

DİLATE KARDİOMİYOPATİLİ HASTALARDA PLAZMA TOTAL ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ

Gamze TOPUZOĞLU¹, Gülsevim SAYDAM¹, Ali Rıza ERBAY², Doğan YÜCEL³, Emine KÜTÜK³

PLAZMA TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

Summary: Antioxidant defence mechanisms have developed in human body against damaging effects of reactive oxygen species. There is a balance between reactive oxygen species and antioxidant defence systems in healthy individuals. An increase in reactive oxygen species or a decrease in antioxidants causes oxidative stress. Myocardial dysfunction and fatal ventricular arrhythmias are proposed to occur due to membrane changes caused by oxidative stress. It is claimed that influence of reactive oxygen species on membrane lipids and proteins causes insufficient myocardial contraction. As plasma antioxidants play a protective role against free radical damage as a whole rather than a single agent, measurement of plasma total antioxidant activity has gained importance in different diseases. In our study in order to evaluate the role of antioxidants in dilated cardiomyopathy plasma total antioxidant activities were measured in 23 patients with dilated cardiomyopathy ages between 17-71, 6 female and 17 male, 9 patients with ischemic origin and 14 patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and 60 healthy subjects as a control group ages between 27-75, 32 female and 28 male. In patients group, mean total antioxidant activity value was 2.80 ± 0.185 mmol/l versus 2.90 ± 0.225 mmol/l in the control group ($p < 0.05$). Decrease of plasma total antioxidant activity with patients dilated cardiomyopathy can be an indicator of oxidative stress and as a result it is thought that antioxidant therapy would be beneficial in these patients.

Key Words: Total antioxidant activity, oxidative stress, dilated cardiomyopathy

Özet: Organizmada oluşan reaktif oksijen türlerinin hasar oluşturucu etkilerine karşı, antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Sağlıklı bireylerde oluşan reaktif oksijen türleriyle, antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin reaktif oksijen türlerinin artması ya da antioksidanların azalması sonucu bozulması, oksidatif stresin açığa çıkmasına yol açar. Dilate kardiyomiyopati (KMP) hastalarda bozulmuş miyokardiyal fonksiyonun ve ölümcül ventriküler aritmilerin artmış oksidatif strese bağlı membran değişikliklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Artan oranda reaktif oksijen türlerinin, membran lipitleri yada proteinleriyle etkileşiminin, miyokardiyal kasılmada yetersizliğe yol açabileceği belirtilmektedir. Plazmada bulunan antioksidanlar, serbest radikal hasarına karşı organizmayı savunmada in vivo olarak birlikte etki gösterdiklerinden çeşitli hastalık süreçlerinde antioksidanların rolünü değerlendirmek amacıyla plazmanın total antioksidan aktivitesinin ölçümü önem kazanmıştır. Çalışmamızda 17-71 yaşları arasında; 17'si erkek, 6'sı kadın; 9'u iskemik ve 14'ü idiyomatik dilate KMP'li 23 hastada ve kontrol grubu olarak 27-75 yaşları arasında 32'si kadın, 28'i erkek 60 sağlıklı kişide, dilate KMP'li hastalarda antioksidanların rolünü değerlendirmek amacıyla plazmanın total antioksidan aktivitesinin ölçümü yapıldı. Ortalama total antioksidan aktivite değerleri hasta grubunda 2.80 ± 0.185 mmol/l, kontrol grubunda ise 2.90 ± 0.225 mmol/l olarak saptandı ($p < 0.05$). Dilate KMP'li hastalarda plazma total antioksidan aktivitesinde gözlenen azalmanın oksidatif stresin göstergesi olduğu ve bu hastalarda antioksidan tedavinin faydalı olabileceği görüşüne varıldı.

Anahtar Kelimeler: Total antioksidan aktivite, oksidatif stres, dilate kardiyomiyopati

¹ Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Ankara

² Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, Ankara

³ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Ankara



GİRİŞ

Aerobik organizmalarda moleküler oksijenin varlığı ve bunun elektron alma eğiliminden dolayı, reaktif oksijen türleri hücrelerde sürekli oluşmaktadır (1). Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen reaktif oksijen türleri protein, lipid, nükleik asit gibi önemli hücresel bileşenlerle reaksiyona girebilme özelliğindedir (2). Reaktif oksijen türlerinin yaşlanmayla ve ayrıca bir çok hastalıkla ilişkili olabileceği saptanmıştır (2,3,4,5).

Organizmada reaktif oksijen türlerinin hasar oluşturucu etkilerine karşı antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Normal koşullarda bu toksik türlerin hasar oluşturucu etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir (6). Plazmadaki antioksidanlar iki gruba ayrılabilir; birincisi plazmanın sıvı fazında bulunan suda çözünebilir antioksidanlardır, ikincisi ise plazma lipoproteinlerinde yer alan yağda çözünen antioksidanlardır. Suda çözünen antioksidanlar askorbik asit, tirik asit, protein tiyoller ve bilirubini içermektedir. Yağda çözünen antioksidanlar arasında tokoferoller ve β -karoten yer alır. Plazmada aynı zamanda düşük düzeyde hücrelerin temel antioksidanı olan glutatyon da bulunmaktadır. Ayrıca plazmada seruloplazmin ve transferrin gibi metal taşıyıcısı 'önleyici antioksidanlar' ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler de antioksidan etki sergiler (7,8,9). Bu antioksidanlar in vivo olarak serbest radikal hasarına karşı organizmayı savunmada tek bir antioksidanın sağladığından daha fazla koruma sağlayacak şekilde birlikte etki gösterirler. Bununla birlikte biyolojik sıvı ya da dokuların total antioksidan kapasitesine bu antioksidanların her birinin tek tek katkıları henüz tam olarak bilinmemektedir (7,10).

Kardiyomiyopati (KMP) terimi, belirti ve bulguların hepsinin ya da çoğunun miyokard işlev bozukluğundan kaynaklandığı tüm kalp hastalıkları için kullanılmaktadır (11). Miyokard fonksiyonun

bozulmasının ve iskemi-reperfüzyon sonrası doku nekrozunun patogeneğinde meydana gelen hasarın subsellüler temelinin açıklanan farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalar, oksijen türevi serbest radikallerin de bu hasar sürecinde geri dönüşümsüz hücre hasarının ortaya çıkmasında önemli rol alabileceğini göstermiştir (12,13,14,15). Dilate KMP'li hastalarda bozulmuş miyokardiyal fonksiyonun ve ölümcül ventriküler aritmilerin, artmış oksidatif hasara bağlı membran değişikliklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (15,16).

Çalışmamız dilate KMP'li hastalarda plazma total antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grubu: Çalışmamız Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi Kardiyoloji Kliniğinde yatırılarak izlenen; klinik bulguları ve iki yönlü ekokardiyografi ile dilate KMP tanısı konulan 23 hastada yapıldı. Hastaların hiçbirinde hipertansif, romatizmal, konjenital, infeksiyöz veya perikardiyal hastalıklara, valvuler kalp hastalığına, mitral kapak prolapsusuna veya hipertrofik KMP'ye rastlanmadı. Hastaların anamnezleri alındı ve fizik muayeneleri, rutin radyolojik tetkikleri (teleradyografi), biyokimyasal (serumda glukoz, üre, kreatinin, kalsiyum, inorganik fosfor, serbest T3, serbest T4, tropin, demir ve demir bağlama kapasiteleri, ferritin) ve hematolojik (hemogram, eritrosit sedimentasyon hızı) testleri yapıldı. Tüm hastaların çalışma öncesi koroner anjiyografileri yapıldı. İskemik dilate KMP'li hastaların epikardiyal koroner arterlerinde %70'den fazla tıkanma saptandı. İdiopatik dilate KMP'li hastaların koroner anjiyografileri normal olarak değerlendirildi. İdiopatik KMP'li hasta grubunda altta yatan bir neden (alkol veya ilaç suistimali, sitotoksik ilaçlar, viral infeksiyon, astma veya atopik hastalıklar, hemakromatozis, sarkoidozis, akut veya kronik miyokardit) saptanmadı. Hastaların fonksiyonel kapasiteleri New York Kalp Cemiyeti

Sınıflandırmasına göre Clas III ve IV olarak değerlendirildi. Bu hastaların sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonları (EF) ortalama %30 bulundu. Hastaların tümü dijital, diüretik, anjiyotensin-konverting enzim inhibitörü ve nitrat kullanmaktaydı. Kalsiyum antagonisti, captopril ve etacrinic asit gibi -SH içeren ilaç kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubu olarak herhangi bir hastalığı olmayan, sigara içmeyen 60 sağlıklı kişi seçildi. Hasta ve kontrol grubuna alınan kişilerin vitamin preparatı kullanmamasına dikkat edildi.

Kan Örnekleri: Çalışma kapsamına alınan kişilerin kan örnekleri 8 ml'lik vacutainer normal ve 4.5 ml K3 EDTA'lı vacutainer tüplere alındı. EDTA'lı kanlar hemen 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Serumlar ise örneklerin pıhtılaşması beklendikten sonra 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Hastaların plazma örneklerinde total antioksidan aktivite ölçüldü. Serum örneklerinde ise total protein, albumin, magnezyum, kalsiyum, ürik asit, total bilirubin ölçümleri yapıldı.

Örneklerin ölçümleri Hitachi 911 otoanalizöründe yapıldı.

Kullanılan malzeme: Plazma antioksidan ölçümleri için metmiyoglobulin Sigma firmasından (St. Louis, MO), 2,2'-azinobis-(3-etilxbenzotiazolin-6sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) Aldrich firmasından (Milwaukee, WI), Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) Aldrich firmasından H₂O₂ ve potasyum ferrisiyanid BDH firmasından (Poole UK) sağlandı. Metmiyoglobinin kullanımdan önce saflaştırılması için Sigma firmasından sağlanan Sephadex-G-15-120 (40-120µm) ve 2x35 cm boyutlarında kolon kullanıldı. pH 7.4, izotonik fosfat tampon solüsyonunun (PBS) hazırlanması için Na₂HPO₄12H₂O, NaH₂PO₄2H₂O ve NaCl Merck firmasından sağlandı. Albumin, total protein, ürik asit, total bilirubin ölçümleri için Boehringer- Mannheim firmasının kitleri kullanıldı. Yöntemlerin presizyonunun ve sağlamlasının (recovery) saptanması için Biorad firmasının (Bio-

Rad Lab., Anaheim USA) liyofilize kontrol serumları kullanıldı.

Yöntem

Ayıracıların hazırlanması: Troloks (2,5 mM, molekül ağırlığı:250,29); 0,015641 gram troloksun 25 ml PBS'de çözünmesiyle hazırlandı.

H₂O₂ çalışma çözeltileri hazırlanması (H₂O₂; %30'luk, özgül ağırlığı 1.10, molekül ağırlığı 34) Önce 500 mM'lık başlangıç dilüsyonu , 515 µl H₂O₂'nin 10 ml PBS'ye eklenmesiyle yapıldı (solüsyon A). H₂O₂'nin 1.08 mM'lık çalışma çözeltisi solüsyon A'nın 10 ml PBS ile dilüsyonuyla hazırlandı.

ABTS'nin hazırlanması (1.5 mM, molekül ağırlığı 548.68). 8.23 mg ABTS, metmiyoglobininle birlikte toplam hacim 10 ml olacak şekilde PBS'de çözüldü.

Metmiyoglobinin hazırlanması, metmiyoglobinin kullanılmadan önce saflaştırıldı. pH 7.4 olan 5 mM PBS ile hazırlanan 400 µM metmiyoglobinin solüsyonu eşit hacimde taze hazırlanmış 740 µM potasyum ferrisiyanid ile karıştırıldı. Bu karışım tamponla dengelenmiş G-15-120 Sephadex kolondan geçirildi. Miyoglobinin farklı formlarının rölatif oranlarının hesaplanmasında Whitburn denklemleri kullanıldı (9,17).

Plazma total antioksidan aktivite ölçüm yöntemi: Plazma total antioksidan aktivite ölçümü için Miller ve arkadaşlarının yaptığı çalışma Hitachi 911 otoanalizörüne uyarlanmıştır. Yöntem ABTS'nin radikal katyonu ABTS^{o+}'nin antioksidanlar tarafından temizlenmesine dayanmaktadır. ABTS^{o+} metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu sonucu oluşan ferril miyoglobinin radikal türlerinin ABTS ile etkileşimi sonucu oluşur. ABTS^{o+} 600 nm'de ölçülebilen kararlı, mavi yeşil bir renge sahiptir. Ortama eklenen örnekteki antioksidanlar bu radikalin, dolayısıyla bu rengin oluşumunu baskılar. Yöntemde, ölçüm sırasında izlediğimiz yol, sabit zamanlı inhibisyon ölçümüdür. Bunda ABTS,



miyogloblin ve örnek karıştırıldıktan sonra reaksiyon H_2O_2 'nin ortama eklenmesi ile başlatılır. Belirli zaman aralığından sonra çözeltinin ve körün absorbansı okunur. Kör absorbansı plazma içeren çözeltinininkinden yüksek olacaktır. Sabit koşullar altında örneğin antioksidan kapasitesi 600 nm'deki test absorbansı ile ters orantılıdır. Yöntemin standardizasyonu suda çözünebilir E vitamini analogu Troloks kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm ünitesi olarak troloks ekivaleni antioksidan kapasite (TEAC) mmol/l kullanılmıştır. TEAC mmol/l olarak çözeltideki antioksidan maddenin kapasitesine eşit olan troloks konsantrasyonu şeklinde tanımlanmaktadır (9).

Plazma total antioksidan aktivite ölçüm yöntemi için normal ve patolojik düzeylerdeki örneklerle gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapıldı. Gün içi kesinlik için, aynı günde aynı örnekten 23 ölçüm yapıldı. Günler arası kesinlik için, her gün bir kontrol serumu çalışıldı. Normal düzeyler için Bio-Rad kontrol serumları patolojik düzeyler için troloks eklenerek konsantrasyonu artırılmış serum havuzu kullanıldı.

Plazma total antioksidan aktivite ölçüm yönteminin sağlama çalışmalarında hazırlanan serum havuzundan alınan örneklerle belirli oranlarda troloks eklendi, her bir örnek üç kez çalışıldı ve bu üç değerlerin ortalaması kullanıldı.

Plazma total antioksidan aktivite ölçüm yönteminin alt ölçüm sınırınının saptanması için, 4 mM'lık troloks 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranında seyreltilerek okumaları üç kez yapıldı ve ortalamaları kullanıldı.

Yöntemin lineeritesini saptamak için, sağlama ve alt ölçüm sınırı belirleme çalışmalarından elde edilen değerler kullanıldı. Parametreler arasındaki korelasyon araştırması için tüm hasta ve kontrol grubu verileri kullanıldı (n=81).

Albumin ölçümü Bromocresol Green metodu, kalsiyum ölçümü o-cresolphthalein complexone

metodu, AST, ALT ve üre ölçümü kinetik uv metod, ürik asit, kreatinin, trigliserit ve kolesterol ölçümü enzimatik kolorimetrik metod, total protein ölçümü Biüret reaksiyonu, total bilirubin ölçümü DPD (3,5 dichlorophenyl diazonium-tetrafluoroborate) metodu, magnezyum ölçümü Calmagite yöntemi, glukoz ölçümü Hekzokinaz metodu kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel hesaplamalar 'SPSS for Windows' istatistik programı kullanılarak yapıldı. Grup karşılaştırmalarında bağımsız Student t testi kullanıldı. Parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirildi.

BULGULAR

Hasta grubunu oluşturan 23 dilate KMP'li hastanın 17'si erkek, 6'sı kadındı ve yaşları 17-71 arasında değişmekteydi. Bu hastaların sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonları ortalama %30 bulundu. İskemik dilate KMP grubunda 9 hasta yer almaktaydı ve bir ya da daha fazla koroner arterde %70 ve daha fazla darlık saptandı. İdyopatik dilate KMP'li 14 hastada ise dilate KMP'ye neden olabilecek altta yatan herhangi bir neden (alkol, ilaç, viral infeksiyon, akut ya da kronik myokardit, sarkoidoz vb.) saptanmadı. Kontrol grubunda 27-75 yaş arası 32 kadın ve 28 erkek olmak üzere 60 kişi oluşturdu.

Ortalama total antioksidan değerleri hasta grubunda 2.80 ± 0.185 mmol/L, kontrol grubunda 2.90 ± 0.225 mmol/L saptandı, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Kontrol ve hasta gruplarına ait total protein, albumin, ürik asit, total bilirubin, kalsiyum, magnezyum değerlerinin ortalamaları Tablo 1'de yer almaktadır. Kontrol ve hasta grupları arasında total protein, albumin, ürik asit, total bilirubin, magnezyum değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0.005$), kalsiyum değerleri anlamlı fark göstermemiştir ($p > 0.005$).

Tablo 1: Kontrol ve hasta gruplarına ait ortalama total protein, albumin, ürik asit, total bilirubin, kalsiyum, magnezyum, total antioksidan aktivite değerleri

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Total protein (g/dl)	7.0±0.49	7.77±0.63
Albumin (g/dl)	4.06±0.63	4.65±0.54
Ürik asit (mg/dl)	7.12±1.86	5.80±1.01
Bilirubin (mg/dl)	0.97±0.58	0.59±0.23
Magnezyum (mmol/l)	0.68±0.20	0.71±0.08
Kalsiyum (mmol/l)	2.29±0.14	2.31±0.15
Total Antioksidan Aktivite (mmol/l)	2.80±0.185	2.90±0.225

TARTIŞMA

Aerobik organizmalarda moleküler oksijenin varlığı ve bunun elektron alma eğiliminden dolayı, reaktif oksijen türleri hücrelerde sürekli oluşurlar ve hücrel serbest radikal reaksiyonlarına aracılık ederler (1). Sağlıklı bireylerde reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengede oksidanlar lehine olan bir bozulma, oksidatif stres olarak adlandırılan hasar oluşumuna öncülük eder (2, 5). Birçok hücre hafif bir oksidatif stresle, antioksidan savunma sisteminde artış sağlayarak başa çıkabilir. Bununla birlikte şiddetli oksidatif stres durumunda hücre metabolizmasında önemli değişiklikler olur, hücrel yapılar ve moleküller, özellikle DNA, proteinler ve lipidler hasara uğrar (2).

Dilate KMP'li hastalarda bozulmuş miyokardiyal fonksiyonun ve ölümcül ventriküler aritmilerin, artmış oksidatif hasara bağlı membran değişikliklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (15,16). Miyokardiyal kasılma gücünün zayıflamasında önemli bir etkenin protein ya da sülfidril (-SH) gruplarının oksidasyonu olabileceği belirtilmiştir (15, 18). Ayrıca Kako ve arkadaşları -SH gruplarının oksidasyonunun plazma membranlarının Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesini de bozduğunu gözlemişlerdir (19). Tüm bu değişikliklerin hücre içi kalsiyum düzeyinde artışla sonuçlanacağı ve dilate KMP'de kasılma

bozukluğuna, ventriküler aritmilerin oluşum mekanizmasına katılabileceği ileri sürülmüştür (15).

Yücel ve arkadaşları idyopatik ve dilate KMP'li hastalarda oksidatif hasarı incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, hasta eritrositlerindeki GSH, -SH ve SOD değerlerini kontrol grubuna göre düşük bulmuşlardır. Ayrıca TBARS ölçümleriyle eritrosit membran lipidlerinin peroksidasyona duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artışın, membran lipidleri ya da proteinlerle etkileşim sonucu miyokardiyal kasılmayı bozabileceği belirtilmiştir. Ayrıca dilate KMP'li hastaların eritrositlerindeki antioksidan savunmanın zayıf olduğu gözlenmiştir (15). Lefnesky ve arkadaşları ise miyokardiyal -SH bileşiklerinin iskemi-reperfüzyon sırasında azaldığını göstermişlerdir ve eksojen -SH grubu uygulamasının -SH bileşiklerinin oksidasyonunu azaltarak, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarını hafifletebileceğini ileri sürmüşlerdir (20). McMurray ve arkadaşları kalp yetmezliğinde MDA konsantrasyonlarında artış ve protein -SH gruplarında azalma gözlemişlerdir (21,22).

Dilate KMP'li hastaların miyokardiyal yüksek enerjili fosfat metabolitlerinde de azalma saptanmıştır (23). O'Brien, yaptığı çalışmada dilate KMP'li dobermanlarda ATP'nin oksidatif üretiminin bozulduğunu gözlemlemiştir (24).

Vücuttaki biyolojik öneme sahip moleküllerin ve hücrel yapıların oksidatif hasara karşı korunabilmesi için, hücre içi ve hücre dışı savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Organizmadaki antioksidanlar aracılığıyla reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma, oluşumlarını engelleme aşamasında gerçekleşir. Bundan sonraki aşama, hasar oluşturucu etken oluşmuşsa onu durdurmaktır. Bu iki aşama yeterince koruyucu olmazsa hasar oluşur (25,26).

Albumin yapısında taşıdığı -SH grupları sayesinde plazmada antioksidan özelliğe sahip bir proteindir. Albumin yapısında bakır iyonlarının bağlanabileceği bölgeler içerdiğinden, bakır



iyonlarının °OH oluşturmaya engel olur, dolayısıyla lipid peroksidasyonunu önler (27, 28, 29).

Lewis ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları çalışmada koroner kalp hastalığı riski ve serum albumin düzeyleri arasında negatif bir ilişki bulmuşlardır. Bu ilişkinin, total serum kolesterolü ya da LDL kolesterol, HDL kolesterol, kan basıncı, sigara gibi diğer risk faktörleri kadar önemli olabileceğini öne sürmüşlerdir (30).

Biz de yaptığımız çalışmada dilate KMP'li hasta ve kontrol gruplarının serum albumin düzeylerini ölçtük ve dilate KMP'li hasta grubunun albumin düzeyini kontrol grubuna göre düşük bulduk.

İnsan plazmasında bulunan bir diğer önemli antioksidan bileşen bilirubindir. Stocker ve arkadaşları in vitro yaptıkları deneylerde, mikromolar konsantrasyonlardaki bilirubinin deneysel olarak oluşturulan peroksil radikallerini etkin biçimde temizlediğini saptamışlardır (31,32). Wu ve arkadaşları albumin bağlı bilirubinin (özellikle delta bilirubin) ve biliverdinin rat hepatositleri ve insan eritrositlerini oksiradikal hasarına karşı koruduğunu bulmuşlardır (32, 33). Yine aynı araştırmacılar delta bilirubinin insan ventriküler miyositlerini oksiradikal hasara karşı vitamin E ve vitamin C gibi antioksidanlardan daha güçlü bir şekilde koruduğunu göstermişlerdir (32,34,35). Çalışmamızda dilate KMP'li hasta grubunun bilirubin düzeyi ortalamasını kontrol grubuna göre daha yüksek bulduk.

Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asidin de C vitamini gibi antioksidan özelliğe sahip olduğu 1970 yılında ortaya atılmıştır (35). İn vitro çalışmalarda ürik asidin eritrositleri singlet oksijen hasarına karşı koruduğu, lipid peroksidasyonunu durdurduğu, hemoglobinin nitritle oksidasyonunu azalttığı, hyalüronik asidin oksidatif yıkımını engellediği, demir ve bakır iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlediği gösterilmiştir (28, 36,37,38). Ayrıca ürik asidin mikrovasküler endoteliumdan ve insan miyokardından salındığı

gözlenmiştir. İzole organ çalışmalarında hücreleri aktive granülositlerce indüklenen reperfüzyon hasarına karşı koruduğu belirtilmektedir (38). Çalışmamızda dilate KMP'li grubun ürik asit düzeylerinin ortalaması kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

Plazmada bulunan antioksidanlar serbest radikal hasarına karşı organizmayı savunmada tek bir antioksidanın sağladığından daha fazla koruma sağlamak amacıyla in vivo olarak birlikte etki gösterirler. Wayner ve arkadaşlarının geliştirdikleri TRAP yöntemine göre ürat 58 ± 18 , plazma proteinleri 21 ± 10 , askorbat 14 ± 8 , E vitamini 7 ± 2 oranında total antioksidan aktiviteye katkıda bulunmaktadır (7). Miller ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada E vitamini analogu troloks'u standart olarak kullanmışlar ve her bir plazma antioksidanı için troloks ekivaleni antioksidan kapasiteyi (TEAC) saptamışlardır. Buna göre ürat, askorbat ve α -tokoferolün antioksidan kapasitesi troloksa eşit bulunmuş, bilirubinin troloksdan daha aktif, albuminin ise daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Ancak albuminin plazma konsantrasyonu yüksek olduğundan antioksidan savunmada ilk sırayı alır (9).

Kristenson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada koroner arter hastalığına bağlı yüksek ölüm oranının sadece geleneksel risk faktörleriyle ilişkili olmadığını, antioksidan savunma ile ilişkili mekanizmaların önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir (39).

Çalışmamızda Miller ve arkadaşlarının yöntemine dayanan total antioksidan aktivite ölçümünü uyguladık. Dilate KMP'li hasta grubunda plazma total antioksidan aktivitesi ortalamasını kontrol grubuna göre düşük bulduk. Çalışmamızda ayrıca hasta ve kontrol gruplarının serum magnezyum, kalsiyum, total protein düzeyleri de ölçüldü. Hasta grubunun serum magnezyum ve total protein değerleri kontrol grubuna göre daha düşük saptandı, ancak hasta ve kontrol gruplarının serum kalsiyum

düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Çalışmamızda plazma total antioksidan aktivitesiyle ürik asit ve bilirubin arasındaki korelasyonu anlamlı bulduk (sırasıyla $r=0.392$; $p=0.000$ ve $r=0.205$; $p=0.037$), ancak plazma total antioksidan aktivitesiyle total protein, albumin, kalsiyum, magnezyum değerleri arasında korelasyonda anlam saptanamadı.

Çalışmamızda total antioksidan aktivite kapsamında yer alan ürik asit ve bilirubin değerleri, hasta grubunda yüksek bulunmuş; buna rağmen total antioksidan kapasite hasta grubunda düşük bulunmuştur. Bu sonuç ürik asit ve bilirubin yüksekliğinin KMP'li hastalarda genel bir bulgu olmakla birlikte total antioksidan kapasite ölçümlerinde belirleyici olmadığını göstermektedir. Hasta grubunda bu parametrelerdeki yüksekliğe rağmen total antioksidan kapasitedeki düşüklük albumine ek olarak C ve E vitamini düzeylerinin de bu açıdan önemli olduğunu ve aynı zamanda dilate KMP'li hastalarda antioksidan açığın görüldüğünden çok daha fazla olabileceğini kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak dilate KMP'li hastalarda plazma total antioksidan aktivitesinde gözlenen azalma, artan oksidatif stresin göstergesidir ve bu hastalarda antioksidan tedavinin uygulanması yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Freeman BA, Crapo JD. (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-7
2. Halliwell B. (1993) The role of oxygen radicals in human diseases with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23 (suppl. 1), 118-26
3. Athar M, Abdulla M, Sultana S, Favier A, Pero R. (1993) Free radicals and trace elements. *J Trace EL Exp Med* 6, 67-73
4. Bast A, Haenen GRM, Declan CJA. (1991) Oxidants and antioxidants. State of the art. *Am J Med* 91 (suppl. 3C), 2S-13S
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85
6. Woo J, Leung SSF, Lam CWK, Ho CS, Lam TH, Janus ED. (1997) Plasma total antioxidant capacity in an adult Hong Kong Chinese population. *Clin Biochem* 30, 553-57
7. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924, 408-19
8. Motchnik PA, Frei B, Amez NB. (1991) Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol* 234, 269-79
9. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in preterm neonate. *Clin Sci* 84, 407-12
10. Mullholland CW, Strain J. (1990) Total peroxyl radical trapping ability of serum: Relation to secondary antioxidant concentrations. *Biochem Soc Trans* 18, 1169-1170
11. Robins and Kumar. (1989) *Cardiomyopathy*. Robbins Pathologic Basis of Diseases, 4th edition. WB Saunders CO Philadelphia, 643-648
12. Dhaliwal H, Kirshenbaum LA, Randhava AK, Singal PK. (1991) Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am Physiol Soc* H632-H638
13. J Mc Cord. (1990) Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312, 159-63
14. Burrell CJ, Blake DR. (1989) Reactive oxygen metabolites and the human myocardium. *B Heart J* 61, 4-8
15. Yücel D, Aydoğdu S, Çehrelı S, Saydam G, Canatan H, Şeneş M, Topkaya BÇ, Nebioğlu S. (1998) Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 44, 148-54
16. Kukreja RC, Hess ML. (1992) The oxygen free radical system: From equations through membran protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 62, 641-55
17. Evans CR, Miller NJ. (1991) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234, 279-93
18. Kong Y, Lesnefsky JE, Ye J, Horwitz LD. (1994) Prevention of lipid peroxidation does not prevent oxidant-induced myocardial contractile dysfunction. *Am Physiol Soc* H2371-H2377
19. Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. (1988) Depression of membrane-bound Na^+K^+ -ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am Physiol Soc* C330-C337
20. Lenefsky JE, Dauber IM, Laurance DH. (1991) Myocardial sulfhydryl pool alterations occur during



- reperfusion after brief and prolonged myocardial ischemia in vivo. *Circulation Res* 68, 605-13
21. Chopra M, Mc Murray J, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. (1993) Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 14, 1493-1498
 22. Mc Murray J, Mc Lay J, Chopra M, Bridges A, Beld JF. (1990) Evidence for enhanced free radical activity in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 65, 1261-2
 23. Hardy JC, Weiss GR, Bottonly PA, Gerstenblith G. (1991) Altered myocardial high energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 122, 795-801
 24. O'Brien PJ. (1997) Deficiencies of myocardial troponin T and creatine kinase MB isoenzyme in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 58, 11-6
 25. Whitehead TP, Robinson D, Allavay S, Syms J, Ann H. (1995) Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* 41,32-5
 26. Sies H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213-19
 27. Rowley DA, Halliwell B. (1983) Superoxide-Dependent and ascorbate- dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: A physiologically significant reaction? *Arch Biochem Biophys* 225, 279-84
 28. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990) The antioxidant of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8
 29. Halliwell B. (1988) Albumin-an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 37, 569-71
 30. Kuller LH, Eichner JE, Orclard TJ, Grandits GA, Mc Callum L, Tracy RP. (1991) The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the multiple risk factor intervention trial. *Am J Epidemiol* 134, 1266-77
 31. Stocker R, Mc Donagh FA, Glazer AN, Bruce AN. (1990) Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* 186, 301-9
 32. Wu TW. (1994) Is bilirubin a risk factor for coronary artery disease? *Clin Chem* 40, 9-10
 33. Wu TW, Carey D, Wu J, Suyigama H. (1991) The cytoprotective effects of bilirubin and biliverdin on rat hepatocytes and human erythrocytes and impact of albumin. *Biochem Cell Biol* 69, 828-34
 34. Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D, Carey D. (1991) Albumin bound bilirubin protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 69, 683-9
 35. Procter P. (1970) Similar functions of uric acid and ascorbate in man. *Nature* 228, 868
 36. Aruoma OI, Halliwell B. (1989) Inactivation of α 1 antiproteinase by hydroxyl radicals, the effect of uric acid. *FEBS Lett* 244, 76-80
 37. Maples KR, Mason RP. (1988) Free radical metabolit of uric acid. *J Biol Chem* 263, 1709-12
 38. Becker BF. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14, 615-31
 39. Kristenson M, Zieden B, Kucinskine Z, Elinder LS, Bergdahl B, Elwing B, Aboravicius A, Razinkoviene L, Calkauskas H, Olsson GA. (1997) Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Sweedish men: concomittant cross sectional study of men aged 50. *BMJ* 314, 629-633