

Yaş ve Sigara İçiminin Eritrosit Katalaz Aktivitesi ve Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Aysun Bay Karabulut*, Elif Özerol*, İsmail Temel*, Engin M. Gözükara*, Ömer Akyol*

*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Malatya

Katalaz (CAT, EC 1. 11.1.6), hidrojen peroksitin suya dönüşümünü katalizleyen antioksidan bir enzimdir. Dokulardaki katalaz aktivitesi büyük oranda değişiklik gösterir. Enzim aktivitesi karaciğer ve böbrek dokularında yüksek düzeyde iken, bağ dokusunda düşüktür. Normalde insan eritrositleri katalaz bakımından zengindir. Bu çalışmada, bazı şikayetlerle farklı kliniklere başvuran 475 sağlıklı bireyden alınan eritrositlerdeki katalaz aktiviteleri belirlendi. Ayrıca sigara içiminin eritrositlerdeki enzim aktivitesine etkisini araştırmak için sağlıklı bireyler sigara içenler (n=88) ve sigara içmeyenler (n=386) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

CAT enzim aktivitesi Aebi metoduna göre belirlendi. CAT aktivitelerinin yanında; kan sayım cihazı ile RBC, MCV, MCHC ve HCT parametreleri ölçüldü.

Farklı yaş gruplarındaki katalaz aktivitelerini belirlemek için, bireyler dört gruba ayrıldı: 1. grup: yaşı 0-20 arasında olanlar (n=28), 2. grup: yaşı 21-40 arasında olanlar (n=192), 3. grup: yaşı 41-60 arasında olanlar (n=172), 4. grup: yaşı 60-81 arasında olanlar (n=83)

Bu grupların eritrosit CAT aktiviteleri sırasıyla, 2981 ± 962 k/grHb, 3039 ± 923 k/grHb ve 3086 ± 797 , 3266 ± 13 k/grHb olarak hesaplandı. Yaş arttıkça katalaz aktivitesinde bir dereceye kadar artış gözlenirken, gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesine etkisi olmadığı görüldü. Sigara içenlerde katalaz aktivitesi 3173 ± 910 k/gHb iken, sigara içmeyenlerde 3065 ± 979 k/gHb bulundu. Görüldüğü gibi katalaz aktivitesi sigara içenlerde içmeyenlere göre biraz yüksektir fakat bu istatistiki olarak anlamlı değildir.

Anahtar Kelimeler: Yaş, Sigara, Katalaz, Antioksidan, Hematolojik Parametreler

The Effect Of Age And Smoking On Erythrocyte Catalase Activity And Some Hematological Parameters

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) is an antioxidant enzyme that catalyses the conversion of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water and $\frac{1}{2} O_2$. The catalase shows various catalytic activity in different tissues. The enzyme activity is higher in liver and kidney and the lower in connective tissues. Human erythrocytes are rich in catalase. In this study, we determined CAT activities in erythrocytes from 475 healthy subjects attended to different clinics for different complaints. We have also divided the subjects into smoker (n=88) and nonsmoker groups (n=386) in order to determine whether smoking may affect the enzyme activity or not in erythrocytes.

Enzyme activity was determined according to the method of Aebi. Activity was expressed in rate constant per gram hemoglobin (k/grHb). Besides CAT activity; RBC, MCV, MCHC, MCH and HCT values were also obtained from Coulter autosampler.

In order to determine CAT activity in different age groups, subjects were divided into to four groups as follows: **Group 1:** ages between 0-20 (n=28), **Group 2:** ages between 21-40 (n=192), **Group 3:** ages between 41-60 (n=172), **Group 4:** ages between 61-80 (n=83)

Erythrocyte CAT activities of these groups were found to be 2981 ± 962 k/gHb, 3039 ± 923 k/gHb, 3086 ± 797 k/gHb and 3266 ± 13 k/gHb, respectively. Although differences of the mean activities between the groups were not statistically significant, CAT activities were increased by age.

There is no effect of smoking on CAT activity in erythrocytes. The activities were 3173 ± 910 k/gHb for smokers, and 3065 ± 979 k/gHb for non-smokers. As seen, smokers have higher CAT activity than nonsmokers, but it was not statistically significant.

Key Words: Age, Smoking, Catalase, Antioxidant, Hematological Parameters

Serbest radikallerin vücuttaki endojen ve eksojen kaynaklarını: solunum zinciri, fagositoz, prostoglandin sentezi, sitokrom P-450 sistemi, oksijenin enzimatik olmayan reaksiyonları ve iyonize radyasyon olarak sıralayabiliriz.¹

Reaktif oksijen türlerinin yaşlanmaya, sigara içimine bağlı olarak arttığı bilinmektedir.²⁻⁵ Bu reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasını ve inaktivasyonunu sağlayan sistemlerden biri de antioksidan enzimlerdir.⁶

Antioksidan enzimlerin bireylerde koruyucu mekanizmasının araştırılması için çok değişik, güvenilir ve standardize metodlar geliştirilmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri çok farklı faktörlerden etkilenmektedir. Bunlar yaş, cinsiyet, yaşam koşulları, hastalık, sigara içimi, alkol kullanımını olabileceği gibi enzim ölçümünde kullanılan metodlar da olabilir.⁷

Eritrosit yaşam süresi, hem oksijen radikal formasyonu hem de intrinstik antioksidan sistemin etkinliğiyle belirlenir.⁸

Yaşlanma için değişik hipotezler öne sürülmüştür.⁴ Şu an geçerli olan en önemli hipotez yaşlanmanın serbest radikal teorisi. Bu teori ilk defa Harman tarafından 1954 yılında ortaya atılmıştır. Yaşlanmanın genetik ve çevre gibi faktörlerden de etkilenebileceğini gösteren çalışmalar vardır.^{9,11} Yaşa bağlı olarak artan serbest radikal miktarı mitokondride oluşan hasara bağlı olarak değişmektedir.

Katalaz enzimi memeli eritrositlerinde bol miktarda bulunur. Katalaz enzimi diğer hücrelerin peroksizomlarında lokalize olmuştur. CAT, tetramerik yapıya sahip molekül ağırlığı 240.000 olan aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" içeren bir hemoproteindir. CAT somatik bir oksidan koruyucudur. Katalazın H₂O₂ ye affinitesi GPX e göre daha fazladır ve CAT eritrosit içerisinde bol miktarda bulunur. Hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalar.¹² Bu enzimin peroksidaz aktivitesine ilave olarak hidrojen peroksidi elektron verici substrat olarak, diğerini de oksidan ve elektron alıcısı olarak kullanma özelliği vardır. Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksid ve metil, etil hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü hidroperoksitlerine ise etki etmez.¹³

Bu çalışmanın amacı, toplumdan randomize olarak seçtiğimiz bireylerde yaşa göre eritrosit CAT aktivitesini tesbit etmek, eğer yaş gruplarında farklılık varsa bunun tahmini sebepleri üzerinde durmaktır. CAT aktivitesi ile birlikte ortalama RBC, MCH,

MCV, MCHC ve HCT değerleri de hesaplanarak aralarında herhangi bir korelasyonun olup olmadığı araştırıldı.

Daha önce yapılan çalışmalarda sigara içiminin de eritrosit antioksidan enzim aktivitesini etkilediği bildirilmiştir.⁵ Bu çalışmada, sigara içen 88 sağlıklı bireyde ve sigara içmeyen 386 bireyde CAT aktivitesiyle beraber yine RBC, MCV, MCHC, HCT değerleri ölçülerek kıyaslandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olğular: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesine değişik nedenlerle gelen ve ilgili bölümün hekimi tarafından sağlıklı olduğuna karar verilen, hiçbir enfeksiyonu bulunmayan ayrıca rutin tetkik amaçlı CBC analizi için kan alınan 475 sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı birey çalışma grubu olarak alındı. Bireyler yaşlarına göre: 1.grup: 0-20 yaş, 28 kişi; 2.grup: 21-40 yaş, 192 kişi; 3.grup: 41-60 yaş, 172 kişi; 4.grup: 61- 81 yaş, 83 kişi olmak üzere 4 ayrı gruba ayrıldı. Ayrıca sigara içme durumuna göre bireyler, sigara içenler 88 kişi, içmeyenler 386 kişi olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Kan Örnekleri: Bütün polikliniklere gelen sağlıklı bireylerden venöz kan örnekleri EDTA 'lı tüplere kondu. Tam kanda STKS, UK cihazı ile RBC (red blood cell), MCV (mean corpuscular volum), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) ve HCT (hematokrit) değerleri hesaplandı. Alınan kan önce 1500 x g de 5 dk santrifuj edildi. Plazma ve lökosit tabakası uzaklaştırıldı. Dipte kalan pellet kısmı 3 kez soğuk izotonik NaCl ile yıkandı. Eritrosit sedimentlerinin üzerinden 0.1'er ml alınarak üzerine 1.9 ml soğuk bidistile su ilavesi ile hemoliz edildi.

Katalaz Aktivite Ölçümü: Katalaz aktivitesini Aebi metoduyla UV/visible spektrofotometrede ölçüldü.¹⁸ H₂O₂ nin parçalanıp ortamdaki uzaklaştırılmasıyla oluşan absorbans azalması 240 nm de takip edildi. Bulunan değeri sulandırma oranı ile çarpıp aktivite sabiti (k değeri) bulunduktan sonra Olympus AU 600 ile ölçülen Hb aktivitesine bölündü. Ayrıca olası bir anemi veya diğer sebeplerle Hb miktarı değişebileceğinden, bulduğumuz k değeri RBC ve % HCT değerine bölünerek k/10⁶ rbc cinsinden de hesaplandı.

İstatistik: İstatistik analizini SPSS ® for Windows 6.0 kullanılarak yapıldı. Yaş gruplarına göre kıyaslama oneway (Kruskal Wallis) ANOVA testi ile yapıldı. Her bir yaş grubuyla CAT, RBC, MCV, MCHC ve

Yaş ve Sigara İçiminin Eritrosit Katalaz Aktivitesi ve Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Tablo1: Yaş gruplarına göre eritrosit katalaz (CAT) aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler.

| | 0-20 (n=28) | 21-40 (n=1929) | 41-60 (n=172) | 61-81 (n=83) |
|---|-------------|----------------|---------------|--------------|
| CAT (k/gHb) | 2981±962 | 3039±923 | 3086±797 | 3266±13* |
| HCT (%) | 36.64±4.71 | 40.58±21.6 | 39.29±5.78 | 44.39±39.88 |
| MCH (pg) | 79.56±7.84 | 82.11±10.5 | 93.8±84.5 | 85.01±6.86 |
| MCHC (g/dl) | 33.83±1.39 | 32.99±6.29 | 34.54±6.75 | 44.15±57.77* |
| MCV (µm ³) | 27.11±3.41 | 29.19±7.06 | 29.15±6.57 | 29.05±5.55 |
| RBC (10 ⁶ /mm ³) | 4.41±0.94 | 5.2 ±5.05 | 4.93±2.96 | 4.66±0.6 |

* p<0.005, diğer bütün yaş grupları ile karşılaştırıldığında

Tablo 2: Sigara içen ve içmeyenlerdeki cat, hct, mch, mchc, mcv, rbc değerleri; (ortalama ±standart sapma)

| | Sigara içen | Sigara içmeyen | P değeri |
|---|-------------|----------------|----------|
| CAT (k/gHb) | 3173 ± 910 | 3065 ± 979 | 0,35 |
| HCT (%) | 43.5 ± 32.3 | 40.17 ± 18.9 | 0.25 |
| MCH (pg) | 82.64 ± 7.1 | 87.83 ± 58.0 | 0,46 |
| MCHC (g/dl) | 32.94 ± 7.1 | 34.95 ±18.3 | 0.38 |
| MCV (µm ³) | 28.01± 4.8 | 29.05± 6.1 | 0.19 |
| RBC (10 ⁶ /mm ³) | 4.78± 0.5 | 5.06± 4.4 | 0.60 |

HCT değerleri kıyaslandı. Ayrıca sigara içiminin her bir parametreyi nasıl etkilediğini anlamak için serbest t testi uygulandı.

BULGULAR

Tablo 1'de görüldüğü gibi yaş artışı ile CAT aktivitesinde bir artış gözlenirse de bu istatistiki olarak anlamlı değildi. Sadece birinci grupla dördüncü grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi. HCT, MCHC değeri yaş arttıkça artmış, fakat bu artış istatistiki olarak anlamlı değildi. 61-81 yaş grubunun MCHC değeri bütün yaş gruplarından anlamlı olarak yüksekti. (p<0.05) MCV ve RBC değerleri ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Sigara içiminin CAT aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde Tablo 2'de görüldüğü gibi serbest t testi yapıldığında istatistiki olarak herhangi bir etkinin olmadığı tesbit edildi. Fakat sigara içenlerin ortalama CAT değerinin içmeyenlerden daha yüksek olduğu görüldü. Diğer parametrelerle yaş arasında da istatistiki olarak herhangi bir fark gözlenmedi.

CAT'ın diğer parametrelerle arasındaki ilişkiye 2 yönlü t testi ile bakıldığında HCT ile CAT arasında anlamlı bir korelasyon bulundu (r= 0.21, p<0.0001) bulundu. Yaş ile diğer parametreler arasında 2 yönlü t testi ile bakıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

TARTIŞMA

Antioksidan enzimlerin yaşlanmada ve bir çok hastalıkta koruyucu etkisi bilinmektedir. Bireyin genetik yapısı yanında çevre, yaşam koşullarının ve bireyin kan alınma sırasındaki durumunun da bu enzimlerin aktivitesine etkisi olduğu bilinmektedir.

Ayrıca laboratuvar çalışma koşullarının da *in vitro* çalışmalarda enzim aktivitesini etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Serbest oksijen radikalleri farklı dokuları farklı oranda etkilemektedir. En fazla etkilenen organlardan biri karaciğerdir. Bu çalışmada bizim eritrosit içi enzim aktivitesini çalışmamızın asıl nedeni bu hücrelerin kolay elde edilebilmeleri ve vücut hücrelerinin geneli hakkında fikir verebilmeleridir. Bir çok çalışma, yaşa bağlı olarak antioksidan enzim aktivitesinin değişebileceğini göstermiştir.^{2,4} Wei ve ark.'nın yaptığı çalışmada cilt fibroblast hücrelerinde yaşla beraber CAT, Cu-Zn SOD ve GSH-Px azalır, Mn-SOD enzim aktivitesinin artmış olduğu görülmüştür.² Fransa'da yapılan bir çalışmada, 4 ile 65 yaş arasında 1782 bireyde ve 65 ile 97 yaş arasında 54 bireyde yaşla beraber CAT, Cu-Zn SOD, GSH-Px aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir; Guemouri ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada 65 yaşına kadar antioksidan enzimler aktivitelerinin stabil olduğu, daha sonraki yaşlarda ise antioksidan enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir.¹⁴ Bir başka çalışmada, CAT ve GSH-Px aktivitesinin yaşla değişmediği gözlenmiştir.⁷ Yapılan başka bir çalışmada da Cu-Zn SOD aktivitesi azalırken, GSH-Px ve CAT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.¹⁵ Bizim çalışmamızda ise istatistiki olarak anlamlı bulunamasa da yaşa bağlı olarak aktivitenin arttığı gözlemlendi.

Bazı çalışmalarda sigara içiminin antioksidan enzim aktivitesini etkilemediği gösterilmiştir. Bunu da Durak ve arkadaşları, eritrositlerdeki potansiyel antioksidan enzim aktivitesine bağlamışlardır.¹⁶ Zhou ve ark. sigara içimiyle SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitesinin azalmış olduğunu göstermişlerdir.³ Başka

bir çalışmada 18-69 yaş arasındaki 103 sağlıklı bireyde antioksidan enzim düzeyleri araştırılmış GSH-PX düzeyinde lineer bir artma ve SOD düzeyinde lineer olmayan bir azalma gözlenmiş, CAT aktivitesinde yaşla ve sigara içimi ile istatistikî olarak bir azalma gözlenmemiştir.⁴ Yine Volkovova ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada yaşla CAT arasında ters bir bağıntı tesbit etmişlerdir.¹⁷ Aynı çalışmada sigara içimiyle CAT arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken sigara içimiyle GPX aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada serebro vasküler hasara uğramış hastalarda CAT aktivitesinin yaşlı bireylerde kontrole göre artmış olduğu gözlenmiştir.¹⁹

Bizim çalışmamızda sigara içimiyle antioksidan enzim aktivitesinde istatistikî olarak anlamlı herhangi bir değişiklik tesbit edilmese de, aktivitenin sigara içenlerde bir miktar arttığı görülmüştür. Bunu da sigara içimine bağlı olarak artan oksidatif stresin antioksidan enzimler tarafından kompanze edilmeye çalışılmasıyla artırdığı şeklinde yorumlayabiliriz.

Ayrıca hematolojik parametrelerden MCHC, MCH, MCV, RBC nin de yaş ile çok az da olsa belli oranda değişikliğe uğrayabileceği gözlenmektedir. Özellikle yaş arttıkça MCHC değerlerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Yapılan bir başka çalışma da hematokrit değerinin katalaz aktivitesi ile ilişki olmadığı gösterilmiştir.²⁰ Yine başka bir çalışmada, MCHC, MCV and MCH değerleri ile yaş arasında anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır.²¹ Blain ve ark'nın yaptığı çalışmada da RBC, MCV ve MCH değerlerinde yaşla bir artış olduğu rapor edilmiştir.²² Bu artışın sebebini yaşla birlikte eritropoetin üretiminin artmasına bağlayabiliriz.

Tüm bu parametrelerle ilgili değişik çalışmaların birbirleriyle çelişen sonuçların olması; bu parametrelerin ve antioksidan enzimlerin yaş ve sigara içimiyle ilgili olarak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Makalenin hazırlanmasında istatistikî yöntemlerin uygulanmasında yardımlarından dolayı biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç Dr. Saim Yoloğluna sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR:

1. Nonhebel DC, Walton JC: Free Radical Chemistry. Cambridge, MA, University Press,1974
2. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC: 11 Oxidative stress in human aging and itochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. Chin J Physiol 2001; 44 (1):1-
3. Zhou JF, Yan XF, Guo FZ, Sun NY, Qian ZJ, Ding DY. Effects of cigarette smoking and smoking cessation on plasma constituents and enzyme activities related to oxidative stress. Biomed Environ Sci 2000; (1):44-55
4. Denham Harman: Aging and Oxidative Stress. JIFCC 1998; 10:24-27
5. Bolzan A D; Bianchi B. S; Bianchi N.O: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. Clin Biochem 1997; 30 (6):449-54
6. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, et al:The characterization of antioxidants. Food Chem Toxicol, 1995; 33: 601-607
7. Andersen H. R., Nielsen J.B., Nielsen F and Grandjean P: Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem. 1997;43(4) 562-568
8. Kurata M. ; Suzuki M.; Agar NS: Antioxidant systems and erythrocyte life span in mammals. Comp Biochem Physiol 1993; 106 (3): 477-78
9. Harman D: Aging: Prospects for further increases in the functional life span. Age 1994;17:119-146.
10. Harman D: Aging and disease: Extending the functional life span. Ann NY Acad Sci 1996;786:2312-36.
11. Harman D:Free radical involvement in aging: Pathophysiology and therapeutic implications. Drugs & Aging 1993;3:60-80
12. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW: Erythrocyte catalase.A somatic oxidant defense? J Clin Invest 1986;77(1):319-21
13. Akkuş I :Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri.Mimosa basım, Konya 1995: 60-61
14. Guemouri I, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G: Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. Clin Chem 1991; 37:1932-7
15. Jozwiak Z, Jasnowska B: Changes in oxygen-Metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. Mech Ageing Dev 1985;32:77-83
16. Durak I, Yalçın S; Burak Çimen MY; Büyük Koçak S; Kaçmaz M; Öztürk HS: Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense systems. J.Toxicol Environ Health 1999; 56(6):373-8
- 17.Volkovova K; Beno I; Staruchova M.; Bobek P; Mekinova D; Tatara M.: Antioksidative enzyme activity in the blood of healthy persons.Bratisl Lek Listy 1996; 97 (3):134-8
- 18.Aebi H.Catalase in vitro.Bergmeyer, U., ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 1974; pp.673-667
19. Koçaturk PA, Akbostancı MC, Isıkay C, Ocal A, Tuncel D, Kavas GO, Mutluer N. Antioxidant status in cerebrovascular accident Biol Trace Elem Res 2001 May;80(2):115-24.
20. Foote RH, Hare E. Blood catalase and haematocrit values in a breeding colony of Dutch-belted rabbits Lab Anim 2001; 35(2):140-6
21. Mangwendeza MP, Mandisodza A, Siziya S. Haematology reference values for healthy elderly blacks residing in Harare, Zimbabwe. Cent Afr J Med 2000 May;46(5):120-3
22. Blain H, Lerouge S, Blain A, Lacomski D, Virion JM, Humbert JC, Jeandel C. Determination by flow cytometry of reference values of erythrocyte parameters in aged subjects. Presse Med 2001 Apr 28;30(16):779-84