundu.

Bunun, Ektoplazmadaki proteinlerin yan hidrojen bağlarında kopma ve Na-K pompasında hasıl olmuş bir gevşeme ve belki de ATP-aze enziminin zedeienmesi tarzında izahı mümkün olsa gerektir.

"Kırmızı kan küreciklerine  $Co^{60}$  ışınlama cihazı içersinde irradiyasyon tatbikatı yapıлып, bu hücrelerde  $K^{42}$  izotop solusyonu vasıtasıyla zar permeabilite ölçülmüş ve irradiye edilen hücrelerde, kontrollara nisbetle bir permeabilite artışı olayının husule geldiği tesbit edilmiştir".

Bundan önceki bir makalemizde, maya hücreleri (*Saccharomyces Cerevisia*) üzerinde 10.000 rad'lık irradiasyondan sonra, dışarı verilen amino asid miktarlarının kantitatif tayinleri sonucu olarak, hücrelerin zar permeabilitelelerinde bir artmanın mevcut olduğu tesbit edilmiş ve bu sonucun hayvansal hücreler üzerinde ve örneğin eritrositlerde de aynı durumda müşahedeler verdiğinden bahsetmiştik(1).

Bu yazımızla, eritrositleri  $Co^{60}$  ile irradiye ederek yaptığımız müteakip deneylerin sonuçlarını takdim ediyoruz.

## Materiyal ve Metod :

- 1) Eritrositler.
- 2)  $Co^{60}$  ışınlama cihazı.
- 3)  $K^{42}$  klörür aktif solusyonu.
- 4) Geiger Szintillation Gamma sayacı.

170 baş sığır ve 64 baş koyun olmak üzere cem'an 234 kesim hayvanı (Cedvel No. 1), mezbahadaki günlük kesimleri esnasında, boğazlarına tatbik olunan ilk bıçak darbesini müteakip çıkan kanlar, aşağıda terkibi yazılı ve sterilize Citratlı Vasat içerisine alınmış ve hiç vakit kaybetmeden, her gün taze olarak laboratuvarlara en seri

(\*) Bu mesai, Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezinde yapılmıştır.

(\*\*) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Profesörü.

vasıta ile getirilmiş ve bu kanların eritrositleri materyel olarak kullanılmıştır.

#### Cedvel No. I.

Zeytinburnu Mezbahasından alınan taze kanlara aid kesim hayvanlarının çeşit, yaş ve cinsiyetlerini gösteren cedveldir.

Çeşidi	Sığır	Koyun
Sayısı	170	64
Yaşları (ortalama)	5-9 (8 yaş)	2 ay-5 yaş (2 yaş)
Cinsiyetleri :		
Erkek	112	38
Dişi	58	26

#### Citratlı Vasat'ın Hazırlanması :

Trinatrium Citrate	1,32 gr.
Glucose	1,48 gr.
Citrik acid	0,48 gr.
Distile su ile	100 ml ye ta-

mamlanmış ve müteakiben kan bankalarında kullanılan 500 ml'lik lâstik tıkaçlı ve dereceli özel şişeler içerisinde (Tıkaçlarına birer enjektör iğnesi geçirildikten sonra) 110°C da 2 saat süre ile sterilize edilmiştir.

#### *Erythrocytlerin hazırlanma usulü*

Önceden hazırlanmış Citratlı solüsyonu havi şişeler, mezbahaya götürülüp, kullanılacağı anda açılıp taze kan ile 500 ml ye tamamlanmaya kadar doldurulur, kapatılır ve kanın pıhtılaşması için şişe dikkatle ve yavaş yavaş muvafık hareketlerle çalkalanarak karıştırılır.

Laboratuvara getirilen kan, hiç vakit kaybetmeden 100 ml lik santrufuj tüplerine 40 ar ml olarak (eşit miktarlarda) taksim edilir. Üzerlerine onun

yarısı kadar (yani 20 şer ml) Serom fizyolojik ilâve olunur. Her tüpe aid özel cam bagetlerle yavaşça karıştırılır ve sonra 1500 devirli santrufujde 20 dakika çevrilir. Sulu faz ile üstteki Loucocyte tabakası atılır.

Dipteki eritrositler üzerine 60 ml ye tamamlanacak tarzda damıtık su ilâve olup, karıştırılıp, santrufuje edilir; üstteki sulufaz atılır. Böylece eritrositler 3 defa serom fizyolojikle yıkanılır ve bu halde, irradiyasyon deneyine hazır durumdadırlar.

Tüp içersinde kalan eritrositlerin miktarı ortalama olarak 24 ml kadar bir hacim göstermektedir. Buna 16 ml serom fizyolojik ilâve edilerek, tekrar ilk alınan 40 ml lik kan hacmine tamamlanır.

Aynı büyüklükteki iki irradiyasyon kabına 20 şer ml olarak taksim olunur (Bunlardan birisi kontrol ve diğeri ise ışınlanma maksadıyla kullanılacaktır; üzerlerine gerekli etiketler yapıştırılır).

Işınlanacak olan eritrositleri havi kap, Co<sup>60</sup> ışınlama cihazı içersine yerleştirilir, 742 rad dozdaki Gamma radyasyonu ile ışınlanır.

*K<sup>42</sup> Klörür Çözeltilisinin maksada uygun şekilde hazırlanması :*

İzotop Laboratuvarlarından getirilmiş bulunan tahminen 0,05-0,5 mCi K<sup>42</sup>/ml konsantrasyondaki radioaktif solüsyonunun belirli miktarı alınıp yarı ömrü hesap olunur ve serom fizyolojikle, aktivitesinin Szintillation Cihazında sayılmasına müsaide olacağı derecede sulandırılır. Böylece K<sup>42</sup> solüsyonu kullanılmağa hazır duruma gelmiş olmaktadır.

*Eritrositlere K<sup>42</sup> nin talbiki:* Hazırlanmış K<sup>42</sup> solüsyonundan yukarıda anlatılmış bulunan kontrol ve irradie edilmiş eritrositleri havi her iki kaba (yani eritrositlerin üzerine) eşit damlalar miktarında konur ve temiz bagetlerle yavaş yavaş karıştırılır. Müteakiben bunların herbirerlerinden, üzerleri (kontrol ve irradie diye) etiketlenmiş ufak santrufuj tüplerine 5 şer ml (Eritrosit +K<sup>42</sup> li) karışım konur.

#### I. Faz :

Tüplerdeki bu eritrositler (Koyun menşeli olanlar için 1 saat ve sığır menşeli olanlar için ise 2 saat süre) ile bekletildikten sonra santrufuje edilirler (dakikada 1000 devir/ 10 dakika).

Üstteki sulu kısımlardan ayrı ayrı pipetlerle, kontrol ve irradie olarak etiketli Szintillation tüplerine aidiyetine göre 1 er ml konulur (artan sulu kısımlar, aktif artıkları deposuna boşaltılır).

#### II. Faz :

Geriye kalan eritrositler üzerine 2 ml serom fizyolojik konur ve ayrı bagetlerle karıştırılır, yukarıdaki gibi (eritrositlerin menşesine göre 1 ve 2 saat bekletildikten sonra) santrufuj edilir; üsttesi sulu kısımlardan 1 er ml alınıp Faz II. nin (kontrol ve irradie olarak etiketlenmiş) tüplerine konur. Artan sulu faz ile tüpteki eritrositler, yıkantılarıyla beraber aktif artıklar deposuna boşaltılır.

#### Radioaktivitenin Ölçülmesi :

Faz I ve Faz II ye aid içlerinde 1 er ml sıvı bulunan (Kontrol ve irradie) tüplerin aktivitele, Szintillation Chihazında (Photo-Multiplayerde)

vakit geçirmeden ayrı ayrı impuls sayıları olarak ölçülmüştür.

Buraya kadar yapılan işlemi hülsa eder isek, Kırmızı kan küreciklerinin K<sup>42</sup> izotopu vasıtasıyla permeabilitelelerinde bir değişiklik olup olmadığı, yıkılmış kürecikler aktif vasata konup oda ısısında 1-2 saat süre ile istirahata bırakıldıktan ve bu müddet sonunda vasattan KKK alınarak sulu kısmın aktivitesini ölçmek ve daha sonra da dışarı alınmış bulunan KKK nin temiz serom fizyolojik ile muamelesi ve 1-2 saat bekletilişlerinden sonra küreciklerin dışarı alınıp adı geçen vasatın aktivitelelerini ölçmek suretiyle, tesbit edilmiştir.

Bunun için kontrol ve irradie tüplerinin birinci Faz ile ikinci Fazlardaki aktivitelelerini gösteren impuls sayıları T- Kare testine tabi tutulmuş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

2 No.li cedvelde görüldüğü gibi I. Faz (veya aktif Faz) olarak isimlendirilen 234 çift deney tüpü muhteviyatları, kontrol ve irradie grupları arasında KKK ne geçmemiş olan K<sup>42</sup> miktarlarını yüzde nisbeti içerisinde göstermekte ve yapılmış T-Kare testi kontrollerine göre de  $P < 0,01$  gibi bir önemlilik farkının mevcudiyeti ortaya çıkmaktadır. Yani kontrol KKK de % 100 derecesinde bir K<sup>42</sup> bakiyesine rastlanmış iken, irradie KKK de bu bakiyenin % 98 olduğu görülmüş veya bunu ters bir ifade ile dile getirirsek, irradie hücrelele % 100 K<sup>42</sup> dahil olmuş iken, kontrol hücrelele ancak % 98 nisbetinde K<sup>42</sup> girmiş bulunmaktadır ve aradaki fark % 2 kadardır.

Cedvel No.2 : Photomultiplier tipi Szintillation Cihazı ile  $K^{42}$  aktivitesinin ölçülmesi suretiyle elde olunan impuls sayılarının T-Kare testinde kontrolünü gösterir Cetveldir.

Deney grupları	I. Faz (Aktif Faz) : KKK ne geçmeyip vasatta kalmış olan aktivite miktarı		II. Faz (Yıkantı Fazı) : Temiz vasata aktive olunmuş KKK den verilen aktivite miktarı	
	Kontrol	İrradiye	Kontrol	İrradiye
Analiz sayısı	234	234	222	222
$\sum X$	2129.8	2089.1	1957.5	1990.7
%	100	98	100	101.7
$\bar{X}$	9.10	8.93	8.81	8.97
$S_{\bar{x}}$	$\pm 0.52$	$\pm 0.64$	$\pm 0.64$	$\pm 0.72$
t	2,74		0,24	
P	$P < 0,01$		$P < 0,5$	

Bu suretle, irradiye edilmiş KKK içine  $K^{42}$  nin daha kolay girebildiği anlaşılmış oluyor. Yine 2 No. lu Cedvelin II. Faz (veya yıkantı Fazı) olarak adlandırılan 222 çift deneyin Kontrol ve irradiye grupları arasında aktive KKK tarafından temiz vasata verilmiş  $K^{42}$  miktarının yüzde oranı içerisinde tesbit olunduğu görülmektedir. Kontrol KKK nin vasata verdiği aktivite 100 olarak kabul edilirse, irradiye edilmiş KKK nin ortama verdiği aktivite % 101,7 kadardır. Aradaki fark burada 1,7 dir.

Her ne kadar P değeri önemsiz bulunmuş ise de, I. Faz'daki farkın fazla  $K^{42}$  almaları yönünden % 2 irradiye edilen KKK aleyhinde ve buradakinin de fazla  $K^{42}$  verme yönünden % 1,7 yine KKK aleyhinde bir sonucun husule gelmesi, büyük bir ihtimalle (şayet deney sayısı daha fazla arttırılabilseydi) bu ikinci faza aid değerler farkının da önemli bulunacağı hususunu düşündürmektedir.

#### Sonuçların muhakemesi :

Hayatın sırrını kendi içinde saklayan Hücrenin, genellikle Nucleus, Cytoplasma ve Mitochondriumlarındaki bioşimik olaylar hemen hemen birbirine benzemektedir.

HUG ve KELLERER gibi radio-bioloji sahasında çok emeği bulunan Alman araştırmacıları, İrradiyasyonda ilk etkinin hücre Cytoplasmasında ve dolayısıyla hücre zarında başladığını tahmin etmektedirler <sup>2,3</sup>).

TROSCHEIN, marke edilmiş amino asitler vasıtasıyla, onların hücre zarlarından kolayca geçebildiklerini kaydetmiştir<sup>(4)</sup>.

Biz de, 10.000 rad ile irradiye edilen maya hücrelerinden, dış vasata daha fazla amino asit itrahi olduğunu tesbit etmişik <sup>(1)</sup>.

RAJEWSKY, sulandırılmış protein eriyiklerinde irradiyasyonun denatürasyon ve koagülasyona sebep olduğuna şahit bulunmaktadır<sup>(5)</sup>.

Ayrıca, maya hücrelerinin irradyasyonundan bir gün sonra dışarıya fazla Nükleik asid bazlarının ve fazla potasyumun itrah olduğu anlaşıldı(1).

Yukarıdaki çalışmaların ışığı altında, hayvansal bir hücre olan Erythrocytlerin irradyasyonu ve  $K^{42}$  nin yardımıyla, hücre zar permeabilitesinin artıp artmadığı, tarafımızdan incelendi. Erythrocytlerin Potasyum alış verişi miktarları radioaktivite sayesinde ölçüldü ve ışınlanan hücrelerin % 1,7-2 nisbetinde fazla  $K^{42}$  alıp verdiği anlaşıldı.

Yukarıdan beri izah olunan hususlar ve elde edilen bulgular bir araya getirildiği zaman, ekseri müelliflerin inandıkları (2, 3, 4, 5), irradyasyonun hücre zarında bir bozukluğa sebep olduğu hususu, bu mesaimizde daha iyi ifade edilmiş bulunmaktadır.

Hakikatte hücre zarında meydana gelen bu bozukluğun, muhtemelen hücre zarı proteinlerinde yan hidrojen bağlarından bir kısmının kopması ve aynı zamanda zarın aktif transport mekanizmasında bir gevşemenin husulü tarzında izahı mümkün gibi görülmektedir.

Böyle bir durum, hakikatte yalnız hücre zar permeabilitesinin artmış oluşu şeklinde karşımıza çıkmış bulunuyor.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die tierischen Roten Blutzellen wurden durch 742 rad Gamma-Radiation bestrahlt. Danach die Zellmembranpermeabilität sind durch isotope  $K^{42}$  gemessen worden.

Damit wurde es festgestellt, dass die bestrahlte Zellen, nach der Kontrolle, 1,7-2 % höhere Membranpermeabilität haben.

Anlässlich dieser Ergebnisse kann man beurteilen, dass die seitlichen Wasserstoffsbindungen des Ektoplasmas und Na-K Pumpe, sowie ATP-ase von den Zellwänden durch Radiation zerstört worden sind.

### Literatür

- 1) YEĞİN, M.M.: İrradiye hücrelerde zar permeabilitesinin tetkiki ve elde edilen sonuçlar. VI. Milli Türk Biyoloji Kongresi, 15-21 Ağustos 1968- İzmir.
- 2) HUG, O.: Biologische Sofortreaktionen auf schwache Strahlendosen. In. IX th International Congress of Radiobiology, V. 2, Hsg.: B. Rajewsky. G. Thieme Verl. Stuttgart, 13, 1961.
- 3) HUG, O. · KELLERER, A.M.: Stochastik der Strahlenwirkung. Springer Verlag, Berlin, 32, 1966.
- 4) TROSCHEIN, A.S.: Das Problem der Zellpermeabilität. Verl. Gustav Fischer Veb, Jena, 6, 1958.
- 5) NİGGLI - FRITZ, H.: Strahlenbiologie. Georg Thieme Verl., Stuttgart, 8, 1959.

Not: ÇNAM nin izotop Bölümü Yöneticilerine ve Laborantım Bay KÖKSAL BAŞSA'ya teşekkürü borç biliriz.