

FOTOSENSİTİZE EDİLEN ERİTROSİTLERDEKİ HEMOLİZ KİNETİK MODELİ: ÇOK VURUŞLU HEDEF TEORİ *

Mehmet Dinçer BİLGİN¹, A.Eser ELÇİN²

ÖZET

Amaç: Fotosensitize edilmiş eritrositlerdeki hemoliz hız kinetiğini örnek sistem olarak kullanarak, hücre zarındaki fotosensitizasyon mekanizmasının açıklanması amaçlanmıştır. Fotohemolizin ışığa bağlı oluşan hasar (fotokimyasal safha) ve termal aktivasyonun (termal safha) birlikte olan etkisiyle oluştuğunu kabul eden “Çok Vuruşlu Hedef Teori”’de; her safhadaki kinetik düzen özel vuru sayıları ile belirlenebilmektedir.

Yöntem: Fotohemoliz hızı ($1/t_{50}$) = $gL^k C_s^j$ formülüyle hesaplanmış olup, t_{50} sistemde %50 hemoliz olması için gerekli olan karanlık inkübasyon zamanını, L uygulanan ışık dozunu, C_s protoporfirin konsantrasyonu, g reaksiyon sabitini, k ve j ise ölçülen üssel değerleri belirtmektedir. Deneyde, pH 7.4, 10 mM tuzlu fosfat tamponda hazırlanan insan eritrositleri değişik konsantrasyonlarda protoporfirin IX ile fotosensitif hale getirilmiş ve ışığa maruz bırakılarak gecikmiş fotohemoliz ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca gecikmiş fotohemoliz verileri “Çok Vuruşlu Hedef Teori” kullanılarak incelenmiştir.

Bulgular: Fotohemoliz eğrileri s-şeklinde olup, düşük protoporfirin konsantrasyonu ve ışınlama zamanında t_{50} değeri daha uzamış olarak ölçülmüştür. Gecikmiş fotohemoliz ölçümlerinde, fotohemoliz hızının soğurulan ışının karesiyle orantılı olduğu belirlenmiştir. Deneyel ve modelle hesaplanan fotohemoliz eğrileri uyum içindedir.

Sonuç: “Çok Vuruşlu Hedef Teori” ile, fotohemoliz sonuçlarının karakterize edilmesi ve karşılaştırması açısından önemli olduğu gösterilmiştir. Bu kinetik modelle belirlenen değişik konsantrasyonda fotosensitif ajan ve ışık dozunun fotohemoliz eğrileri üzerine olan etkisinin, ölçülen deneyel verilerle uyum içinde olması ile “Çok Vuruşlu Hedef Teori” desteklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: “Çok Vuruşlu Hedef Teori”, eritrosit membranı, fotohemoliz, kinetik model, protoporfirin IX.

Kinetic Model of Photosensitized Homolysis of Erythrocytes: Multihit Target Theory

SUMMARY

Aim: By using rate kinetics of photosensitized hemolysis of erythrocyte as a model system, understanding the mechanism of photosensitization on the cell membrane was purposed in this work. Photohemolysis required the combined effect of the light activated (photochemical stage) and thermal (thermal stage) process, and these stages can be represented by “Multihit Target Theory”, defined with photochemical and thermal hit numbers.

Method: Photohemolysis rate was calculated by using $1/t_{50} = g L^k C_s^j$ where t_{50} is the dark incubation time required for 50% hemolysis, L is the incident light dose, C_s is the bound dye concentration, j and k are the “as measured” exponents, and g is the reaction constant. Erythrocyte suspension, which was prepared in pH 7.4 10 mM phosphate buffered saline, was photosensitized with various concentration of protoporphyrin IX and was irradiated by visible light. Then, delayed photohemolysis was measured for each sample, and data were analyzed using “Multihit Target Theory”.

Results: Prolonged t_{50} values were measured on delayed photohemolysis curve (s-shaped) with low protoporphyrin IX concentration and irradiation time. Delayed photohemolysis measurements are indicative of second power dependence of the photohemolysis rate on the absorbed light energy. Photohemolysis data obtained from experiments and kinetic model calculations were in good agreement.

Conclusion: “Multihit Target Theory” is important for characterizing and comparing photohemolysis results. The effects of various concentrations of photosensitizers and light doses on photohemolysis curve were analyzed with kinetic model. Thus, experimental data were in good agreement with recent kinetic model, based on “Multihit Target Theory”.

Keywords: “Multihit Target Theory”, erythrocyte membrane, photohemolysis, kinetic model, protoporphyrin IX.

Fotosensitize edilmiş eritrositlerdeki hemoliz mekanizması son 70 yıldır araştırılmaktadır. Fotohemoliz mekanizmasına ilginin devam etmesinin nedenleri olarak aşağıdaki faktörler sayılabilir: (i) İnsan ve hayvan derisinde birçok ilaç ve kimyasal ajanın oluşturduğu foto-sensitizasyonun *in vitro* olarak eritrositlerdeki fotosensitizasyon ile benzer

özellik göstermesi, (ii) Hücre membranında oluşan foto-oksitatif hasarların ve hemoliz kinetiğinin araştırılmasında eritrositlerin tekrarlanabilir ve iyi karakterize edilmiş bir model sistem oluşturması, (iii) Fotohemolizin, alternatif kanser tedavisi olan fotodinamik tedavinin (FDT) etki mekanizmasındaki erken kan akımı durmasında rol alması.¹⁻³

* Bu çalışmanın bir kısmı 4-6 Eylül 2002 tarihindeki 13. Ulusal Biyofizik Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, AYDIN

² Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Bölümü, ANKARA

Fotohemoliz mekanizması, hız kinetikleri ve bu mekanizmayı etkileyen parametrelerin tümüyle uyumlu olmalıdır. Böylece, geliştirilen kinetik model ile birçok fotodinamik ajan tarafından oluşturulan deneysel veriler analiz edilebilmektedir.^{2,4-6}

Fotosensitif ajanın, eritrositlerle ışığa maruz kalmadan önce etkileşime girdiği fizyolojik durumlara benzerlik gösterdiğinden birçok çalışmada gecikmiş fotohemoliz kullanılmıştır. Gecikmiş fotohemoliz (GFH) deneyinde, eritrosit solüsyonunun fotosensitif ajanla karanlıkta bekletilmesini takiben kontrollü ışık dozuna maruz bırakılmakta ve daha sonra da karanlıkta oluşan hemoliz hızı ölçülmektedir.

Bu çalışmada, eritropoetik porfiri hastalarındaki gibi *in vitro* olarak eritrositlerdeki fotohemolizden sorumlu tutulan kuvvetli hidrofobik bir porfirin türevi olan protoporfirin IX (PPIX) kullanılmıştır. PPIX ile fotosensitize edilen eritrositlerdeki hemolizin hız kinetiğini incelemek ve deneysel olarak elde edilen gecikmiş fotohemoliz hız değerlerinin geliştirilen kinetik model olan “Çok Vuruşlu Hedef Teori” (ÇVHT) ile uyumunun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gecikmiş Fotohemoliz Deney Düzenegi

Gönüllü sağlıklı yetişkin erkekten sitratlı tüpe alınan kan 1500 r.p.m.'de 10 dakika santrifüj edildi. Eritrositler %0.9 NaCl içeren pH 7.4 10 mM fosfat tamponu (Tuzlu Fosfat Tampon) ile yıkandılar. Eritrosit süspansiyonu hemositometrede 5.5×10^7 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı ve örnekler hazırlandı. Bu örnekler tuzlu fosfat tamponunda hazırlanmış çeşitli konsantrasyondaki protoporfirin IX (Sigma Chem. Co., St.Louis, MO, US) ile 37 °C etüvde 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tuzlu fosfat tamponu ile örnekler yıkanarak eritrositlere bağlı olmayan protoporfirin, ortamdan uzaklaştırıldı ve spektrofotometrik (Unicam Model UV-530, İngiltere) olarak eritrositlere bağlı PPIX konsantrasyonu belirlendi. Hazırlanan örneklerin önce 10 dakika karanlıkta oksijenlenmesi sağlandı ve takiben 24 °C de değişen sürelerde görünür ışığa maruz bırakıldı. Işık kaynağı olarak Corning C.S. No.0-52 filtre (>360 nm) ve 2 cm su ile ışını filtre edilen 200 W yüksek basınçlı cıva/ksenon ark lambası kullanıldı. Bu kaynağın kuvveti 360-700 nm arasında 14 mW/cm² olarak ölçüldü. Manyetik karıştırıcı ve sıcaklığı ayarlanabilir 2 x 2 cm cam küvetteki örnekler ışımaya takiben 37 °C de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre ile OD₇₅₀ (750 nm de ışın saçılımının olduğu optik yoğunluk) ölçümler yapıldı ve sonra fraksiyonel hemoliz (%100 hipotonik fosfat tampon referans olarak kullanıldı) değerleri belirlendi. Deneysel olarak belirlenen bu değerler ÇVHT ile analiz edildi. Bütün deney işlemleri minimum ışık içeren karanlık ortamda gerçekleştirildi. Deney düzeneginin kontrolünde PPIX içermeyen eritrosit örneklerinin aynı işlemlere

maruz bırakılması sonucu ihmal edilebilir seviyede fotohemoliz oluşmuştur. Elde edilen deneysel gecikmiş fotohemoliz verilerinin analizi için SPSS 10.0 istatistik programı kullanıldı. Non-parametrik bir test olan Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi deneysel veriler ile ÇVHT ile hesaplanan verileri değerlendirme için kullanıldı.

Kinetik Model

Fraksiyonel hemolizin (f) karanlık inkübasyon zamanına (t) göre grafiğinde hemoliz eğrileri bir gecikme zamanını takiben sigmoid (s) şeklindedir. Gecikmiş fotohemolizde karanlıkta inkübasyon zamanının başlangıcından ölçülen $ve f=0.5$ olması için gerekli olan t_{50} , hemoliz hızını tanımlayan $1/t_{50}$ parametresi ile karakterizedir. Matematiksel olarak t_{50} aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$1/t_{50} = g L^k C_s^j \quad (1)$$

Bu denklemde; t_{50} ile eritrositlerin %50'sinin hemoliz olması için gerekli olan karanlık inkübasyon zamanı, L ile uygulanan ışık dozu, C_s ile sistemdeki fotosensitif ajanın konsantrasyonu, k ve j ile ölçülen üssel değerler, ve g ile denklem sabiti tanımlanmaktadır. GFH de k üssel değeri yukarıdaki denklemde C_s sabit olarak tutulduğunda ve j üssel değeri ise L sabit tutulduğunda hesaplanmaktadır. GFH için literatürdeki j ve k değerleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Deneysel Fotohemoliz Hız Parametreleri

Fotosensitif Ajan	k	j	Kaynak
Benzoporfirin	2.00±0.03	1.88±0.03	⁵
Sodyum Hiperisin	2.06±0.03	1.89±0.14	⁴
Hematoporfirin	1.99±0.02	1.89±0.03	⁵
Photofrin TM	1.82±0.03	1.24±0.08	⁴
Klorin e ₆	2.13	1.42	⁸
Floksasin B	2.00	1.40	⁷
Lutesyum teksafirin	1.94±0.12	-	⁶
Protoporfirin IX	2.08±0.12	1.20±0.10	⁵

Çok Vuruşlu Hedef Teori

Bu teori, fotosensitize edilen eritrositlerdeki hemoliz oluşması için fotokimyasal hasar oluşturan termal aktivasyona ihtiyaç olduğunu ileri sürmektedir. Fotokimyasal hasar oluşma olasılığı m vuru sayısı ile ve fotokimyasal hasardan sonra oluşan termal hemoliz oluşma olasılığı ise q vuru sayısı ile tanımlanmaktadır. ÇVHT'deki fotokimyasal safhayı aşağıdaki denklem tanımlanmaktadır:

$$G(\beta C_e t) = 1 - e^{-(\beta C_e t)} \sum_{v=0}^{v=m-1} (\beta C_e t)^v / v! \quad (2)$$

Bu denklemde, G eritrositte oluşan fotokimyasal pre-hemolitik hasarın olasılığı, β birim fotosensitif ajan konsantrasyonu başına etkili ışık dozu oranını, C_e

etkili olan ajan konsantrasyonunu, t' pre-litik ışına maruz bırakma zamanını, ve m fotokimyasal vuru sayısını göstermektedir. Ayrıca $\beta C_e t'$ terimi t' sonrası biriken ortalama fotokimyasal vuru sayısı şeklinde tanımlanabilir ve bu etkili olan ışın dozu ile orantılıdır. Termal hemoliz olasılığı denklem (3) ile tanımlanmıştır;

$$Hp(t) = 1 - e^{-(\alpha G t)^q} \sum_{u=0}^{u=q-1} (\alpha G t)^u / u! \quad (3)$$

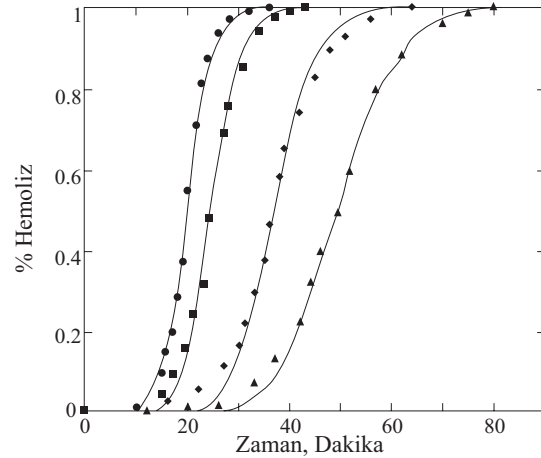
$Hp(t)$ termal inkübasyon zamanı t' den sonra fraksiyonel hemoliz oluşma olasılığını, α fotokimyasal ve termal safhalar arasındaki eşleşme hız sabitini, G eritrositte hemolitik fotokimyasal hasar olasılığını ve q termal vuru sayısını göstermektedir. Denklem (2) ve (3)'de, soğurulan düşük ışık dozu ve kısa karanlık inkübasyon zamanları için limitler $\beta C_e t' \rightarrow 0$ ve $\alpha G t \rightarrow 0$ tanımlandığında $j = k = m$ gösterilir.

BULGULAR

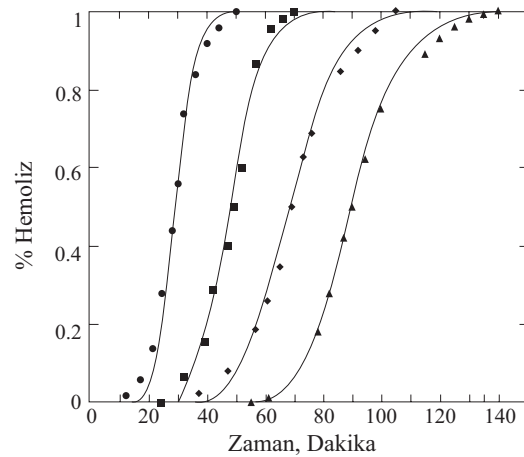
Gecikmiş Fotohemoliz

Deney setlerinde $17 \mu\text{M}$ protoporfirin ile bağlı eritrositlere değişen dozda ($13.5, 11.5, 9.6,$ ve 7.6 Joule/cm^2) görünür ışık uygulanmasıyla sigmoid şekilde olan tipik GFH eğrileri elde edildi. (Şekil 1, işaretler). Bu eğrilerden hesaplanan $1/t_{50}$ lerin ışınım dozlarına (L) olan logaritmik grafiğindeki eğimden deneysel k değeri belirlendi (Tablo 2). Düşük fotosensitif ajan konsantrasyonunda deneysel k değerinin yaklaşık 2 olduğu gösterildi. GFH eğrilerini değerlendirmede t_{50} değerlerinin yanında, karanlıkta % 30 ve 70 hemolizin olduğu zaman hesaplanan t_{30} ve t_{70} değerlerinin t_{70}/t_{30} olarak tanımlandığı "bağıl eğim" (relative steepness = S) kullanıldı (Tablo 2). ÇVHT'de herhangi bir fotokimyasal vuru sayısı değeri için bağıl eğim sadece termal vuru sayısına (q) bağlıdır ve burada S değeri 1.24 olarak hesaplanmıştır.

Denklemler (1) deki ışın dozu sabit tutularak deney yenilendi. Dört değişen konsantrasyonda protoporfirin IX ($6.87, 12, 27.48,$ ve $41.21 \mu\text{M}$) ile bağlı eritrositler 16.8 J/cm^2 ışın dozuna maruz bırakıldı (Şekil 2, işaretler). Hesaplanan $1/t_{50}$ değerlerinin konsantrasyona olan logaritmik



Şekil 1. $17 \mu\text{M}$ protoporfirin IX ile fotosensitize edilmiş insan eritrositlerinde değişen ışın dozlarında oluşan gecikmiş fotohemoliz eğrileri. İşaretler: ● $L=13.5 \text{ J/cm}^2$; ■ $L=11.5 \text{ J/cm}^2$; ◆ $L=9.6 \text{ J/cm}^2$; ▲ $L=7.6 \text{ J/cm}^2$. Çizgi: $m=2$, $q=25$, ve $\alpha=10 \text{ dk}^{-1}$ olacak şekilde Denklem (2) ve (3) kullanılarak hesaplanan "Çok Vuruşlu Hedef Teori" ile hesaplanan verilerle hesaplanmıştır.



Şekil 2. Protoporfirin IX ile fotosensitize edilmiş insan eritrositlerinde sabit ışın dozu ($L=16.8 \text{ Joule/cm}^2$) uygulandığında oluşan gecikmiş fotohemoliz eğrileri. İşaretler: ● $L=41.21 \mu\text{M}$; ■ $L=27.48 \mu\text{M}$; ◆ $L=12 \mu\text{M}$; ▲ $L=6.87 \mu\text{M}$. Çizgi: $m=2$, $q=25$, ve $\alpha=10 \text{ dk}^{-1}$ olacak şekilde Denklem (2) ve (3) kullanılarak hesaplanan "Çok Vuruşlu Hedef Teori" ile hesaplanan verilerle hesaplanmıştır.

Tablo 2. Protoporfirin ile fotosensitize edilmiş insan eritrositlerinde GFH verileri: Deneysel ve kinetik model parametreleri

$C_s (\mu\text{M})$	$L_{\text{ort}} (\text{J/cm}^2)^*$	Deneysel Parametreler		Model Parametreleri ^s	
		$k^{\&}$	$S_{av}^{\#}$	k	S_{av}
1.0	30	2.04 ± 0.16	1.24 ± 0.03	2.01 ± 0.17	1.24
11.6	11	1.97 ± 0.15	1.30 ± 0.02	1.99 ± 0.25	1.24
17	11	1.67 ± 0.10	1.23 ± 0.02	1.66 ± 0.11	1.24
37.8	6	1.52 ± 0.25	1.23 ± 0.03	1.52 ± 0.25	1.24

* Dört değişik ışın dozunun ortalama değerini içeren örnek (3 kez tekrarlanmıştır)

& Denklem (1) de sabit fotosensitif ajan konsantrasyonunda hesaplanmıştır.

$S = t_{70}/t_{30}$ değerlerinden hesaplanmıştır.

^s "Çok Vuruşlu Hedef Teori" ile hesaplanmıştır.

grafisindeki eğimden deneysel j değeri 1.3 ± 0.02 olarak belirlendi. Şekil 2 yardımıyla S değeri 1.21 ± 0.04 olarak hesaplandı.

Geçikmiş fotohemoliz deneysel ölçümlerinde denklem (1) kullanılarak hesaplanan $k \approx 2$ ve $m \approx 2$ sonucu fotohemoliz hızının soğurulan ışınının karesiyle orantılı olduğunu gösteren parametredir.

Elde edilen gecikmiş fotohemoliz verileri ile ÇVHT tarafından hesaplanan veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Bu amaçla Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi ile yapılan analizde $k_{\text{deney}} = 1.79 \pm 0.23$ ve $k_{\text{model}} = 1.79 \pm 0.22$ ($p = 0.382$) olarak hesaplanırken $S_{\text{deney}} = 1.24 \pm 0.03$ ve $S_{\text{model}} = 1.24 \pm 0.00$ ($p = 0.644$) olarak hesaplanmıştır. Model denklemleri kullanılarak hesaplanan değerlerin deneysel veriler ile uygunluk içinde olması ÇVHT desteklemektedir.

Kinetik Modelin Verilere Uygulanması

Fotosensitize edilen eritrositlerdeki hemoliz fotokimyasal safha ve termal safhanın birlikte etkisiyle oluşur. GFH deneysel verilerinin kinetik modele uygunluğu ile ilgili parametreler şöyledir: (i) GFH reaksiyon hızı, eritrositlere bağlı fotosensitif ajan için ışık dozunun karesi ile orantılıdır yani ışığa maruz bırakılan safha (fotokimyasal safha) için olan $m=2$ değeri yada $j=k=2$ değeri, soğurulan ışınımında fotohemoliz hızının karesiyle orantılı olduğunu belirtir. (ii) GFH de j değeri k değerine eşit olmalıdır. Bu tahminde oluşacak farklılıklar deneysel farklılıkların modele eklenmediğinin göstergesidir. (iii) Termal vuru sayısı deneysel bağıl eğim (S) ile ilişkilidir ve buradaki $S = 1.24$ değeri $q=25$ değerine karşılık gelir. (iv) Denklem (3) kullanılarak, $t_{50} = D_q / G\alpha$ şeklinde tanımlandığında D_q terimi termal vuru sayısına (q) yakın bir sayı olarak belirlenmiştir. Matematiksel analiz sonucu sırasıyla 5, 10, 20, 25, 30 olan q değerleri için D_q değerleri sırasıyla 4.67, 9.67, 19.67, 24.67, 29.67 olarak hesaplanmıştır. (v) Eşleşme sabiti (α) deneysel verilere uyacak şekilde 10 dk^{-1} belirlenmiştir. (vi) Şekil 1 ve 2 de çizgi ile gösterilen eğriler ÇVHT için denklem (2) ve (3)'ün kullanılması ile elde edilen matematiksel verilerle oluşturulmuştur.

TARTIŞMA

Fotohemoliz reaksiyonu, soğurulan ışık dozunda doğrusal-olmayan hız kinetiği ile birçok fotokimyasal reaksiyondan farklıdır. Fotosensitize edilen eritrositlerde fotokimyasal safha ve termal safhanın birlikte etkisiyle oluşan fotohemoliz sonuçlarını karşılaştırmak ve analiz edebilmek için niceliksel bir kinetik model gerekliliği üzerine kinetik model geliştirilmiştir. ÇVHT'nin ana hipotezleri kompleks bir olgu olan fotohemolizi açıklamada genel olarak kabul edilen "kolloid-ozmotik" modelle uyum içindedir. Kolloid ozmotik modele göre; fotokimyasal

hasar eritrosit membranının ozmotik özelliklerini değiştirerek, termal evre sırasında hücrenin şişmesine ve sonunda parçalanmasına neden olmaktadır.⁹⁻¹² Kısaca, fotohemoliz mekanizmasını: eritrositlere bağlı fotosensitif ajan tarafından ışığın soğurulmasıyla oluşan singlet oksijen, membran lipid ve protein kısımlarını etkilemektedir. Membran protein yapısının değişmesi sonucu katyon salınımı ve takiben hücre şişmesi gerçekleşmektedir. Fotooksidasyona uğramış lipid kısımlarının birlikte etkisiyle karanlık dönemdeki hemoliz uyarılmaktadır. Fotokimyasal ve termal safhalar GFH'de birbirlerini takip etmektedir. Kinetik modelin matematiksel uygunluğu çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan fotosensitif ajan ve ışık dozu içeren deney gruplarındaki fotohemoliz eğrilerinde gösterilmiştir. ÇVHT ile aynı m , q , ve α değerlerinin kullanıldığı koşullarda oluşturulan gecikmiş fotohemoliz eğrileri, deney ortamında farklı fotodinamik ajanlarca oluşturulan gecikmiş fotohemoliz eğrileriyle uyum içinde olduğu bildirilmiştir.^{2,4,5} Bu çalışmada da deneysel verilerin kinetik model ile uyumluluğu gösterilmiştir.

ÇVHT ile belirlenen kinetik model parametreleri deneysel veriler ile uyum içindedir. Bu modelde GFH için $j > 1$ ve değişen C_s değerlerinde oluşan hemoliz eğrileri için S sabit olarak belirlenmiştir. Flaksasin B ve klorin e₆ için düşük j değeri, bu ajanların eritrositler ve hücre dışı sulu ortam arasında etkileşime girmesindedir.^{7,8,11} Bu tanımlama eritrositlere tamamen bağlanan PPIX için geçerli değildir. Verilerin model ile tahminine göre eritrositlere bağlı PPIX konsantrasyonu artarken k değeri 2.0 dan 1.5 doğru düşmektedir çünkü düşük etkili ışınım değerlerinde (ya düşük C_s ve/veya düşük ışın dozu) $k=2$ değeri uygulanabilir. Yani bu durumda denklem (1)'de hesaplanan k değeri fotokimyasal vuru sayısına (m) eşit olacaktır. Diğer durumlarda $k < m$ denklemi geçerli olacaktır. Daha karmaşık olan j değeri hesaplamalarında PPIX konsantrasyonu rol oynamaktadır. Eritrositlerin intrinsek fotohemoliz mekanizması üzerine karanlıkta PPIX ile bağlanma etkisi bu çalışmada hesaplanan $j=1.2$ değeri açıklayabilir. Eritrositlere PPIX ve merocyanin 540 bağlanmasının, eritrosit şeklinin diskoidden ekinoide değişmesi, hücrelerin şişmesi, K^+ salınımı ve ozmotik hemolize karşı korunma gibi ters etkilere neden olduğu belirtilmiştir.¹³ Grossweiner ve ark. PPIX ile bağlanmanın insan eritrositlerinin ozmotik frajilitesini azalttığını göstermişlerdir.² PPIX için hız kinetiği karanlıkta eritrositlere bağlanma safhasındaki etkileşimlerle değişmektedir. Bu modelle açıklanmaya çalışılan fotohemoliz mekanizması membran yapısını bozan veya fotosensitif ürün oluşturan fotosensitif ajanlar için değişik olabilir.

KAYNAKLAR

1. Bilgin M.D. Biomedical application of photosensitizer. Illinois Institute of Technology,

- Chicago IL, ABD, Doktora tezi, 1999.
2. Grossweiner L.I., Fernandez J.M., Bilgin M.D. Photosensitization of red blood cell haemolysis by photodynamic agents. *Lasers Med Sci* 1998; 13: 42-54.
 3. Ben-Hur E.A., Orenstein A., Livne A., Rosenthal I. Photosensitized oxidation of human red blood cells: Cation effects on volume changes and relevance to blood vessel occlusion. *Lasers Life Scis* 1990; 3: 245-53.
 4. Al-Akhras M.A., Grossweiner L.I. Sensitization of photohemolysis by hypericin and Photofrin. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996; 34: 169-75.
 5. Khalili M, Grossweiner L.I. Sensitization of photohemolysis by benzoporphyrin derivative monoacid ring A and porphyrins. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1997; 37: 236-44.
 6. Bilgin M.D., Al-Akhras M.A., Khalili M., Hemmati H., Grossweiner L.I. Photosensitization of red blood cell hemolysis by lutetium texaphyrin. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 121-27.
 7. Valenzeno D.P., Pooler J.P. The concentration and fluence dependence of delayed photohemolysis. *Photochem Photobiol* 1982; 35: 427-29.
 8. Frolov A.A., Gurinovich G.P. The laws of delayed photohaemolysis sensitized by chlorin e_6 . *J Photochem Photobiol B: Biol* 1992; 13: 39-50.
 9. Davson H., Ponder E. Photodynamically induced cation permeability and its relation to hemolysis. *J cell Comp Physiol* 1940; 15: 67-74.,
 10. Pooler J.P. The kinetics of colloid osmotic hemolysis. *Photohemolysis. Biochim Biophys Acta* 1985; 812: 199-205.
 11. Valenzeno D.P. Photohemolytic lesions: Stoichiometry of creation by phloxine B. *Photochem Photobiol* 1981; 40: 681-689.
 12. Potapenko A. Y. Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1991; 9: 1-7.
 13. Lagerberg J.W.M., Williams M., Moor A.C.E. ve ark. The influence of merocyanine 540 and protoporphyrin on physicochemical properties of erythrocyte membrane *1996; 1278: 247-53.*

YAZIŞMA ADRESİ

Yrd.Doç.Dr. M. Dinçer BİLGİN
Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı, AYDIN 09100

Fax : 0256-212-3169
Tel : 0256-225-3166 x147
Cep : 0533-336-9295

E-Posta : mdbilgin@adu.edu.tr

Geliş Tarihi : 22.04.2004
Kabul Tarihi : 20.12.2004

Teşekkürler: Bu çalışmanın deneysel aşamasının gerçekleşmesinde Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Doku Mühendisliği ve Biyomalzeme Laboratuvarında çalışmalarımıza olanak tanıyan Doç. Dr. Y. Murat Elçin'e teşekkürlerimizi sunarız. Çalışmamıza katkılarından dolayı Prof. Dr. Leonard I. Grossweiner'a teşekkür ederiz.