

Miyokard Disfonksiyonu Olan Hastalarda Disfonksiyonun Derecesi ile Antioksidan Enzim Düzeylerinin Karşılaştırılması

Comparison of the Antioxidant Enzyme Levels with the Degree of Dysfunction in Patients with Myocardial Dysfunction

Dr. Nurşen Sezgin, Dr. Alpaz Tufan Sezgin*, Aysun Karabulut, PhD, Ergün Topal*,
Dr. İrfan Barutçu*, Engin M. Gözükara*, PhD

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve *Kardiyoloji Anabilim Dalları, Malatya

Özet

Amaç: Kalp yetersizliği olan hastalarda miyokard disfonksiyonun, artmış oksidatif strese bağlı membran değişikliklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada antioksidan enzim düzeyleri ile miyokard disfonksiyonundaki bozulmanın derecesi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırdık.

Yöntemler: Klinik bulguları ve iki yönlü ekokardiyografi ile miyokard disfonksiyonu tanısı konulan 60 hastadan (ejeksiyon fraksiyonu (EF) < %35 olan 30 ve EF= %35-50 olan 30 hasta) ve 20 sağlıklı bireyden alınan kan örneklerinden antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri çalışıldı.

Bulgular: Eritrosit SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre (grup 1) EF düzeyi ileri derecede düşmüş olan (EF< %35) grup 3 de istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0.01). Ancak EF düzeyi hafif derecede düşmüş olan (EF= %35-50) grup 2'de eritrosit SOD düzeyleri kontrol grubuna göre düşmüş olmasına rağmen istatistiksel olarak bu fark anlamlı değildi. Aynı şekilde eritrosit katalaz ve eritrosit GSHPx aktiviteleri de kontrole göre EF'si ileri derecede düşmüş olan grupta anlamlı derecede düşük olarak saptandı (sırasıyla p=0.04, p=0.02).

Sonuç: Sonuç olarak serbest oksijen radikalleri konjestif kalp yetersizliğinin başlangıcında ve devamında rol oynamaktadır. Artmış serbest radikaller kalp kasi fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. (*Anadolu Kardiyol Derg 2004; 4: 130-4*)

Anahtar Kelimeler: Serbest oksijen radikalleri, antioksidan enzim, iskemik kardiyomyopati

Abstract

Objective: Myocardial dysfunction in patients with cardiomyopathy is proposed to occur due to membrane changes caused by oxidative stress. In our study we evaluate whether there is any relation between the degree of myocardial dysfunction and antioxidant enzymes.

Methods: We studied superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) and catalase (CAT) enzyme activities from blood samples of 60 patients (30 patients had ejection fraction (EF) <%35 and 30 patients had EF= %35-50) who have myocardial dysfunction according to clinical findings and two-dimensional echocardiography, and 20 healthy volunteers.

Results: We found erythrocyte SOD enzyme activities of patients with EF <%35 (group 3) were significantly lower than in control subjects (group 1) (p=0.01). However in group 2 patients (EF= %35-50), erythrocyte SOD activities were found to be lower than in control subjects but this difference was not significant. Erythrocyte CAT and GSHPx enzyme activities of group 3 were also significantly lower than in control group (p=0.04 and p=0.02 respectively).

Conclusion: In conclusion, reactive oxygen species play a significant role in the initiation and the progression of congestive heart failure. Increased free radicals levels may cause myocardial muscle dysfunction. (*Anadolu Kardiyol Derg 2004; 4: 130-4*)

Key Words: Free oxygen radicals, antioxidant enzyme, ischemic cardiomyopathy

Giriş

Serbest oksijen radikalleri oldukça reaktif ve stabil olmayan metabolitler olup, protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli biyomolekülleri değiştirme kapasitesine sahiptirler. Sağlıklı kişilerde bu metabolitlerin zararlı etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku ha-

sarı en aza indirilmektedir (1). Organizmada glutatyon, ürik asit, ascorbik asit, bilirubin ve protein tiyoller gibi antioksidanların yanında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzimler de antioksidan etki gösterir (2).

Serbest oksijen radikalleri (SOR), membran lipid ve proteinleri ile reaksiyona girerek miyokardiyal kalsımayı azaltır. Azalmış veya yetersiz miyokardiyal ka-

sılma ise kardiyomiyopatinin en genel özelliğidir (3). Kardiyomiyopati terimi, belirti ve bulguların hepsinin ya da çoğunun miyokard işlev bozukluğundan kaynaklandığı tüm kalp hastalıkları için kullanılmaktadır (4). Miyokard fonksiyonunun bozulmasının ve iskemi reperfüzyon sonrası doku nekrozunun patogenezinde meydana gelen hasarın sellüler temelini açıklayan farklı mekanizmalar öne sürülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin geri dönüşümsüz bir şekilde hücre hasarının ortaya çıkmasında önemli rol alabileceğini göstermiştir (5-7).

İskemik kardiyomiyopatili hastalarda antioksidan enzim düzeyleri çalışılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen miyokard disfonksiyonun derecesine bağlı olarak antioksidan enzim düzeylerinde değişiklik olup olmadığını inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de bu çalışmamızda ekokardiyografi ile hastaları miyokard disfonksiyonunun derecesine göre gruplara ayırarak antioksidan enzim düzeylerine baktık ve serbest radikallerin, disfonksiyonun derecesi ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık.

Yöntemler

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniği'nde izlenen; klinik bulguları ve ekokardiyografi ile kardiyomiyopati (KMP) tanısı konulan 60 hastada yapıldı. Çalışmaya alınma kriteri; 1) koroner anjiyografide en az bir epikardiyal koroner arterde > %70 darlığı olan ve ekokardiyografi ve sol ventrikül sineanjiyografi ile ejeksiyon fraksiyonu < %50 altında olan iskemik kalp yetersizliği olan hastalar, 2) konvansiyonel tedaviye rağmen klinik olarak kalp yetersizliği olan hastalar. Çalışmaya alınmama kriterleri: 1) son üç ay içerisinde akut koroner sendrom (ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, non-ST elevasyonlu miyokard infarktüsü ve kararsız angina pectoris) öyküsü olan olgular, 2) hipertansif, romatizmal, konjenital, infeksiyöz veya perikardiyal hastalıklara, valvuler kalp hastalığına, mitral kapak prolapsusuna veya hipertrofik KMP'ye bağlı kalp yetersizliği olan olgular çalışma dışı bırakıldı. Hastaların fonksiyonel kapasiteleri New York Kalp Cemiyeti Sınıflandırmasına göre sınıf III ve IV olarak değerlendirildi. Bu hastalar sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonlarına (EF) göre < %35 (30 hasta) ve EF= %35-50 (30 hasta) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hastaların tümü dijitalis, diüretik, anjiyotensin-konverting enzim inhibitörü ve nitrat kullanmaktaydı. Kontrol grubu olarak sigara içmeyen, hipertansiyonu, kalp hastalığı, böbrek, karaciğer hastalığı, diyabet gibi hiçbir kronik hastalığı olmayan, hastalarla aynı yaş grubunda 20 sağlıklı kişi seçildi.

Kan örnekleri heparinize tüplere alındı ve bekletilmeden 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Soğuk izotonik ile üç kez yıkanan eritrositler soğuk distile su ile hemolize edilerek, hemolizattan SOD, CAT ve GSHPx, plazmadan ise SOD aktivitesi çalışıldı. Eritrosit hemoglobin tayini Drabkin reaktifi (8) ile, plazmada total protein tayini ise Lowry (9) metodu kullanılarak belirlendi.

Süperoksit dismutaz, Sun ve ark.ları (10), CAT, Aebi (11) ve GSHPx ise Paglia ve ark.ları (12) tarafından tarif edilen spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Eritrosit SOD ve GSHPx -U/gHb, eritrosit CAT, katalaz aktivitesi -k/gHb, plazma SOD ise -U/g prot olarak verildi

İstatistik analizleri; SPSS for Windows, version 10.0 programı ile yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA testi uygulandı. Veriler ortalama ± Standart Sapma olarak verildi. Grup içi karşılaştırmalarda ise LSD testi kullanıldı. Ayrıca Microsoft Excel programı ile % EF düzeylerine göre çalışılan parametrelerin korelasyon analizleri yapıldı.

Bulgular

Tablo 1'de grup verilerinin karşılaştırılması ve anlamlılık değerleri verilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar, ekokardiyografi ile tespit edilen EF düzeylerine göre gruplara ayrıldı ve ortalama EF düzeyleri; kontrol grubunda (1. grup) %63.95±4.12, hafif kalp yetersizliği olan (EF=%35-50) 2. grupta %38.87±4.0 ve ağır kalp yetersizliği olan (EF<%35) 3. grupta %25.97±3.84 olarak hesaplandı.

Eritrosit SOD seviyeleri grup 1, grup 2 ve 3'de sırasıyla 339.29±35.67 U/gHb, 311.72±44.85 U/gHb ve 288.96±79.92 U/gHb olup kontrol grubuna göre sırasıyla grup 2 ve 3'de %8 ve %15'lik bir düşüş vardı. Eritrosit SOD seviyelerinde EF düzeyi ileri derecede düşmüş olan (EF< %35) grup 3 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (p=0.01). Ancak EF düzeyi hafif derecede düşmüş olan (EF= %35-50) grup 2'de eritrosit SOD düzeyleri kontrol grubuna göre düşmüş olmasına rağmen istatistiksel olarak bu fark anlamlı değildi. Ayrıca EF düzeyleri ve eritrosit SOD düzeyleri arasında zayıf, ancak anlamlı pozitif ve lineer bir korelasyon saptandı (Şekil 1). Plazma SOD düzeyleri ise grup 1, 2 ve 3'de sırasıyla 95.17±24.61 U/g prot, 94.30±22.14 U/g prot ve 89.96±30.23 U/g prot idi ve kontrol grubuna göre hasta gruplarında özellikle de grup 3'de daha fazla azalmakla birlikte gruplar arası fark anlamlı değildi. Aynı şekilde eritrosit katalaz (sırasıyla grup 1,2 ve 3'de

208.56±31.71 K/gHb, 190.44±33.66 K/gHb ve 158.35±25.93 K/gHb) ve eritrosit GSHPx (sırasıyla 1311.89±241.41 U/gHb, 1050.71±351.75 U/gHb ve 821.59±240.37 U/gHb) seviyelerinde olup kontrole göre EF'si ileri derecede düşmüş olan grupta anlamlı derecede düşük enzim seviyeleri saptandı (sırasıyla p=0.04 ve p=0.02). Korelasyon grafiğinde de EF dü-

zeyleri ve eritrosit CAT ve GSHPx düzeyleri arasında pozitif ve lineer bir korelasyon saptandı (Şekil 2 ve 3).

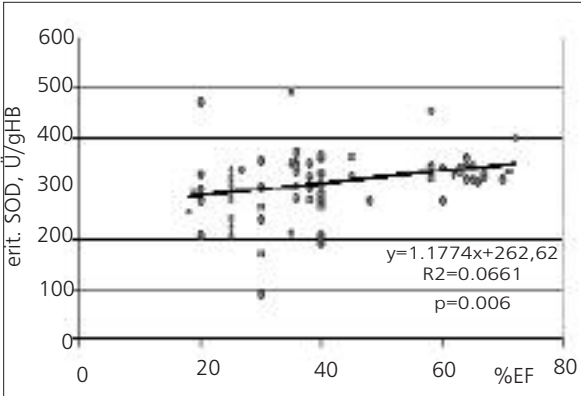
Tartışma

DeneySEL ve klinik kalp yetersizliğinde oksidatif stres SOD, GSHPx, CAT aktivitesi ve lipid peroksidlerin

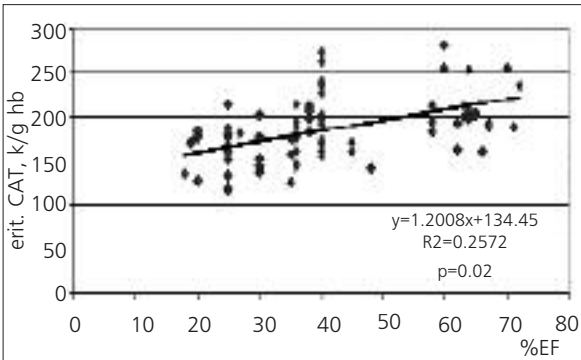
Tablo 1. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	Parametreler	Grup 1 (kontrol) EF ≥ %50 (n=20)	Grup 2 (n=30) EF=%35-50	Grup 3 (n=30) EF < %35	P
1	Yaş, (yıl)	49.10 ± 10.48	56.00 ± 8.98	60.53 ± 9.26	p=0.00a,b
2	EF, (%)	63.95 ± 4.12	38.87 ± 4.00	25.97 ± 3.84	p=0.00a,b,c
3	Hb, (g/dl)	14.95 ± 1.05	14,56 ± 1.45	14.06 ± 2.13	p=0.17
4	Pl. Prot, (g/dl)	7.99 ± 0.39	7.72 ± 0.86	7.67 ± 0.85	p=0.11
5	Erit.SOD, (U/g Hb)	339.29 ± 35.67	311.72 ± 44.85	288.96 ± 79.92	p=0.01a
6	Pl. SOD, (U/g prot)	95.17 ± 24.61	94.30 ± 22.14	89.96 ± 30.23	p=0.7
7	Erit CAT, (k/g Hb)	208.56 ± 31.71	190.44 ± 33.66	158.35 ± 25.93	P=0.04a,c
8	Erit GSHPx, (U/gHb)	1311.89 ± 241.41	1050.71 ± 351.75	821.59 ± 240.37	P=0.02a

CAT: katalaz, EF: ejeksiyon fraksiyonu, Erit.: eritrosit, GSHPx: glutatyon peroksidaz, Hb: hemoglobin, Pl.: plazma, Prot: protein, SOD: süperoksit dismutaz, a, b ve c gruplararası anlamlılıkları gösterir. a= grup 1 ve 3 arası anlamlı, b= grup 1 ve 2 arası anlamlı, c= grup 2 ve 3 arası anlamlı.

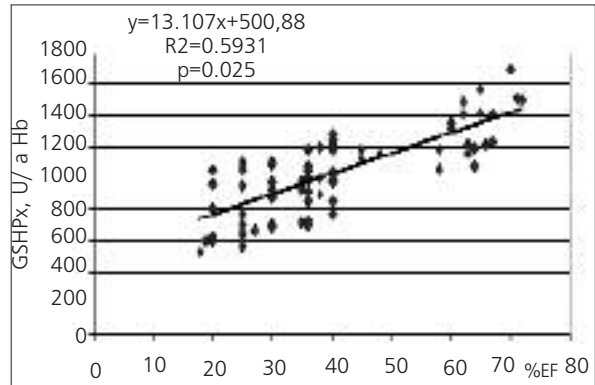


Şekil 1. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri arasındaki ilişki



Şekil 2. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile eritrosit katalaz (CAT) düzeyleri arasındaki ilişki

plazma seviyeleri ölçülerek dolaylı yoldan değerlendirilmektedir (13). Süperoksit dismutaz ve GSHPx' in kalpte serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda majör bir rol oynadığı öne sürülmektedir (14). Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı korunmada SOD ilk basamak olmasına rağmen, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit (H2O2) dismutasyonunu katalizlediği için H2O2 seviyesini artırarak etki eder. H2O2 birikmesinin majör tehlikesi fizyolojik savunma sistemi olmayan oldukça reaktif hidroksil radikali üretimidir. Katalaz ve GSHPx, H2O2'i metabolize ettikleri için en önemli antioksidatif enzimler olarak ortaya çıkar. Ancak kalpteki katalaz konsantrasyonunun gram doku başına H2O2 üretimi



Şekil 3. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile eritrosit glutatyon peroksidaz (GSHPx) düzeyleri arasında ilişki

herhangi bir organdan daha fazla olan karaciğerdeki- nin % 2'sinden daha az olduğu gösterilmiştir (15). Kı- saca katalazın hidrojen peroksit affinitesi daha az- dır, bu yüzden glutatyon redoks sistemi kalpte hidro- jen peroksit metabolizmasında majör yol olarak rol oynar. Buna rağmen pek çok çalışmada endojen ka- talaz ve katalaz mRNA'sının önemli rol oynadığı da öne sürülmüştür (14).

Çalışmamızda kontrol grubuna göre hasta grupla- rında (özellikle ağır miyokard disfonksiyonu olan grup- ta anlamlı olmak üzere ($p=0.01$)) azalmış eritrosit SOD aktivitesi tespit ettik. Yine plazma SOD aktivite- sinde de anlamlı olmasa da düşüş vardı. Eritrosit SOD enzimiyle birlikte eritrositte CAT ve GSHPx enzim akti- vitelerini de çalıştık ve bu enzim aktivitelerinde de ağır miyokard disfonksiyonu olan hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş tespit ettik ($p<0.05$). Ayrıca bu grupta ejeksiyon fraksiyonu daha az düş- müş olan gruba göre anlamlı olmasa da her üç enzim aktivitesinde de azalma vardı. Bunlar da artmış ser- best radikal üretiminin bir işareti olarak kabul edilebi- lir. Antioksidan sistemin bu üç enzimi en az bir radika- le hassas olduğundan dolayı, yüksek oksidatif stres durumunda bir çeşit inhibisyon meydana gelir. Hidro- jen peroksitin SOD enzimini inaktive ettiğine dair çok sayıda çalışma vardır (16). Bu inaktivasyonun muhtem- el bir mekanizması SOD'ın serbest radikal oluşturan Fenton Reaksiyonunda, demirin yerini alabilen bakır içerdiği için bu radikale hassas olduğudur. Bu enzim- ler aynı zamanda direkt veya dolaylı olarak birbirlerini inaktivasyondan da korurlar. Böylece radikallerin sü-rekli arttığı bir üretim hızı ile geri dönüşümsüz bir oto- katalitik süreç ve hücre ölümü meydana gelir (16).

Ayrıca artmış süperoksit radikali peroksinitrit oluşu- mu yoluyla hem daha toksik bir radikal oluşturmakta hem de nitrik oksidin yararlanımını azaltmaktadır (17).

Hill ve ark.ları da (18) sıçanlarda yaptıkları bir ça- lışmada koroner ligasyondan sonra sol ventrikül pik sistolik basınç ve sol ventrikül end-diyastolik basınçla- ra göre hafif, orta ve ağır kalp yetersizliği belirledikle- ri sıçanlarda antioksidan enzim düzeylerini çalışmışlar ve CAT ile GSHPx seviyelerinde progressif bir düşüş belirlemişlerdir. Süperoksit dismutaz seviyesinde ise hafif ve orta yetersizlik durumunda değişiklik olmaz-ken 16 hafta sonra anlamlı olarak düşüş gözlemiştir- dir (18).

Baumer ve ark.ları (19) ise idiyopatik dilate kardi- yomiyopatisi olan hastalarda CAT mRNA'sında deği- şiklik olmaksızın enzim aktivitesinde azalma tespit et-mişlerdir. Bunun da post-transkripsiyonel mekaniz- madan kaynaklandığını ve miyokardın hidrojen pe-

roksit detoksifikasyon kapasitesindeki azalmanın, int- rasellüler redoks dengesinde bir sapmaya yol açabile- ceğini belirtmişlerdir (19).

Birçok çalışmada antioksidan enzim düzeylerinin çeşitli kalp hastalıklarında azaldığı gösterilmiştir (14,18-20). Ancak biz çalışmamızda ekokardiyografi ile ölçülen ejeksiyon fraksiyonları ile, hastaları miyo- kard disfonksiyonunun derecesine göre gruplara ayır- dık ve fonksiyon bozukluğunun ilerlemesi ile çalıştığımız parametreler arasında fark olup olmadığını araş- tırdık. Böylece serbest radikallerin kalbin kasılma gü- cü ve kalp yetersizliğinin prognozundaki etkilerini an- lamaya çalıştık ve ejeksiyon fraksiyonu ileri derecede düşmüş olan grupta her üç antioksidan enzim düze- yini de kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulduk. Ancak EF düzeyi hafif derecede düşmüş olan (EF= %35-50) grup 2'de antioksidan enzim düzeyleri kontrol grubuna göre düşmüş olmasına rağmen istatistik- sel olarak bu fark anlamlı değildi.

Sonuç olarak serbest oksijen radikalleri konjestif kalp yetersizliğinin başlangıcında ve devamında rol oynamaktadır. Serbest radikaller kalp kası fonksiyon bozukluğuna yol açarak, kardiyak fonksiyonlarda bo- zulmayı artırabilir.

Serbest radikallerin kalp yetersizliğinde arttığı ve mortalite ile yakın ilişkili olduğu, günümüzde bir çok kişi tarafından düşünülmektedir. Antioksidan vita- minler kalp yetersizliği tedavisine eklenmeye başlan- mıştır ancak serbest radikallerin kardiyovasküler ha- sar yapıcı mekanizmaları henüz tam olarak anlaşıla- madığından bu konuda daha fazla çalışma yapılması- na ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Woo J, Leung SSF, Lam CWK, Ho CS, Lam TH, Janus ED. Plasma total antioksidant capacity in an adult Hong Kong Chinese population. Clin Biochem 1997; 30; 553-7.
2. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995. p.42-5.
3. Sürenkök T, Erbay AR, Saydam G, Yücel D, Kütük E, Göksel S. Dilate kardiyomiyopatisi hastalarda fibrinoje- nin oksidatif modifikasyonu. Turk J Cardiol 1998; 1: 269-74.
4. Cotran RS, Kumar V, Robins SH. Cardiomyopathy. Ro- bins Pathologic Basis of Disease. 4th edition. Philadel- phia: WB Saunders; 1989. p.643-8.
5. Mc Cord J. Oxygen derived free radicals in post ische- mic tissue injury. N Eng J Med 1990; 312: 159-63.
6. Burrell CJ, Blake DR. Reactive oxygen metabolites and the human myocardium B Heart J 1989; 61: 4-8.

7. Yücel D, Aydoğdu S, Çehreli S, et al. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998; 44: 148-54.
8. Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19th edition Philadelphia: WB Saunders; 1996. p.550-1.
9. Lowry O, Rosenbraugh N, Ferr L, Randall R. Protein measurement with theophyllinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 183: 265-75.
10. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
11. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press; 1974. p.673-7.
12. Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-9.
13. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Res* 1999; 43: 562-71.
14. Dieterich S, Bielgk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 2000; 101: 33-9.
15. Lai CC, Huang WH, Askari A, Klevay LM, Chiu TH. Expression of glutathione peroxidase and catalase in copper-deficient rat liver and heart. *Nutr Biochem* 1995;6: 256-62.
16. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion DL, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mechanism of ageing and development. *Mech Ageing Dev* 1990; 51: 283-97.
17. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PYK. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: 2327-36.
18. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996; 148: 291-300.
19. Baumer AT, Flesch M, Wang X, Shen Q, Feuerstein GZ, Bohm M. Antioxidative enzymes in human hearts with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 121-30.
20. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 1999; 85: 147-53.