

HİPERTİROİDİ HASTALARINDA PLAZMA OKSİDATİF PROTEİN HASARI

Ufuk ÇAKATAY*, Neşe ÖZBEY**, Tülay AKÇAY***, Refik KAYALI***,
Ayşegül TELCİ*, Ahmet SİVAS*

ÖZET

Proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel olaylar proteinlerin oksidatif modifikasyonundan etkilenir. Hipertiroidizmde oksidatif stresin arttığı bildirilmektedir. Hipertiroidi hastalarında oksidatif protein hasarını plazma proteinlerinde araştırmak amacı ile, 20 hipertiroidi hastası ve 20 ötiroid kontrolde kolorimetrik yöntemlerle plazma oksidatif protein hasar parametrelerini inceledik. Hipertiroidi hastalarının plazma protein karbonil düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Diğer taraftan, hipertiroidi hastaları ile kontrol grubu arasında protein tiol, total tiol, nonprotein tiol, doymamış demir bağlama kapasitesi düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Hipertiroidi hastalarının plazma lipid hidroperoksid düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek, eritrosit glutasyon düzeyleri ise anlamlı derecede düşüktü. Sonuç olarak, hipertiroidi hastalarında plazma oksidatif protein hasarının artmış olduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Oksidatif protein hasarı, protein karbonil, protein tiol, hipertiroidizm

SUMMARY

Plasma oxidative protein damage in hyperthyroid patients. Various cellular processes in which proteins take part are affected by oxidative modifications. Oxidative stress has been reported to be increased in hyperthyroidism. We determined plasma oxidative protein damage parameters by colorimetric methods in 20 hyperthyroid patients and in 20 euthyroid controls in order to investigate oxidative protein damage in plasma proteins in hyperthyroidism. Plasma protein carbonyl levels of hyperthyroid patients were significantly increased compared to the controls. On the other hand, plasma protein thiol, total thiol, nonprotein thiol, unsaturated iron binding capacity levels of hyperthyroid patients were not significantly different from those of the controls. In hyperthyroid patients, plasma lipid hydroperoxide levels were significantly increased, and erythrocyte glutathione levels were significantly decreased compared to the control group. In conclusion, we found that plasma oxidative protein damage was increased in hyperthyroid patients.

Key words: Oxidative protein damage, protein carbonyl, protein thiol, hyperthyroidism

GİRİŞ

Oksidatif protein hasarı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmiş ve geniş araştırmalara konu olmuştur. Proteinlerin reaktif oksijen türevlerince modifikasyonu bir dizi hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişinde rol oynamaktadır (2,7,13,16). Bu reaktif türevler çok sayıda fizyolojik olan ve olmayan reaksiyondan kökenini alabilir (2,7). Reaktif oksijen türevlerinin oluşumundaki artış veya antioksidan tutucu kapasitesindeki azalma proteinler dahil

hücrel moleküllerin oksidatif modifikasyonuna yol açmaktadır (18). Oksidatif olarak modifikasyona uğramış proteinlerin büyük bir kısmı onarıma uğramadan proteolitik degradasyon ile uzaklaştırılır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin sinyal transdüksiyon mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücrel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir (2,7,10,12,14).

Mecmuaya geldiği tarih: 22.01.2001

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı, Çapa, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalı, Çapa, İstanbul

*** İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil (PCO) düzeylerinde artış^(2,7,10,12,14) ve protein tiol^(5,9,16) düzeylerinde azalma ile karakterizedir. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi ile histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinde ve/veya peptit omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PCO ürünleri meydana gelir^(2,7,10,12). PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir⁽¹²⁾. Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiol (P-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur^(5,9,16). P-SH antioksidan fonksiyonunu peroksidasyonu başlatan oksidanları tutarak gösterir. Böylelikle vitamin E ve/veya lipitler oksidatif ataktan korunur⁽¹⁶⁾.

Amacımız plazmada, PCO oluşumu ve P-SH kaybı ile karakterize olan oksidatif protein hasarının, hipertiroididen nasıl etkilendiğini ve diğer oksidatif stres parametreleriyle ilişkisini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalında hipertiroidi tanısı konulmuş ve henüz ilaç tedavisi altına alınmamış hastalar ile bu hastaların yaş grubuna uyan ötiroid sağlıklı kişilerden alınan venöz kan örnekleri kullanıldı. Venöz kan örnekleri sabah 8.00-9.00 saatleri arasında, heparinli, kuru ve EDTA'lı vakumlu tüplere alındı. Çalışmaya alınan bireylerin aç olmalarına ve herhangi bir interferansa neden olabilecek antioksidan madde kullanmamalarına dikkat edildi.

Ayrılan plazmalarda oksidatif protein hasarını saptamak amacıyla spektrofotometrik (Ultrospec 4050 LKB) olarak hemen PCO⁽¹²⁾, oksidatif stresi saptamak için ise total tiol (T-SH)⁽⁹⁾, non-protein tiol (NP-SH)⁽⁹⁾,

eritrosit glutatyon (GSH)⁽³⁾ ve lipit hidroperoksit (LHP) düzeyleri çalışıldı⁽¹¹⁾. Oksidatif protein hasarını saptamakta kullanılan P-SH düzeyleri, P-SH = T-SH - NP-SH formülünden yararlanılarak hesaplandı⁽⁹⁾. Peletlerdeki protein miktar belirtimi Folin-Lowry metoduna göre ticari kit ile (Sigma) yapıldı.

Hipertiroidi hastalarının serum T₃, T₄ ve TSH düzeyleri Immulite 2000 otoanalizöründe kemilüminesans yöntemiyle çalışıldı. Serum UIBC (doymamış demir bağlama kapasitesi), total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserit düzeyleri Hitachi 747 seçimli otoanalizöründe (Boehringer Mannheim) çalışıldı. LDL-kolesterol düzeylerinin hesaplanmasında Friedewald formülünden yararlanıldı⁽⁸⁾. Serum ApoA, ApoB ve Lp(a) düzeyleri türbidimetrik olarak (Behring) çalışıldı.

Bulgularımızın istatistiksel değerlendirilmesi, INSTAT istatistik programı ile Mann-Whitney U test'i ve Spearman korelasyonu kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlılık sınırı kabul edildi.

BULGULAR

Hipertiroidi hastalarının plazma PCO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0.001). Diğer taraftan, hipertiroidi hastaları ile kontrol grubu arasında T-SH, NP-SH, P-SH, UIBC düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Hipertiroidi hastalarının plazma LHP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek (p<0.05), eritrosit GSH düzeyleri ise anlamlı derecede düşüktü (p<0.001), (Tablo 2). Hipertiroid hasta grubunda yapılan Spearman korelasyon analizinde, PCO düzeyleri ile LHP düzeyleri arasında (r=0.24, p>0.05) ve PCO düzeyleri ile GSH düzeyleri arasında (r= 0.31, p>0.05) korelasyon saptanmadı.

Hipertiroidi hastalarının serum TSH düzeyleri 0.05 \pm 0.13 μ U/mL, T₃ ve T₄ düzeyleri

Tablo 1. Hipertiroidi hastaları ve kontrol grubunun genel özellikleri

	Hipertiroidi Hastaları (n=20)	Kontrol Grubu (n=20)
Yaş	43.6 ± 8	44.9 ± 9
Cins (erkek/kadın)	12/8	10/10
Total kolesterol (mg/dL)	179 ± 49	159 ± 31
HDL-kolesterol (mg/dL)	50 ± 20	42 ± 10
VLDL-kolesterol (mg/dL)	36 ± 23*	16 ± 6
LDL-kolesterol (mg/dL)	93 ± 41	101 ± 30
Trigliserit (mg/dL)	180 ± 154	82 ± 30
Apo A1 (mg/dL)	103 ± 16	102 ± 13
Apo B (mg/dL)	94 ± 16	89 ± 21
Lp(a) (mg/dL)	51 ± 15	49 ± 16

(*) $p < 0.05$ **Tablo 2.** Hipertiroidi hastaları ve kontrol grubunun oksidatif protein hasar ve oksidatif stres parametreleri (ortalama ± standart sapma).

	Hipertiroidi Hastaları (n=20)	Kontrol Grubu (n=20)
PCO (nmol / mg protein)	0.67 ± 0.07**	0.57 ± 0.05
P-SH (pmol / mg protein)	3.77 ± 0.78	3.83 ± 0.73
T-SH (µmol / L)	375 ± 45	394 ± 57
NP-SH (µmol / L)	86 ± 22	82 ± 21
LHP (µmol / L)	2.58 ± 0.70*	2.12 ± 0.72
GSH (mg / dL tam kan)	29.99 ± 4.53**	34.91 ± 3.85

PCO; Protein karbonil, P-SH; Protein tiol, T-SH; Total tiol, NP-SH; Non-protein tiol, LHP; Lipit hidroperoksit
 (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$

ise sırasıyla 3.98 ± 2.04 ng/mL, 17.89 ± 3.76 µg/dL olarak belirlendi. Hastaların PCO ile T_3 düzeyleri arasında ($r = 0.43$, $p < 0.05$) ve PCO ile T_4 düzeyleri (0.48 , $p < 0.05$) arasında anlamlı korelasyon saptandı. Diğer taraftan hipertiroid hastalarının PCO ile TSH (0.15 , $p > 0.05$) düzeyleri arasında korelasyon mevcut değildi.

Hipertiroidi hastaları ile kontrol grubunun serum ApoA, ApoB, Lp(a) düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Hipertiroidi hastalarının serum total kolesterol, HDL-ko-

lesterol, LDL-kolesterol, trigliserid düzeyleri kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı. Hastaların serum VLDL-kolesterol düzeyleri ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Hipertiroidi hastalarında (1,4,6,13) ve sıçanlarla yapılan deneysel hipertiroidi çalışmalarında (17) oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Adalı ve arkadaşları (1) hipertiroidi hastalarının plazma malondialdehit (MDA) düzeylerini kontrollere göre yüksek, eritrosit GSH düzeylerini ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük olarak saptamışlardır. Bianchi ve arkadaşları (4) ise hipertiroidi hastalarının plazmalarındaki tiobarbitürik asitle reaksiyonlaşan maddelerin (TBARS) konsantrasyonunda kontrollere göre anlamlı bir artış görüldüğünü bildirmişlerdir. Diğer taraftan Seven ve arkadaşları (13) hipertiroidi hastalarında TBARS ve eritrosit GSH düzeylerinin kontrollere göre yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Hipertiroidi hastalarında lipit peroksidasyon parametreleri olan MDA ve TBARS artışının yanı sıra, total ve LDL-kolesterol düzeylerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (15). Çalışmamızda hipertiroidi hastalarının plazma LHP düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir yükseklik saptadık. Diğer taraftan hastaların serum total ve LDL-kolesterol düzeyleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark yoktu. Hipertiroidi hastalarının LDL-kolesterol düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı olmasa da düşüktü.

Reaktif oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan, oksidatif protein hasarı sonucunda protein yapısında meydana gelen değişiklikler; agregasyon ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının değişikliğe uğraması olarak sıralanabilir. Bu değişiklikler

sonucunda proteolize yatkınlık ve normal fonksiyonda azalma meydana gelir (2,7,14). Tapia ve arkadaşları (17), T₃ verilerek hipertiroidi oluşturulmuş sıçanlarda karaciğer dokusunda protein oksidasyonu ve lipit peroksidasyonunun arttığını bildirmiştir. Diğer taraftan, literatürde hipertiroidi hastalarının plazmalarında oksidatif protein hasarını inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda hipertiroidi hastalarının plazma PCO düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptadık. Buna karşılık, hastaların plazma P-SH düzeyleri kontrol grubununkinden istatistiksel olarak farklı değildi.

Sonuç olarak hipertiroidi hastalarındaki lipit peroksidasyonunun yanı sıra plazma proteollerinin oksidatif hasarının da oksidatif strese etkili bir mekanizma olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Adalı M, İnal-Erden M, Akalın A, Efe B: Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clin Biochem* 32: 363 (1999).
2. Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313 (1997).
3. Beutler E, Duron O, Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882 (1963).
4. Bianchi G, Solaroli E, Zaccheroni V, Grossi G, Bargossi AM, Melchionda N, Marchesini G: Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Horm Metab Res* 31: 620 (1999).
5. Bourdon E, Loreau N, Blache D: Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB* 13: 233 (1999).
6. Costantini F, Pierdomenico SD, De Cesare D, De Remigis P, Bucciarelli T, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Nubile G, Guagnano MT, Sensi S, Cuccurullo F, Mezzetti A: Effect of thyroid function on LDL oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 732 (1998).
7. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324: 1 (1997).
8. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 449 (1972).
9. Hu ML: Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Method Enzymol* 233: 381 (1994).
10. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Schacter E: Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 233: 347 (1994).
11. Nourooz-Zadeh J: Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Method Enzymol* 300: 58-62 (1999).
12. Reznick AZ, Packer L: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol* 233: 357 (1994).
13. Seven A, Taşan E, Hatemi H, Burçak G: The impact of propylthiouracil therapy on lipid peroxidation and antioxidant status parameters in hyperthyroid patients. *Acta Med Okayama* 53: 27 (1999).
14. Stadtman ER, Levine RL: Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899: 191 (2000).
15. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HA, Falko JM: Both hypothyroidism and hyperthyroidism enhance low density lipoprotein oxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3421 (1997)
16. Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M: The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 285: 344 (1991).
17. Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA: Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 106: 209 (1999).
18. Usmar VD, Halliwell B: Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and vascular system. *Pharmaceutical Res* 13: 649 (1996).