

HEPATİT C'Lİ HASTALARIN ERİTROSİTLERİNDE SUPEROKSİT DİSMUTAZ VE KATALAZ AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

AYSUN BAY KARABULUT*, YAŞAR BAYINDIR**, ÇETİN ÖZTÜRK***, EMİNE SÖNMEZ****, KADIR BATÇIOĞLU***, ENGİN GÖZÜKARA***

ÖZET

Hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu kronikleşmesi ve tedavi güçlüğü nedeniyle önemini korumaktadır. HCV'li hastalarda interferon alfa tedavisi alanlarda ve almayanlarda eritrosit içi süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerini araştırdık. Bu amaçla Turgut Özal Tıp Merkezi'ne gelen 10 sağlıklı, gönüllü birey kontrol olarak (Grup I), akut hepatit C'li 10 hasta (Grup II), tedavi almamış kronik hepatit C'li 10 hasta (Grup III) ve 6 aylık interferon tedavisini tamamlamış (9 milyon U/ hafta) kronik hepatit C'li 10 hasta (Grup IV) olmak üzere toplam 40 kişide eritrosit SOD ve CAT aktivitesini araştırdık. SOD aktivitesi değerlerini Grup I'de 2145.11 ± 336.78 U/g Hb; Grup II'de 2819.34 ± 336.99 U/g Hb; Grup III'de 1133.75 ± 245.29 U/g Hb; grup IV'te 1782.65 ± 157.50 U/g Hb olarak bulundu. Bütün gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi ($p < 0.0001$). Eritrosit içi ortalama CAT değerleri ise Grup I'de 254.33 ± 69.40 K/g Hb; Grup II'de 254.76 ± 44.15 K/g Hb; Grup III'te 286.62 ± 75.42 K/g Hb; Grup IV'te 218.15 ± 38.86 K/g Hb olarak bulundu. İstatistiki olarak Grup I - III ve Grup I - IV arasındaki fark anlamlıydı. ($p < 0.005$). Sonuç olarak SOD seviyesi tedavi edilen grupta artmış CAT seviyesi ise düşmüştür.

Anahtar Kelimeler: Hepatit C enfeksiyonu, Süperoksit Dismutaz, Katalaz, İnterferon alfa

SUMMARY

THE EVALUATION OF INTRAERYTHROCYTE SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE ACTIVITY IN THE PATIENTS WITH HEPATITIS C INFECTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is still important due to difficulties in treatment and leading to chronic state. In this study, we searched for intraerythrocyte Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) levels in patients with HCV who received and not received interferon alfa. For this goal, four groups of patients [Group I: ten healthy, volunteer individuals served as control group; Group II: 10 patients with acute HCV infection; group III: 10 untreated patients with chronic HCV infections, and group IV: 10 patients who completed six months of interferon therapy (9 million units / week)] included in the study. Superoxide dismutase (SOD) activity was 2145.11 ± 336.78 U/g Hb, 2819.34 ± 336.99 U/g Hb, 1133.75 ± 245.29 U/g Hb, 1782.65 ± 157.50 U/g Hb, respectively. The difference between the groups was statistically significant ($p < 0.0001$). Intraerythrocyte mean CAT level was 254.33 ± 69.40 K/g Hb, 254.76 ± 44.15 K/g Hb, 286.62 ± 75.42 K/gHb, and 218.15 ± 38.86 K/gHb, respectively. The difference between Groups I and III, and Groups I and IV were statistically significant ($p < 0.005$). In conclusion intraerythrocyte SOD levels increase, but CAT levels decrease in treated groups.

Key Words: Hepatitis C, Superoxide Dismutase, Catalase, Interferon alpha

Giriş

Hepatit C virusu (HCV) yaygın ve ilerleyici karaciğer hastalığına neden olur. Akut hepatit C'li (AHCV) hastaların % 95' inde kronikleşme ve siroz meydana gelir (1). Hepatit C virusu (HCV) karaciğer içinde çoğalır, lenfosit içinde de bulunabileceği gösterilmiştir (2, 3). HCV enfeksiyonu için henüz etkili bir tedavi bulunmuş değildir. Fakat kronik hepatit C enfeksiyonu için interferon α (IFN α), interferon β (IFN β) tedavileri halen uygulanmakta olup çeşitli monoterapi ve kombine tedavi protokolleri uygulanmaktadır (1). Kronik Hepatit C virusu (KHCV) enfeksiyonlarında IFN α ve β tedavilerine yanıt ortalama % 40-50 oranında olup bunlarda tedavi kesildikten sonra relaps oranı % 40-70 civarındadır (4-5). Çeşitli antiviral ajanlarla kombine protokol-

lerin uygulanması ile kalıcı yanıt oluşturma çalışmaları devam etmektedir ve yeni ajanlar denenmektedir (6).

Reaktif oksijen türlerinin viral hepatitlerde karaciğerde doku hasarını artırdığına ilişkin çalışmalar mevcuttur (7, 8). Reaktif oksijen türleri olarak OH \cdot , O $_2$ \cdot , H $_2$ O $_2$ sıralanabilir. Hidrojen peroksit yapısında çiftleşmemiş elektron taşımadığından serbest radikal olarak sınıflandırılmaz, fakat doku hasarını indükleyen bir ajandır. Süperoksit dismutaz

* İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

*** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

**** Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

(SOD), süperoksit (O₂) radikalini hidrojen peroksit ve suya dönüştürme özelliğine sahiptir. Böylece doku hasarı oluşturan O₂ radikaline karşı bir dereceye kadar koruma sağlar. SOD'un Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD olmak üzere iki formu vardır. Biz bu çalışmada eritrosit içi Cu-Zn-SOD aktivitesini çalıştık. Katalaz (CAT) enzimi de "hem" içeren ve hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan bir enzimdir.

Viral hepatit C hastalarında bu enzimlerin aktiviteleri hastalığın seyri ve tedavinin etkinliğinin araştırılması açısından önemli sonuçlar verir. Biz de bu çalışmamızda akut, kronik hepatit C enfeksiyonu bulunan hastalarda tedavi alan ve almayan gruplarda antioksidan enzimlerden SOD (Cu-Zn SOD) ve CAT'ın eritrosit içi aktivitesindeki değişimleri izledik.

Gereç ve Yöntem

Hastalar:

Grup 1: Kontrol grubu; Turgut Özal Tıp Merkezine gelen antioksidan tedavi kullanmayan, alkol kullanmayan, ilave bir hastalığı bulunmayan, 30 ± 15 yaşları arasındaki 10 sağlıklı bireyden oluşuyor.

Grup II: Akut hepatit C'li hasta grubu; klinik ve laboratuvar olarak akut HCV enfeksiyonu tanısı konmuş iki – dört haftadır sarılık, halsizlik, idrar renginde koyulaşma, hepatomegali ve karaciğer enzimlerinde yükselme, HCV RNA pozitifliği olan, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji kliniğinde yatan veya polikliniğine müracaat eden 10 hastadan oluşturuldu.

Grup III: Kronik hepatit C'li hasta grubu; 6 aydan uzun süredir anti HCV pozitif, HCV RNA pozitif ve ALT-AST yüksekliği bulunan 10 hastadan oluşturuldu.

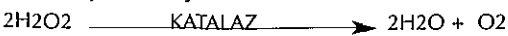
Grup IV: Kronik hepatit C'li olup 3 milyon ünite x 3/ hafta olmak üzere 6 aylık interferon alfa tedavisini tamamlamış 10 hastadan seçildi.

Eritrosit numunelerinin hazırlanması: Hastalardan ve kontrol grubundan 5ml heparinize kan kübital medyan venlerinden alındı. Alınan kanlar 1000x g ve + 400 C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki plazma kısmı pastör pipeti ile ayrı bir eppendorf tüpe alınarak

- 4000 C' de saklandı. Eritrosit tabakasının üzerindeki buffy coat kısmı atılarak alttaki kısmın üzerine 10 ml izotonik sodyum klorür çözeltisi ilave edildi. 10 dk santrifüj edildikten sonra üzerindeki kısım atılarak alttaki kısmın üzerine yine PBS ilave edilerek 2 defa daha santrifüj edildi. Eritrositler buz gibi soğuk su ile 5 kat dilüe edildikten sonra vortex ile karıştırılıp -40 oC'de çalışılncaya kadar saklandı.

Katalaz Tayini:

Katalaz enzimi, (CAT, E.C.1.11.1.6) hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürür.



Bu çalışmada Aebi (8) yöntemi kullanıldı. prensip olarak bu metodda ortamdaki hidrojen peroksitin CAT tarafından parçalanması ile 240 nm' de meydana gelen absorpsiyon azalmasının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Standart şartlarda deney ortamına eklenen H₂O₂ nin

birim zamandaki absorpsiyon azalması hızı, katalaz aktivitesini belirler.

A-) Kullanılan Reaktifler:

1- Fosfat Tamponu: (pH=7, 50 mM) 50 mM K₂HPO₄' de 413 ml alınarak, üzerine 50 mM Na₂HPO₄ ilave edilerek hazırlandı.

2- Hidrojen Peroksit Çözeltisinin Hazırlanması: % 30'luk H₂O₂ çözeltisinden; hazırlanan fosfat tamponunun 100 ml' sine optik dansitesi (240nm'de) 0.5 olana kadar ilave edilerek hazırlanır.

B-) Deneyin Yapılışı:

Eritrosit hemolizatını distile su ile 100 kat dilüe ettikten sonra, kör küvetine 2.99 ml fosfat Tamponu, 10 µl hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilip 240 nm'de okunur. Numune küvetine ise 2.99 ml hidrojen peroksit çözeltisi 10 µl numune konar konmaz 240 nm'de hemen absorpsiyon azalması 15 sn aralıklarla kaydedilir. Sonuçlar K/g Hb/ml olarak hesaplanır.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini:

Bu metod, Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) tarafından ksantin - ksantin oksidaz yoluyla üretilen süperoksit radikallerinin, H₂O₂' ye dönüştürülmesi ve nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgenmesi esasıyla çalışan bir metoddur (9). İndirgenen NBT 560 nm'de maksimum absorpsiyon veren mavi renkli formazana dönüşür. SOD enzimi de iki süperoksiti dismutate ederek hidrojen peroksit oluşturmaktadır. Böylece belirli bir miktar NBT'nin bulunduğu deney ortamında, süperoksitin miktarı standardize edildiği zaman ortamdaki SOD enziminin aktivitesiyle NBT ters orantılı olarak mavi renk oluşur.

Kullanılan Reaktifler:

1-) Assay Reaktifi : 200 ml 0.3 mMol/L Ksantin, 100 ml 0.6 mMol/L Na₂EDTA, 100 ml 150 µmol/L NBT, 60 ml 400 mMol/L Na₂CO₃, 30 ml 1g/L BSA çözeltilerinin hepsi karıştırılarak koyu renkli bir şişede + 4 oC'd e saklandı.

2-) Ksantin Oksidaz: 167 Ü/L (soğuk 2M 'lik (NH₄)₂SO₄ ile 1ml'ye tamamlandı.

3-) CuCl₂ : 0.8 mMol/L (100 ml)

4-) (NH₄)₂SO₄ : 2M (10 ml)

5-) Kloroform-Etanol çözeltisi (C/E): 3 hacim kloroform 5 hacim etanol ile karıştırıldı.

B-) Deneyin Yapılışı:

Eritrosit numuneleri 100 kat, dilüe edildikten sonra 3/5 oranında hazırlanan kloroform/etanol çözeltisinden eşit hacimde konarak +4 oC'd e 4000 x g' de 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra üstteki süpernatandan alınarak çalışmaya başlandı. Kör tüpüne ve test tüplerine 2.45 ml Assay reaktifi; 0.5 ml numune test tüpüne, 0.5 ml distile su kör tüpüne; 50 µl Ksantin Oksidaz ilave edildi. Yirmi dakika 25 oC beklendikten sonra tüm tüplerin üzerine 1 ml CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 560 nm'de önce spektrofotometrede okundu.

Hemoglobin Tayini: Kolorimetrik siyanometemoglobin metoduyla Olympus AU-600 otoanalizör cihazında tesbit edildi.

One-Way ANOVA ile yapılan istatistiksel karşılaştırmada gruplar arasındaki farkın hangi ikili karşılaştırmalarından ortaya çıktığını anla-

Tablo 1: HCV'li hastalarda ve sağlıklı grupta SOD ve CAT değerleri

	SOD (U/ gHb)	p	CAT (K/gHb)	p
GRUP I	2145.11 ± 336.78		254.33±69.40	
GRUP II	2819.34 ± 336.99	<0.0001	254.76± 44.15	
	>0.005			
GRUP III	1133.75 ± 245.29	<0.0001	286.62±75,42	<0.005
GRUP IV	1782.65 ± 157.50	<0.0001	218.15±38.86	<0.005

mak için Post Hoc testlerden LSD testi uygulandı.

Bulgular

Tablo 1'de görüldüğü gibi SOD aktivite değerlerini Grup I için: 2145.11±336.78 U/g Hb; Grup II için: 2819.34 ± 336.99 U/g Hb; grup III için: 1133.75±245.29 U/g Hb; grup IV için: 1782.65±157.50 U/g Hb olarak bulduk. One-Way ANOVA ile yapılan istatistiki karşılaştırma gruplar arasındaki farkın hangi ikili karşılaştırmalarından ortaya çıktığını anlamak için Post Hoc testlerden LSD testini uyguladık. Tüm gruplar arasında f değerini 190.58 ve p değerini p<0.0001 bulduk. Buna göre eritrosit SOD aktivitesini akut hepatit C'li hastalarda kontrole göre yüksek bulunurken kronik hepatit C'li hastalarda kontrole göre düşük bulduk; kronik hepatit C'li olup interferon tedavisi alan hastalarda ise kontrole göre düşük fakat yakın bulduk. Eritrosit CAT ortalama değerlerini ise Grup I'de 254.33 ± 69.40 K/g Hb; Grup II'de 254.76 ± 44.15 K/g Hb; Grup III'te 286.62 ± 75,42 K/g Hb; Grup IV'te 218.15 ± 38.86 K/g Hb olarak bulduk. İstatistiki olarak gruplar arasında f değerini 6,72 ve p değerini p<0,005 olarak bulduk.

Tartışma

Eritrosit SOD aktivitesini akut hepatit C'li hastalarda kontrole göre yüksek bulurken kronik hepatit C'li hastalarda kontrole göre düşük bulduk; kronik hepatit C'li olup interferon tedavisi alan hastalarda ise kontrole göre düşük fakat yakın bulduk. Akut dönemde artmış oksidatif hasara karşı koruma sağlamak amacıyla SOD aktivitesi de artmış; kronik dönemde ise artık azalmaya başlamıştır. Süperoksit dismutaz aktivitesinin kronik hepatit C enfeksiyonlarında azaldığını veya arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (12, 13). Sonuç farklılıkları kronik hepatit C vakalarının farklı evrelerinde bulunmasından kaynaklanmış olabilir. İnterferon ve antioksidan tedavinin birlikte uygulandığı bir çalışmada bir glutatyon prekürsörü olan N-asetil sistein KHCV enfeksiyonunda interferonla kombine edilmiştir. Bu çalışmada antioksidan aktivitenin arttığı, hasarın azaldığı ve ALT düzeylerinde azalma olduğu gözlenmiştir

Pak ve Nikitin'in yaptığı çalışmada Akut viral hepatitte SOD, CAT ve glutathion peroxidase (GSH-Px) aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (14). Par ve ark. (15)'nin yaptığı çalışmada kronik hepatit C'de SOD aktivitesi artmış, GSH-Px aktivitesini azalmış olarak bulunmuştur. Yüz

çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada kronik hepatit B ve C 'de CAT ve SOD aktivitesinin azalmış olduğu görülmüştür (16). Yapılan bir başka çalışmada kronik aktif hepatit C'li hastalarda TBARS ve GSH-Px artmış ve total thiol içeriği azalmış iken, 6 aylık IFN alfa tedavisinden sonra TBARS ve GSH-Px içeriği azalmış ve total thiol içeriğini artmış bulmuşlardır. Bu çalışmada IFN-alfa tedavisinin antioksidan kapasiteyi artırarak koruma sağladığı gözlenmiştir (17).

Akut hepatit C'li hastalarda CAT aktivitesinin değişmediğini ve kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olmadığını; kronik hepatit C'li hastalarda kontrol grubuna göre yüksek iken kronik hepatit C'li olup interferon tedavisi alan hastalarda düşme olduğunu tesbit ettik. Katalaz enzimi AHCV' de değişmez; bu enfeksiyonlarda akut dönemde SOD'un, kronikleşme süresinde ise CAT'ın etkilenmesi söz konusudur. İnterferon tedavisini tamamlamış grupta ise CAT aktivitesi düşük bulunmuştur. Bir immunmodulator olan ve antiviral ajan gibi etki eden interferon tedavilerinden sonra oldukça yüksek oranda relapsların olması; tedavi protokolüne antioksidan ilave ederek örneğin CAT aktivitesinin artırılması ile kalıcı yanıt oluşturabilir mi? Veya daha uzun süreli remisyon sağlanabilir mi? Sorularını akla getirmektedir. Bunun için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak akut HCV enfeksiyonlarında kontrol grubuna göre eritrosit içi SOD aktivitesi artmış, kronik HCV enfeksiyonunda azalmış, tedavi gören grupta ise biraz artış görülmüştür.. Gruplar arası istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.0001). Eritrosit içi CAT ise akut HCV enfeksiyonlarında değişmemiş, kronik HCV'de artmış, tedavi ile azalma gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre kronik tedavi alan ve almayan gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark mevcuttu (p< 0.05). Tedavilerde interferon ve antioksidan kombinasyonunu içeren klinik çalışmalar; HCV enfeksiyonlarında antioksidanların kalıcı yanıt veya uzun süreli remisyonlardaki rolünü daha iyi açıklayabilir, kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Yenen OŞ: Viral Hepatitler, "Topçu AW, Söyletler G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları, s. 700-715, 1996, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
2. Zignego A L , Maccia D, Monti M: Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. J.Hepatology, 1992, 15: 382-386.

3. Sanchez-Tapias J.M: Viral hepatitis C," .Prieto J, Rodes J, and Shaftriz DA (eds), Hepatobiliary Diseases" p 573-609, 1992, Springer-Verlag , Berlin.
4. Bisceglie DI, Martin AM, Kassianides C: Recombinant interferon alfa threpy for chronic hepatitis C. N Engl J, 1989, 321: 1506-1510.
5. Camps J, Castilla A , Ruiz J , Civera MP , and Prieto J: Rando- mised trial of lymphoblastoid alfa interferon in chronic hepatitis C : ef- fects on inflammation, fibrogenesis and viremia. J Hepatol, 1993, 125: 1702-1704.
6. Beloqui O, Preito J , Suarez MGB , Qian CH , Garcia N , and Civeira MP: N-Acetyl Cystein Enhances the Response to Interferon - _ in Chronic Hepatitis C: A pilot Study. Journal of Interferon research, 1993, 13 : 279-282.
7. Preedy VR , Reilly ME, Mantle D, and Peters TJ: Oxidatif Dama- ge in Liver Disease . JIFCC, 1998, 10 (1): 16-20.
8. Aebi H: Catalase in vitro, "Bergmeyer U (ed), Methods of enzy- matic analysis" p 673-667, 1974, Academic Press, New York.
9. Podezasy JJ, Wei R: Reduction of iodonitrotetrazolium violet by süperoxide radicals. Biochem Res Com, 1988, 150 : 1294-1301.
10. Levin S , Hann T: Interferon system in Acute Viral Hepatitis. The Lancet, 1982, 592-594.
11. Wheelock EF, Scehenker S, Combes B: Absence of circulating interferon in patients with infectious end serum hepatitis. Proc Soc Exptl Biol Med , 1988, 128: 251- 253.
12. Inagaki T, Katoh K, Takiya S: Relationship between superoxi- de dismutase (SOD) and viral liver diseases. Gastroenterol Jpn, 1992, 27 (3) : 382- 389.
14. Pak SG, Nikitin EV: Status of the processes of free-radical oxi- dation and the antioxidation system in patients with a severe course of hepatitis B. Klin Med , 1991, 69 (9) : 54-57.
15. Par A, Roth E, Rumi G, Kovacs Z, Nemes J, Mozsik G: Oxi- dative stress and antioxidant defense in alcoholic liver disease and chro- nic hepatitis C. Orv Hetil, 2000, 141 (30) : 1655-1659.
16. Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G: Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. Med Sci Monit, 2000, 6 (4) :713-718.
17. Mutlu-Turkoglu U, Ademoglu E, Turkoglu S, Badur S, Uysal M, Toker G: The effects of interferon-alpha on serum lipid peroxidati- on and total thiol content in patients with chronic active hepatitis-C. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 96 (3) : 357- 361.