

Koroner arter hastalarında eritrosit katalaz ve karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Ayşegül Çebi (*), Yüksel Kaya (**), Halit Demir (***)

ÖZET

Serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türlerinin koroner arter hastalığının patogenezinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Koroner arter hastalarında katalaz (CAT) ve karbonik anhidraz (CA) aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmaya 10 kadın ve 25 erkek olmak üzere 35 koroner arter hastası katıldı. Kontrol grubu anjiyogramı normal olan yedi kadın ve 26 erkek olmak üzere 33 bireyden oluşturuldu. Hasta ve kontrol gruplarının eritrosit örneklerinde CAT enzim aktivitesi Aebi yöntemine göre spektrofotometre ile, CA enzim aktivitesi ise karbondioksit hidrasyon yöntemiyle ölçüldü ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Koroner arter hastaları ve kontrol bireylerinin CAT değerleri sırasıyla 13.09 ± 4.74 EU/gHb ve 21.30 ± 17.99 EU/gHb⁻¹ iken, CA enzim aktiviteleri ise 0.75 ± 0.28 EU/gHb ve 2.06 ± 0.24 EU/gHb olarak tespit edildi. Hasta gruptaki bireylerin eritrosit CAT ve CA enzim aktiviteleri kontrol bireylere göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.015$, $p<0.001$). Bu sonuçlara göre, koroner arter hastalarının CA enzim aktivitelerinin düşmesiyle eritrositlerdeki asid-baz dengesinin bozulduğu söylenebilir. Koroner arter hastalarında serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir enzim olan CAT enzim aktivitesinin normalden düşük bulunmasının hastalık sürecinde hastaların oksidatif strese maruz kalmasına bağlı olabileceği, bu stresi ortadan kaldıracak girişimlerin hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Eritrosit, karbonik anhidraz, katalaz, koroner arter hastalığı

SUMMARY

Determination of erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in patients with coronary artery disease

Free oxygen radicals or reactive oxygen species are accepted to have an active role in the pathogenesis of coronary artery disease. Thirty five patients with coronary artery disease including 10 women and 25 men were enrolled in this study performed in order to determine the activities of catalase (CAT) and carbonic anhydrase (CA) in patients with coronary artery disease. Control group included 33 individuals, seven women and 26 men, with normal angiograms. CAT and CA enzyme activities in red blood cell samples of patients and control subjects were measured with spectrophotometry (with Aebi method) and carbon dioxide hydration method, respectively, and compared statistically. CAT values were 13.09 ± 4.74 EU/gHb and 21.30 ± 17.99 EU/gHb⁻¹ and CA enzyme activities were 0.75 ± 0.28 EU/gHb and 2.06 ± 0.24 EU/gHb in patients with coronary artery disease and control subjects, respectively. The erythrocyte CAT and CA enzyme activities in the patient group were statistically significantly lower than those of the control group ($p=0.015$, $p<0.001$). It may be concluded that acid-base balance in the erythrocytes is disordered with the decreasing CA enzyme activities of patients with coronary artery disease. The lower levels of CAT enzyme activity which is a protective enzyme against free radical damage may be due to the oxidative stress from which the patients suffered, and manipulations toward erasing this stress may be effective in the prevention and treatment of the disease.

Key words: Erythrocyte, carbonic anhydrase, catalase, coronary artery disease

* Giresun Üniversitesi Piraziz Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü

** Yüksek İhtisas Hastanesi Kardiyoloji Kliniği, Van

*** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı

Aynı basım isteği: Ayşegül Çebi, Giresun Üniversitesi Piraziz Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Giresun
E-mail: cebiaysegul@hotmail.com

Makalenin gelişi tarihi: 05.04.2011 • **Kabul tarihi:** 02.08.2011

Giriş

Koroner arter hastalığı (KAH) gelişmiş ülkelerde morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır (1). Koroner arterlerde ateroskleroz gelişmesi sonucu ortaya çıkan KAH, miyokardın oksijen ve besin ihtiyacının yeterince karşılanamamasından dolayı ortaya çıkar (2). Mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen, oksidatif stresin aterosklerozun başlaması ve ilerlemesinde en önemli faktörlerden birisi olduğu söylenebilir (3). Oksidatif stres, özellikle de düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL-kolesterol) oksidatif modifikasyonları, KAH'nın patogenezinde önemli rol oynayabilir (4). Bazı araştırmacılar prooksidan-antioksidan dengesizliği ve koroner lezyonların şiddeti arasında bir bağlantı olduğunu belirtmişlerdir (5-7). Süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) enzimleri başlıca antioksidan savunma birimleridir. CAT ve GPX, SOD'un ürettiği toksik hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürür (8,9). Daha önceki çalışmalar, plazma antioksidan kapasitesinin KAH'da düştüğünü göstermiştir (10). Hiperkolesterolemi ise KAH'yı önemli derecede teşvik eder (11). Karbonik anhidraz (CA) en az 14 farklı izoenzimi bulunan çinko metalloenzim ailesidir. Bu izoenzimlerin bazıları sitozolik (CA1, CA2, CA3, CA7, CA13), bazıları membrana bağlı (CA4, CA9, CA12 ve CA14) ve bir kısmı ise mitokondriyaldir (CA5) (12). CA enzimi karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyon-dehidrasyon reaksiyonuna katılır: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$. Bu enzim pH regülasyonu ve iyonik dengenin devamlılığı gibi pek çok fizyolojik süreçte rol alır (13,14).

Bu çalışmanın amacı koroner arter hastalarında eritrosit CAT ve CA enzim aktivitelerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya Van Yüksek İhtisas Hastanesi Kardiyoloji Kliniğinde koroner anjiyografi ile KAH tanısı konulmuş 35 hasta (10 kadın ve 25 erkek) ve anjiyogramı tamamen normal olarak değerlendirilen 33 sağlıklı birey (7 kadın ve 26 erkek) olmak üzere

toplam 68 birey katıldı. Hasta ve kontrol gruplarında diyabetes mellitus ve KAH aile hikayesi yoktu. Her iki grup da sigara kullanmamaktaydı. Koroner EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Altta kalan pellet kadar %0.09'luk NaCl çözeltisi ilave edildi ve santrifüj edildi. İki kez yıkama işlemi tekrar edildikten sonra eritrosit paketleri elde edildi. Ölçümler yapıncaya kadar -80 derecede steril tüpler içinde saklandı. CAT aktivite tayini Aebi yöntemine göre belirlendi (15). Hidrojen peroksit substrat olarak kullanıldı. Potasyum fosfat tampon çözeltisi (0.05 M, pH 7.00) içerisinde hazırlanmış substrat (2.95 ml, 19 mmol/l H₂O₂) içeren kuvartz küvet üzerine 0.1 ml enzim (eritrosit) ilave edildi. Absorbans değişimi (5 dk) spektrofotometre (Shimadzu UV-1201, Japan) ile 240 nm'de okundu. CA aktivite tayini Maren yöntemine göre yapıldı (13). Bu yöntem, CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu sebebiyle pH'nın 10'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. pH 7.4'de renk değişimi gösterdiğinden dolayı fenol kırmızısı indikatör olarak kullanıldı. Tampon olarak ise pH'sı 10 olan karbonat tamponu kullanıldı. Aktivitelerin tespiti şu prosedüre göre yapıldı: Reaksiyon tüpüne önce 2 ml indikatör (Fenol kırmızısı) ve 1.5 ml doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışıma 0.1 ml enzim çözeltisi eklendi. Aynı anda bu çözelti karışımına 0.4 ml karbonat tamponu katılarak kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile ölçüldü ve Tc olarak belirlendi. Kör olarak kullanılan tüpe 0.1 ml enzim çözeltisi yerine saf su katıldı. Aynı işlemler tekrarlanıp To belirlendi. Bu yöntemde CA enzim aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂

hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tarif edilmektedir. İstatistik analizlerinde SPSS-18 programı kullanıldı. Gruplar arasında bağımsız örneklem t-testi yapıldı. p<0.05 istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi (16).

Bulgular

KAH ve sağlıklı grubun klinik özellikleri Tablo I'de gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi gruplar arasında yaş, kilo, trigliserid, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-kolesterol), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL-kolesterol), kreatinin ve hematokrit değerleri bakımından istatistiksel farklılık bulunmadı (p>0.05). Diyabetes mellitus ve KAH aile hikayesi her iki grupta da yoktu. KAH ve sağlıklı bireylerin CAT enzim aktiviteleri sırasıyla 13.09±4.74 EU/gHb ve 21.30±17.99 EU/gHb olarak bulundu (Tablo II). Hasta ve sağlıklı bireylerin CA enzim aktiviteleri ise sırasıyla 0.75±0.28 EU/gHb ve 2.06±0.24 EU/gHb olarak tespit edildi (Tablo II). KAH grubunda CAT aktivitesi sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu (p=0.015) (Tablo II). CA aktivitesi KAH grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu (p<0.001) (Tablo II).

Tartışma

KAH gerek gelişmiş ülkeler, gerekse ülkemizde mortalite ve morbidite nedeni olarak ilk sıralarda yer alan hastalıklardandır. Koroner arterlerde ateroskleroz gelişmesi sonucunda KAH ortaya çıkar. KAH miyokardın oksijen ve besin ihtiyacının karşılanmasında bozukluğa neden olur (2). Oksidatif stres ve serbest radikallerin kalp hastalıklarının ortaya çıkmasında önemi olduğu bilinmektedir. Vücutta meydana gelen anti-

Tablo I. Çalışma gruplarının klinik özellikleri

	Koroner arter hastalığı grubu (n=35)	Kontrol grubu (n=33)	p değeri
Yaş (yıl)	47±6.0	48.96±5.2	0.16
Kilo (kg)	78.68±8.5	79.81±7.9	0.574
Trigliserid (mg/dl)	188.06±86.18	168.83±66.39	0.306
LDL kolesterol (mg/dl)	123.06±48.02	110.7±29.55	0.209
HDL kolesterol (mg/dl)	39.09±5.84	41.8±9.9	0.178
Kreatinin (mg/dl)	0.89±0.16	0.89±0.14	0.925
Hematokrit (%)	44.11±5.53	43.81±3.3	0.791

Tablo II. Koroner arter hastaları ve kontrol grubunun katalaz ve karbonik anhidraz düzeyleri

	Koroner arter hastalığı grubu (n=35)	Kontrol grubu (n=33)	p değeri
Katalaz (EU/gHb)**	13.09±4.74	21.30±17.99	0.015
Karbonik anhidraz (EU/gHb)**	0.75±0.28	2.06±0.24	<0.000

*: Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir

** : EU: Enzim ünitesi, Hb: Hemoglobin

oksidan-prooksidan dengesizliği de bu patolojilerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (5-8). Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının derecesi, hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. SOD, GPX ve CAT gibi bazı antioksidan enzimler serbest radikallerin oluşmasını engeller (17). Oksidatif stresin vücuttaki savunma mekanizmalarından birisi olan CAT enzimi, bu çalışmada koroner arter hastası ve kontrol gruplarının eritrositlerinde ölçüldü. Hasta gruplarındaki CAT aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Serdar ve ark.nın yaptığı çalışmada ise koroner arter hastalarında SOD ve GPX enzimleri sağlıklı bireylere kıyasla daha düşük, plazma malondialdehid seviyesi ise daha yüksek bulunmuştur (18). Bu çalışmada, hasta gruplarındaki CAT aktivitesinin düşük olması Serdar ve ark.nın çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Demirbağ ve ark. koroner arter hastalarının total antioksidan kapasitesinin anjiyogramı normal olan bireylere göre düştüğünü ve DNA zararının arttığını göstermişlerdir (19). Başka bir çalışmada hipertansif bireylerde serbest radikal ve DNA zararının yükseldiği belirtilmiştir (20). Literatürde aşırı oksidatif stres ile yetersiz antioksidan savunma sisteminin kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir (3,21). Yaptığımız bu çalışmada KAH'da CAT enzim aktivitesi önemli derecede düşük bulunmuştur. Çünkü CAT çok güçlü bir antioksidan enzimdir. Toksik hidrojen, peroksidin uzaklaştırılmasında kullanılır ve bu yüzden KAH'nın patogenezinde önemli rol oynayabilir.

Çalışmamızda eritrosit CA aktivite değerleri incelendiğinde KAH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşüklük tespit edildi (Tablo II). Karbondioksit ve sudan karbonik asidin oluşumunu sağlayan CA enzim aktivitesinin KAH grubunda düşük olması, bu patolojik süreçte asid-baz dengesinin bozulduğunun ve eritrositlerdeki hipoksinin göstergesidir (22). CA II enzim eksikliği olan üç Japon hasta üzerinde yapılan bir çalışmada kalp atım hızı, vücut sıcaklığı, solunum hızı sağlıklı bireylere göre daha yüksek iken, arteriyel kandaki pH ve karbonik asid daha düşük bulunmuştur. Ayrıca karbondioksidin uzaklaştırılmasında orta dereceli aksamaların olduğu rapor edilmiştir (23). Vücuttaki asid-baz dengesinin düzenlenmesi hücre dışı pH'nın 7.4 olması temeline dayanmaktadır. Bu ise Henderson-Hasselbach eşitliğiyle gösterilen karbonik tampon bileşikler olan karbondioksit ve bikarbonatın derişimlerine bağlıdır. Asidin başlıca kaynakları ise karbondioksit ve laktik asid üreten aerobik ve anaerobik hücresel solunum sistemidir. Eğer asidler hücrede birikirse hücre içi pH tehlikeli derecede düşebilir. Bu durum ise hücrenin

fonksiyonlarında sorunlara yol açar. Yapılan bazı çalışmalarda tümörleşme sürecinde CA'daki düşüşün önemli bir etken olduğu belirtilmiştir (24,25).

Oksidatif stres kardiyovasküler hastalık insidansını artırmaktadır (9). Hidrojen peroksidi detoksifiye eden CAT enzimi hidrojen peroksidin zararlı etkilerini peroksidazlar yardımıyla büyük ölçüde azaltmaktadır (8). Reaktif oksijen radikali veya serbest oksijen radikali tarafından oluşturulan oksidatif stres ya da lipid peroksidasyonu başlıca ateroskleroz, kanser, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif sinir sistemi hastalıkları gibi pek çok hastalığın gelişimi ile ilişkilidir. Oksidatif stresin lipidler, proteinler ve DNA üzerindeki biyolojik oksidatif etkileri C vitamini, E vitamini ve fenolik bileşikler gibi dışarıdan diyetle alınan antioksidanlar ve içerden alınan antioksidanlarla (SOD, CAT ve GPX) kontrol altında tutulur. Yine ek olarak serbest radikal hasarından koruyucu savunma sistemi olarak vitamin E, vitamin C, beta-karoten, glutatyon, ürik asid, bilirubin ve çeşitli metalloenzimler; GPX (selenyum), CAT (demir) ve SOD (bakır, çinko, manganez) ve örneğin seruloplazmin (bakır) gibi bazı proteinleri içerir. Serbest radikal oluşumu ile antioksidan aktivite arasındaki denge oksidatif strese bağlı bozuklukların patogenezinde önemli rol oynar. KAH hastalarında klinik olarak stabil olsalar bile, oksidatif stresin yüksek olduğu gösterilmiştir (26,27). Yine Aparna ve ark.nın yaptığı çalışma bizim bulgularımıza paralellik göstermektedir (28). Yapılan başka çalışmalarda KAH grubunda CAT enzim aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (29,30). KAH grubunda CAT enzim aktivitesinin normale göre düşük olması, hastalığın oluşumunda veya ileri sürecinde bireyin yüksek derecede oksidatif strese maruz kaldığını göstermektedir. Bununla birlikte KAH'da reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma kapasitesi arasında dengesizlik olduğu rapor edilmesine rağmen, sebebi tam olarak anlaşılamamıştır. Antioksidan sistemde aksaklıkların olması hastalığın prognozunu daha da kötüleştirebilir. Diğer yandan, CA'nın KAH'da düşük seviyede olması hastalık sürecinde pH dengesizliğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak ortaya çıkan oksidatif stresi ve asid-baz dengesizliğini ortadan kaldıracak girişimlerin, hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olabileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Yusoff K. Vitamin E in cardiovascular disease: has the die been cast? Asia Pac J Clin Nutr 2002; 11: 443-447.
2. Messerli FH, Oparil S, Feng Z. Comparison of efficacy and side effects of combination therapy of angiotensin converting enzyme inhibitor (benazepril) with calcium

- antagonist (either nifedipine or amlodipine) versus high-dose calcium antagonist monotherapy for systemic hypertension. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1182-1187.
3. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.
 4. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1815-1826.
 5. Riemersma RA, Wood DA, MacIntyre CCA, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* 1991; 337: 1-5.
 6. Regnström J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-1186.
 7. Jayakumari N, Ambikakumari V, Balakrishnan KG, Iyer KS. Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes. *Atherosclerosis* 1992; 94: 183-190.
 8. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
 9. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 426-432.
 10. Nojiri S, Daida H, Mokuno H, et al. Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men. *Jpn Heart J* 2001; 42: 677-690.
 11. Kagan A, Kannel WB, Dawber TR, Revotskie N. The coronary profile. *Ann N Y Acad Sci* 1963; 97: 883-894.
 12. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004; 19: 199-229.
 13. Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* 1967; 47: 595-781.
 14. Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioassays* 1989; 10: 186-192.
 15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
 16. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalı. 4. Baskı. Ankara: Özdemir Yayıncılık Ltd Şirketi, 1993: 70-99.
 17. Gianetti J, Pedrinelli R, Petrucci R, et al. Inverse association between carotid intima media thickness and the antioxidant lycopene in atherosclerosis. *Am Heart J* 2002; 143: 467-474.
 18. Serdar Z, Yesilbursa D, Dirican M, Sarandol E, Serdar A. Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 655-664.
 19. Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyiğit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570: 197-203.
 20. Njelekela M, Negishi H, Nara Y, et al. The relation of oxidative DNA damage to hypertension and other cardiovascular risk factors in Tanzania. *J Hypertens* 2001; 79: 529-533.
 21. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2002; 106: 927-932.
 22. Benarroch EE. Hypoxia-induced mediators and neurologic disease. *Neurology* 2009; 73: 560-565.
 23. Taki K, Kato H, Endo S, et al. Cascade of acetazolamide-induced vasodilatations. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; 103: 240-248.
 24. Cobanoglu U, Demir H, Duran M, Şehitogullari A, Mergan D, Demir C. Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 1377-1382.
 25. Venta PJ. Carbonic anhydrases in mammalian cell culture and tumors. In: *The Carbonic Anhydrases*. Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G, Carter ND (eds). New York: Plenum Press, 1991: 71-78.
 26. Cihan HB, Çolak C, Nisanoğlu V ve ark. Radial arter aterosklerozunda antioksidan enzimler ve 6-sülfatoksimeatoninin rolü. *Turk J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 16: 216-222.
 27. Weinbrenner T, Cladellas M, Isabel Covas M, et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 168: 99-106.
 28. Aparna A, Betigeri AM, Pasupathi P. Homocysteine and oxidative stress markers and inflammation in patients with coronary artery disease. *Int J Biol Med Res* 2010; 1: 125-129.
 29. Valiūnienė J, Jablonskienė V, Kuėinskienė ZA. Homocysteine and lipid peroxidation markers in patients with coronary heart disease. *Biologija* 2007; 53: 29-33.
 30. Kaur K, Bedi G, Kaur M, Vij A, Kaur I. Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in coronary artery disease. *Indian J Clin Biochem* 2008; 23: 33-37.