

r-HuEPO tedavisi ve serum total glutatyon s-transferaz aktivitesi

Dr.Bünyamin KAPTANOĞLU*, Dr.Mahmut DALMAZ**, Dr.Ali KOŞAR**, Dr.Mehdi YEKSAN**,
Dr.İdris AKKUŞ*, Dr.Nurten YEKSAN***, Dr.Süleyman ALICI**

Glutatyon S-transferaz (GST)'lar organizmada yaygın olarak bulunan bir enzim grubudur. Bazı hastalıkların ve hormonal manipulasyonların bu enzimin hücresel düzeyini değiştirdiği bilinmektedir. Bu çalışmada diyaliz hastalarında r-HuEPO tedavisinin serum total GST konsantrasyonuna etkisini inceledik. Hastalar üç gruba ayrıldı. Grup-I en az altı aydır haftada 2000-4000 IU subkutan r-HuEPO tedavisi gören 15 hastadan oluşuyordu. Grup-II kontrol grubu olup hiç r-HuEPO tedavisi almamış 15 hastadan oluşuyordu. Grup-III'de ise çalışmadan önce r-HuEPO tedavisi görmemiş 10 hasta mevcut olup bu gruptaki hastalar 3 aylık çalışma süresince haftada 3000 IU subkutan r-HuEPO tedavisi aldılar. Grup-III' deki hastalardan tedavi öncesi ve sonrası serum GST aktivitesine bakıldı. Grup-I ve -II' deki hastalarda sadece birkez GST aktivitesi bakıldı. Hastalarda total GST tayini Habig ve ark.'nın metoduna göre çalışıldı. Grup-I ve -II' deki hastalarda serum GST aktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.1$). Fakat Grup-III' deki hastalarda r-HuEPO tedavisi öncesi serum GST aktivitesi üç aylık r-HuEPO tedavisi ile 31.69 ± 6.23 U.L.' den 39.04 ± 7.20 U.L. düzeyine yükseldi Bu istatistiki olarak anlamlı idi ($p < 0.03$). Ayrıca serum GST konsantrasyonu ile serum transaminaz düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon ve HBs+ hastalarla HBs- hastalar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Sonuç olarak, r-HuEPO, tedavinin başlangıcında serum GST seviyesini yükseltmekte fakat uzun süreli tedavi ile bu etkiye karşı tolerans geliştirmekte olduğu sonucuna varılabilir. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 2(1):28-31,1995]

Anahtar Kelimeler : r-HuEPO, glutatyon S-transferaz

r-HuEPO treatment and serum total glutathione S-transferases activities

Glutathione S-transferases (GST) are found throughout the body. It has been known that some disease states and hormonal manipulations change the cellular amount of these enzymes. In this study, effect of r-HuEPO treatment on serum total GST activities were investigated in hemodialysis patients (HD). The patients were divided into three groups. Group-I consisted of 15 patients having 2000-4000 IU week r-HuEPO subcutaneously for at least 6 months. Group-II were 15 patients and had no r-HuEPO treatment. Group-III consisted of 10 patients who never had r-HuEPO before starting the three months' study. In Group-I and -II, GST activities were analyzed in the beginning of the study, whereas in Group-III these assays were performed both at the onset and in the end of three months' study. GST assays were done by the method of Habig et al. There was no significant differences between group-I and -II in terms of serum total GST activities ($p > 0.1$) but GST activities in group-III were increased with r-HuEPO treatment in the end of study (39.04 ± 7.2 U.L.) compared to the activities obtained at the beginning of the treatment (31.69 ± 6.6) ($p < 0.03$). On the other hand we could not find any correlation between serum GST and Transaminase activities and any difference between GST activities of HBs+ and HBs- patients. In conclusion, r-HuEPO may increase the level of serum GST activity with short-term treatment (3 months), but may gain tolerans with long-term r-HuEPO treatment. [Journal of Turgut Özal Medical Center 2(1):28-31,1995]

Key Words : r-HuEPO, glutathione S-transferases

* : Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı - Konya

** : Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı - Konya

*** : Konya SSK Hastanesi Dializ Ünitesi - Konya

Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik veya katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi taşıyıcı ve bağlayıcı rolleri vardır. Katalitik olarak yabancı maddeleri glutatyon (GSH) daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesine neden olurlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri vardır. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pekçok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için depo ve taşıma rolü üstlendiğinin kanıtıdır.^{1-8, 14}

Rekombinant insan eritropoetinin (r-HuEPO) hemodializ hastalarında anemi tedavisinde kullanılmasına 1985 yılında başlanmış olup hala birçok ülkede başarı ile kullanılmaktadır.⁹ Literatürde GST'lerin uyarılması rat ve fare gibi memeli hayvanlarda incelenmiş ve hormonal manipülasyonların bu enzimin seviyesini değiştirebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle biz bu çalışmada hemodializ hastalarında (HD) kemik iliğini etkileyen bir hormon olan r-HuEPO tedavisinin serum total GST aktivitesi üzerine etkisini inceledik.

MATERYAL VE METOD

Çalışmaya 40 hemodializ hastası alındı. Grup-I 6 ila 42 ay süreyle haftada 2000-4000 IU subkutan r-HuEPO (Eprex Cılag) alan 15 hastadan oluşuyordu. Grup-II kontrol grubu olup r-HuEPO almayan 15 hastadan oluşuyordu. Grup-III daha önce hiç r-HuEPO tedavisi almamış 10 hasta olup bu hastalara 3 aylık çalışma süresince 3000 IU/hafda subkutan r-HuEPO tedavisi verildi. Hastaların klinik özellikleri Tablo I' de özetlenmiştir.

Çalışmaya alınan 45 hastadan 17'si hipertansif olup 10 hasta kalsiyum kanal blokleri, 7 hasta anjiyotensin inhibitörü kullanıyordu. Çalışma boyunca hastaların antihipertansif ilaçları değiştirilmedi. Tüm hastaların 2 gr /gün Ca, aktif D3 vitamini (0.25 mg/gün) aliminyum fosfor bağlayıcıları, multivitamin preparatlarını düzenli olarak almaları sağlandı. Çalışma süresince r-HuEPO'nun etkinliği açısından her iki gruba ağızdan demir normal dializ

hastası ihtiyacına göre verildi. Hastalar haftada 2-3 kez 4 saat süren HD tedavisi görüyorlardı. Hastaların 11'ine 'cuprophane', 29'una 'polysulphone' dializerlerinin kullanıldığı diyaliz uygulandı. Çalışmaya alınan HD hastalarının kronik böbrek yetmezliği etiolojisi aşağıdakilerden oluşuyordu. 11 hastada glomerulonefrit, 4 ünde nefrotik sendrom, 3 ünde hipertansif glomeruloskleroz, 3 ünde diabetik nefropati, 4 ünde nefrolitiazis, 2 sinde piyelonefrit, 2 sinde polikistik böbrek hastalığı, 1 inde ankilozan spondilite bağlı böbrek yetmezliği, 1 inde Alport sendromu, 1 inde konjenital ureteral stenoz, 1 inde amiloidoz, 1 inde ise renal arter stenozu mevcut idi. 9 hastanın etiolojisi bilinmemekte idi.

Total GST tayini Habig ve arkadaşlarının⁶ metoduna göre çalışıldı. Okumalar Atom 388 marka spektrofotometrede 25°C' de yapıldı. pH' sı 6.5 olan fosfat tamponunda 1 mM GSH (Sigma, G-4251), 1mM 1-kloro,2-4 dinitrobenzen (CDNB, Sigma, C-6396, 100 gr) ve 1 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Sigma, Lot: 126F-0299) ihtiva eden çalışma çözeltisinin 1 ml' sine 20 mikrolitre serum ilave edilip karıştırıldıktan sonra hemen cihaza verildi.

Okumalar cihazın hafızasına tarafımızdan önceden yerleştirilmiş programa göre yapıldı. Programda 1 dk ön inkübasyon ve 30 saniye arayla 6 okuma yapıldı. D/dk cihaz tarafından otomatik hesaplanarak 5312 faktörü ile çarpıldı. Böylece sonuçlar U/L cinsinden bulundu.

Ölçümlerde GSH ile CDNB arasında meydana gelen spontan reaksiyon göz önüne alınarak reaktifte serum ilave edilmeden aktivite ölçümü yapıldı ve serum ilave edilmeden de bir miktar ürün oluştuğu görüldü. Bu şekilde ölçülen aktivite kör ölçümü gibi kabul edilerek diğer ölçümlerden çıkarıldı. Böylece sadece enzimin katalizlediği aktivite ölçülmüş oldu.⁸ GSH derişimleri deney süresince ihmal edilebilecek oranda okside olduğundan bu oksidasyon göz ardı edildi.

BULGULAR

Birinci grupta 6-12 aydır hemodializden sonra 2000-4000 subkutan IU r-HuEPO alan 15 hasta vardı. Hastaların yedisi kadın sekizi erkek; yaşları 18 ila 62 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 36.7 ± 14.3 yıl; hemodializ süreleri 2 ay ile 60 ay arasında olup ortalama 32 ± 19 ay idi. Bu grup hastaların hepsi de polysulphone membran kullanıyorlardı. Bu gruptaki hastaların 8'i hipertansif, 7'si normotansif olup çalışma başında ortalama sistolik basınçları 140.7 ± 26 mm Hg, diastolik basınçları 83.3 ± 13.5

Tablo I. Grup-I, -II ve -III'deki hastaların özellikleri

	Grup-I (n=15) 6-42 aydır EPO kullanan	Grup-II (n=15) Hiç EPO Kullanmayan	Grup-III (n=10) Yeni EPO'ya Başlayan
Cinsiyet (E : K)	8:7	8:7	6:4
Yaş (Yıl)	36.7 ± 14.3	40.7 ± 13.1	35.3 ± 11.9
HD Süresi (Ay)	32 ± 19.0	39.7 ± 25.5	27.8 ± 24.5
Hiperten./Normoten	8:7	3:11	4:6
Sistol. Bas. (mmHg)	140.7 ± 26	132.7 ± 22.8	131.9 ± 22.9
Diast. Bas. (mmHg)	83.3 ± 13.5	80 ± 13.1	79.6 ± 13
Hematokrit (%)	29.53 ± 5.08	27.92 ± 26.9	21.96 ± 2.98
Membr. : Cupr:Poly	:-:15	6:9	5:5

mm Hg idi.

İkinci grupta r-HuEPO tedavisi almayan 15 hasta vardı. Hastaların 8 i erkek, 7 si kadın; yaşları 18 ila 65 arasında olup yaş ortalaması 40.7 ± 13.1 yıl; hemodializ süreleri 3 ila 6 ay arasında olup ortalama 39.7 ± 25.5 ay idi. Bu grup hastaların 6 sı cuprophane, 9 u polysulphone dializ tedavisi görüyorlardı. Hastaların 3 ü hipertansif 11 i normotansif olup ortalama sistolik basınçları 132.7 ± 22.8 , diastolik basınçları 80.0 ± 13.1 mmHg idi.

Üçüncü grupta daha önce hiç r-HuEPO tedavisi almamış 10 hasta olup bu hastalara 3 aylık çalışma süresince 3000 IU her dializden sonra subkutan r-HuEPO tedavisi verildi. Bu hastaların 6 sı erkek 4 ü kadın yaşları 15 ile 56 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 35.3 ± 11.9 yıl; hemodializ süreleri 1 ay ile 60 ay arasında değişmekte olup ortalama 27.8 ± 24.5 ay idi. Hastaların 5 i cuprophane 5 i polysulphone membranlı dializ tedavisi görüyorlardı. Bu gruptaki hastaların 4 ü hipertansif 6 sı normotansif olup sistolik basınçları 131.9 ± 22.9 , diastolik basınçları 79.6 ± 13 mmHg idi.

Grup-I ve II'deki hastalarda serum GST aktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.1$). Fakat Grup-III'deki hastalarda r-HuEPO tedavisi öncesi serum GST aktivitesi 3 aylık r-HuEPO tedavisi ile 31.69 ± 6.23 U/L'den 39.04 ± 7.20 U/L düzeyine yükseldi. Bu istatistik olarak anlamlı idi ($p < 0.003$). ayrıca serum GST konsantrasyonu ile serum transaminaz düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon ve HBs+ hastalarla HBs- hastalar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi.

TARTIŞMA

r-HuEPO dializ hastalarında gelişen anemilerin tedavisinde halen dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. r-HuEPO tedavisi ile hemodializ hastalarında yaşam kalitesi artmaktadır. Bu etkilerin

yanında r-HuEPO tedavisinin başlıca olumsuz etkileri eritrosit kitlesindeki artışa bağlı oluşan demir eksikliği, hipertansiyon, konvülsyonlar, dializer içinde pıhtılaşmaların olması, Flu-like semptomlar, serum fosfat seviyesinde yükselme ve solute klirensin azalmasıdır¹⁰. Bu çalışmada Grup-III'deki hastalarda 3 aylık r-HuEPO kullanımı ile serum total GST aktivitesi anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.003$).

Bu durum r-HuEPO tedavisinin özellikle erken dönemlerinde serum total GST aktivitesini artırdığını gösterir. Diğer taraftan grup-I ve II'deki serum total GST aktiviteği arasında anlamlı farkın olmaması ise uzun süreli r-HuEPO kullanımında bu etkiye tolerans geliştiğini gösterebilir. Literatürde GST'lerin uyarılması rat ve fare gibi hayvanlarda incelenmiş ve hormonal manipülasyonların bu enzim seviyesini değiştirebildiği gözlenmiştir. Fakat r-HuEPO tedavisinin GST üzerine etkisi incelenmemiştir. Bu nedenle r-HuEPO tedavisinin erken dönemindeki bu serum total GST seviye artışının mekanizmasını izah etmek güçtür. İndirekt olarak r-HuEPO tedavisinin bazı steroid hormonlar üzerine olan etkilerine bağlı veya direkt olarak r-HuEPO nun GST'yi uyarıcı etkisine bağlı olabileceği gibi erken dönemde r-HuEPO organizmaya yabancı bir madde etkisi yaparak geç dönemlerde ise biouyumunun iyi olması sonucu bu etki kalkmaktadır.

Literatürdeki hepatitlerde, özellikle otoimmün hepatitlerde GST'nin arttığı bildirilmektedir. Biz serum total GST aktivitesi ile transaminazlar (SGOT, SGPT) arasında anlamlı bir korelasyon bulamadık ayrıca cuprophane membran kullanılan hastalarda HBs+ hastalarla HBs- hastalar arasında serum total GST aktivitesi bakımından anlamlı bir fark yoktu. Bu durum üremik hastalarda karaciğer hasarında transaminazlardaki artışın beklenenin çok altında olması sebebine bağlı olabilir.

Sonuç olarak, r-HuEPO tedavinin başlangıcında

serum total GST seviyesi yükselmekte fakat uzun süreli tedavide bu etkisine tolerans gelişmektedir. Bu durum r-HuEPO' nun GST üzerine indirekt veya direkt uyarıcı etkisi sonucu r-HuEPO' nun biouyumluluğu için bir gösterge olarak kabul edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Simons PC, David LVJ. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione affinity chromatography. *Anal Biochem* 1977;82:334-41.
2. Bengt Mannervik. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol* 1985;157:357-415.
3. Pickett CB. Glutathione s-transferases: Gene structure, regulation and biological function. *Annu Rev Biochem* 1989;58:743-64.
4. Hayes JD, David J, Brian JC, Geoffrey B. Purification of human hepatic glutathione S-transferases and the development a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clinica Chimica Acta* 1983;134:107-21.
5. Trakshel GM, Mahin DM. Characterization of glutathione S-transferases in rat kidney. *Biochem J* 1988; 252:127-36.
6. Habig WH, Michael JP, William J. Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 198,74;249(22):7130-9.
7. McQuaid S, Aidan O, Michael RB, Peter H. Transcriptional activation of the glutathione S-transferase π gene in human ureteric and bladder carcinomas. *Cancer Letters* 1988;39:209-16.
8. Ünsal İ. Koyun karaciğeri glutatyon S-transferazının saflaştırılması ve izozimlerinin tanımlanması. Doktora tezi, Ankara 1990.
9. Pollok M, Bommer J, Gurland HJ. Effect of r-HuEPO treatment in end-stage renal failure patients. Result of a multi-center phase II/III study. *Contr Nephrol* 1989;76:201-11.
10. Scigalla P, Wiczorek L, Bicker U. In: March B, Garnick. Erythropoietin in clinical application by Marcel Dekker, Inc. 1990;141-82.

Yazışma adresi : Doç.Dr.Mehdi YEKSAN
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları ABD
KONYA